



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

Professeur d'Université
Professeur d'Université
Directeur de recherche
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, les chromosomes de la cellule établissent une plaque métaphasique au centre du fuseau mitotique composée 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 ordonnée dans le noyau. Toute la complexité de la mitose est d'attacher chacune des chromatides au bon pôle afin d'exercer des forces sur ces derniers pour les positionner sur la plaque métaphasique au centre du fuseau avant leur séparation et migration vers les pôles durant l'anaphase.

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

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

La dynamique des chromosomes durant la mitose est aussi largement contrôlée par un grand nombre d'acteurs autres que les microtubules. Certains d'entre eux étant responsables de l'attachement MTs-kinétochore comme les complexes NDC80 et DAM1, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules comme la kinésine-8 et la kinésine-13.

Durant mon travail de thèse, j'ai étudié la dynamique des chromosomes en mitose chez la levure à fission qui a l'avantage de conserver les mécanismes primordiaux de la mitose avec les eucaryotes supérieurs. Deux mécanismes conservés au cours de l'évolution 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 oscillation 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 (*J. Cell Science*, in press). De plus, le processus d'alignement des chromosomes, encore mal compris, est en partie contrôlé par la kinésine-8 via une activité dépendante de la longueur des microtubules. Il semblerait donc que cette kinésine, soit capable de fournir une information spatiale le long du fuseau mitotique afin de positionner correctement les chromosomes. Enfin, j'ai utilisé un modèle mathématique de la ségrégation des chromosomes développé dans l'équipe précédemment afin de tester de manière quantitative les hypothèses de mécanisme du centrage des chromosomes par la kinésine-8.

L'ensemble de mon travail porte donc sur le contrôle du mouvement, de l'attachement et du positionnement des chromosomes durant la mitose afin de mieux comprendre les processus biophysiques associés à la mitose.

Summary

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

Chromatids are the indivisible units of genetic material during mitosis just like atoms in a molecule. Originally each of these « objects » is not attached and randomly located. All the complexity of mitosis resides in attaching each chromatids to the correct pole to be able to exert forces and to position them on the metaphasic plate at the center of the mitotic spindle before their separation and migration towards the poles in anaphase.

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

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

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

During my PhD, I studied fission yeast chromosome dynamic during mitosis. This cellular model has the advantage of sharing many fundamental mechanisms of symmetrically dividing higher eukaryotic cells. Two conserved mechanisms throughout evolution are chromosome alignment during metaphase and back and forth movement along the spindle, called chromosome oscillation. By analyzing chromosome trajectories, I showed that both processes are performed through independent mechanisms in fission yeast (J.Cell Sci. in press). Moreover chromosome alignment process, which is still poorly understood, is regulated by Kinesin-8 via a length dependent activity on microtubules. This suggests that Kinesin-8 is able to provide spatial information along the mitotic spindle to properly po-

sition chromosomes. Finally, I used a mathematical model of chromosome segregation in order to test quantitatively different hypotheses of chromosome centering process.

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

Remerciements

- jury
- sylvie et yannick
- céline
- guillaume
- jonathan
- équipe
- labo
- parents
- parents olivia
- amis
- olivia

Table des matières

Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des acronymes	xi
1 Introduction	1
1.1 La vie d'une cellule	3
1.2 La mitose : la dernière étape du cycle cellulaire	5
1.2.1 Les phases de la mitose	5
1.2.2 Le kinétochore	8
1.2.3 Les microtubules	9
1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrices des microtubules	11
1.2.5 L'ancrage du microtubule au kinétochore	13
1.2.6 Les différents types d'attachements	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 mouvement des chromosomes	18
1.3.3 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte	21
1.3.4 Le point de contrôle de la transition métaphase/anaphase	22
1.4 Modélisation mathématique de la mitose	23
1.4.1 Que signifie « modéliser un processus biologique » ?	24
1.4.2 L'assemblage du fuseau mitotique	25

1.4.3	La dynamique des chromosomes	28
1.5	La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cellulaire . .	33
1.6	Problématique	36
2	Résultats	37
2.1	« Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations »	37
2.2	Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase .	60
2.2.1	La reconstruction des trois chromosomes de la levure à fission : un challenge ?	61
2.2.1.1	Détection par fit gaussien	62
2.2.1.2	Reconstruction des trajectoires	65
2.2.1.3	Résumé du workflow de reconstruction des trajectoires	71
2.2.2	L'état de cohérence du mouvement des kinétochores frères	71
2.2.3	Analyse du mouvement par « Mean Square Displacement »	76
2.2.3.1	La MSD, un outil pour accéder aux différents phénomènes gouvernant un mouvement	76
2.2.3.2	Mesure de la MSD appliquée au mouvement de Cen2-GFP .	78
2.3	Modélisation bio-mécanique de la ségrégation des chromosomes	82
2.3.1	Modéliser la dynamique des chromosomes par une approche « force balance »	82
2.3.1.1	Types de forces en jeux	82
2.3.1.2	L'équation du mouvement	84
2.3.1.3	Application au fuseau mitotique	86
2.3.1.4	Implémentation numérique	87
2.3.2	Un modèle de congression alternatif	88
2.3.3	Vers un modèle d'attachement à trois états	93
3	Discussion	99
3.1	L'approche multidisciplinaire comme méthode d'étude en biologie cellulaire	99
3.2	La dynamique des chromosomes en mitose	100

A Annexes	103
A.1 Exemple d'utilisation de kt_simul	103
Bibliographie	107

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/phd_thesis (free as in freedom not as in a beer!).

Liste des figures

1.1	Illustration du livre « Cell theory » de Rudolf Virchow	2
1.2	Les différentes étapes du cycle cellulaire	4
1.3	Les différentes étapes de la mitose	7
1.4	Structure d'un kinétochore	9
1.5	Structure et dynamique du microtubule	10
1.6	Reconstruction 3D des kinésines dépolymérisatrice	12
1.7	Les domaines protéiques des différentes kinésine-8	12
1.8	Stucture de l'attachement kinétochore-microtubule	13
1.9	Les différents types d'attachements des microtubules aux kinétochères	14
1.10	Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT	16
1.11	Deux types de cellules différentes en métaphase	16
1.12	Cellule humaine de la prophase à la métaphase	17
1.13	Modèle standard du changement de direction des kinétochères frères.	20
1.14	Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase	22
1.15	Le mécanisme d'action du SAC	23
1.16	Workflow de l'approche modélisation en biologie	25
1.17	Modèle numérique de l'assemblage du fuseau	26
1.18	Temps moyen de capture des chromosomes	27
1.19	Deux mécanismes de l'assemblage du fuseau mitotique	28
1.20	Différents modèles de types d'attachement entre le microtubule et le kinétochore	30

1.21	Modèle de ségrégation des chromosomes	31
1.22	Morphologie de la levure à fission	34
1.23	Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission	35
1.24	Visualisation d'un seul chromosome en microscopie à fluorescence	35
2.1	Image en microscopie à fluorescence de deux fuseaux mitotique	61
2.2	Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions	63
2.3	Précision de la détection des blobs	63
2.4	Principe de l'algorithme de détection de blob par déflation	64
2.5	Principe de l'algorithme de détection de blob par déflation	65
2.6	Le tracking est l'étape de liaison des objets d'intérêts dans le temps	65
2.7	Les deux matrices de coût du LAP tracker	66
2.8	Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochores	68
2.9	Algorithme de tracking pour un chromosome	68
2.10	Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ces deux pôles.	69
2.11	Interface graphique de correction manuelle des trajectoires	70
2.12	Workflow de reconstruction des trajectoires	71
2.13	Schéma de mouvement cohérent et incohérent des kinétochores frères.	72
2.14	Direction des kinétochores frères en metaphase.	73
2.15	Temps passé dans les différents états de cohérence dans différentes conditions	74
2.16	Distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions	75
2.17	Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques	77
2.18	Exemple de MSD pour un mouvement dirigé et un mouvement brownien simulé	78
2.19	MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. .	79
2.20	MSD en log-log pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions	80
2.21	Régression linéaire sur des MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions	81

2.22 Schéma des trois éléments mécaniques fondamentales	84
2.23 L'équation du mouvement	85
2.24 Modélisation mécanique du fuseau mitotique	86
2.25 Trajectoire des chromosomes <i>_in silico_</i>	87
2.26 Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique	88
2.27 Premier mécanisme expliquant l'alignement des chromosomes	89
2.28 Distribution de l'alignement relatif des chromosomes en anaphase	89
2.29 Second mécanisme expliquant l'alignement des chromosomes	92
2.30 Modèle d'attachement à deux états	93
2.31 Modèle d'attachement à trois états	95
A.1 Exemple de trajectoire générée par 'kt_simul'	105
A.2 Animation graphique d'une simulation	106

Liste des acronymes

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

1

Introduction

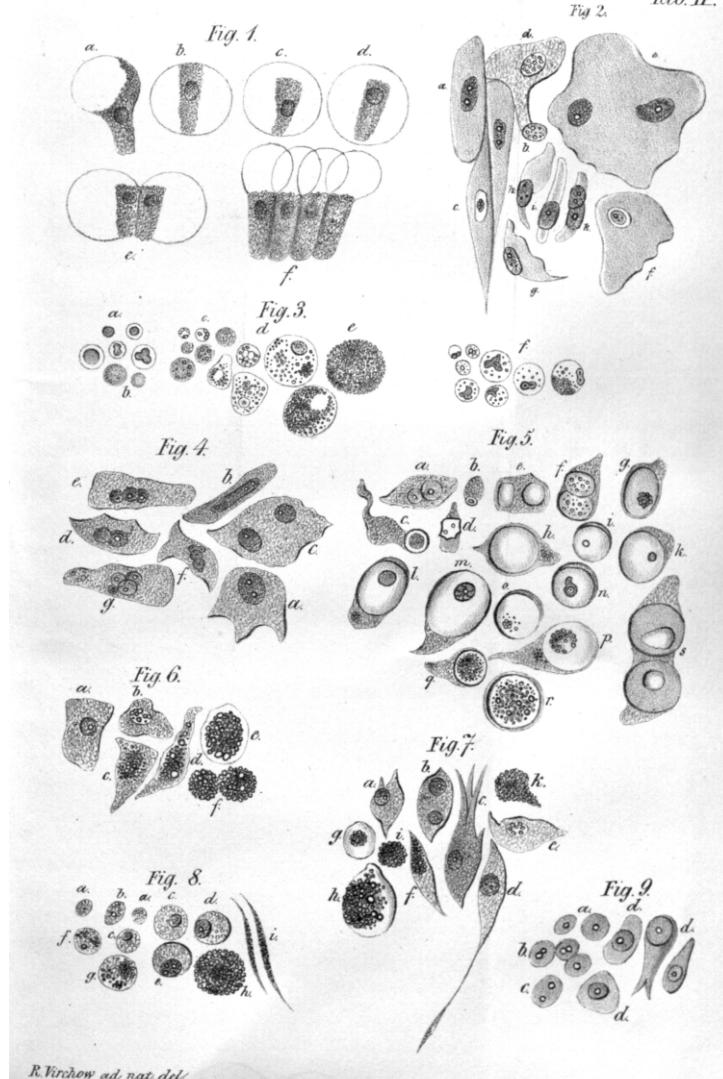
La cellule est un objet complexe que l'Homme, depuis longtemps maintenant, essaie de comprendre. En effet c'est en 1665 que Robert Hooke, un savant anglais, observa pour la première fois au microscope des « petites unités structurelles » qu'il décrira plus tard dans un ouvrage intitulé « Micrographia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

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

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

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

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



R. Virchow ad nat. del.

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

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

La mitose est un domaine de recherche important pour deux raisons majeures :

- Mieux comprendre le fonctionnement du vivant par la compréhension de ce mécanisme primordial sans lequel la vie ne serait jamais apparue sur Terre.
- Mieux comprendre le cancer, qui n'est autre qu'un ensemble de maladies impliquant un dérèglement de la division cellulaire.

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

1.1 La vie d'une cellule

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

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

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

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

- une phase de croissance (**phase G1**) durant laquelle la cellule va augmenter 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 cruciale pour le maintien de la stabilité génétique. En effet chacun des nucléotides (allant de quelques milliers à plusieurs milliards selon le type de cellules) doit être dupliqué avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voient transmettre la même information génétique.
- une phase de préparation de la division cellulaire (**phase G2**) durant laquelle la cellule relance la synthèse de protéine et croît rapidement afin de préparer sa division. Cette phase est importante car 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 apparue 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. Les phases S et G2 préparent la division cellulaire qui a lieu à la phase M.

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

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

D'une manière plus générale on peut aussi noter que l'un des enjeux de la biologie cellulaire aujourd'hui est de comprendre quelle est la part des mécanismes conservée entre différents types cellulaires et quelle est la part spécifique 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 : la dernière 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 précédents et ceux composant la mitose ont pour objectif d'assurer une division intègre et égale entre les deux cellules filles.

L'entrée en mitose est un événement contrôlé en grande partie par la kinase Cdc2 aussi appelée Cdk1 (Nasmyth and Reed, 1980; Nurse and Thuriaux, 1980). Cette protéine, conservée de la levure à l'Homme, s'associe avec une protéine régulatrice, la Cycline B. Le complexe s'active alors de manière transitoire pour 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 ce processus peuvent être à l'origine de cellules possédant un nombre défectueux de chromosomes (cellule aneuploïde). On sait aussi que les cellules aneuploïdes peuvent contribuer à la formation de tumeur cancéreuse (Kops et al., 2005).

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

- la **prophase** : les brins d'ADN (la chromatine) se condensent pour former des structures ordonnées et séparées les unes des autres; les chromosomes. Les deux pôles, appelés centrosomes chez les eucaryotes supérieurs, se séparent afin de former le fuseau mitotique.

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

- la **prométaphase** : la membrane nucléaire se désassemble dans le cas d'une mitose ouverte (Boettcher and Barral, 2013) tandis qu'elle reste intacte dans les mitoses fermées (répandues chez les protistes et organismes unicellulaires). 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 se positionner à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique. Cette étape cruciale de la mitose est régulée par des points de contrôle qui détectent la présence de chromosomes mal attachés et retardent le passage à l'étape suivante.

En effet, la transition métaphase/anaphase est régulée par un point de contrôle appelé le SAC (Spindle Assembly Checkpoint) qui permet à la cellule de bloquer la ségrégation des chromosomes en cas d'attachement incorrect (Musacchio and Salmon, 2007). L'anaphase débute au moment de l'activation de l'APC (Anaphase Promoting Complex), une ubiquitine ligase responsable de la dégradation de la Cyclin B et donc de l'inactivation du complexe Cdk1 (Sivakumar and Gorbsky, 2015).

- l'**anaphase** : durant l'anaphase A et grâce à l'activation de l'APC, le complexe cohésine reliant les chromatides soeurs est dégradé (Oliveira et al., 2010). Cela conduit au mouvement de chaque chromatide vers son pôle respectif grâce à la dépolymérisation des microtubules au cours de l'anaphase A. A l'anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge, éloignant alors les pôles du fuseau et les chromosomes loin du centre de la cellule. On notera que ces deux phases peuvent être distinctes ou pas selon le type de cellule étudiée.
- la **télophase** : les microtubules attachés aux kinétochores se désagrègent, les chromosomes se décondensent et retournent à leur état initial de brins d'ADN. L'enveloppe nucléaire se reforme dans le cas d'une mitose ouverte.
- la **cytocinèse** : à ce stade, la mitose est finie. Durant cette période, la cellule va alors se diviser grâce à la formation d'un sillon au niveau de la membrane cytoplasmique qui s'invagine jusqu'à « couper » la cellule mère en deux cellules filles.

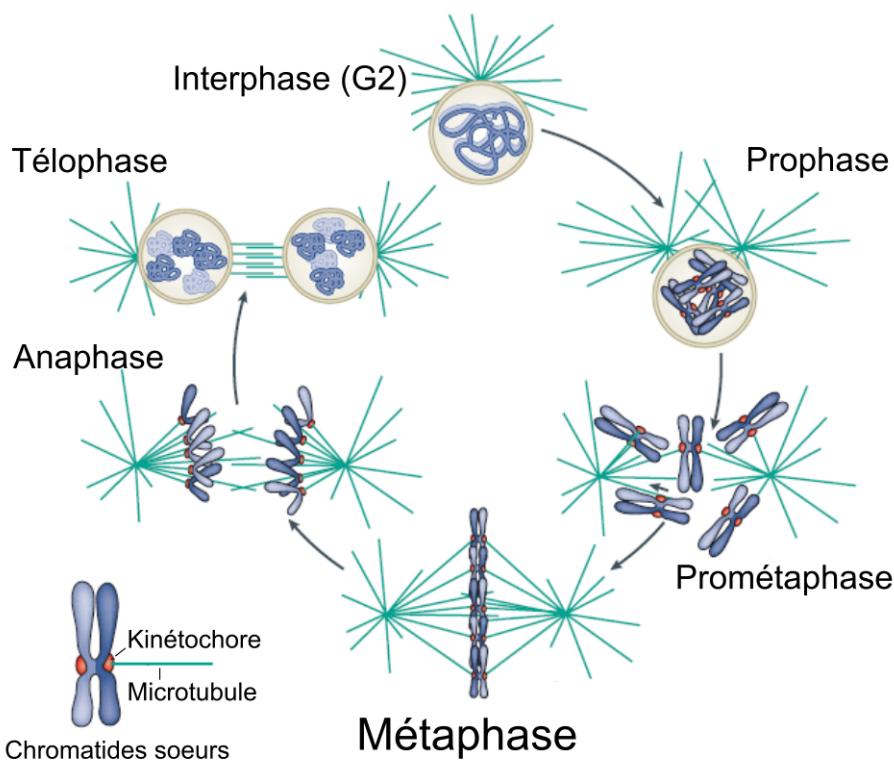


Figure 1.3: Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008)). Durant les cinq phases de la mitose la cellule établit un fuseau mitotique par élongation de ces deux pôles (en vert) puis doit répartir la même quantité de chromosomes (en bleu) à chacun des pôles.

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 protéines de très grande taille (jusqu'à 80 chez les cellules humaines) dont l'assemblage se situe sur la partie centromérique des chromatides au niveau des variants d'histone H3 (appelé CENP-A).

Il est composé de deux régions (Figure 1.4) :

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

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



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

1.2.3 Les microtubules

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

La formation d'un microtubule requiert un complexe protéique qui 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 coiffée de dimère GTP et c'est son hydrolyse en GDP qui permet l'assemblage des protofilaments.

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

Les microtubules, et d'une manière plus générale l'ensemble des protéines du cytosquelette, permettent le maintien de la forme tridimensionnelle. De plus, elles



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

participent aussi de manière active au processus de migration cellulaires ainsi que de transport intra-cellulaire. C'est ainsi qu'il est possible d'apprécier la grande diversité de formes et d'élasticité des cellules composant l'ensemble des organismes connus.

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

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

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

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

Bien que les microtubules soient des structures très dynamiques, un grand nombre de molécules et de protéines sont capables de modifier cette dynamicité. Notamment, une

famille de protéines est connue pour induire la dépolymérisation des microtubules pendant la mitose.

1.2.4 Les kinésines dépolymérisatrices des microtubules

Les premières études sur cette famille de kinésines ont commencé dans les années 1990 (voir la 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 des microtubules. Par exemple, la déplétion de la kinésine-13 dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (appelé XKCM1) a pour effet d'augmenter la taille des microtubules qui présentent par ailleurs un taux de catastrophe plus bas (Walczak et al., 1996). Par la suite la kinésine-13 a été retrouvée dans de nombreux organismes pour lesquels il a été montré un rôle dans la déstabilisation des microtubules (Ganem et al., 2005; Maney and Hunter, 1998).

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

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

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

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



Figure 1.6: Vue en trois dimensions 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).

Si les protéines dépolymérisatrices influencent le comportement de l'attachement entre le microtubule et le kinétochore, il n'a pas été montré qu'elle joue un rôle dans l'attachement. Celui-ci dépend de protéines spécifiques du kinétochore qui permettent l'ancrage du microtubule, ainsi que le maintien de l'attachement.

1.2.5 L'ancrage du microtubule au kinétochore

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

Ce complexe est un hétérotétramère composé des protéines : Ndc80, (Hec1 chez les humains), Nuf2, Spc24 et Spc25 (Wei et al., 2005) (voir Figure 2.8A). L'une des extrémités qui possède un domaine pouvant s'attacher au microtubule est composée de Ndc80-Nuf2 tandis que l'autre extrémité, Spc25-Spc24, possède un domaine s'attachant à la plaque externe du kinétochore.

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).



Plus récemment J.G DeLuca et al. ont proposé un modèle continu de l'attachement des microtubules au kinétochore (Zaytsev et al., 2014). En effet les sites d'attachement ne sont plus vus comme un ensemble d'éléments discrets, mais comme une surface sur laquelle les attachements se font de manière non exclusive (voir Figure 2.8B).

1.2.6 Les différents types d'attachements

L'association des kinétochores frères avec leurs pôles respectifs s'appelle un attachement amphitétique, 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 des 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 à la fois.

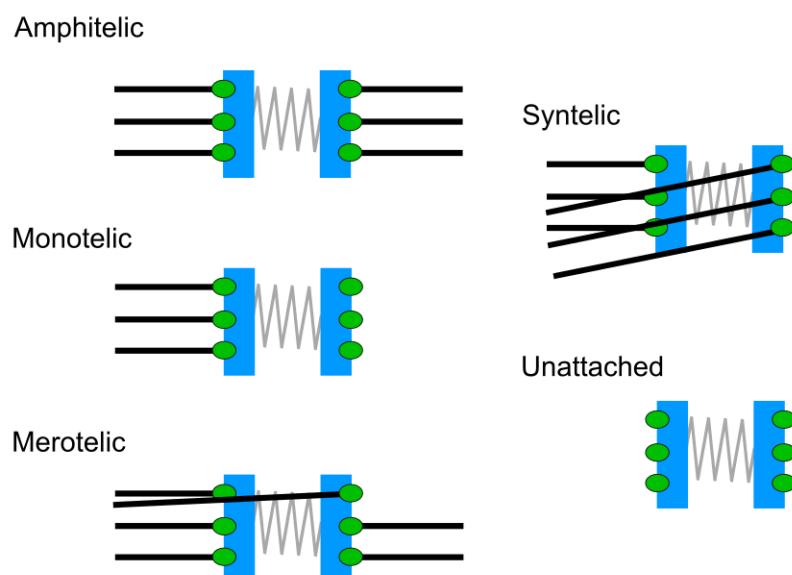


Figure 1.9: Les différents types d'attachements des microtubules aux kinétochores. Le seul attachement correct pour le fuseau mitotique est l'attachement amphitétique aussi appelé attachement bi-orienté. Les autres attachements sont généralement corrigés durant la mitose.

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 robustes de correction.

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

Dans les années 90, Nicklas et al. montra dans un expérience de micromanipulation sur 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 microdissection au laser sur des chromosomes en métaphase (Skibbens et al., 1995) ont montré que les deux chromatides sœurs se déplacent vers leurs pôles respectifs après ablation de leur région centrale, ce qui indique que l'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 éliminés avec le temps tandis que les attachements corrects auraient tendance à être maintenus jusqu'au début de l'anaphase (Kirschner and Mitchison, 1986).

Un des mécanismes proposés pour expliquer l'instabilité des attachements incorrects, sous une moindre tension, est basé sur l'activité d'une protéine kinase appelée Aurora B et localisée au centre du centromère. La phosphorylation de certaines 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 kinétochères est grande, due à une tension élevée, Aurora B n'aurait pas accès aux protéines du kinétochore et ne pourrait donc pas déstabiliser l'attachement en déphosphorylant ces substrats (Tanaka et al., 2002).

Ces mécanismes ne peuvent néanmoins pas corriger les attachements mérotéliques. En effet les deux kinétochères 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 soient encore mal compris, l'un d'entre eux semble impliquer Aurora B (Cimini et al., 2006). Un autre mécanisme propose une correction structurelle en provoquant un déséquilibre de force présent en anaphase sur le kinétochore mérotélique et implique les forces responsables de l'elongation du fuseau (Courtheoux et al., 2009).

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 afin de mettre



Figure 1.10: Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT. Quand les deux kinétochores sœurs sont éloignés (schéma de droite), Aurora B ne peut pas atteindre les protéines du kinétochore (en vert) et donc déstabiliser l'attachement KT-MT.

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 sœurs sont encore attachées entre elles par la cohésine et alignées au milieu du fuseau mitotique entre les deux pôles (Figure 1.11).

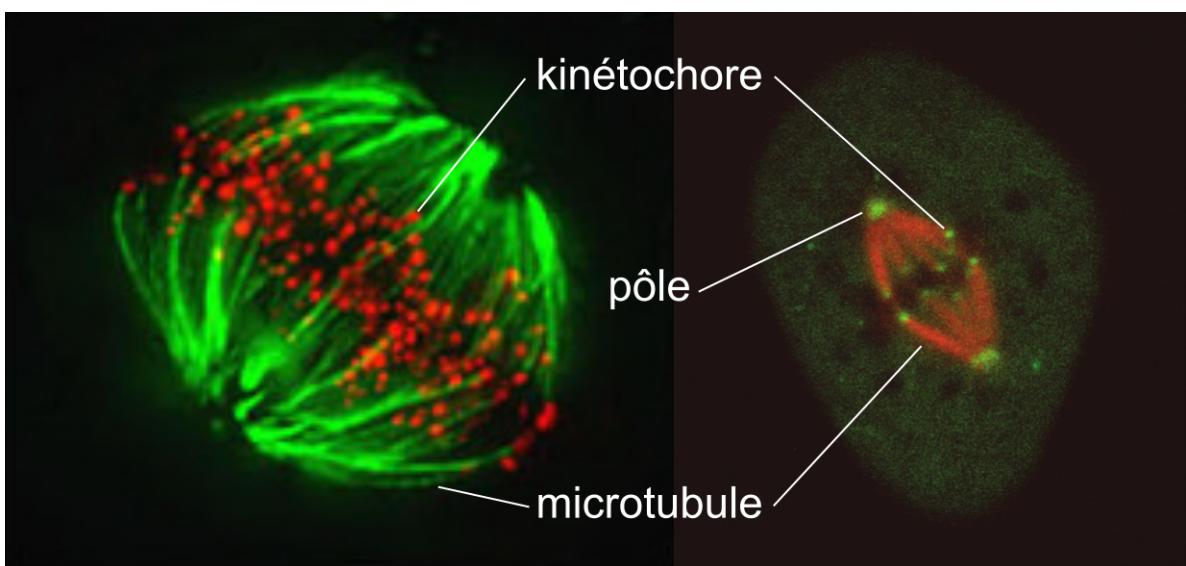


Figure 1.11: Deux cellules en métaphase (cellule HeLa à gauche et cellule Ptk1 à droite). Pour les deux cellules les kinétochores de l’ensemble des chromosomes sont marqués respectivement en rouge et vert tandis que les microtubules sont marqués respectivement en vert et rouge. (Huang et al., 2008; Wan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

Bien que les mécanismes évolutifs, qui ont mis en place l'alignement des chromosomes au cours de l'évolution, restent inconnus; on constate que dans l'ensemble des cellules eucaryotes les chromosomes s'alignent. Le mécanisme d'alignement est de mieux en mieux compris (voir Auckland and McAinsh (2015) pour une revue).

En début de prométaphase les chromosomes initialement non attachés commencent à se biorienter. C'est à ce moment qu'ils vont subir une série de mouvements de va et vient (aussi appelé oscillations) pour venir, petit à petit, s'aligner au niveau de la plaque équatoriale (au milieu du fuseau mitotique). On peut observer ce processus à l'œuvre en microscopie à fluorescence en marquant les kinétochores et les microtubules d'une cellule humaine par exemple (Figure 1.12).

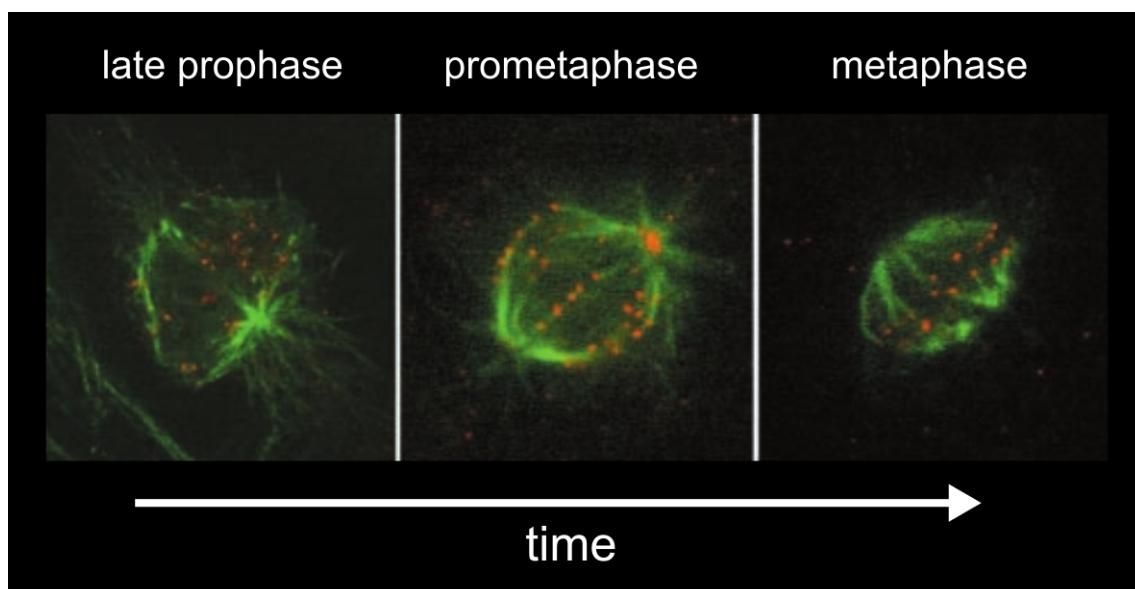


Figure 1.12: Cellule humaine (RPE1) en début de mitose. Les kinétochores (en rouge) sont alignés à la fin du processus durant la métaphase. On peut deviner les deux pôles du fuseau en suivant où les microtubules (en vert) convergent. (DeLuca et al., 2002)

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

Par exemple, il a été montré qu'un chromosome amphithélique non aligné dans des cellules humaines accumule l'homologue de la kinésine-13, appelé MCAK, au niveau du kiné-

tochore qui se déplace vers son pôle (on parle de « *poleward* kinetochore » ou « kinetochore P » en anglais), ce qui implique une dépolymérisation biaisée du microtubule et donc un mouvement plus rapide en direction du centre du fuseau mitotique (Kline-Smith et al., 2004), effet qu'on retrouve aussi dans des chromosomes alignés (Jaqaman et al., 2010). Une fois positionnée au niveau de la région équatorienne du fuseau, MCAK disparaît et devrait donc réduire la force appliquée au niveau du kinétochore P.

Une autre étude montre qu'une accumulation dépendante de la longueur du microtubule dans des cellules humaines de l'homologue de la kinésine-8 (Kif18A) sur le kinétochore opposé au pôle connecté (on parle de « *anti-poleward* kinetochore » ou « kinetochore AP » en anglais) constraint l'amplitude des oscillations des chromosomes en augmentant le changement de direction du mouvement des chromosomes (Stumpff et al., 2012). Dans ce cas là, l'augmentation de la protéine Kif18A sur le kinétochore AP réduit la dynamique du microtubule (Du et al., 2010; Stumpff et al., 2011).

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

1.3.2 Le mouvement des chromosomes

Bien que aucun modèle commun expliquant le mécanisme général de congression chez tout les organismes n'existe, on observe à travers tout ces mécanismes un processus conservé chez l'ensemble des cellules eucaryotes. Les chromosomes se déplacent de manière régulière en exhibant des mouvements oscillatoires (Armond et al., 2015; McIntosh, 2012; Skibbens et al., 1993).

Deux mécanismes sont nécessaires pour produire ce mouvement :

- En premier lieu, les kinétochères frères doivent être sous l'effet d'une force afin de pouvoir bouger. Cette force serait majoritairement dû à l'attachement microtubules - kinétochères. Plusieurs modèles proposent différents mécanismes capable de générer une force (Civelekoglu-Scholey et al., 2006; Joglekar and DeLuca, 2009; McIntosh, 2012; Powers et al., 2009). Le modèle stipulant que l'énergie proviendrait de la dépolymérisation des microtubules et transmise par une protéine capable de lier le microtubule instable avec le kinétochore (le complexe NDC80 et le complexe DAM1 possiblement) est en fait la version moderne d'un modèle théorique établi

dans les années 1990, appelé le modèle Hill (Hill, 1985). Ces différentes mécanismes sont détaillés en Section 1.4.3.

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

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

Le modèle standard du switch de direction d'un chromosome a été théorisé en 1994 par Rieder et al. (Rieder, 1994) suite à différentes études sur le mouvement coordonné des kinétochores frères (Skibbens et al., 1993) et le rôle capitale de la chromatine centromérique dans la coordination du switch de direction du mouvement des chromosomes (Skibbens et al., 1995).

Ce modèle (Figure 1.13) stipule que c'est la tension entre les deux kinétochores qui déclenche le changement d'état du leading kinétochore en P-AP. La diminution de tension s'en suivant déclencherait alors le changement d'état AP-P du second kinétochore (le trailing kinétochore).

Des observations sur des cellules Ptk1 montrant que le switch est déclenché lorsque la distance inter-kinétochore est maximum, concorde avec ce modèle (Wan et al., 2012). Cependant beaucoup de questions restent encore ouvertes.

Par exemple certains chromosomes de cellules d'eucaryotes supérieurs exhibent des mouvements très instables sans oscillations apparentes (Burroughs et al., 2015; Wan et al., 2012). De plus il a été observé dans plus de 30% des switch chez les cellules HeLa que le premier kinétochore a switché n'est pas le leading kinétochore mais le trailing kinétochore (Burroughs et al., 2015).

Pour finir aucune étude n'a encore déterminé les propriétés du mouvement des chromosomes dans des cellules de plus petites tailles et ne possédant pas de chromokinésines (Stumpff et al., 2012) comme la levure.

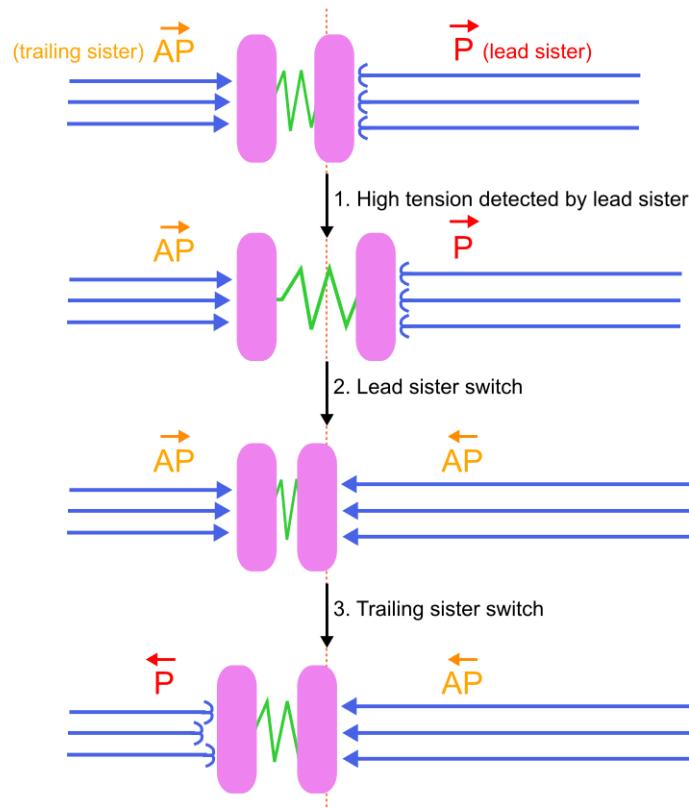


Figure 1.13: Modèle standard du changement de direction des kinétochores frères. Le leading kinétochore en se déplaçant plus vite augmente la tension et donc la distance entre les deux kinétochores. L'augmentation de tension bascule le leading kinétochore d'un état P à un état AP. Il en résulte une perte brute de tension et donc de stretch étant donné que les deux kinétochores se déplacent l'un vers l'autre. Cette relaxation déclenche alors le changement d'état du trailing kinétochore de AP en P. Les microtubules en bleu en forme de flèche représentent la polymérisation tandis que les autres microtubules sont en dépolymérisation.

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

En 2015, Burroughs et al. ont proposé un nouveau modèle plus précis que le modèle standard stipulant que la tension seule ne pouvait expliquer le déclenchement du switch de direction. En se basant sur des observations très précises de l'évolution de la distance inter-kinétochore autour de l'événement de switch de direction, ils stipulent que en plus de la tension, une horloge régulerait le taux de catastrophe et de rescue des microtubules kinétochoriens.

Le mouvement des chromosomes fait parti d'un plus grand ensemble, le fuseau mitotique, qui durant la métaphase est sous l'effet d'importantes forces.

1.3.3 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte

La métaphase est un moment très particulier de la mitose car c'est le moment où le fuseau atteint un état stationnaire. A ce stade, l'appareil mitotique subit une contrainte maximum car tous les chromosomes sont attachés et produisent une force (Figure 1.14). Le complexe cohésine contrebalance les forces appliquées aux kinétochores. De plus les microtubules inter-digitées produisent aussi une force d'extension au niveau du centre du fuseau. La métaphase est donc le moment où toutes ces forces s'équilibrivent entre elles. Le fuseau est dans un état d'attente qui sera rompu aussitôt que l'équilibre des forces est brisé par la dégradation de la cohésine sonnant alors le début de l'anaphase.

Pour donner une idée des forces en jeu, Nicklas a mesuré que la force maximale que pouvait supporter un chromosome était de l'ordre de 700 pN (Nicklas, 1983), ce qui correspond à une force approximative de 10-15 pN par microtubule. Le maintien de la stabilité mécanique du fuseau métaphasique subissant de telles contraintes est encore mal compris.

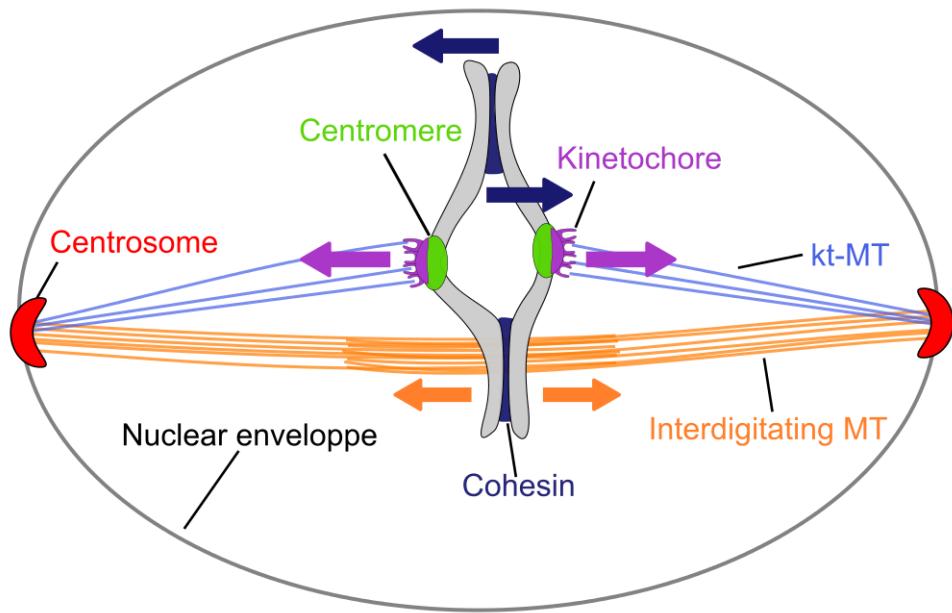


Figure 1.14: Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase (mitose fermé). Les flèches correspondent aux forces appliquées sur les différents éléments du fuseau mitotique.

1.3.4 Le point de contrôle de la transition métaphase/anaphase

Le point de contrôle de l’assemblage du fuseau (« Spindle Assembly Checkpoint » ou SAC en anglais) maintient la stabilité génomique en retardant la division cellulaire jusqu’à ce que la fidélité de tous les attachements soit garantie (voir Lara-Gonzalez et al. (2012) pour une revue). Quand un attachement est incorrect (Figure 1.9), il y a activation du SAC et blocage du cycle cellulaire.

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

Lorsque tous les kinétochores sont attachés de manière stable, alors le SAC se désactive et une cascade métabolique dégrade le complexe cohésine (Figure 1.15).

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 et Cdc20 (Sudakin et al., 2001) appelé le « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC) (Figure 1.15). Ce complexe, à ce jour connu pour être l’inhibiteur principal de l’APC/C, est une E3 ubiquitine ligase qui cible des protéines du cycle cellulaire afin de les dégrader par protéolyse (Pines, 2011). L’une des cibles de l’APC/C est la sécurine qui inhibe la protéine capable de

cliver la cohésine appelée la séparase (Figure 1.15).

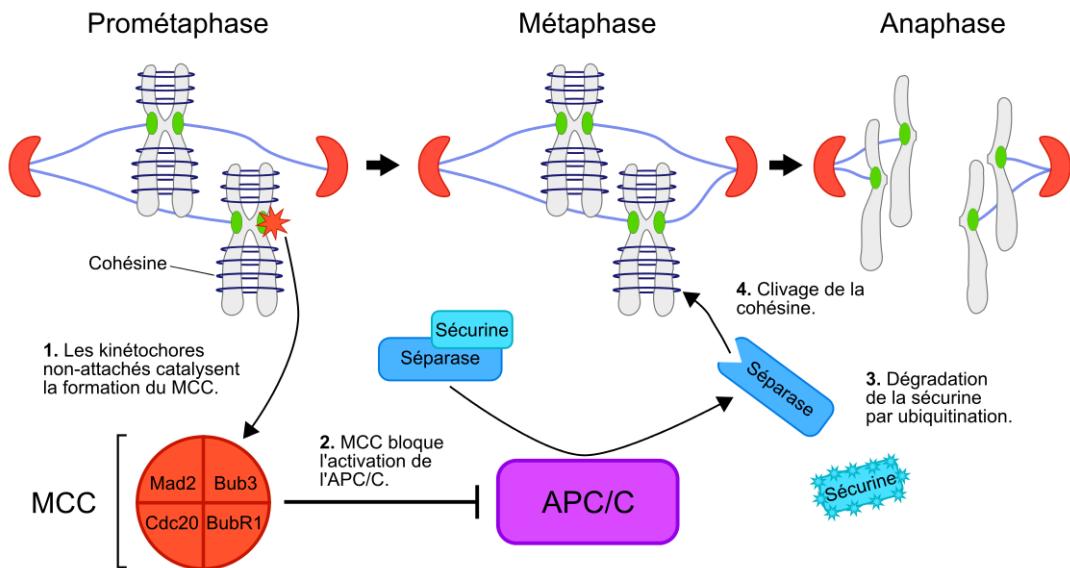


Figure 1.15: Le mécanisme d'action du SAC. Les chromosomes non-attachés catalysent la formation du MCC au niveau du kinétochore. Le MCC bloque l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C. Une fois tous les kinétochères correctement attachés, l'APC/C dégrade la sécurine, ce qui active la séparase qui active le complexe protéique de la cohésine.

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

Le réseau métabolique, dont fait partie le SAC, peut être modélisé comme une cascade de réactions chimiques (voir Novak and Tyson (1995) pour un exemple de modélisation chez la levure à fission). Ce type de problème dynamique est souvent modélisé à l'aide d'un système d'équations différentielles. Bien que les modèles de réseaux métaboliques puissent prendre en compte la dimension spatiale des processus étudiés en compartimentant les réactions, il manque la prise en compte d'une réelle géométrie de la cellule ou des objets la composant.

1.4 Modélisation mathématique de la mitose

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

1.4.1 Que signifie « modéliser un processus biologique » ?

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

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

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

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

Un scientifique tire des conclusions en fonction des différents résultats produits par 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 1.16).

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

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

La mitose est un processus cellulaire d'une extrême complexité en grande partie due au grand nombre de phénomènes mis en jeu dans un volume si petit. Il en résulte qu'il

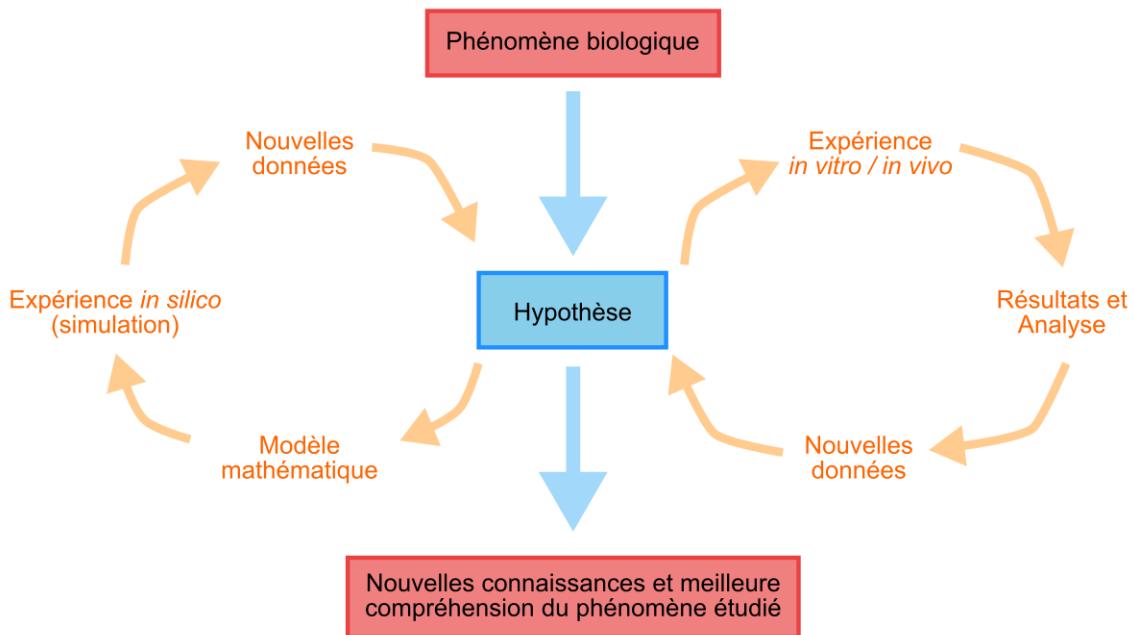


Figure 1.16: Schéma reproduisant un workflow expérimental possible lors de l'étude d'un phénomène biologique par une approche de modélisation (adapté de Woelke et al. (2010)).

est à ce jour, en 2015, encore hors de notre portée de modéliser avec précision la mitose dans son intégralité. Chaque modèle s'applique donc à décrire un moment bien spécifique de la mitose avec un niveau de précision plus ou moins important. Ces deux variables expliquent la grande diversité des modèles existants.

Pour finir on soulignera l'existence de nombreux modèles décrivant des phénomènes biologiques très spécifiques tels que l'instabilité dynamique des microtubules (Bowne-Anderson et al., 2013; Nedelec and Foethke, 2007), la génération de force au niveau de l'attachement kinétochore-microtubule (Keener and Shtylla, 2014, Shtylla and Keener, 2011), l'effet de certaines kinésines sur la dynamique des microtubules (Hough et al., 2009; Reese et al., 2014). Ces modèles sortent du cadre d'une description générale du processus de la mitose et ne seront pas discutés ici.

1.4.2 L'assemblage du fuseau mitotique

Durant l'assemblage du fuseau mitotique, le fuseau qui est en train de se former, « capture » les chromosomes par l'intermédiaire des microtubules. Ce processus de capture est étudié et modélisé depuis longtemps, ce qui en fait un bon exemple d'utilisation de la modélisation mathématique dans l'étude d'un processus biologique.

Le modèle le plus répandu décrivant l'assemblage du fuseau mitotique est celui ap-

pelé « recherche et capture » (Figure 1.17). Durant la prométaphase, les microtubules s’assemblent aux deux pôles du fuseau et vont « sonder » l’espace de manière stochastique afin d’attacher chacun des 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 minutes (Wollman et al., 2005). Il existe donc des biais durant ce processus permettant une capture plus rapide et fidèle des chromosomes.

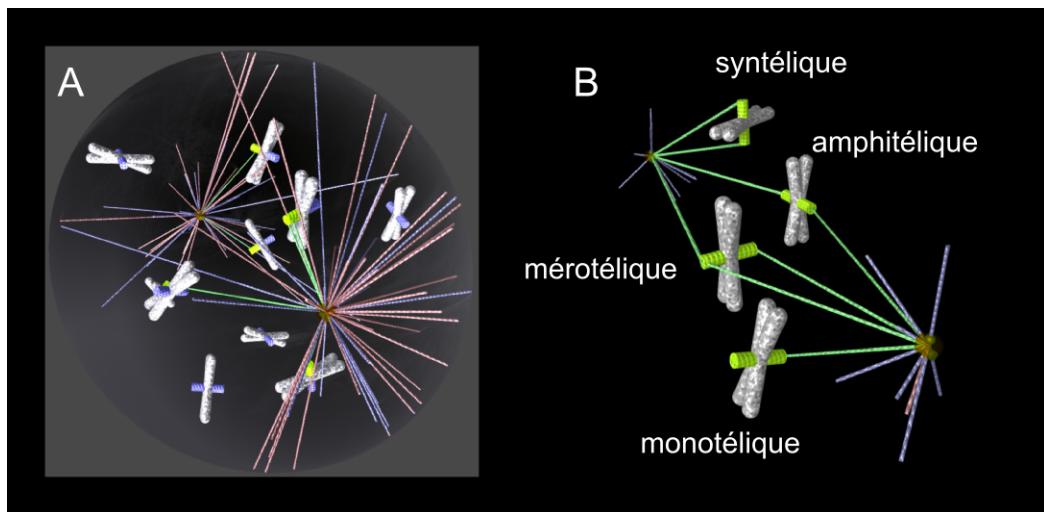


Figure 1.17: Modèle numérique de l’assemblage du fuseau (Paul et al., 2009). **A.** Des chromosomes durant la phase « recherche et capture ». Certains kinétochores sont attachés (en vert) et d’autres sont non attachés (en bleu). **B.** 4 types d’attachements possibles des chromosomes.

Un modèle propose que l’un de ces biais puisse être la présence d’un gradient de RanGTP autour des kinétochères (Figure 1.18). Une plus forte concentration de RanGTP stabiliserait les microtubules et les feraient croître en direction des kinétochères (loin des pôles). Des simulations numériques ont montré que ce biais spatial lors du processus de recherche augmenterait la vitesse de capture (Wollman et al., 2005).

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

Deux mécanismes pourraient expliquer la précision des attachements *in vivo*. Le premier stipule que lors d’un attachement monotélique, le chromosome effectue une rotation de telle façon que le kinétochore attaché se positionne face à son pôle tandis que son kinétochore frère ferait face au pôle opposé et aurait donc une plus forte probabilité de s’y attacher (Figure 1.19A). Ce mécanisme réduit de manière importante le pourcentage

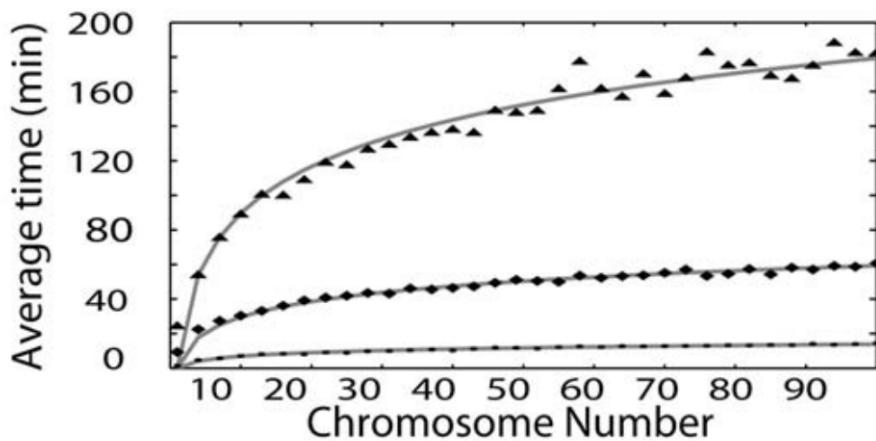


Figure 1.18: Temps moyen de capture de tous les chromosomes en fonction du nombre de chromosomes total pour trois modèles différents *in silico* : modèle non-biaisé (recherche aléatoire) avec 1000 MTs (triangles), modèle biaisé (gradient de RanGTP) avec 250 MTs (losanges), modèle biaisé avec 1000 MTs (cercles) (Wollman et al., 2005).

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 amphithélique apparaît de manière évolutive (un peu à la façon d'un processus Darwinien). C'est à dire que la capture serait un processus d'essais et d'erreurs itératif. Au début, les attachements syntétiques sont fréquents et disparaissent souvent (Lampson et al., 2004) jusqu'à ce que seuls les attachements amphithéliques soient conservés. Ceci est possible seulement si les taux d'attachement et de détachement dépendent de l'état d'attachement du kinétochore comme illustré Figure 1.19B. Ici aussi des simulations numériques ont montré que ce mécanisme réduit de manière très importante le nombre d'erreurs d'attachement (Mogilner and Craig, 2010; Paul et al., 2009).

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

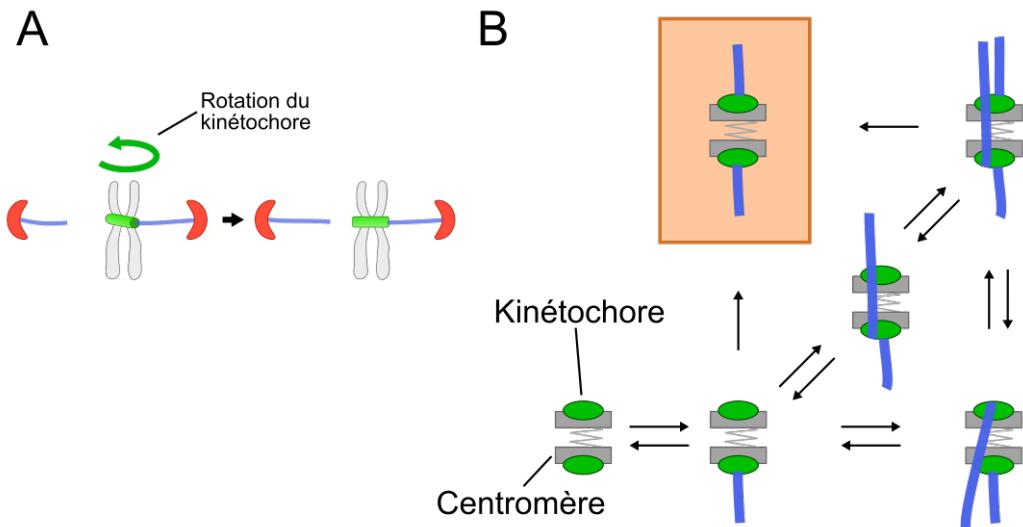


Figure 1.19: Deux mécanismes expliquant la fidélité des attachements durant le processus de « recherche et capture ». **A.** Mécanisme impliquant l’orientation du kinétochore frère en réponse à un attachement monotélique. **B.** Mécanisme évolutif qui « sélectionne » l’attachement amphithélique (box 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 durant la mitose est le mécanisme qui permet au kinétochore de maintenir son attachement à des microtubules qui dépolymérisent. L’un des premiers modèles expliquant ce phénomène est le modèle de Hill (Hill, 1985). Ce modèle (« Hill sleeve model » en anglais) utilise des propriétés classiques de cinétique et thermodynamique pour montrer comment un microtubule qui dépolymérise peut rester attaché profondément dans une région du kinétochore composée de « crans » qui sont autant de mini barrières d’énergie (Figure 1.20A). Les hétérodimères de tubuline interagissent avec un nombre fini de sites d’attachements le long de cette région du kinétochore avec une affinité modérée. L’insertion est donc contrôlée par les fluctuations thermiques et le microtubule

peut perdre des sous-unités (dépolymérisation) aux endroits accessibles, c'est à dire dans la région la plus profonde du kinétochore. Le mouvement du microtubule est donc constraint et biaisé par différentes barrières d'énergie dues aux nombreux attachements du microtubule dans cette région du kinétochore.

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

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

En 2006, une autre équipe proposa un modèle alternatif en se référant à des observations faites *in vivo* montrant que des protéines motrices étaient requises pour le mouvement des chromosomes dans un certain nombre d'organismes. Le modèle (Civelekoglu-Scholey et al., 2006) construit comme une balance de force est basé sur la présence des deux moteurs du kinétochore antagoniste, la dynéine et CENP-E, ainsi que deux membres de la famille des kinésine-13 localisés au niveau du pôle du fuseau et du kinétochore (Figure 1.20B). L'anaphase est aussi reproduite en dégradant le lien élastique entre les deux kinétochères représentant la cohésine. Ce modèle est capable de reproduire certaines propriétés du mouvement des chromosomes telles que leur vitesse de déplacement en métaphase et anaphase.

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

Par la suite, il fut proposé un nouveau modèle par Tournier et al. décrivant la correction des attachements mérotélique durant l'anaphase chez la levure à fission (Courtheoux et al., 2009). Ce modèle de balance de force est construit sur des observations macroscopiques

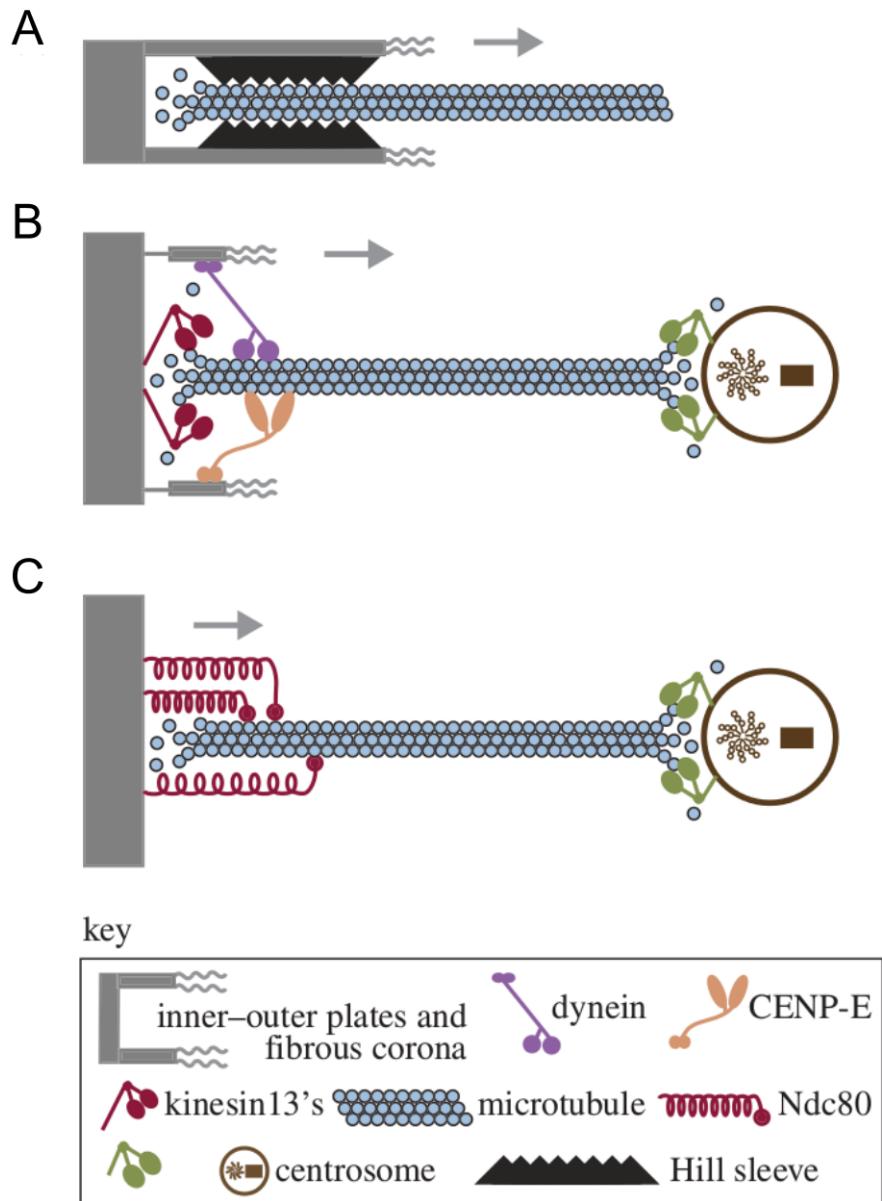


Figure 1.20: Différents modèles de types d'attachment entre le microtubule et le kinétochore (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014). **A.** « Hill sleeve model » qui suppose l'existence d'un nombre fini de sites d'attachments arrangés en série. **B.** Une balance de force est mise en place entre différentes protéines motrices localisées aux pôles du fuseau et au kinétochore. **C.** L'attachment se fait par un complexe protéique non moteur appelé NDC80. Il fait office de coupleur dynamique.

du fuseau en anaphase. De plus il montre de manière élégante comment un phénomène purement physique (augmentation de la tension au kinétochore) est capable de corriger un attachement mérotélique.

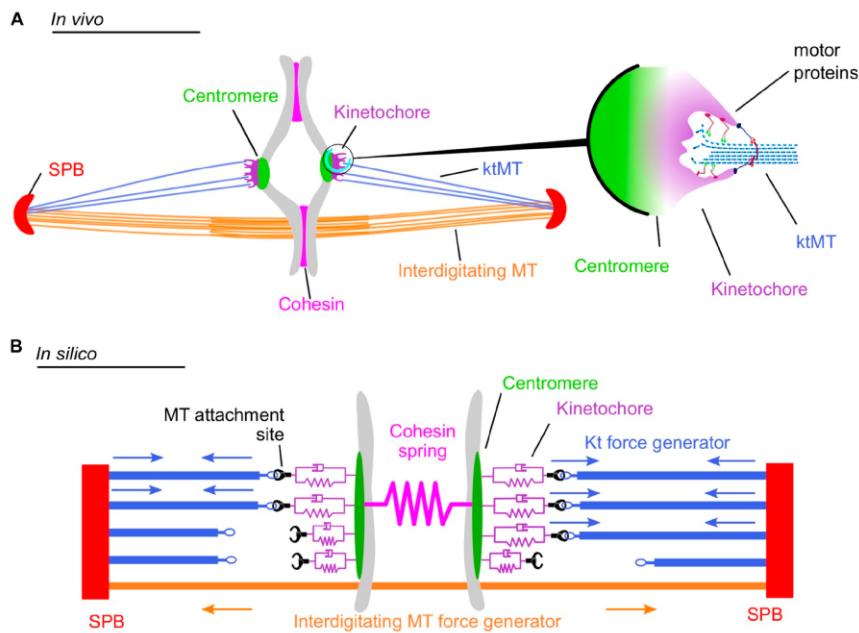


Figure 1.21: Modèle de ségrégation des chromosomes basé sur un attachement KT-MT stochastique (Gay et al., 2012). **A.** Schéma du fuseau mitotique de la levure à fission. **B.** Schéma du modèle représentant la façon dont sont agencés les différents éléments mécaniques du modèle reproduisant un fuseau mitotique *in vivo*.

La même équipe proposa un peu plus tard un autre modèle plus général décrivant la dynamique du fuseau de la prophase et l'anaphase (Gay et al., 2012). Ce modèle est composé d'objets viscoélastiques représentant les composants du fuseau (pôle, kinétochore, cohésine et site d'attachement). Chacune des ces unités est arrangée de façon à former un fuseau (Figure 1.21). Les sites d'attachement sont autant de moteurs qui tirent le chromosome en direction du pôle quand il est actif. Les attachements se désactivent de manière stochastique, prenant également en compte deux mécanismes régulant l'attachement KT-MT: l'orientation du kinétochore et la tension exercée sur les deux kinétochères frères (Gay et al., 2012).

Ce modèle décrit la dynamique du fuseau à un niveau macroscopique plus haut que le modèle proposé par Civelekoglu-Scholey et al. L'une des forces du modèle est sa capacité à décrire la dynamique des attachements en métaphase et anaphase sans faire d'hypothèse forte sur le fonctionnement de l'attachement et des différentes protéines participant à ce processus. Les paramètres qui le composent résultent d'un grand nombre de mesures *in vivo* qui décrivent non pas des propriétés individuelles de protéines mais

des propriétés biophysiques d'objets macroscopiques composant le fuseau telles que les constantes d'élasticité du kinétochore ou d'un site d'attachement.

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

Plus récemment, un troisième mécanisme alternatif fut proposé pour expliquer l'attachement du microtubule au kinétochore. Ce modèle est une adaptation de celui de Civelekoglu-Scholey et al. (Figure 1.20C). Le mécanisme est basé sur des observations biophysiques d'un complexe protéique, appelé NDC80 et supposé être responsable de l'attachement entre le microtubule et le kinétochore (Alushin et al., 2010; Joglekar and DeLuca, 2009; Santaguida and Musacchio, 2009). En pratique ce modèle ressemble au modèle de Hill proposé par Joglekar & Hunt, à l'exception d'une différence très importante: les liens élastiques peuvent se détacher et s'attacher de manière indépendante les uns des autres (Figure 1.20C).

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

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

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

Il est bien entendu impossible de faire une liste exhaustive des modèles décrivant la dy-

namique du fuseau. Cependant on retrouve un point essentiel dans tous ces modèles : l'origine de l'énergie responsable du mouvement des chromosomes reste encore très hypothétique. Pour résumer, deux modèles existent : soit l'énergie provient de la dynamique du microtubule (modèle de Hill), soit l'énergie provient de protéines motrices (modèle de Civelekoglu-Scholey). On note qu'il est possible de modéliser le fuseau mitotique sans aucune des ces deux hypothèses (Gay et al., 2012).

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

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

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

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1.22) est une levure à division symétrique aussi appelée « levure à fission ». Elle est de forme cylindrique de 3 à 4 μm de diamètre et de 7 à 10 μm de longueur en fonction de l'étape du cycle cellulaire.

Elle se développe sur les racines des arbres ainsi que dans les sols à proximité. On la retrouve aussi dans les vieux alcools. 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 Sanger. On estime que son génome contient environ 14 millions de paires de base codant pour ~5000 protéines et ~500 ARNs non-codant.

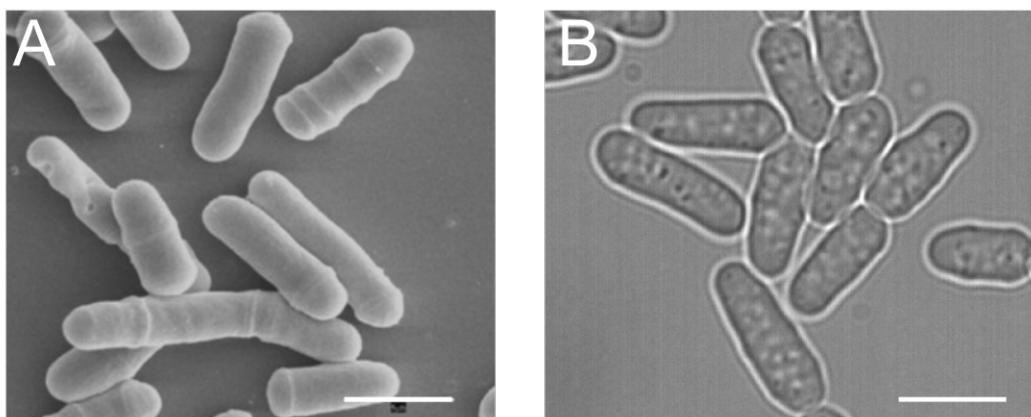


Figure 1.22: Morphologie de la levure à fission. **A.** Vue en microscopie électronique à balayage de *S. pombe* (Morgan, 2007). **B.** Vue en microscopie optique à champ large en fond clair. La barre correspond à 8 µm dans les deux vues.

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 minutes (Figure 1.23). En phase exponentielle de croissance, 80% des cellules sont en G2 et 15-20% en mitose.

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

Les phases de la mitose sont classiques et composées de la sorte : la prométaphase qui dure 2.5min, 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), 2.5-3 μm ; l'anaphase A dure moins de 20s, l'allongement du fuseau est rapide, de l'ordre de 0.5 à $1\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ (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 5-6 μm avant de lancer la cytocinèse. La cytocinèse 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 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 répétitions (plusieurs centaines) de l'opéron lac (aussi

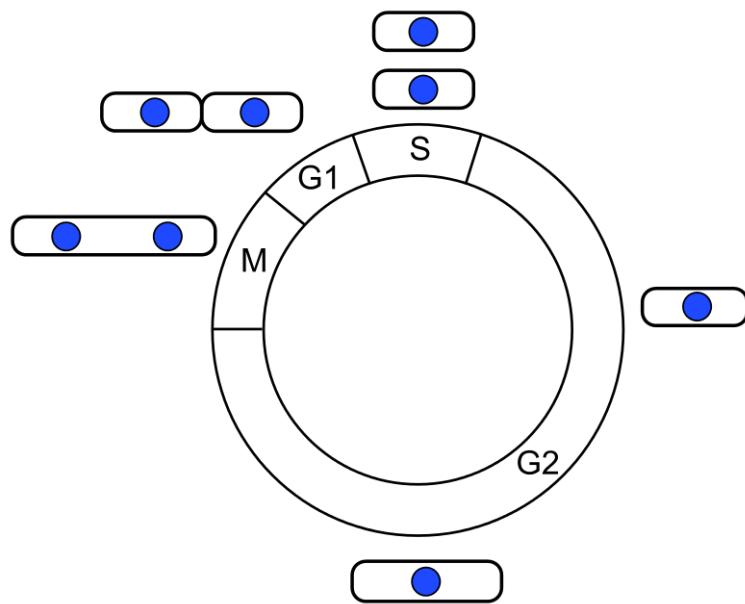


Figure 1.23: Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission. La levure à fission possède une phase G2 très longue comparé à d'autres types cellulaires.

appelée opéron lactose) au sein du génome. Le gène *lacI*, auquel a été ajoutée une sonde fluorescente GFP, code pour le répresseur qui va venir se fixer sur la partie du génome où a été inséré l'opéron *lac* (Figure 1.24A). 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 associée à un marqueur fluorescent des pôles du fuseau permet donc la visualisation et le suivi dans le temps de la position d'un chromosome au sein du fuseau mitotique (Figure 1.24B).

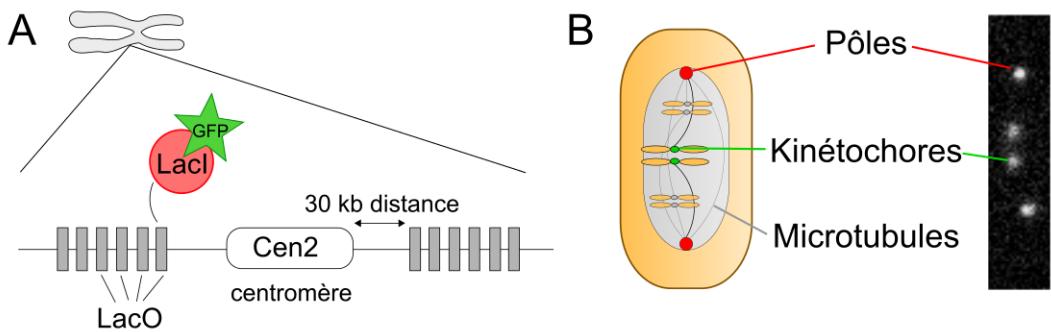


Figure 1.24: Visualisation d'un seul chromosome en microscopie à fluorescence. **A.** Système LacO/LacI pour la visualisation d'une région spécifique d'un chromosome à l'aide d'un marqueur fluorescent de type GFP. **B.** Schéma et vue en microscopie à fluorescence d'une cellule de levure à fission marquée pour les deux pôles du fuseau et les deux kinétochères du chromosome 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 forces.

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

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

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

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

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

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

2

Résultats

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

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

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

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

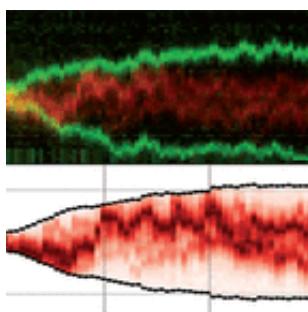
De plus un modèle mathématique de la ségrégation des chromosomes implémentant ce mécanisme dépendant de la longueur est suffisant pour reproduire l'alignement des chromosomes et prévenir l'apparition de chromosomes retardataires en anaphase.

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

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

Journal of Cell Science

Home



Kinesin-8 family members have been shown to control chromosome congression in higher eukaryotes by regulating chromosome oscillations. However, it is unclear how kinesin-8-dependent regulation of microtubule (MT) dynamics contributes to chromosome alignment in *Schizosaccharomyces pombe*. On page 3720, Sylvie Tournier, Yannick Gachet and colleagues present a quantitative description of the oscillation and positioning of chromosomes in order to decipher the role of kinesin-8 in kinetochore alignment. They found that $\Delta Kip6$ cells, which lack kinesin-8 activity, have a defect in centering kinetochores. However, this defect was not caused by the increase of chromosome oscillation that the authors noted in these cells. Correcting the large drifts in kinetochore trajectories that resulted from unattached kinetochores in the absence of kinesin-8 did not rescue chromosome misalignment either. Insights into the molecular role of kinesin-8 came from the observation that kinesin-8 could control MT pulling forces in a length-dependent manner. By modelling spindle dynamics to predict chromosome segregation defects, the authors were able to demonstrate that including a length-dependent MT pulling force is sufficient to reproduce chromosome alignment. By contrast, omitting the pulling force contribution generated a situation resembling that in $\Delta Kip6$ mutant cells. Thus, in fission yeast, chromosome congression is achieved through a mechanism that involves the localised action of kinesin-8 at kinetochores to generate a force gradient to correctly align chromosomes.

© 2015. Published by The Company of Biologists Ltd

Articles

Advance articles

39

RESEARCH ARTICLE

Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

*These authors contributed equally to this work

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

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

Received 24 July 2014; Accepted 3 September 2015

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

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

RESULTS

Kinesin-8 actively controls and maintains kinetochore alignment during mitosis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

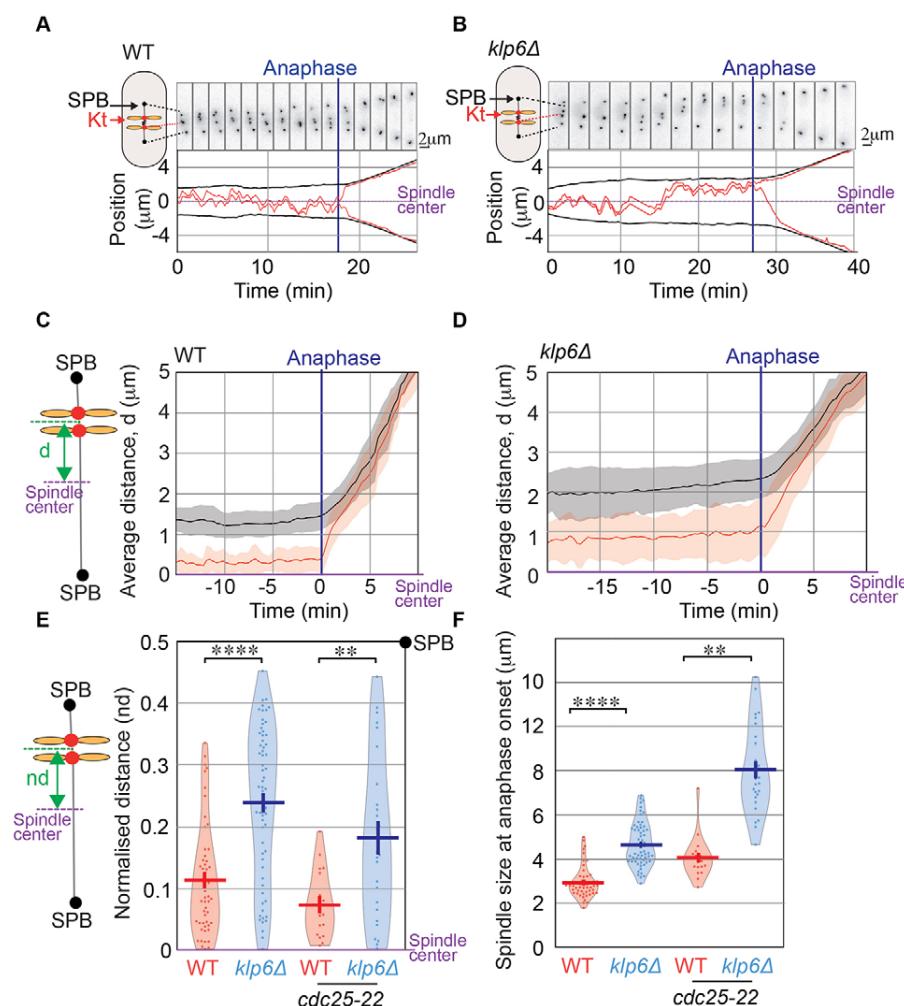


Fig. 1. The stability of sister kinetochore centering during metaphase depends on kinesin-8 activity. (A,B) Typical timelapse fluorescence images of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (marking the centromeric region of chromosome 2) and Cdc11-GFP (marking the spindle poles) during metaphase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

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

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

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

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

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

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

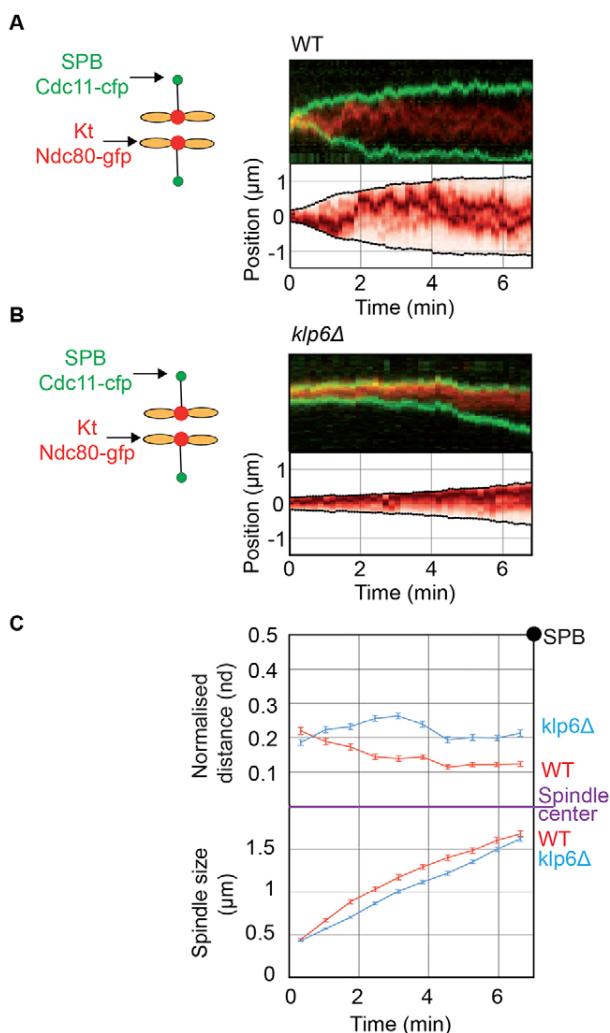


Fig. 2. Kinesin-8-dependent chromosome alignment is performed through an active process before metaphase. (A,B) Upper panel. Typical kymographs of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Ndc80-GFP (shown in red) and Cdc11-CFP (shown in green) from prophase to metaphase. Frames were taken every 5 s.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

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

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

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

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

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

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

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

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

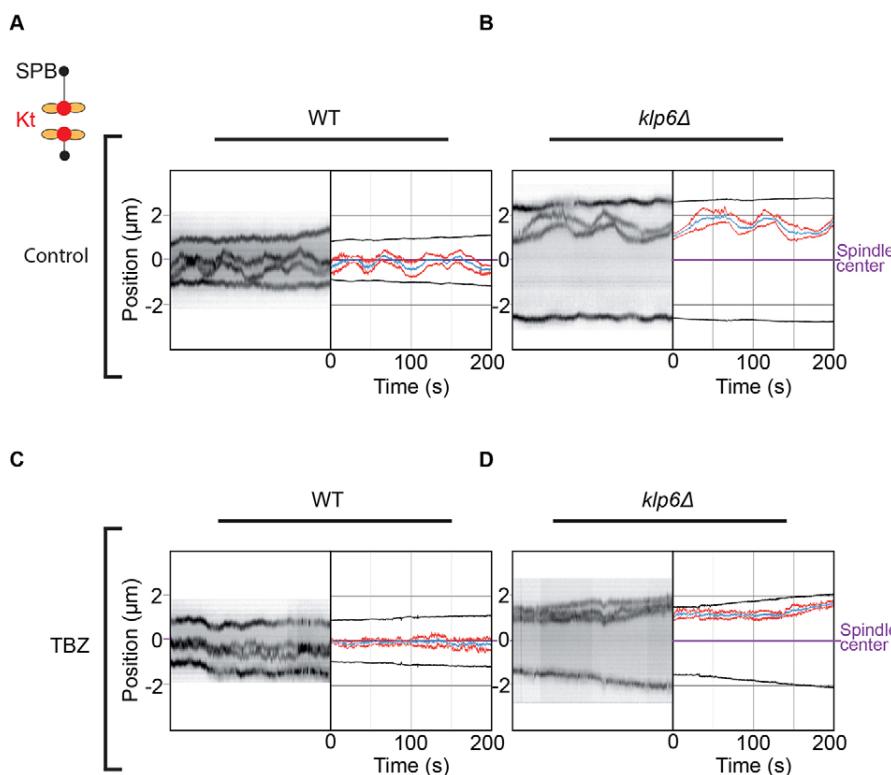


Fig. 3. Low doses of the MT-depolymerizing drug TBZ abolish chromosome oscillation but not centering. (A,B) Typical kymographs obtained at high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) and corresponding tracked trajectories of wild-type (WT) or *klp6Δ* cells expressing Cen2–GFP (sister centromeres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

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

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

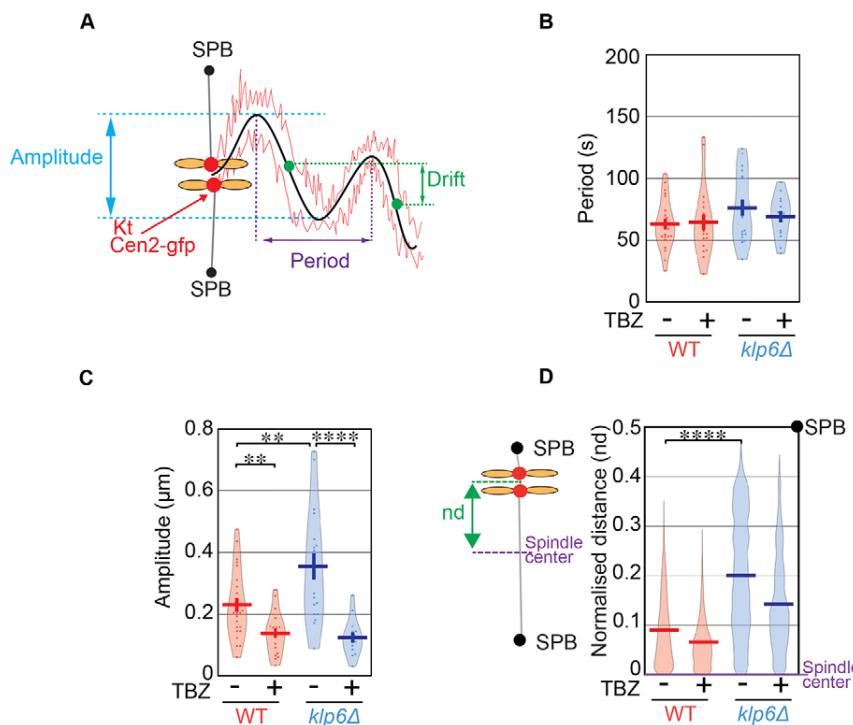


Fig. 4. Kinetochore oscillations are not required for the role of kinesin-8 in chromosome congression. (A) Schematic representation of oscillation periods, amplitudes and drifts in kinetochore trajectories. (B) Periods of kinetochore oscillations obtained with the Fourier transform method during metaphase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

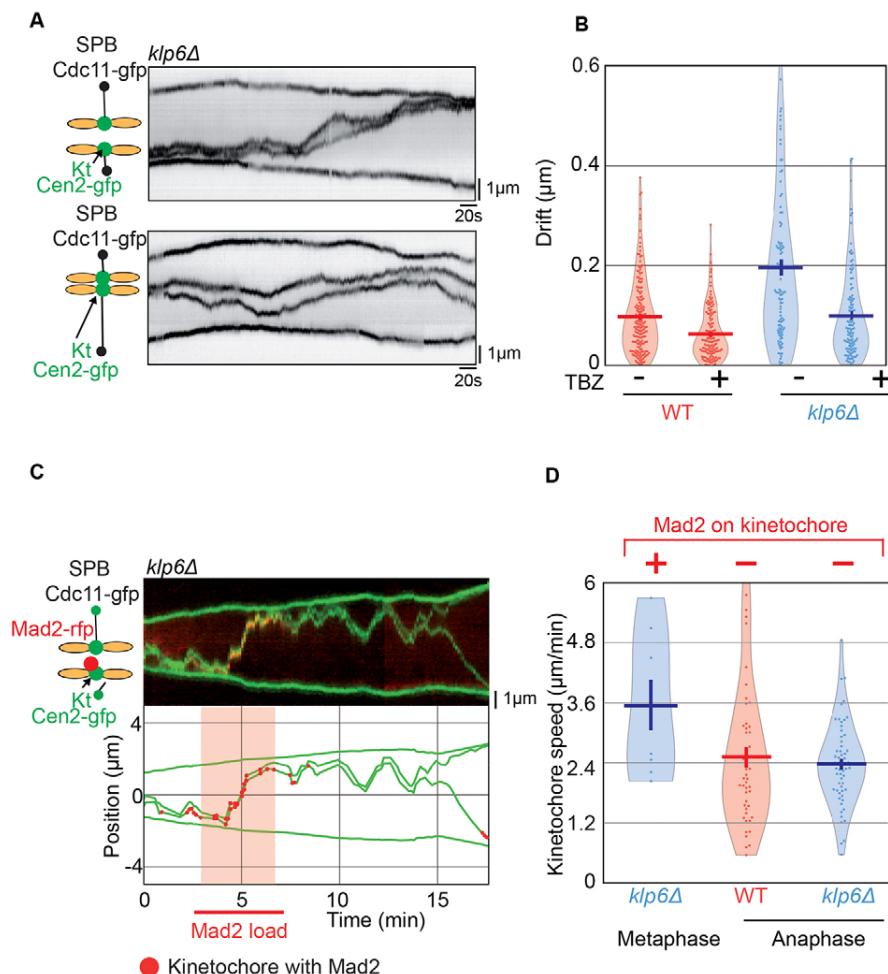


Fig. 5. Kinesin-8 mutants display imbalanced traction forces at kinetochores leading to chromosome detachment and instability in kinetochore positioning. (A) Typical kymographs obtained at a high-frame rate (frames were taken every 0.1 s) of *klp6Δ* cells expressing Cen2-GFP (to mark sister centromeres)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

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

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

DISCUSSION

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

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

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

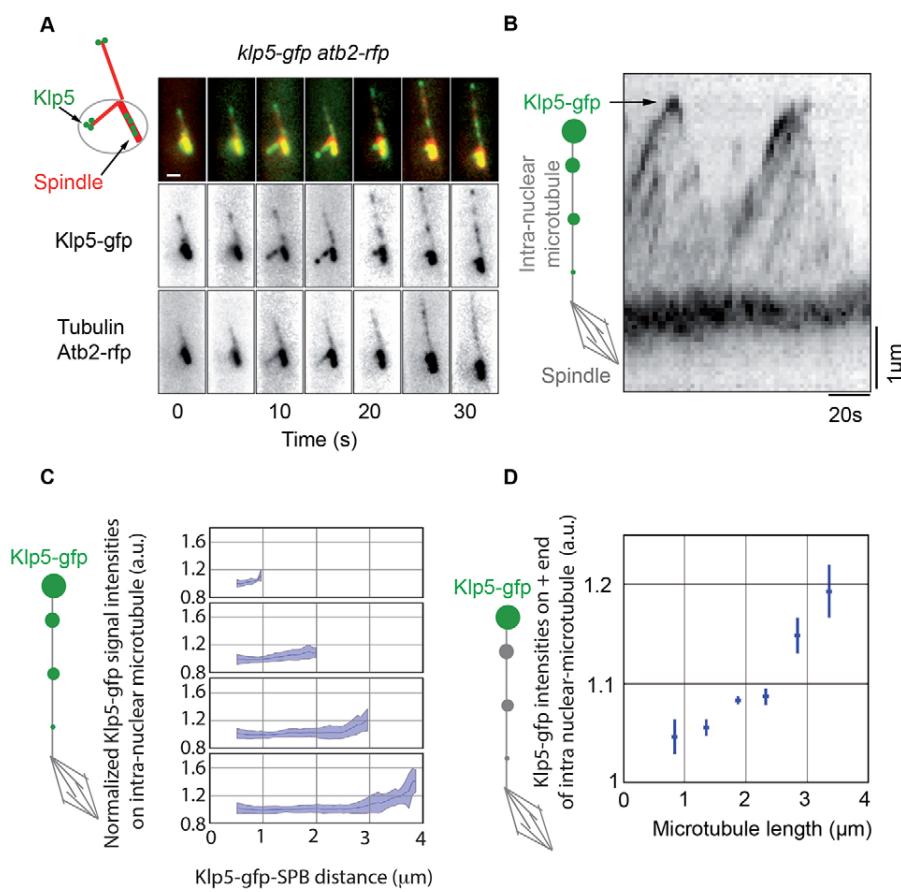


Fig. 6. Kinesin-8 accumulates at the tip of mitotic MTs in a length-dependent manner. (A) Typical time-lapse fluorescence images of wild-type cells expressing Atb2-GFP (tubulin) and Klp5-GFP (frames were taken every 5 s). Scale bar: 1 μm. (B) Kymograph representation of Klp5-GFP localization on intra-nuclear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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

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

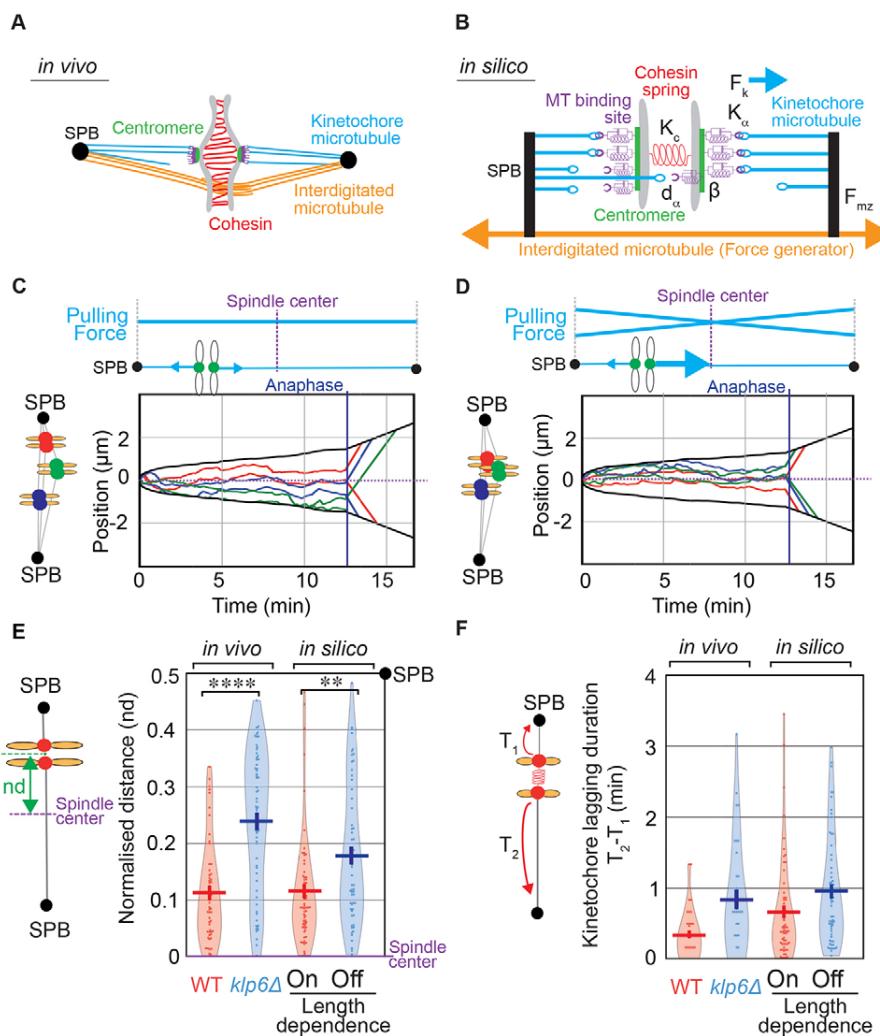


Fig. 7. A length-dependent pulling force centers kinetochores and prevents lagging chromosomes in a force-balance model. (A) Schematic representation of the metaphase spindle. The two SPBs (black) are linked by overlapping interdigitated MTs (orange). The chromosome (gray) is linked to the SPBs by its centromere regions (green). The three MT-binding sites located on each kinetochore (purple) are connected to the SPBs by ktMTs (blue lines). The two sister chromatids are held together by the cohesin complex (red). (B) Biophysical representation of the metaphase spindle. The SPBs are linked by the 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). Cohesion 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 $klp6\Delta$, $n=63$] 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 $klp6\Delta$ cells, $n=34$) or *in silico* (in the presence, $n=503$ or absence of length dependence, $n=451$). The plots in E and F are violin plots, which combine a standard box plot with a density trace. Each circle represents a value in the dataset, the horizontal bar represents the mean of the distribution and the vertical bar represents s.e.m.

Live-cell imaging

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

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

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

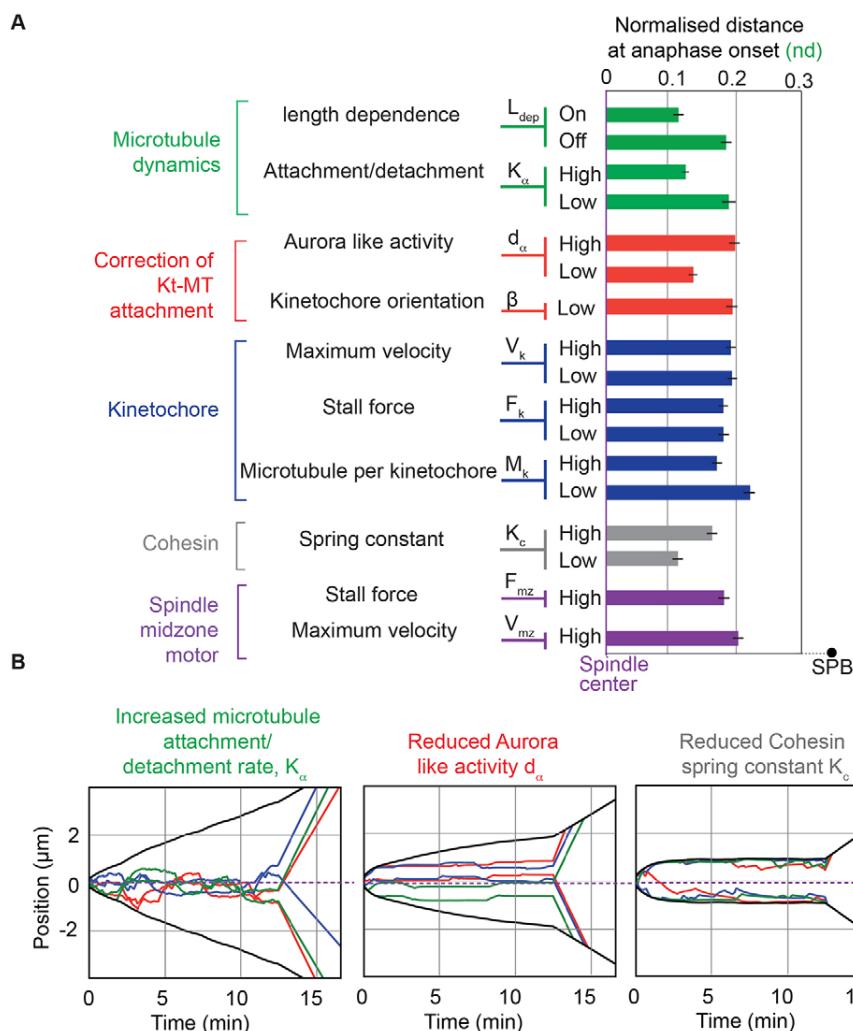


Fig. 8. Influence of several model parameters on kinetochore alignment. (A) Normalized distance between sister kinetochore position to the spindle center at anaphase onset. Several model parameters were either increased (High) or decreased (Low) as compared to the default value (Table S1) to study their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

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

Image analysis

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

Peak detection and tracking

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

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

Quantification of fluorescence signal

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

Quantification of MT dynamics

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

Kymographs

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

Characterization of amplitudes and periods of oscillations

Fast Fourier transform analysis

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

Detection of local maxima

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

Statistical analysis

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

Modeling

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

General assumption

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

Length-dependent pulling force

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

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

Funding

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

Supplementary information

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

References

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

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

SUPPLEMENTAL INFORMATION

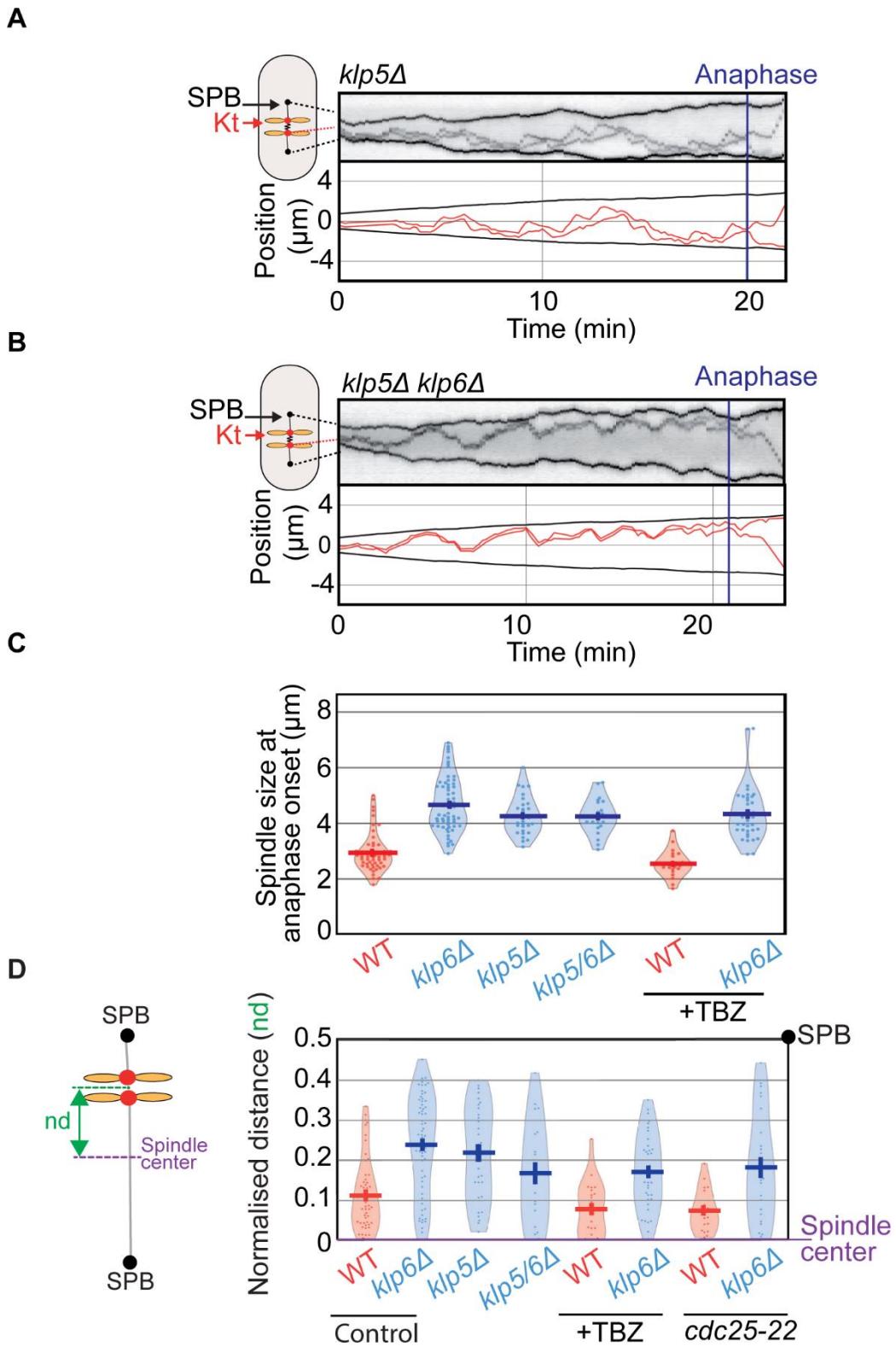


Figure S1. *klp5Δ* or double mutant *klp5Δ klp6Δ* are deficient for chromosome centering.

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

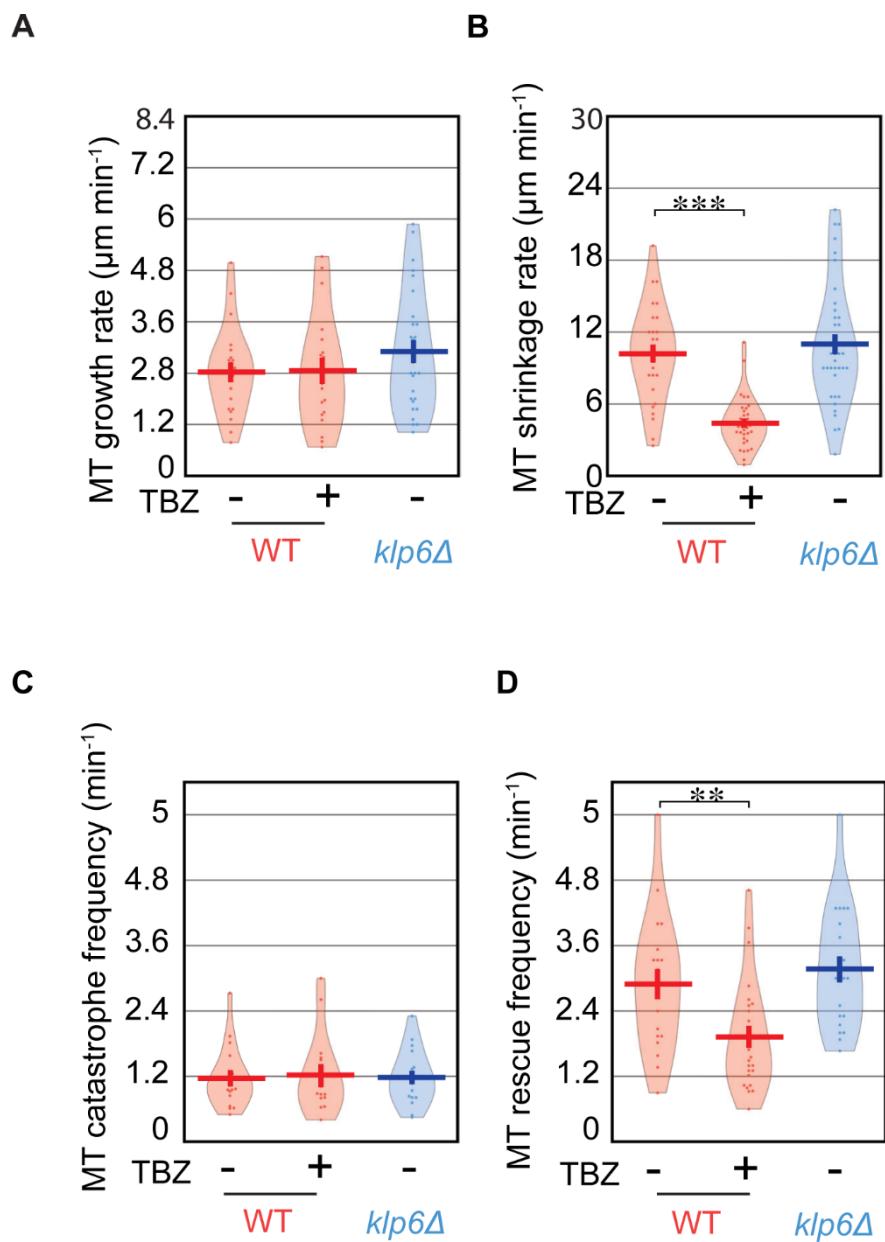


Figure S2. Analysis of microtubule dynamics in the presence or absence of TBZ.

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

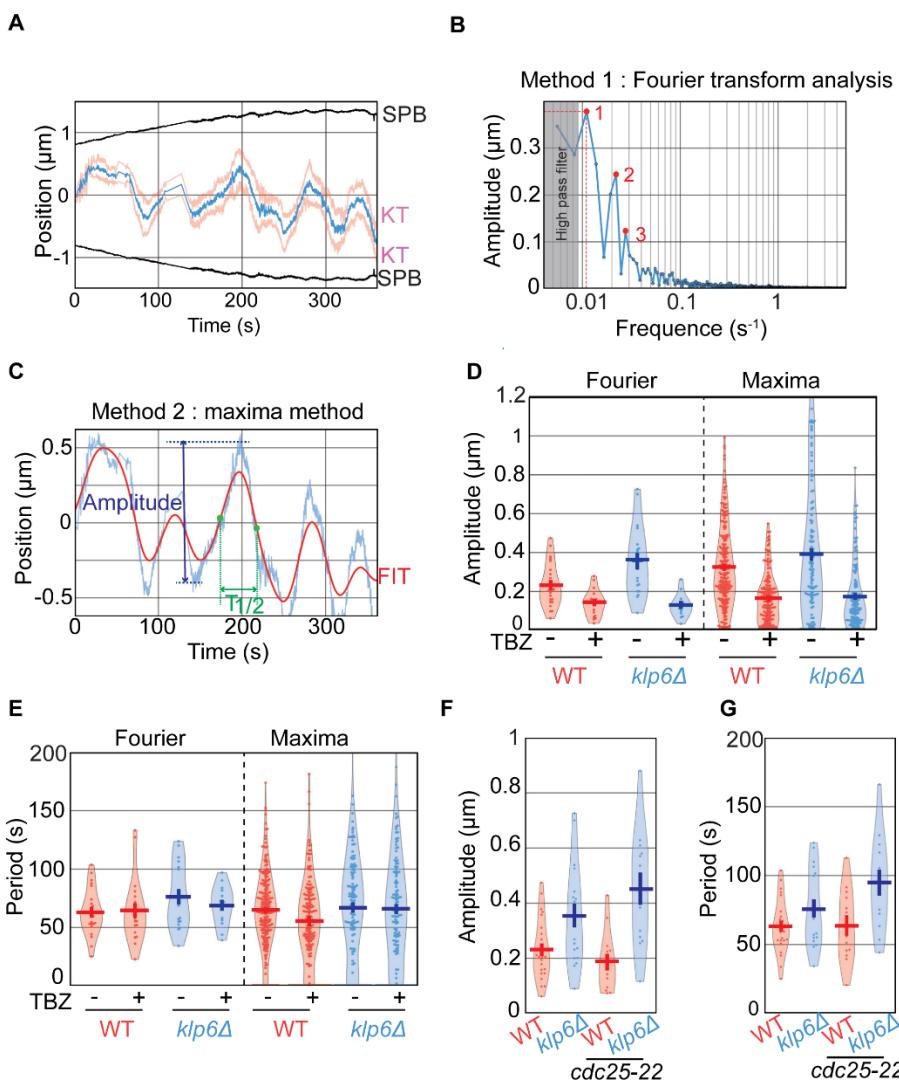


Figure S3. Characterization of kinetochore oscillation periods and amplitudes.

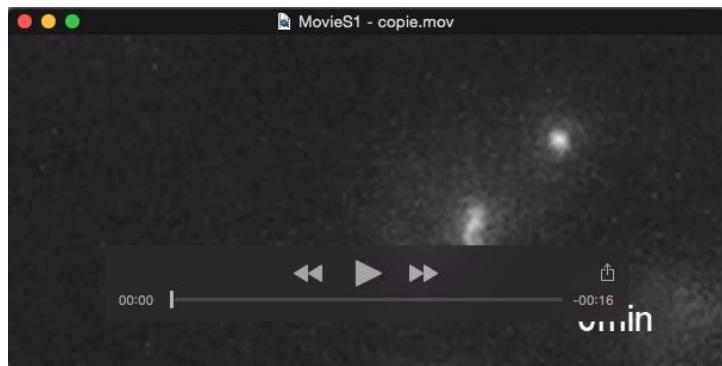
(A). Kinetochore (Cen2) trajectories used to illustrate oscillation analysis (frames were taken every 0.1 s). The blue line represents the middle of the Cen2 spots (shown in red). **(B)** Fourier transform analysis of kinetochore trajectories. The peak of highest amplitude is identified in the Fourier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

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

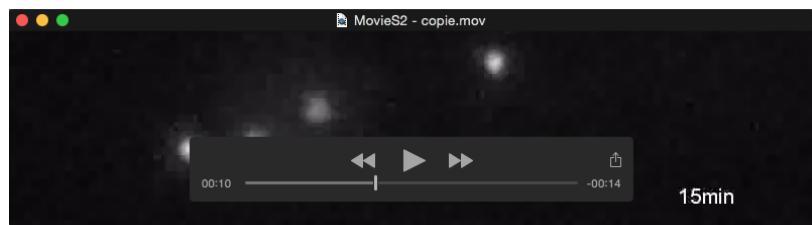
Parameter	Description	value
L_{dep}	Factor controlling force load on kinetochore in a length dependent manner	0.2
K_α	Microtubule Attachment/detachment rate per min	3.6
d_α	Range of action of Aurora like activity (μm)	0.05
β	Kinetochore orientation parameter	1
V_k	Kinetochore maximum velocity ($\mu\text{m}/\text{min}$)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

Table S2: Strains used in this study

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



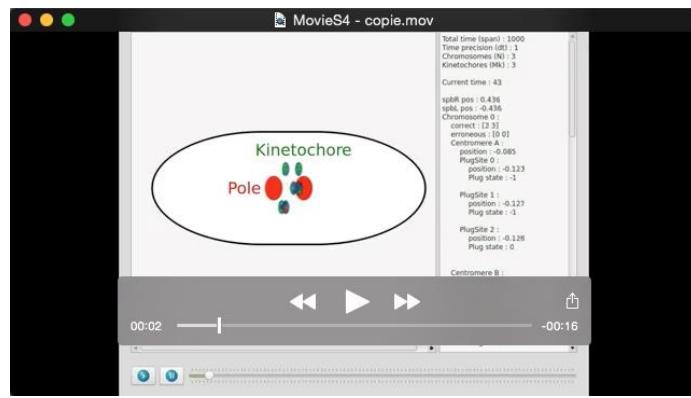
Movie 1. Fluorescent time-lapse imaging of centromere 2 (Cen2-gfp) and spindle pole (Cdc11-gfp) dynamics in a wild type fission yeast cell. Frames were taken every 10 s.



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



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



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

2.2 Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase

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

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

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

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

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

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

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

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

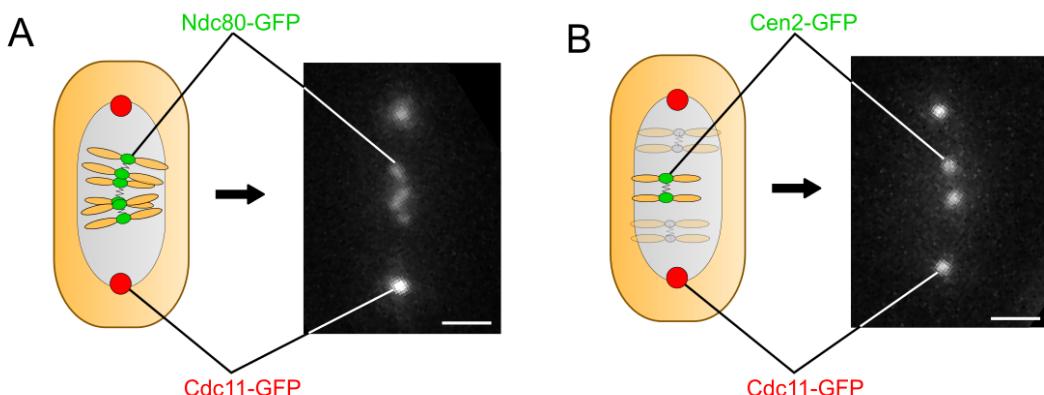


Figure 2.1: Image en microscopie à fluorescence de deux fuseaux mitotiques. **A.** Cellule marqué en GFP pour les six kinétochères (Ndc80-GFP, en vert sur le schéma) et pour les pôles (Cdc11-GFP, en rouge sur le schéma). **B.** Cellule marqué en GFP pour le centromère du chromosome II (Cen2-GFP, en vert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

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

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

2.2.1.1 Détection par fit gaussien

En imagerie on définit un blob comme étant « une région d'une image formée par un ensemble de pixels connectés spatialement ». Plus communément un blob est un point qui correspond à une région intéressante de l'image. Par exemple, Figure 2.1B contient quatre blobs, deux correspondant aux pôles du fuseau mitotique et deux autres correspondant à la partie péri-centromérique des deux chromatides sœurs du chromosome II. L'étape de la détection est d'arriver à obtenir les propriétés géométriques de ces quatre objets (position, largeur et intensité).

L'un des algorithmes les plus utilisés pour la détection de blob se base sur la convolution de l'image par un noyau Gaussien suivi de l'application de l'opérateur Laplacien (on parle de « Laplacian of Gaussian » en anglais¹). Cette approche est très précise mais est aussi très sensible au paramètre d'échelle, c'est à dire que son résultat va fortement dépendre de la relation entre la taille des structures des blobs et la taille du noyau gaussien.

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

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

Une implémentation existe dans le plugin TrackMate inclus dans Fiji (Schindelin et al., 2012). Son code est librement disponible.²

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

Enfin un autre algorithme de détection de blob a aussi testé durant ce travail. Il est basé

¹https://en.wikipedia.org/wiki/Blob_detection#The_Laplacian_of_Gaussian

²<http://git.io/vC9zf>

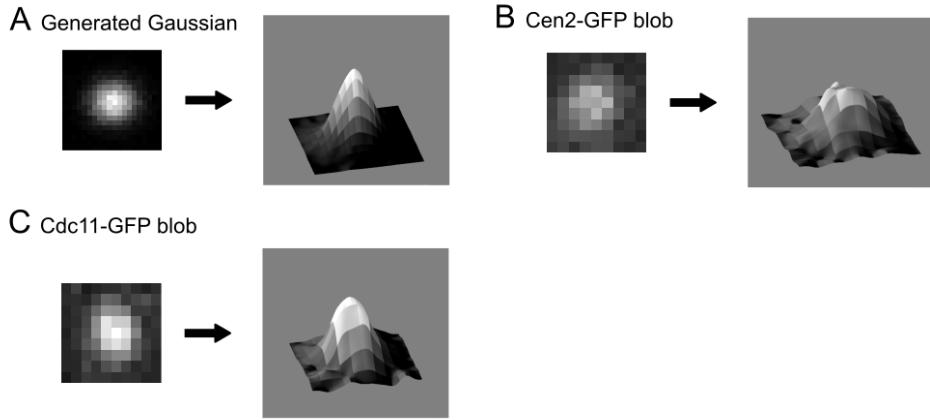


Figure 2.2: Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions. **A.** Cet image a été générée *in silico* par l'échantillonnage aléatoire d'une distribution gaussienne. Le surface plot (image de droite) contient une dimension supplémentaire en z dont la hauteur est proportionnelle à l'intensité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

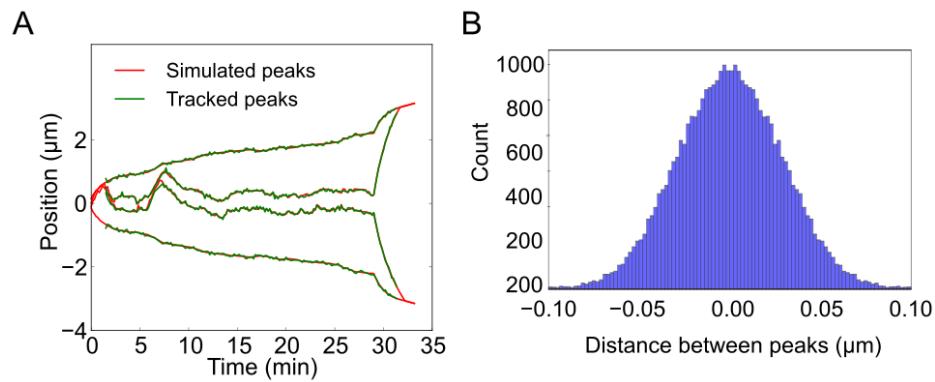


Figure 2.3: Précision de la détection des blobs. **A.** Superposition d'une trajectoire de chromosome et pôle simulée *in silico* (en rouge) avec la trajectoire reconstruite par détection de blob (en vert). **B.** Distribution de la distance entre les blobs simulés et les blobs détectés.

sur le travail de Sergé et al. (Sergé et al., 2008) dont le principal atout consiste à être capable de détecter plusieurs blobs très proche les uns des autres comme cela peut être le cas lorsque on visualise les six kinétochores de la levure à fission (Figure 2.1A).

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

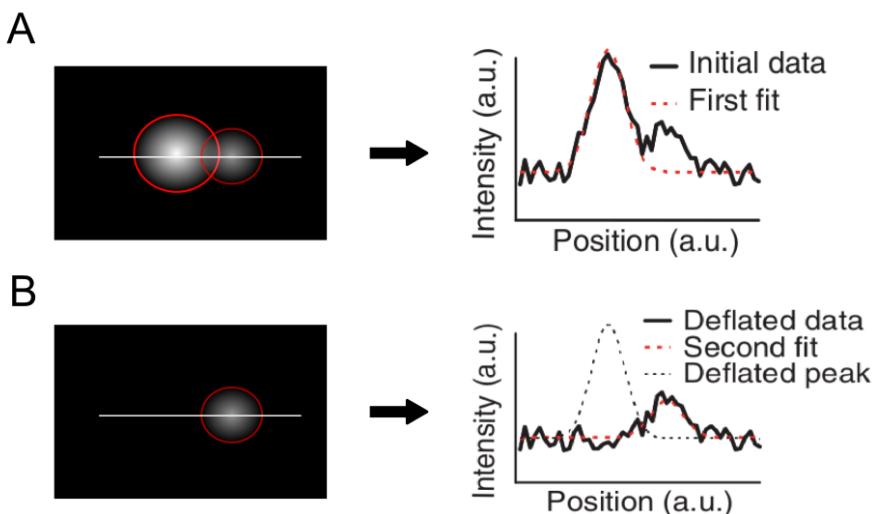


Figure 2.4: Principe de l'algorithme de détection de blob par déflation. **A.** Le premier tour de fit gaussien détecte le blob le plus grand et le plus intense. **B.** Une fois le premier blob détecté soustrait de l'image source, le second tour de fit gaussien détecte le blob plus petit et moins intense.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

Une implémentation en Python de cet algorithme est librement disponible en ligne.³

Deux raisons ont empêchés cet algorithme d'être utilisé dans le cadre de ce travail. La première est que l'implémentation en Python est beaucoup plus lente (quasiment un facteur 100) que la détection de blob proposée par le plugin TrackMate. Afin de remédier à cela il faudrait ré-implémenter l'algorithme de façon plus efficace, probablement en utilisant un langage plus bas niveau tel que Cython ou le C. Cette perte de temps aurait pu éventuellement être acceptable si la détection de blobs superposés dans les images à six kinétochores (Figure 2.1A) fonctionnait bien. Or l'algorithme de déflation ne donne pas de résultat convaincant comparé à celui proposé par TrackMate (Figure 2.5). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la déflation est réellement efficace sur des sondes à molécules unique (« Single Particle Tracking » ou aussi SPT en anglais) et non pas des agrégats de multiples sondes fluorophores comme c'est le cas pour Cen2-GFP.

³<http://git.io/vCHGs>

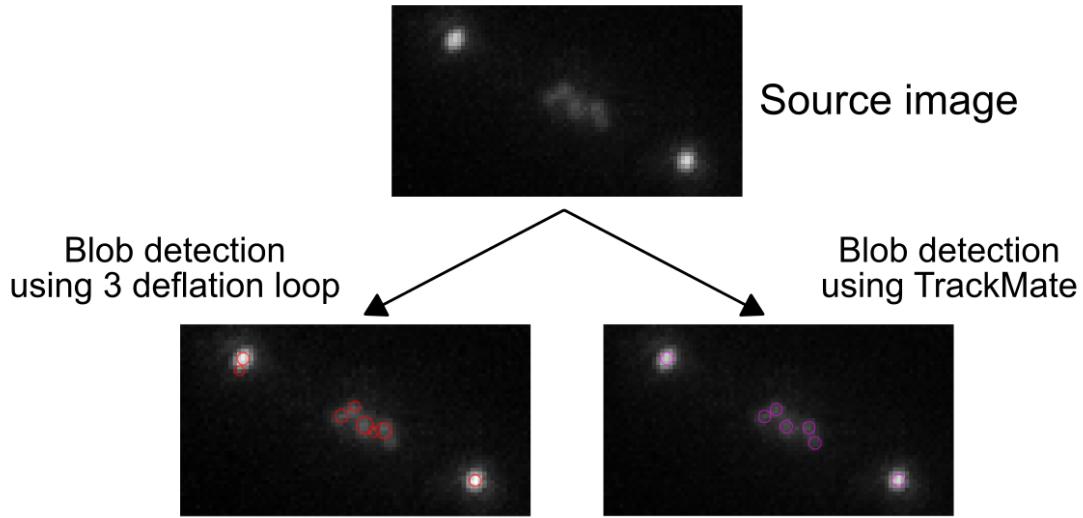


Figure 2.5: Comparaison entre le LoG détection de TrackMate et l’implémentation par déflation basé sur l’algorithme de Sergé et al. Aucun des deux algorithmes n’arrivent à détecter les six kinétochores et les deux pôles. Par contre l’algorithme de TrackMate (à droite) détecte cinq kinétochores et les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

Une fois les blobs détectés pour chaque pas de temps, il faut encore relié chaque blob avec son blob correspondant dans le temps afin d’obtenir les trajectoires uniques de chaque chromosomes et des pôles; c’est l’étape de tracking.

2.2.1.2 Reconstruction des trajectoires

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

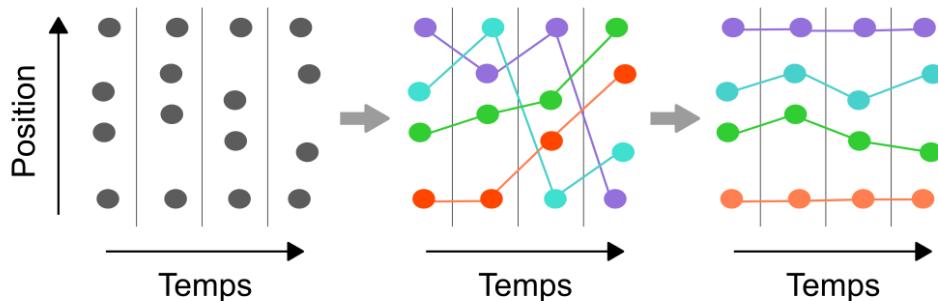


Figure 2.6: Le tracking est l’étape de liaison des objets d’intérêts dans le temps. Sans cette étape il est impossible de savoir si un objet est le même que un autre dans deux temps différents.

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

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

Trois chromosomes

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

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

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

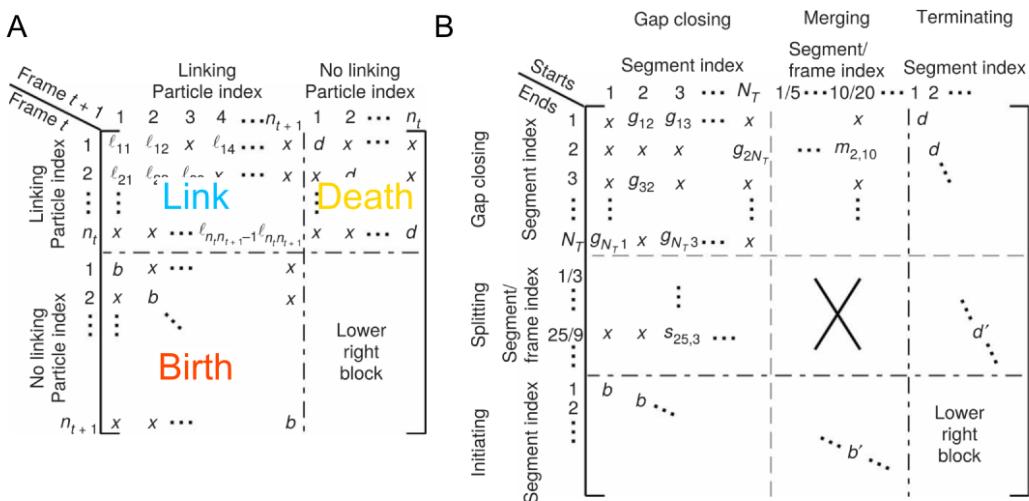


Figure 2.7: Les deux matrices de coût du LAP tracker. **A.** Matrice de coût contentant l'ensemble des liens possibles entre deux blobs pour deux pas de temps successifs t et $t + 1$. Il existe donc autant de cette première matrice que de pas de temps dans la trajectoire. Le bloc en bas à droite (LRB)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

Dans la première matrice (Figure 2.7A), chaque ligne et colonne correspond à un blob allant de de 1 à n_{t+1} pour deux pas de temps successifs t et $t + 1$. Chaque intersection de la matrice va contenir un score qui va mesurer la probabilité que l'événement en question arrive. Par exemple pour le bloc en haut à gauche (le bloc de liaison), chaque case correspond à un événement de liaison entre les deux blobs correspondant. Tandis que dans le

bloc en bas à gauche, le score correspond à la probabilité que ce blob soit le premier d'un trajectoire (c'est à dire qu'il n'est lié à aucun autre blob dans le passé), on parle alors de « birth ». Le bloc en haut à droite correspond aux probabilités de mort d'une trajectoire, c'est à dire que le blob soit le dernier d'une trajectoire (pas de liaison dans le futur), on parle alors de « death ».

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

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

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

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

On observe que certains morceaux de trajectoires sont correctement reconstruits. Cependant dans les deux reconstructions, les six kinétochères ne sont jamais clairement visibles. Soit certains sont superposés à d'autre et donc ils apparaissent comme un unique blob, soit certains d'entre eux sortent du champ focal du microscope. Il est très compliqué de différencier entre les deux scénarios.

Afin d'obtenir des trajectoires exactes de chromosomes tout au long de la mitose l'une des solutions est d'imager seulement les deux kinétochères d'un seul chromosome.

Un chromosome

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

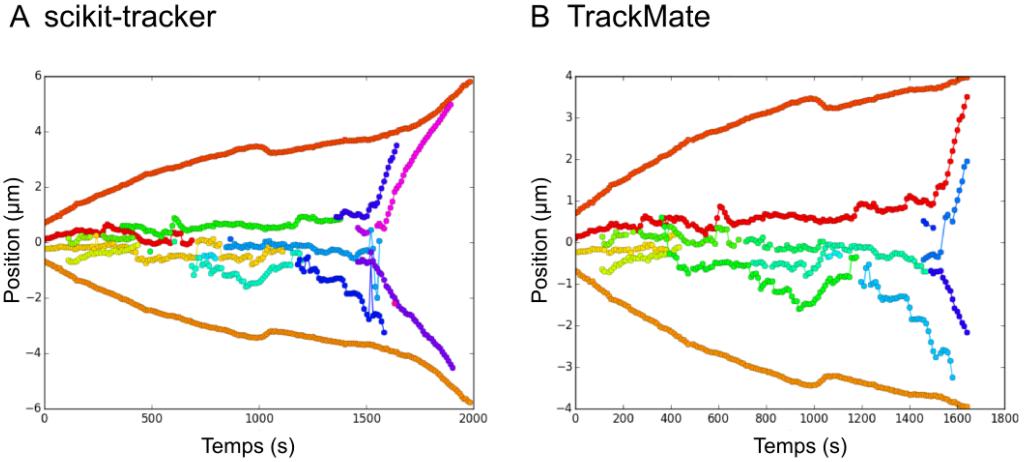


Figure 2.8: Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochères. **A.** La reconstruction est basé sur une implémentation développé dans le cadre de cette étude appelé scikit-tracker. **B.** Reconstruction avec le plugin Fiji nommé TrackMate.

majorité des cas.

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

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

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

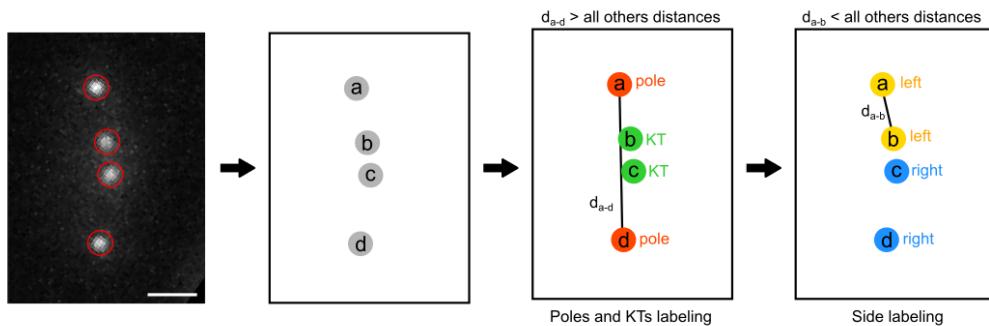


Figure 2.9: Algorithme de tracking pour un chromosome.

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

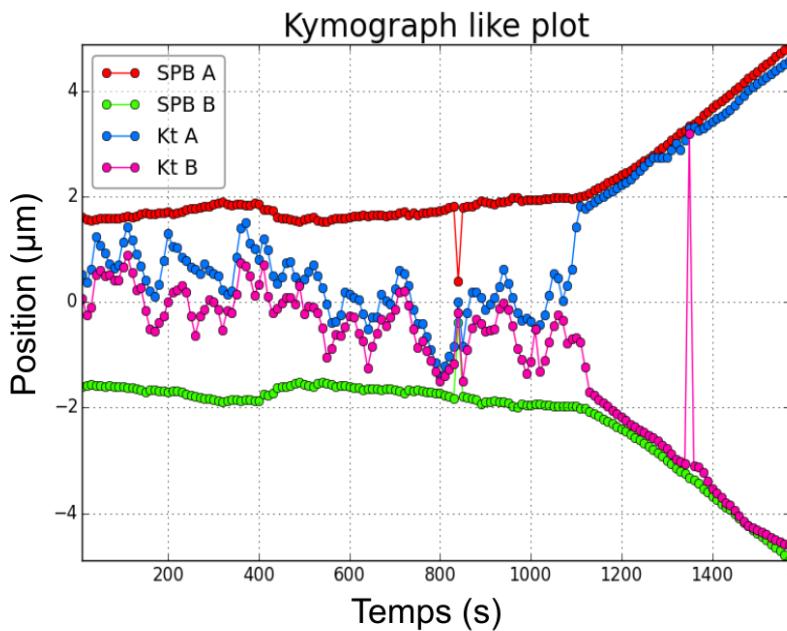


Figure 2.10: Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ces deux pôles.

Interface de correction manuelle des trajectoires

Afin de pouvoir facilement corriger les trajectoires des chromosomes contenant des erreurs qu'ils auraient été dommage d'écartier de l'analyse, il a été développé une interface graphique de correction manuelle. Cette interface écrite en Python est basé sur la bibliothèque pyqtgraph.⁴ Son code est librement disponible.⁵

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

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

⁴www.pyqtgraph.org

⁵<http://git.io/vCNxh>

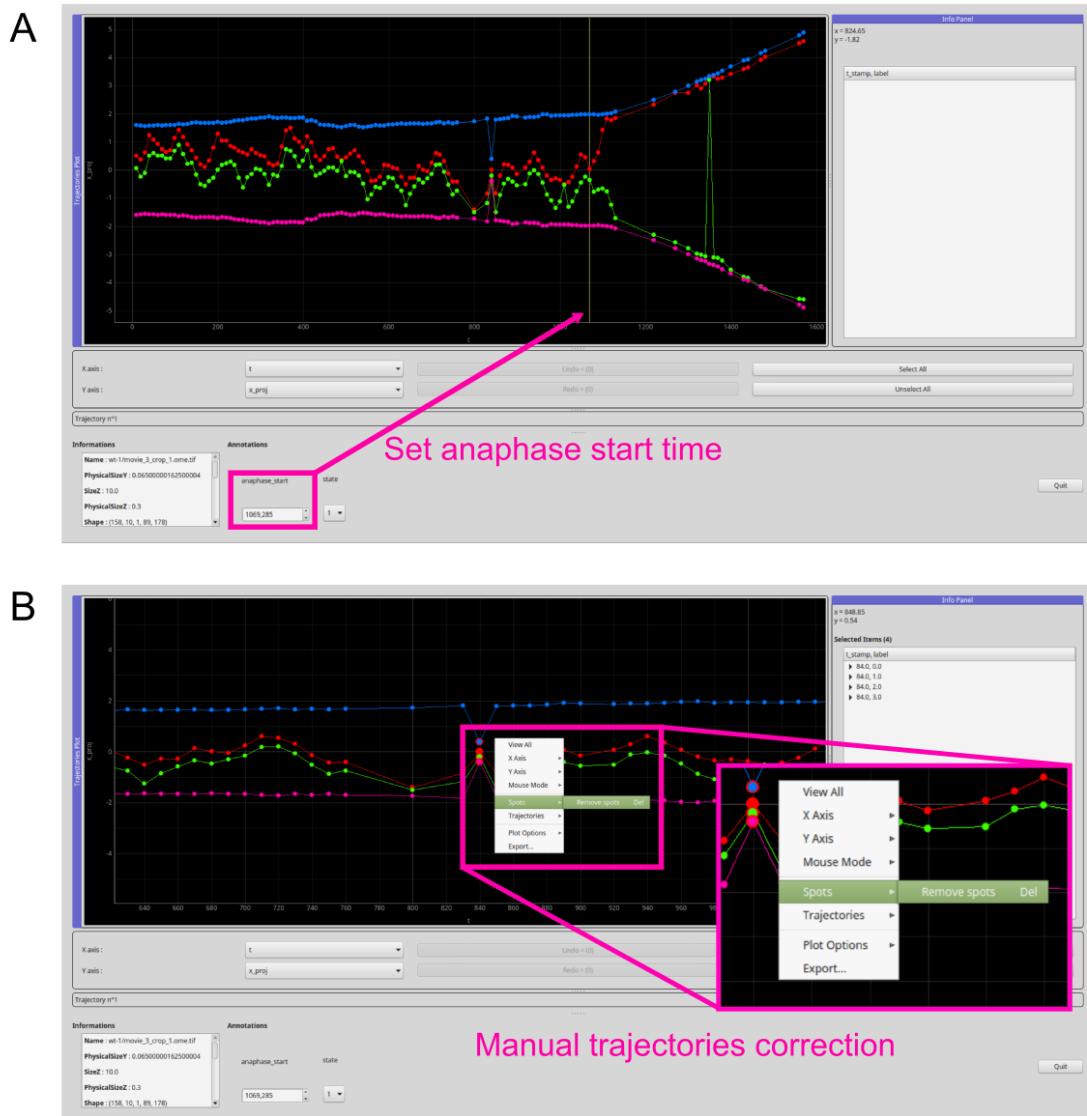


Figure 2.11: Interface graphique de correction manuelle des trajectoires. **A.** Le début de l'anaphase peut être modifier manuellement. **B.** Chaque trajectoire peut être modifiée à l'aide d'une interface simple et intuitive.

2.2.1.3 Résumé du workflow de reconstruction des trajectoires

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

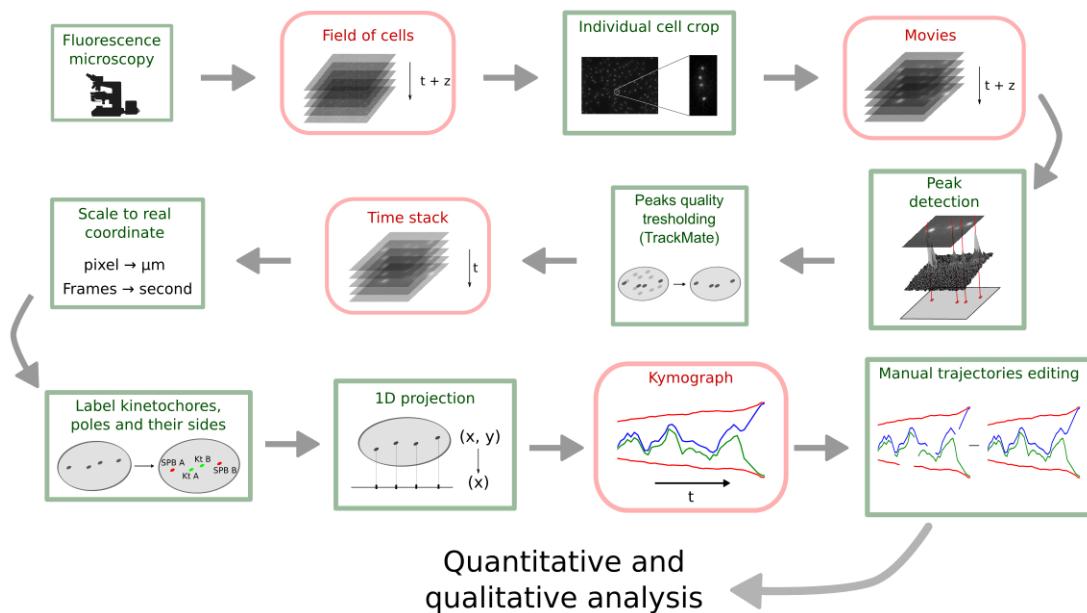


Figure 2.12: Workflow de reconstruction des trajectoires. Deux étapes nécessitent une intervention manuelle. Suite à la détection de blobs (peaks) et après la reconstruction automatique des trajectoires.

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

2.2.2 L'état de cohérence du mouvement des kinétochores frères

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

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

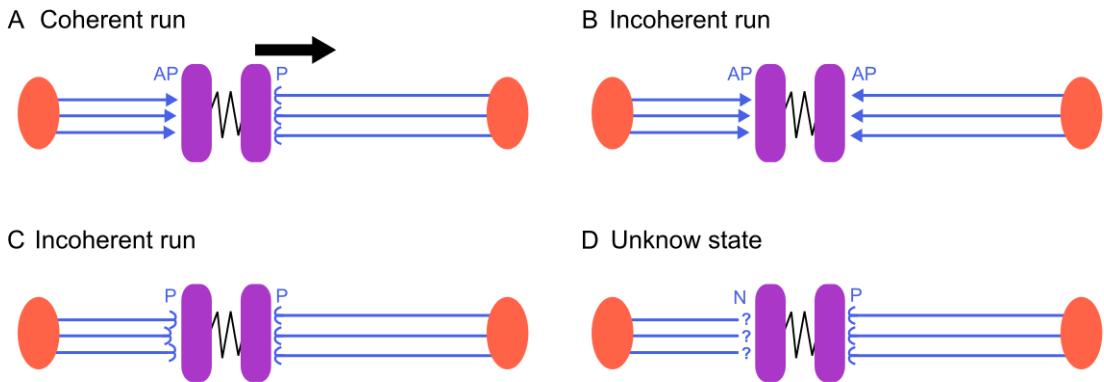


Figure 2.13: Schéma de mouvement cohérent et incohérent des kinétochores frères. **A.** Les deux kinétochores frères sont dans des états poleward et anti-poleward, le mouvement est cohérent. **B** et **C.** Les deux kinétochores frères sont dans le même état poleward ou anti-poleward, le mouvement est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

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

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

Où n_p et n_{AP} sont le nombre de pas de temps contenant un état poleward et anti-poleward dans la fenêtre de temps de taille w . L'état est déterminé en regardant le signe du mouvement en fonction de la position du pôle. Les pas de temps avec $S_i < -S^*$ sont assignés comme P. Les pas de temps avec $S_i > S^*$ sont assignés comme AP. Les paramètres ont été fixé manuellement avec $S^* = 0.15$ et $w = 10$ (avec $dt = 100ms$). Si $-S^* < S_i < S^*$ alors le pas de temps est considéré comme n'ayant pas de direction (N).

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

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

Si on compare les états de cohérence de plusieurs cellules dans différentes conditions (Figure 2.15) on observe que le mutant kinésine-8 ($klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$) passe plus de temps dans un état incohérent que des cellules sauvages. Plus précisément le mutant

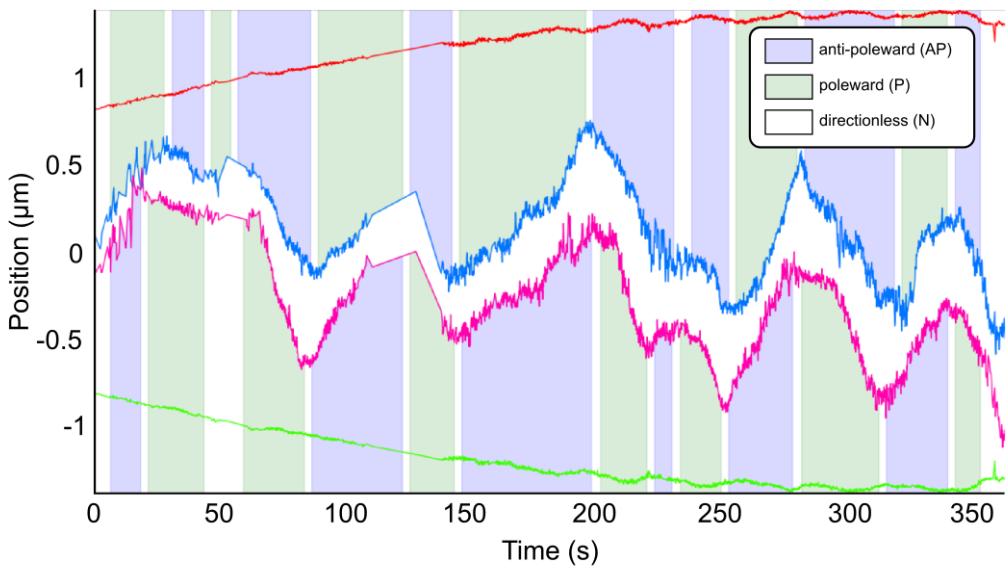


Figure 2.14: Direction des kinétochores frères en métaphase. Trajectoires des pôles (rouge et vert) et des kinétochore frères (bleu et rose) en métaphase dans une cellule sauvage. Le pas de temps de l'acquisition est de 100ms.

kinésine-8 semble passer plus de temps dans l'état incohérent AP-AP alors que l'état P-P semble être le même que dans les cellules sauvages.

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

La distance inter-kinétochore entre les deux kinétochores peut être un bon moyen pour quantifier la tension exercée sur les kinétochores par les microtubules. De cette façon, en observant la distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions, on voit que de manière assez subtile la distribution des distances pour un état cohérent (AP-P) a une moyenne de environ 400nm dans toutes les conditions. Elle semble par ailleurs très légèrement supérieure pour l'état incohérent P-P et très légèrement inférieure pour l'état incohérent AP-AP. Bien que ces résultats ne soit pas significatif, ils pourraient supporter l'idée qu'un mouvement AP implique une force de poussée tandis qu'un mouvement P implique une force de traction sur le kinétochore.

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

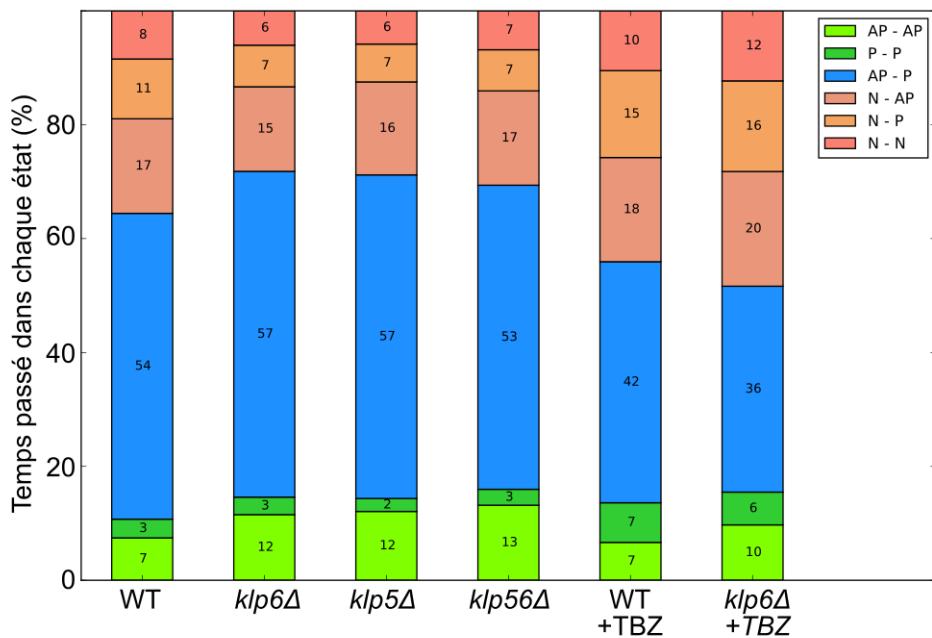


Figure 2.15: Temps passé dans les différents états de cohérence dans différentes conditions. WT désigne une cellule sauvage. *klp6Δ*, *klp5Δ* et *klp56Δ* désigne différents mutants de la kinésine-8 qui possède tous le même phénotype (voir Section 2.1 pour plus de détails). TBZ désigne une drogue, le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

plus que la différence observée. De plus la sonde ne se situe pas dans l'axe des deux kinétochères frères ce qui signifie qu'une traction ou une poussée sur cet axe pourrait bien être invisible en mesurant la distance entre les sonde Cen2-GFP.

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

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

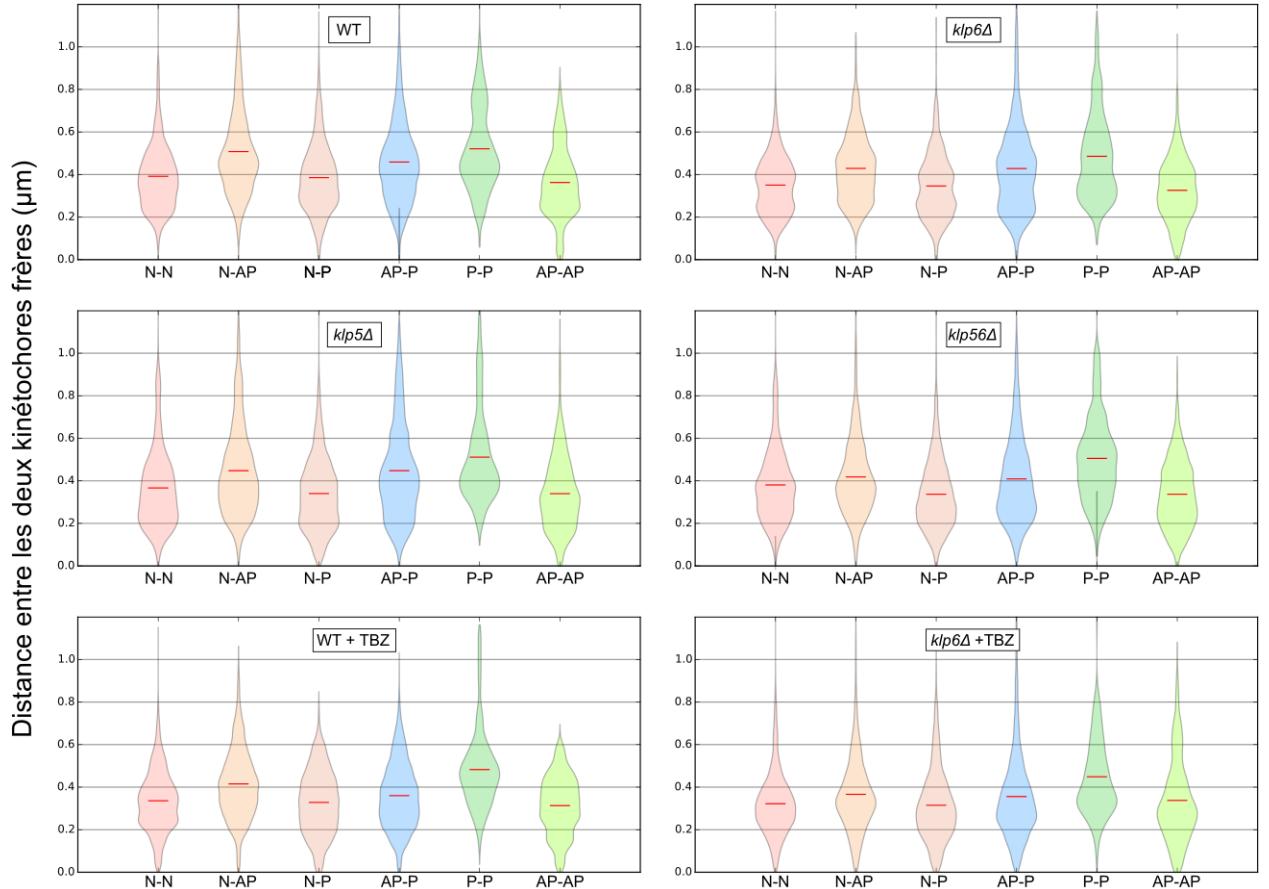


Figure 2.16: Distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions. La barre rouge des violin plots désigne la moyenne. WT désigne une cellule sauvage. *klp6Δ*, *klp5Δ* et *klp56Δ* désignent différents mutants de la kinésine-8 qui possède tous le même phénotype (voir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

2.2.3 Analyse du mouvement par « Mean Square Displacement »

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

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

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

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

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

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

- pour un mouvement diffusif (mouvement brownien) :

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

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

- pour un mouvement confiné et diffusif :

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

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

- pour un mouvement dirigé :

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

Où v est la vitesse de la particule.

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

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

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

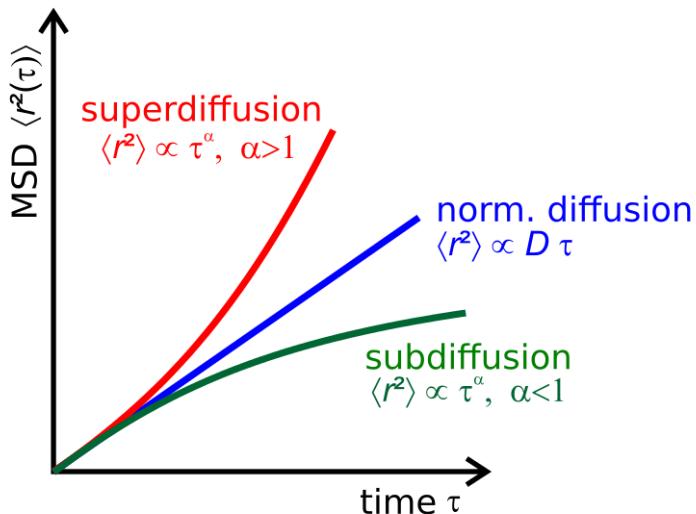


Figure 2.17: Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques. Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMsd_anomalous_diffusion.svg

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

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

Par exemple on peut simuler un mouvement brownien et un mouvement dirigé en deux dimensions (Figure 2.18A,B). On observe que dans le cas d'un mouvement brownien, l'aire

explorée (la MSD) est beaucoup plus petite pour un même délai que dans le cas d'un mouvement dirigé.

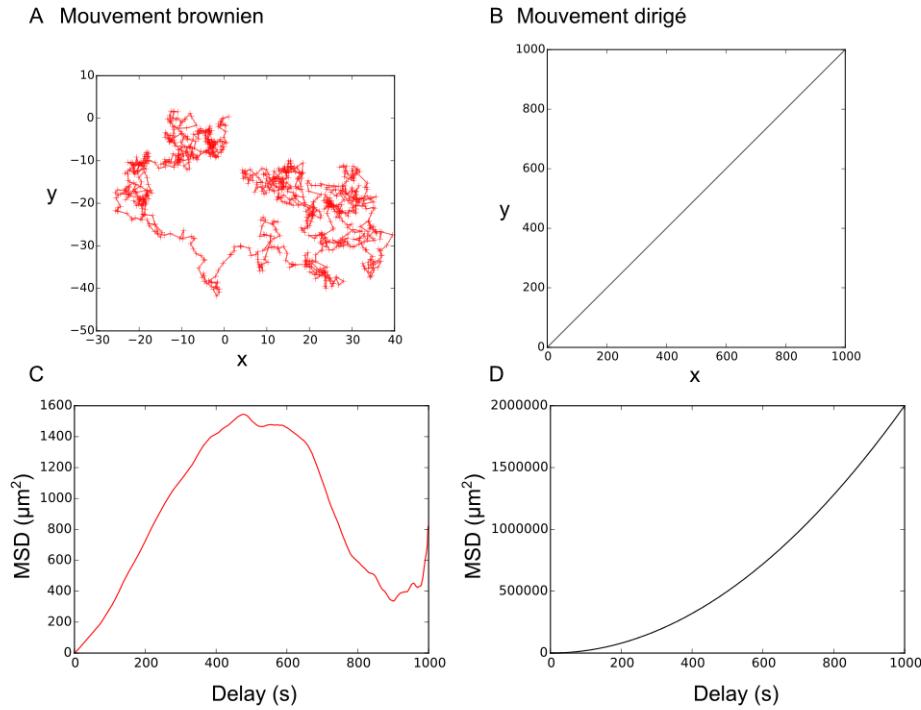


Figure 2.18: Exemple de MSD pour un mouvement dirigé et un mouvement brownien simulé. **A** et **B**. Évolution des positions d'une particule en deux dimensions dans le cas d'un mouvement respectivement brownien et dirigé simulé. **C** et **D**. MSD correspondant aux mouvements en **A** et **B**.

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

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

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

L'observation des MSD de différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions (Figure 2.19 et Figure 2.20 pour une visualisation en log-log) fait apparaître une sur-diffusion des trajectoires dans les cellules sans kinésine-8 ($klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$) ce qui

concorde avec une augmentation de l'amplitude (voir Section 2.1) ainsi qu'une perturbation de l'état de cohérence du mouvement des kinétochores frères.

On peut aussi observer que les trajectoires avec TBZ sont très largement sous diffusives comparées aux trajectoires sans TBZ. Ceci qui confirme qu'une force net plus faible est appliquée dans ces conditions dû à un attachement plus faible des kinétochores aux microtubules. Les kinétochores sera alors dans un confinement forcés du fait des moindres forces s'exerçant sur elles. Cette observation confirme que l'attachement est primordiale dans la génération de la force au niveau du kinétochore.

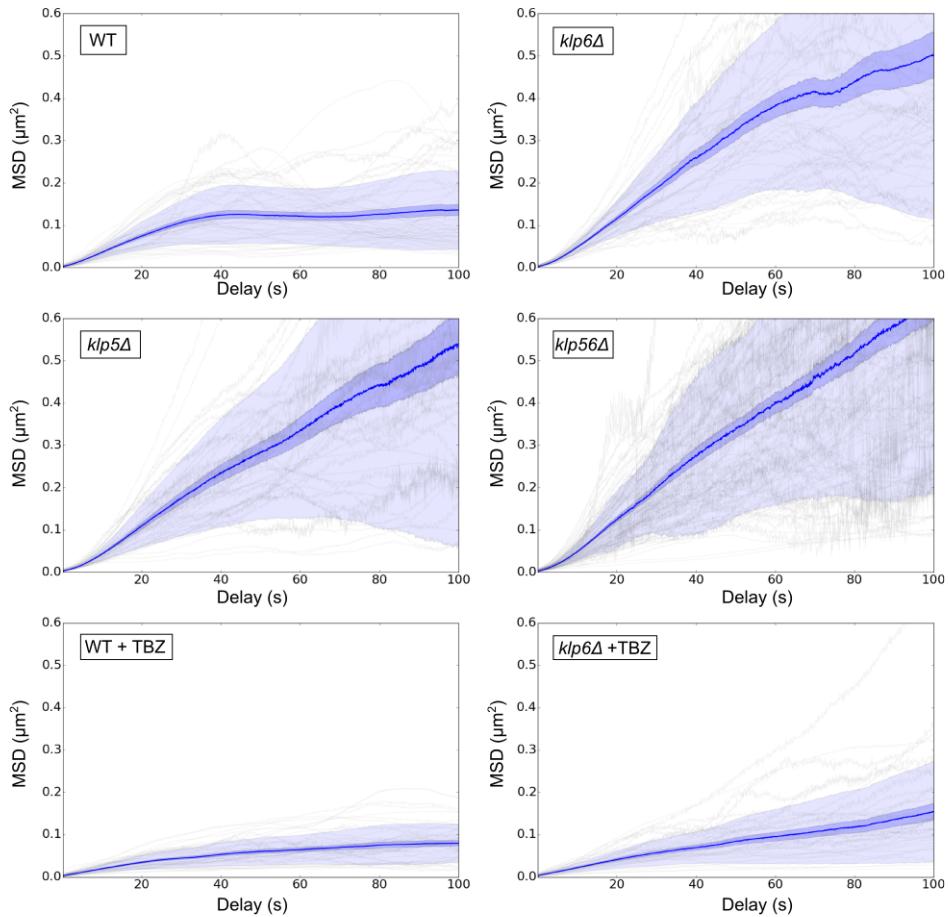


Figure 2.19: MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La ligne bleu foncé représente la MSD moyenne pondérée par le nombre de pas de temps pour un délai donné. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente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

La visualisation en log-log (Figure 2.20) permet de voir de manière plus précise ce qui se passe aux temps courts. Il est ainsi possible d'observer que toutes les MSD pourraient posséder trois temps caractéristiques (Figure 2.21) :

- Un premier temps allant jusqu'à 0.3s (en orange) pourrait traduire l'effet des différents processus aléatoires sur le mouvement (mouvement brownien, bruit blanc de la mesure, etc).
- De 0.3s à 2s (en vert), la pente chute brusquement (Figure 2.21), ce qui pourrait être la signature de la mesure de Cen2-GFP qui bougerait de la même manière qu'une particule confinée dû à son éloignement au point où s'exerce les forces au niveau du kinétochore et à l'état faiblement rigide de la chromatide.
- De 2s à 40s (en bleu), la pente augmente (Figure 2.21) ce qui pourrait traduire l'effet du la force appliquée au niveau des kinétochores. Cette pente serait alors caractéristique d'un mouvement dirigé.

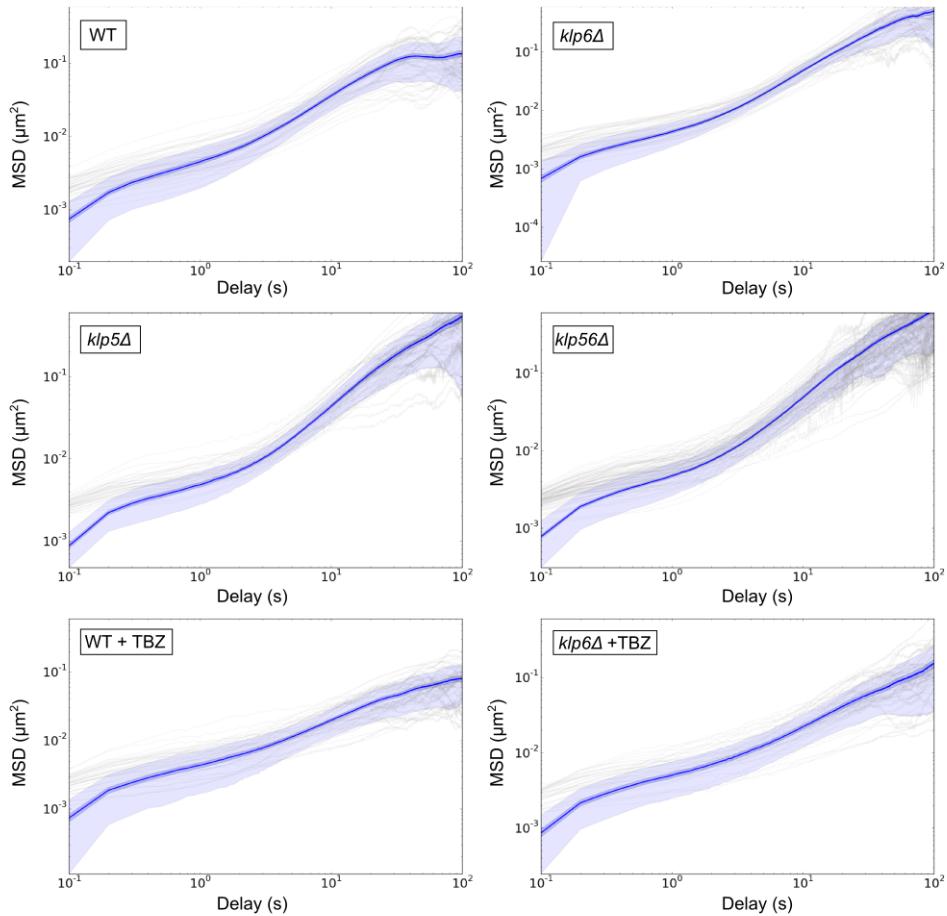


Figure 2.20: MSD en log-log pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente la déviation standard. Les MSD en gris correspondent aux MSD individuelles de chacune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

Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que dans les MSD avec TBZ, la troisième pente (de 2s à 40s) est plus faible comparé aux MSD sans TBZ. Cela pourrait signifier que les

kinétochore en présence de TBZ sont moins soumis à une force possiblement dirigée par un processus de mouvement dirigé comme le confirme l'analyse des oscillations en Section 2.1. Pour confirmer ce résultat il faudrait mesurer cette troisième pente en faisant varier les concentrations de TBZ et regarder si une corrélation existe.

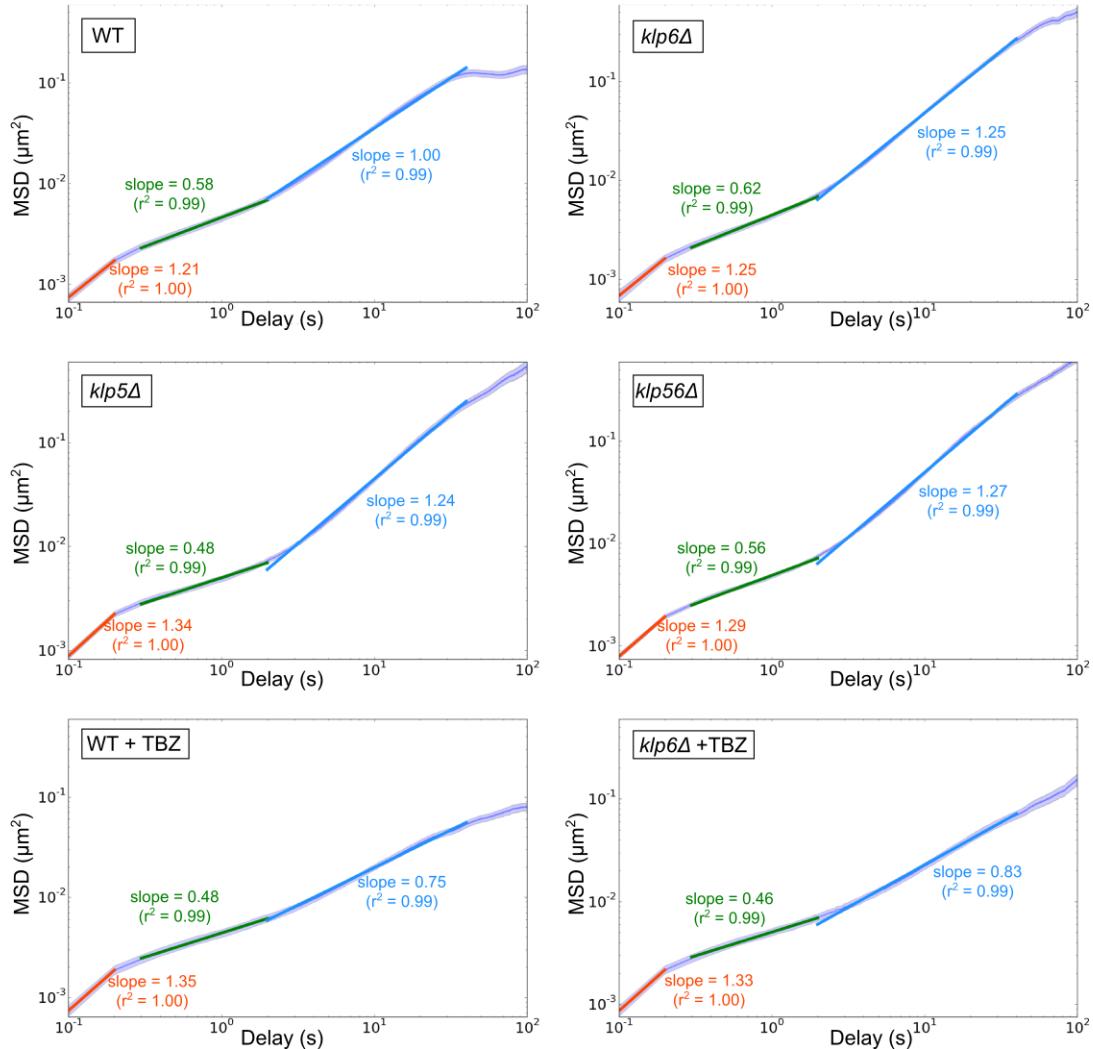


Figure 2.21: Régression linéaire sur des MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La régression linéaire a été faite en utilisant la fonction `scipy.stats.linregress` de la bibliothèque python `scipy`. Les temps choisis pour les trois différentes régressions sont : de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

Des analyses plus précises sont nécessaires pour pouvoir conclure sur les différents types de phénomène en jeu dans le mouvement des chromosomes. Il serait notamment intéressant de comparer le mouvement de Ndc80-GFP (situé au niveau du kinétochore) avec celui de Cen2-GFP.

Il pourrait être par la suite utile de modéliser à partir de ces différentes mesures les modèles de mouvement vus dans la section précédente. L'approche bayésienne semble être une approche intéressante dans ce type de problème (Monnier et al., 2012).

2.3 Modélisation bio-mécanique de la ségrégation des chromosomes

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

2.3.1 Modéliser la dynamique des chromosomes par une approche « force balance »

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

Le cadre théorique sur lequel est basé ce travail est une adaptation du modèle de Tournier et al.. Les deux sections suivantes détaillent l'approche physique utilisée dans ce modèle.

2.3.1.1 Types de forces en jeux

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

- les forces **magnétiques**, d'amplitude très faible au niveau moléculaire, sont provoquées par un champs magnétique qui s'applique sur des protons possédant un moment magnétique.
- un objet de masse m subit une force **gravitationnelle** de magnitude mg , où g est l'accélération causée par la gravité. Au niveau cellulaire cette force est très petite.
- une force **centrifuge** est subit par un objet en rotation. Sa magnitude vaut ma_c , où a_c correspond à l'accélération centrifuge. On peut aussi noter que la force centripète

est la force opposée à la force centrifuge qui empêche un objet en rotation de « fuir » le centre.

- une force **optique** est une force de collision correspondant à une pression optique dû au moment cinétique des photons. Les photons peuvent donc exercer une force quand ils sont diffractés par un objet. Cette force est très faible dans la nature, par exemple si une molécule absorbe 10^9 photons par seconde (cela correspond à un laser puissant), la force optique ne sera que de $10^{-6} pN$.
- les forces **thermiques** sont un autre type de force de collision dues au choc sur un objet par une multitude d'objets de taille plus faible. Par exemple une protéine en suspension dans de l'eau va subir une force thermique à cause du choc des molécules d'eau à sa surface. L'ensemble des collisions provenant de toutes les directions, ils en résultent une force totale net aléatoire. La force appliquée sur une protéine de $100 kDa$ est de l'ordre de $500 pN$. Cette force gouverne un processus physique appelé mouvement brownien ou encore marche aléatoire.
- les forces **électrostatiques** s'appliquent à une particule chargé q par un champ électrique E . Elle est de magnitude $F = qE$. Ces forces sont à l'origine du lien qui attache les différents atomes d'une molécule.

La nature très diverse de ces forces ainsi que la difficulté à les mesurer à des échelles microscopiques les rend difficilement utilisable pour l'étude des processus cellulaires et subcellulaires (TODO: C'EST VRAI CE QUE JE RACONTE LA ?).

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

D'après la seconde loi de Newton, la masse provoque une accélération constante égale à $a = F/m$ où a est l'accélération, F la force appliquée et m la masse (Figure 2.22). Si on définit l'accélération a comme étant la dérivée première de la vitesse v et la dérivée seconde de la position x par rapport au temps t , on a :

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

Un amortisseur est un élément mécanique qui répond à une force appliquée en se déformant à vitesse constante avec une magnitude de $v = F/\gamma$, où γ correspond au coefficient

de viscosité (Figure 2.22). Cet objet idéal est utilisé pour modéliser le mouvement d'un objet dans un fluide comme par exemple une cuillère qu'on insère dans un pot de miel. L'action de tirer rapidement la cuillère hors du pot, peut soulever le pot à cause du coefficient de viscosité élevé du miel qui va contrer la force de la cuillère tirée de manière proportionnelle à la vitesse.

Enfin un élastique est un élément mécanique qui s'allonge en réponse à une force. L'allongement d'un élastique par rapport à sa longueur de repos est égale à $L = F/\kappa$, où κ la constante d'élasticité et L l'allongement (Figure 2.22). Si la constante d'élasticité est indépendante de la force ou de l'extension, on dit que l'élastique suit la loi de Hooke.

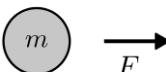
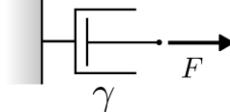
Type d'élément mécanique	Schéma	Equation	Ordre de grandeur
masse		$F = ma$	10^{-9} pN
amortisseur		$F = \gamma v$	1-1000pN
ressort		$F = \kappa x$	1-100pN

Figure 2.22: Schéma des trois éléments mécaniques fondamentales : la masse, l'amortisseur et le ressort (adapté de Howard (2001)). Les ordres de grandeurs correspondent à la magnitude des forces rencontrées au niveau moléculaire : forces élastiques pour le ressort, forces visqueuses pour l'amortisseur et force gravitationnelles pour la masse.

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

2.3.1.2 L'équation du mouvement

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

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

Où le premier terme inertiel est la seconde loi de Newton, le second terme correspond aux forces visqueuses et le troisième terme est du aux forces élastiques. F correspond à toutes les autres forces externes appliquées au système (Figure 2.23).

Equation du mouvement (en milieu très visqueux)

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

force
inertiel force
visqueuse force
élastique

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

\downarrow

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

Figure 2.23: L'équation du mouvement décrit l'évolution spatial d'un objet au cours du temps sous l'action de plusieurs forces appliquées sur lui. Le terme inertiel peut être omis dans le cas d'un objet évoluant dans un système très visqueux pour des nombres de Reynolds très bas.

Le terme inertiel étant une dérivée seconde de la position par rapport au temps $\frac{dx^2}{dt^2}$, sa résolution numérique ou algébrique peut être complexe et rendre les temps de calcul relativement long (C'EST BIEN DE METTRE CA???).

Il est possible d'approximer l'équation du mouvement en enlevant le terme inertiel lorsqu'on étudie des systèmes où la force inertiel est négligeable par rapport aux forces visqueuses. Par exemple dans le cas d'un système évoluant dans un milieu très visqueux par rapport à sa masse comme dans une cellule. Ce rapport entre les deux forces est symbolisé par le nombre de Reynolds.

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

Où ρ est la densité du fluide, L la longueur caractéristique de l'objet, v sa vitesse et η sa viscosité. Quand $Re \ll 1$, cela signifie que les forces dues à la masse sont négligeables par rapport aux forces visqueuses, ce qui est le cas dans un système subcellulaire (Figure 2.23).

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

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

2.3.1.3 Application au fuseau mitotique

Dans le cas du fuseau mitotique, on identifie en premier lieu, l'ensemble des différents objets qui composent le fuseau tel que les pôles, les kinétochores, les sites d'attachement, etc. Ensuite on définit les propriétés visco-élastiques décrivant chacun des objets pour ensuite définir les forces appliquées sur le système. Par exemple la force due à un attachement élastique entre les deux kinétochores (qui correspond à la cohésine) va dépendre de la position relative des deux kinétochores l'un par rapport à l'autre et du paramètre de raideur κ qui caractérise la cohésine et qui peut être déterminé *in vivo* (Figure 2.24).

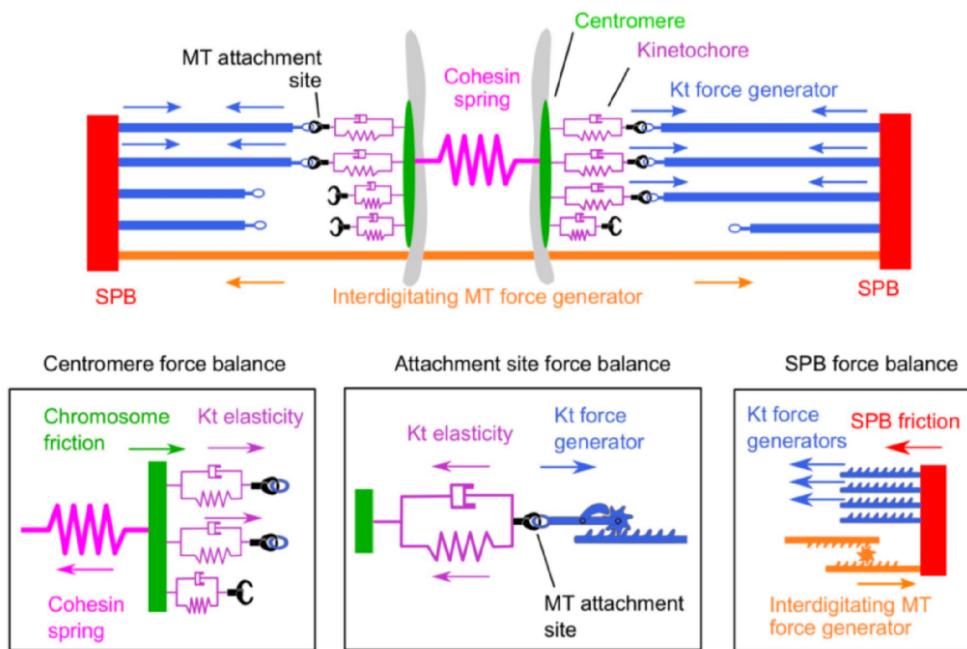


Figure 2.24: Le fuseau modélisé est composé de différents objets ayant des propriétés visco-élastique définies. On décrit aussi les forces appliquées sur les objets comme par exemple la force motrice qui tire sur un site d'attachement (en violet) quand un microtubule s'y attache (en bleu) (Gay et al., 2012)

Dans un système mécanique tel que celui-là, il est difficile de prédire la réponse du système aux forces appliquées. On assume donc qu'en chaque point de l'espace la somme des forces appliquées au système est nul :

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

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

On peut alors construire un système d'équation linéaire décrivant le système mécanique du fuseau mitotique (voir Gay et al. (2012) pour le système d'équation complet). La résolution numérique permet alors d'accéder aux trajectoires des kinétochores et des pôles (Figure 2.25).

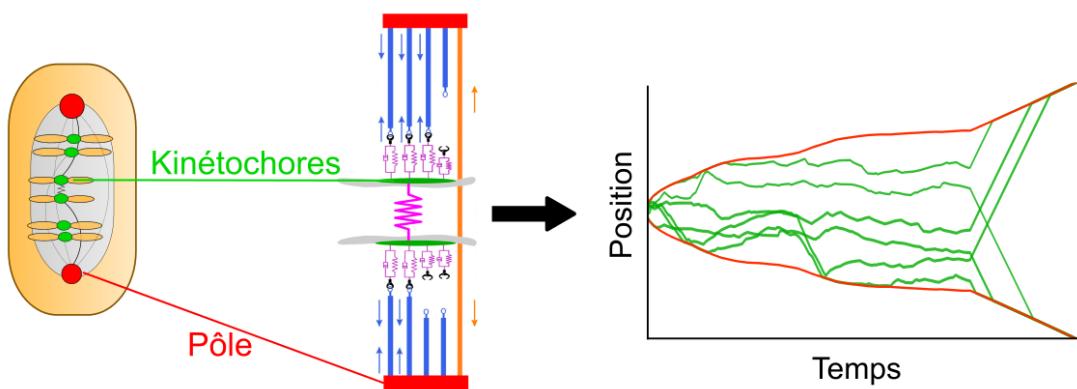


Figure 2.25: Une simulation numérique permet de résoudre l'équation du mouvement et ensuite accéder à l'évolution des positions de chaque objets au cours du temps.

2.3.1.4 Implémentation numérique

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

`kt_simul` a été conçu de manière à être facilement utilisable. Il est ainsi possible d'exécuter une simulation en une dizaine de ligne de codes. Différentes options sont disponibles pour récupérer ou visualiser les données générées par la simulation. Pour un exemple d'utilisation voir l'annexe en Section A.1.

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

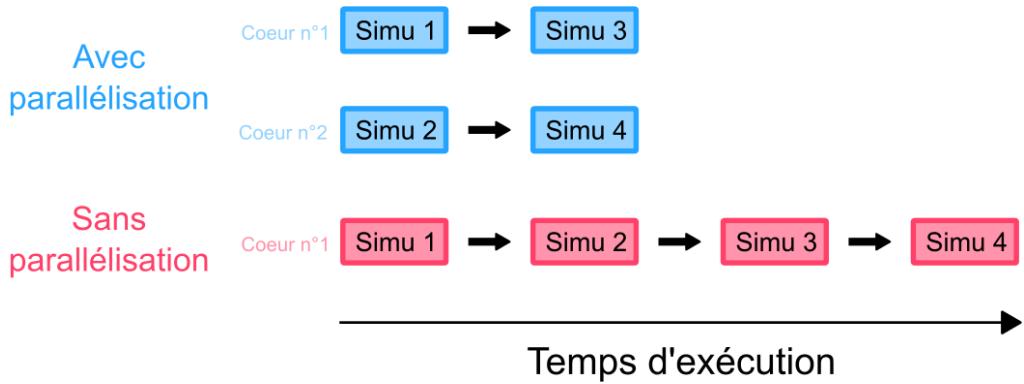


Figure 2.26: Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique. Différence de vitesse d'exécution théorique entre une implémentation parallélisée et une implémentation séquentiel. Un algorithme parallélisé (en bleu) utilise les différents cœurs de la machine pour exécuter plusieurs simulations en même temps. Donc une machine possédant deux cœurs exécute en théorie les quatre simulations deux fois plus vite qu'un algorithme non parallélisé (en rose).

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

2.3.2 Un modèle de congression alternatif

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

Il a par ailleurs été montré *in silico* qu'une force dépendante de la distance au pôle sur le kinétochore pouvait reproduire l'alignement des chromosomes *in vivo* (Figure 2.27 et Figure 2.28) en adaptant un modèle existant de la congression des chromosomes (Gay et al., 2012). Cette force dépendante de la longueur est gouverné par un seul paramètre L_{dep} qui caractérise l'amplitude de la dépendance en longueur de cette force. Elle a été optimisé afin de reproduire les distributions d'alignement *in vivo* (pour le détail de l'implémentation, se référer aux méthodes de l'article en Section 2.1).

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

Hypothesis 1 : Length-dependent pulling force

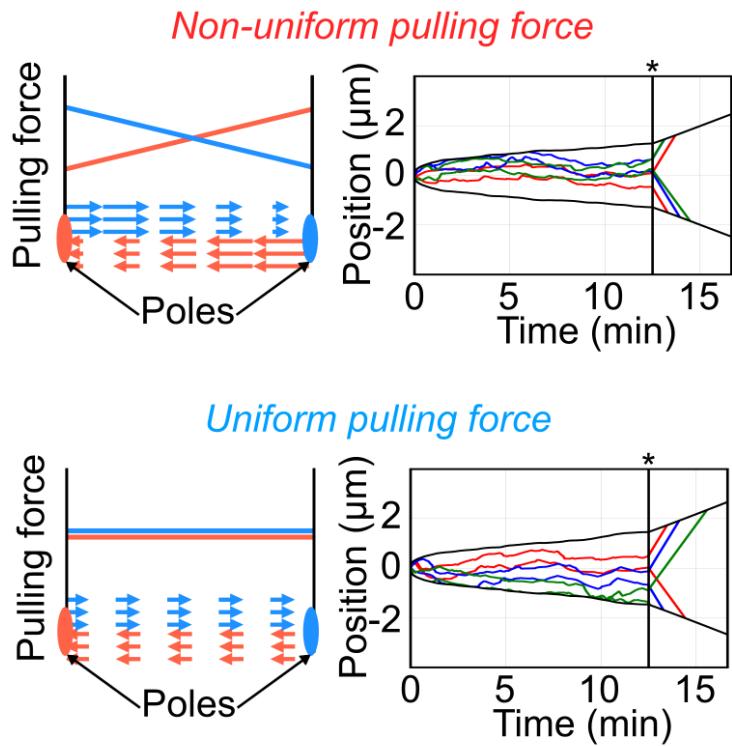


Figure 2.27: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans force dépendante de la longueur.

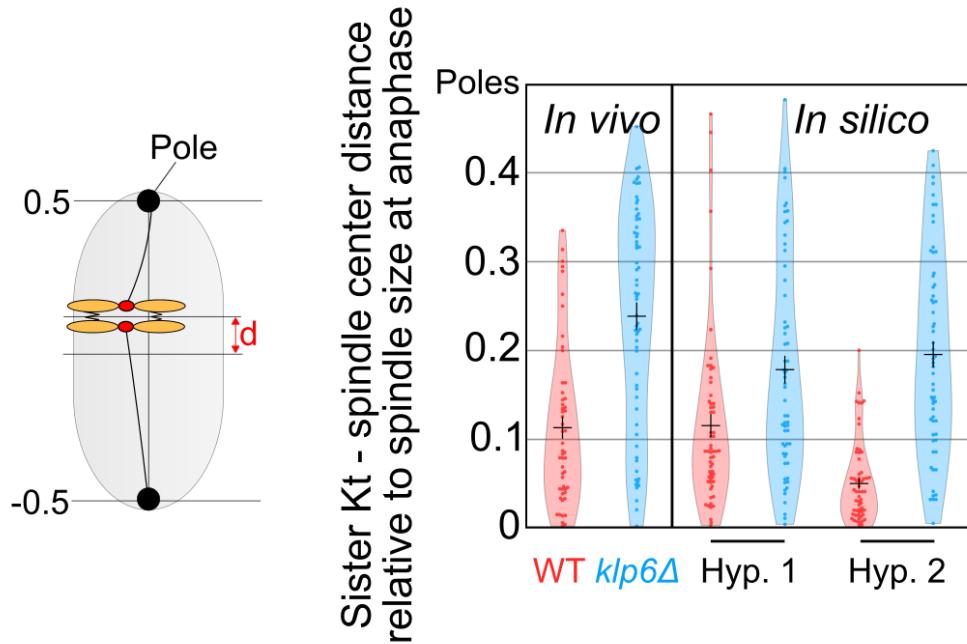


Figure 2.28: Distribution de l'alignement relatif des chromosomes en anaphase *in vivo* (dans les cellules WT, $n=52$ et $klp6\Delta$, $n=63$) et *in silico* pour l'hypothèse 1 (avec, $n=60$ ou sans la force dépendante de la longueur, $n=60$) et *in silico* pour l'hypothèse 2 (avec, $n=60$ ou sans la force dépendante de la longueur, $n=60$). Une distance proche de 0 signifie que le chromosome est positionnée au milieu du fuseau mitotique.

2014; Walczak et al., 2013).

La force dépendante de la longueur, décrite par l'hypothèse 1, peut donc s'expliquer par le fait que si un microtubule possède une densité plus élevée de kinésine-8 à une extrémité, il produira une force de traction plus élevée sur le kinétochore. Bien que cette hypothèse reproduise de manière fidèle l'alignement ainsi que les chromosomes retardataires en anaphase (Figure 2.28 et aussi Figure 7 de l'article en Section 2.1), le mécanisme proposé est encore très phénoménologique et le lien entre force de traction et kinésine-8 reste largement hypothétique.

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

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

Cette distribution non uniforme des extrémités plus des microtubules pourrait avoir été observée chez la levure à fission par des reconstructions 3D du fuseau mitotique en cryo-microscopie électronique (voir notamment la Figure 12 de Ding et al. (1993) ainsi que la Figure 1 de Ward et al. (2014)). Ce résultat reste cependant encore à confirmer dû aux déformations du fuseau que peut engendrer ce type de technique.

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

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

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

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

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

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

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

$n_{dep}(d_{KT})$ représente donc la distribution du taux d'attachement le long du fuseau mitotique. Il a été impossible de reproduire des trajectoires de chromosomes similaires à celles observées *in vivo* en faisant coïncider la distribution de $n_{dep}(d_{KT})$ avec les distribution de microtubule observées en cryo-microscopie électronique par Ding et al. (1993) et Ward et al. (2014).

Cependant il est possible de supposer une distribution hypothétique suivant une loi de Cauchy (Figure 2.29). Ce type de distribution est préféré par rapport à une distribution gaussienne plus classique à cause de sa longue queue qui permet de ne pas interdire les attachements proches des pôles. On définit $n_{dep}(d_{KT})$ comme suit :

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

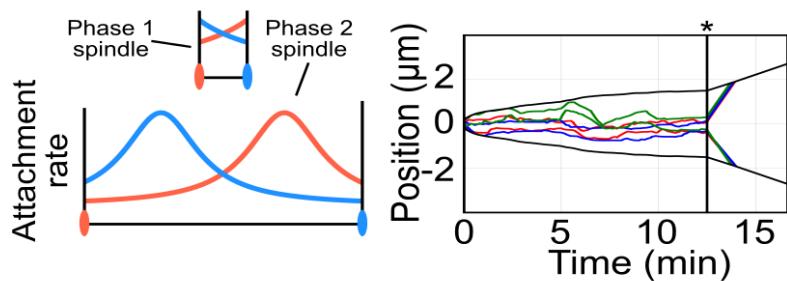
Où γ est le paramètre d'échelle (correspondant à la largeur de la distribution) et x_0 le paramètre de position qui représente la longueur médiane du microtubule. Afin de garder une valeur moyenne de $n_{dep}(d_{KT})$ proche de 1, on normalise le préfacteur n_{dep} par la valeur moyenne de la distribution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

L'implémentation de ce modèle (Figure 2.29) permet d'observer que cette hypothèse est aussi capable de reproduire l'alignement des chromosomes en mitose (Figure 2.28).

Aucun du modèle initial (Gay et al., 2012) ou bien des deux hypothèses développées ici ne sont cependant suffisantes pour reproduire l'amplitude des oscillation des chromosomes observées de la prométaphase à la métaphase (Jaqaman et al., 2010; Skibbens et al., 1993). Il semblerait donc qu'un autre mécanisme soit requis pour expliquer ce type de mouvement.

Hypothesis 2 : Length-dependent KT-MT attachment

Non-uniform attachment



Uniform attachment

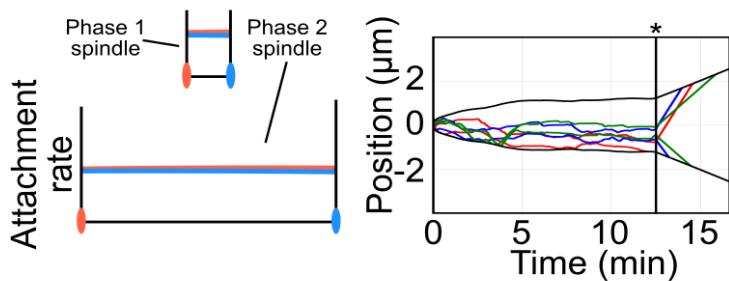


Figure 2.29: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans taux d'attachement dépendant de la longueur.

2.3.3 Vers un modèle d'attachement à trois états

TODO: LA GUILLAUME SI T'AS DES IDÉES PR RAJOUTER DES TRUCS, N'HESITE PAS. EN MEME TEMPS ON A EU PEU DE RESULTATS AVEC CA DC BON... APRES JE RESTE CONVAINCU QUE CETTE STRATEGIE EN Y PASSANT UN PEU DE TEMPS PEU DONNER DES TRUCS SYMPA SANS AVOIR A SORTIR L'ARTILLERIE LOURDE EN MOD-ELISANT LES MICROTUBULES ET NDC80 COMPLETEMENT.

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

On rappelle que le modèle initialement développé par Tournier et al. ne contient pas de structure pouvant s'apparenter aux microtubules *in vivo*. En effet, le système est composé d'un attachement à deux états, qui peut être; soit « ON » est produire une force en direction du pôle, soit « OFF » est ne produire aucune force (Figure 2.30). Le passage entre les deux états se fait de manière stochastique avec en plus deux mécanismes de corrections qui peuvent modifier les constantes d'attachement et de détachement (voir Gay et al. (2012) pour le fonctionnement de ces deux mécanismes de corrections).

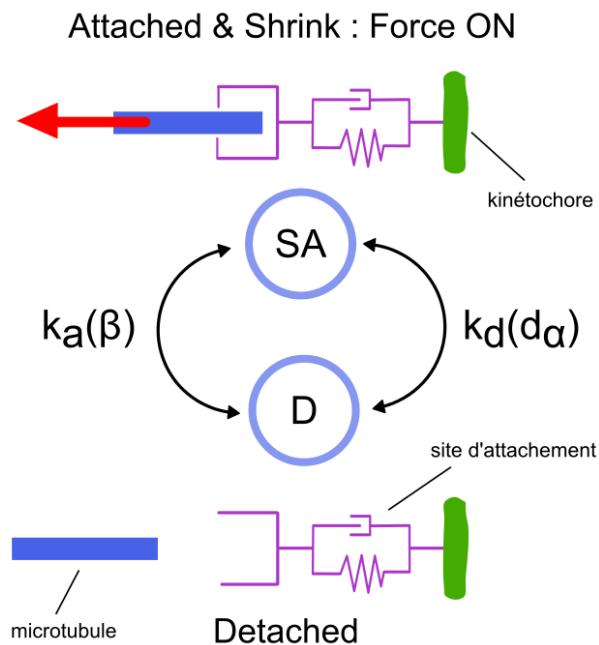


Figure 2.30: Modèle d'attachement à deux états. Le passage d'un état à l'autre se fait de manière stochastique et est régulé par deux mécanismes de corrections gouvernés par les deux paramètres β et d_α (Gay et al., 2012).

L'idée du modèle d'attachement à trois états est d'ajouter un niveau de flexibilité supplémentaire dans la dynamique des attachements et donc aussi dans la dynamique des forces

appliquées aux chromosomes dans le but de produire des mouvements oscillatoires tel que observés *in vivo*.

L'ajout d'un état permettrait au système de mieux « imiter » l'action des microtubules sur la dynamique des attachements sans réellement avoir à modéliser les microtubules eux-mêmes.

Le concept que les microtubules peuvent « pousser » par polymérisation et « tirer » par dépolymérisation a été proposé dans les années 70 par Inoué et Sato (Inoué and Sato, 1967). Les mécanismes gouvernant cette génération de force devint évident lorsque l'instabilité dynamique des microtubules a été découverte (Mitchison and Kirschner, 1984).

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

Le modèle à trois états proposent d'intégrer ces observations (Figure 2.31) :

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

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

De plus, il est proposé que le passage de GA à SA soit gouverné par le taux de catastrophe, $k_{catastrophe}$, (passage d'un état polymérisation à un état dépolymérisation) du microtubule attaché et que le passage de SA à GA soit gouverné par le taux de rescue, k_{rescue} , (passage d'un état dépolymérisation à un état polymérisation) du microtubule attaché (Figure 2.31).

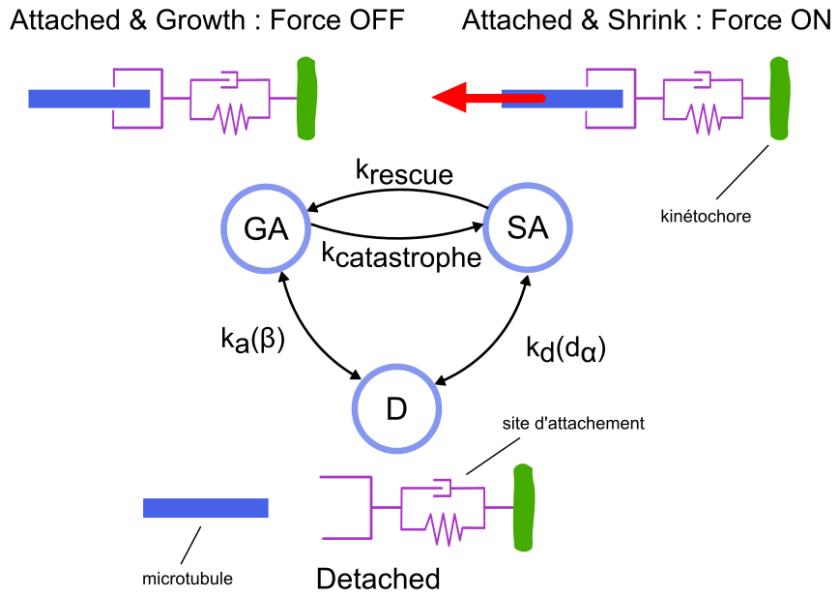


Figure 2.31: Modèle d'attachement à trois états. Les trois états prennent en compte les différentes observations faites entre la génération de la force au niveau du kinétochore et la dynamique des microtubules.

Cette implémentation du modèle d'attachements à trois états ajoute donc deux paramètres et aucune synchronisation entre les kinétochores frères. On suppose donc que les oscillations seraient une caractéristique émergente du système (théorie du kinétochore bête, voir Khodjakov et al. (1999)).

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

Ainsi le système introduit un mécanisme de communication entre les deux kinétochores frères et on suppose alors que les oscillations soient une conséquence directe de la capacité des kinétochores à sentir l'état de leurs kinétochores frères (théorie du kinétochore intelligent, voir Khodjakov et al. (1999)).

Un exemple d'implémentation de la modulation des taux de catastrophe et de rescue pourrait prendre cette forme :

$$k_{rescue} = \frac{k_{max,rescue}}{1 + e^{\frac{-v}{v_{shrink}}}}$$

$$k_{catastrophe} = \frac{k_{max,catastrophe}}{1 + e^{\frac{-v}{v_{growth}}}}$$

GUILLAUME: JAI DU MAL A ME SOUVENIR/COMPRENDRE PK ON A CON-

STRUCTURE UNE MODULATION BASE SUR DES VITESSE. NE POURRAIT ON PAS FAIRE UN SWITCH DEPENDANT DE LA TENSION DONC DU STRETCH (SI ON SUPPOSE UN COEF DE RAIDEUR CONSTANT) COMME PROPOSE DANS LES MODELES STANDARD (VOIR Rieder and Salmon, 1994 ET PLUS RECEMMENT <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.09500>) ??? (par contre pas le temps de tester, je peux en parler en discussion)

GUILLAUME: JE VIENS DE FINIR <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.09500> ET EN FAITE ILS DISENT QUE AU CONTRAIRE LE SWITCH PEUT PAS SEXPLIQUER PAR JUSTE UN TRESHOLD SUR LA TENSION SINON ON POURRAIT JAMAIS AVOIR DES OSCILLATIONS AUSSI NET (VOIR LA FIGURE 4A DE L'ARTICLE ELIFE POUR LES DETAILS). DU COUP IL PROPOSE UN "switching time regulator" (A TENSION CLOCK MODEL), VOIR FIGURE 6).

Où v_{growth} et v_{shrink} serait les vitesses maximales de polymérisation de dépolymérisation des microtubules attachés au kinétochore.

Ici on rajoute donc quatre paramètres libres ($kmax_{rescue}$, $kmax_{catastrophe}$, v_{growth} et v_{shrink}) en plus des deux autres déjà présent (β et d_α).

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

Pour calculer F_{mz} on doit déterminer le nombre moyen de sites d'attachements générant une force appelé $\langle \alpha \rangle$. Il faut donc dans le cas du modèle d'attachement à trois états calculer l'état d'équilibre à l'aide de la matrice de transition des différents états ((Brun et al., 2009)). Pour cela on suppose que le processus de transition est une chaîne de Markov. Pour simplifier, un processus de Markov est une suite d'états dans lequel les états futurs ne dépendent pas des états passés mais uniquement de l'état présent.

Cependant le grand nombre de paramètre ajoutés par ce modèle a rendu très difficile leurs optimisations afin d'obtenir des simulations stables. C'est à dire qu'avec six paramètres libres il est nécessaire d'en « tester » un grand nombre afin de trouver un jeu de paramètre qui reproduira de manière convenable les trajectoires *in vivo*. Ces paramètres représentant, pour certains, des valeurs mesurables *in vivo*, ils doivent en plus de cela rester dans des ordres de grandeurs acceptables.

Par exemple si on veut tester dix valeurs pour les six paramètres en faisant pour chaque jeu de paramètre dix simulations, on doit faire $10^6 * 10 = 10\ 000\ 000$ simulations (ce qui correspond à 210 jours de calcul sur une station de travail standard).

Plusieurs tentatives d'optimisation ciblée avec un nombre de paramètre à tester plus faible on était tenté mais sans succès.

Il est probable que ce modèle à trois états, bien que complexe, soit capable de reproduire une partie du mouvement des chromosomes observées *in vivo*. Cependant il manque encore probablement du travail sur l'implémentation numérique ainsi que sur l'optimisation des paramètres libres. Une première piste serait d'ajouter le troisième état en fixant les deux nouveaux paramètres (k_{rescue} et $k_{catastrophe}$). Ainsi on aurait plus que quatre paramètres à optimiser. L'ajout de la modulation du taux de catastrophe et du taux de rescue se ferait alors dans un second temps.

TODO: BON JAI FAIT COMME JAI PU POUR CETTE DERNIERE PARTIE... GUILAUME LA AUSSI SI TU AS DES IDEES... JE PRENDS :-)

3

Discussion

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

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

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

L'interaction entre la physique et la biologie est quant à elle plus vieille. En effet de nombreux physiciens et les techniques dérivées de la physique ont joué un rôle important dans la

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

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

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

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

Cette approche à la fois originale mais aussi de plus en plus répandue a permis d'explorer de nouvelles hypothèses à l'origine de la régulation de la dynamique des chromosomes durant la mitose chez la levure.

3.2 La dynamique des chromosomes en mitose

- communication active ou bien emergente des mecanisme sous jacent plus basique ?
- force de la levure dans ce type d'étude car mvt tres irregulier

- regularite lie au nombre de chromosome/taille/nbre de microtubule
- analyse stat bayesienne
- regulation mvt oscillation
 - si mt sont impliques dans le switch
 - difference levure/cellule supp
 - mvt irregulier 20% chez hella
 - modele qui doit aussi prendre en compte ca
- regulation position
- apport modelisation ds la dynamique
- ouvre passage a la 3d et multi organismes
- orientation
- est ce que la dynamique des chromosomes est pas influencé par d'autre mechanisme en dehors du fuseau comme l'orientation

A

Annexes

A.1 Exemple d'utilisation de kt_simul

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

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

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

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

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

```

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

# Launch simu
meta.simul()

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

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

```

Les trajectoires et les états d'attachements peuvent être sauvegardés dans un fichier binaire pour une analyse ultérieure (appelé ici `simu.h5`).

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

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

```

from kt_simul.gui.animation import Animator

anim = Animator(meta)
anim.play()

```

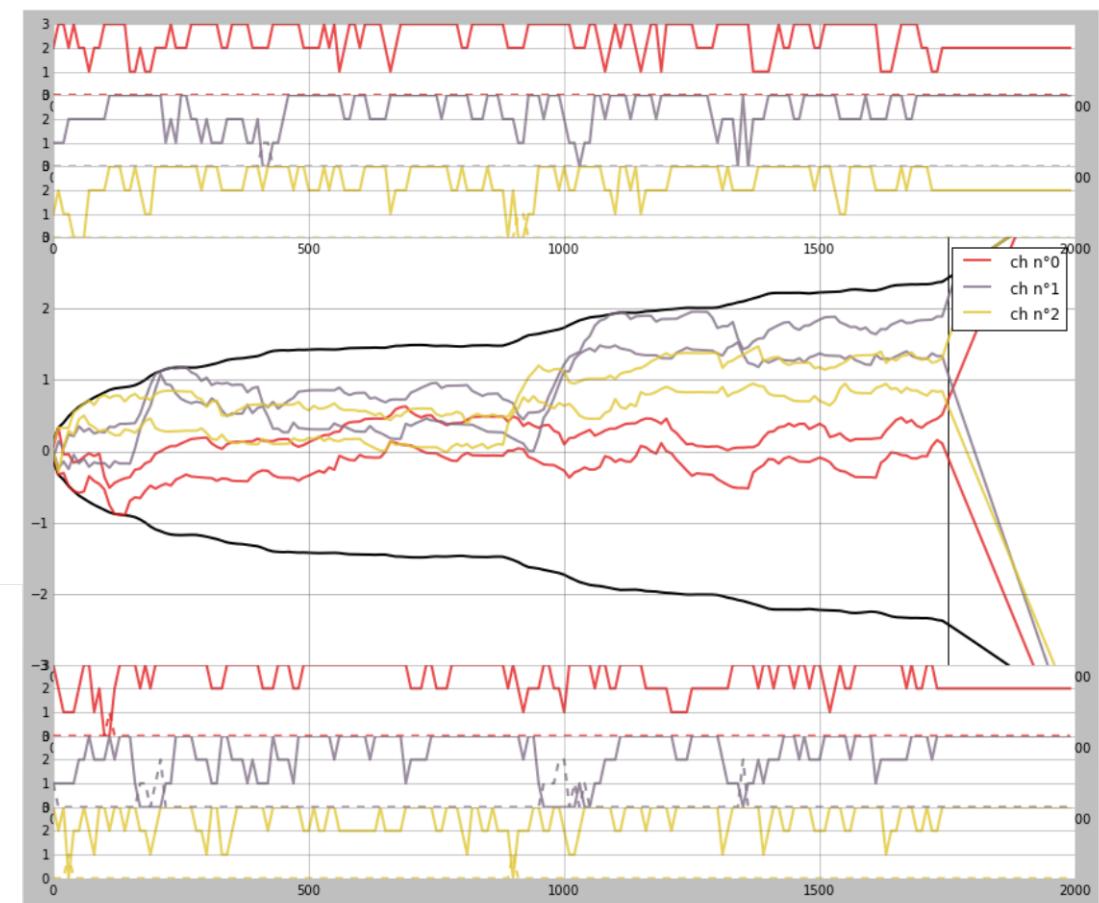


Figure A.1: Exemple de trajectoire générée par `kt_simul`. En plus de l'évolution de la position (axe des ordonnées) en fonction du temps (axe des abscisses), on visualise aussi les états d'attachements de chaque kinétochore sur les panneaux supérieurs et inférieurs.

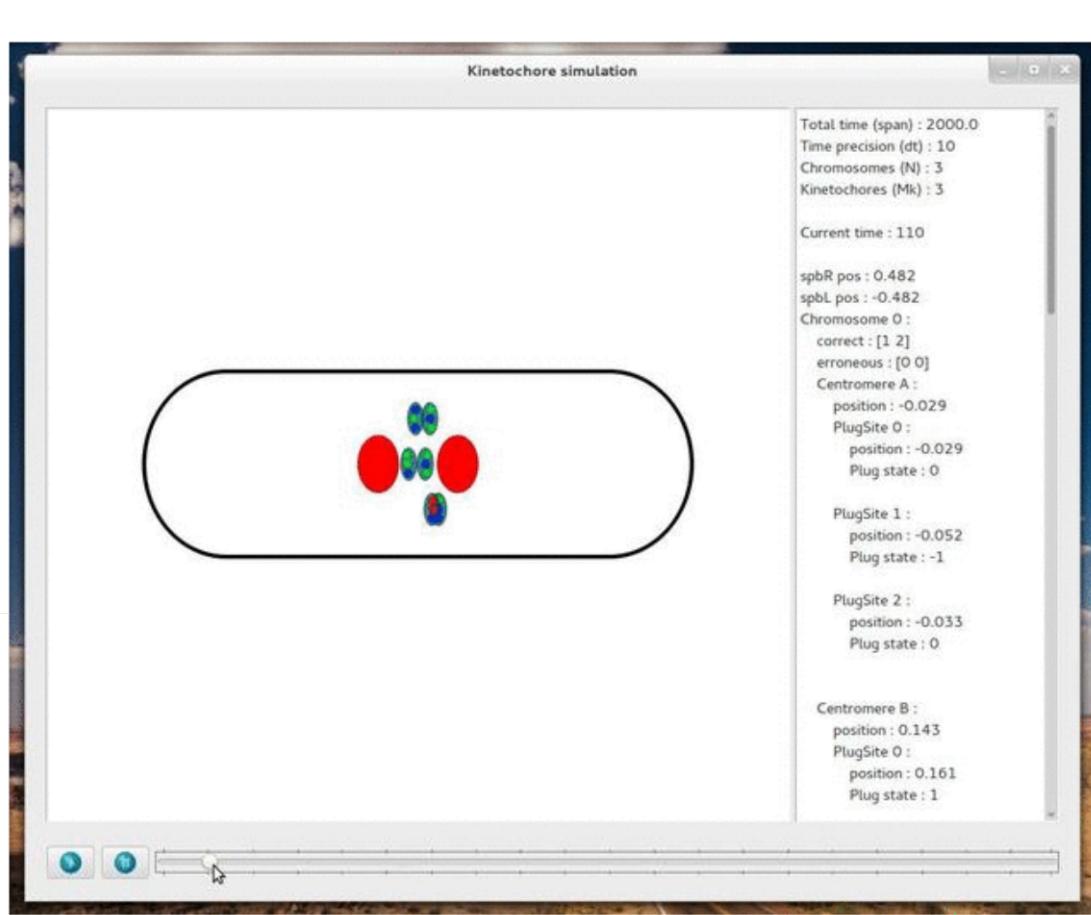


Figure A.2: Animation graphique d'une simulation. L'interface graphique permet de suivre la dynamique en temps réel à l'aide d'un « slider » en bas qui permet de changer le temps. Le panneau à droite permet d'avoir une vue détaillée de la position et de l'attachement de chaque site d'attachement.

Bibliographie

Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* *468*, 576–579.

Alushin, G.M., Ramey, V.H., Pasqualato, S., Ball, D.A., Grigorieff, N., Musacchio, A., and Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* *467*, 805–810.

Amaro, A., Samora, C., and Holtackers, R. (2010). Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. *Nature Cell*

Armond, J.W., Vladimirov, E., Erent, M., McAinsh, A.D., and Burroughs, N.J. (2015). Probing microtubule polymerisation state at single kinetochores during metaphase chromosome motion. *Journal of Cell Science* *128*, 1991–2001.

Auckland, P., and McAinsh, a.D. (2015). Building an integrated model of chromosome congression. *Journal of Cell Science* *128*, 3363–3374.

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.

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

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

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

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.

Civelekoglu-Scholey, G., and Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. *Interface Focus* 4, 20130073.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

Hochegger, H., Hégarat, N., and Pereira-Leal, J.B. (2013). Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. *Open Biology* 3, 120185.

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. *Biochemical Journal* 96, 3050–3064.

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

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

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

Inoué, S., and Sato, H. (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *The Journal of General Physiology* 50, Suppl:259–l:292.

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

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

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

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

Joglekar, A.P., Bloom, K.S., and Salmon, E.D. (2010). Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 57–67.

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

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

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

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

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

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

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

14, 311–317.

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

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

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).

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

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

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

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

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

McEwen, B.F., Dong, Y., and VandenBeldt, K.J. (2007). Using electron microscopy to understand functional mechanisms of chromosome alignment on the mitotic spindle. *Methods in Cell Biology* 79, 259–293.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 379–393.

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*.
- Oliphant, T.E. (2007). SciPy: Open source scientific tools for Python. *Computing in Science and Engineering* 9, 10–20.
- Oliveira, R. a, Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nature Cell Biology* 12, 185–192.
- Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W.T., Nardi, I.K., Cimini, D., and Mogilner, A. (2009). Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15708–15713.
- Peskin, C.S., Odell, G.M., and Oster, G.F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophysical Journal* 65, 316–324.
- Peters, C., Brejc, K., Belmont, L., Bodey, A.J., Lee, Y., Yu, M., Guo, J., Sakowicz, R., Hartman, J., and Moores, C. a (2010). Insight into the molecular mechanism of the multitasking kinesin-8 motor. *The EMBO Journal* 29, 3437–3447.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, 427–438.
- Powers, A.F., Franck, A.D., Gestaut, D.R., Cooper, J., Gracyzk, B., Wei, R.R., Wordeman, L., Davis, T.N., and Asbury, C.L. (2009). The Ndc80 Kinetochore Complex Forms Load-Bearing Attachments to Dynamic Microtubule Tips via Biased Diffusion. *Cell* 136, 865–875.
- 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.

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

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.

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

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

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

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. *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.

Stumpff, J., Du, Y., English, C.A., Maliga, Z., Wagenbach, M., Asbury, C.L., Wordeman, L., and Ohi, R. (2011). A tethering mechanism controls the processivity and kinetochore-microtubule plus-end enrichment of the kinesin-8 Kif18A. *Molecular Cell* 43, 764–775.

Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, C.L., and Wordeman, L. (2012). Kif18A and Chromokinesins Confine Centromere Movements via Microtubule Growth Suppression and Spatial Control of Kinetochore Tension. *Developmental Cell* 22, 1017–1029.

Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Biology* 154, 925–936.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108, 317–329.

Tirnauer, J., and Canman, J. (2002). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Molecular Biology* of

Tischer, C., Brunner, D., and Dogterom, M. (2009). Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Molecular Systems Biology* 5, 250.

Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. a, Tanaka, T.U., and Howard, J. (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nature Cell Biology* 8, 957–962.

Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S., and Howard, J. (2009). Kinesin-8 Motors Act Cooperatively to Mediate Length-Dependent Microtubule Depolymerization. *Cell* 138, 1174–1183.

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.

Ward, J.J., Roque, H., Antony, C., and Nédélec, F. (2014). Mechanical design principles of a mitotic spindle. *ELife* 4, 1–28.

Wargacki, M.M., Tay, J.C., Muller, E.G., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2010). Kip3, the yeast kinesin-8, is required for clustering of kinetochores at metaphase. *Cell Cycle* 9, 2581–2588.

Waters, J.C., Skibbens, R.V., and Salmon, E.D. (1996). Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 1), 2823–2831.

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

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., Avila-Sakar, A., Wang, H.W., Niederstrasser, H., Wong, J., Drubin, D.G., Nogales, E., and Barnes, G. (2005). Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex. *Molecular Cell* 17, 277–290.

Westermann, S., Wang, H.-W., Avila-Sakar, A., Drubin, D.G., Nogales, E., and Barnes, G. (2006). The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends. *Nature* 440, 565–569.

Wickstead, B., and Gull, K. (2006). A “holistic” kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. *Molecular Biology of the Cell*.

Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p Complex from *Saccharomyces cerevisiae* Contains Conserved Centromere Components and Has a Function in Chromosome Segregation. *The Journal of Cell Biology* 152, 349–360.

Woelke, A.L., Murgueitio, M.S., and Preissner, R. (2010). Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology.

Wollman, R., Cytrynbaum, E.N., Jones, J.T., Meyer, T., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the ‘search-and-capture’ process during mitotic-spindle assembly. *Current Biology : CB* 15, 828–832.

Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *EMBO Journal* 22, 2284–2296.

Ye, A.A., Deretic, J., Hoel, C.M., Hinman, A.W., Cimini, D., Welburn, J.P., and Maresca, T.J. (2015). Aurora A Kinase Contributes to a Pole-Based Error Correction Pathway. *Current Biology : CB* 25, 1842–1851.

Zaytsev, A.V., Sundin, L.J.R., DeLuca, K.F., Grishchuk, E.L., and DeLuca, J.G. (2014). Accurate phosphoregulation of kinetochore-microtubule affinity requires unconstrained molecular interactions. *Journal of Cell Biology* 206, 45–59.