



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

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

Présentée et soutenue le 16/12/2015 par :
Hadrien Mary

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

JURY

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

École doctorale et spécialité :

École Doctorale Biologie Santé Biotechnologies

Unité de Recherche :

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

Directeur(s) de Thèse :

Sylvie Tournier et Yannick Gachet

Rapporteurs :

Benoit Arcangioli et Emmanuelle Fabre

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

François Jacob, 1974

Résumé

La mitose est une étape clé du cycle cellulaire, très préservée chez toutes les cellules eucaryotes, durant laquelle le matériel génétique de la cellule (les chromosomes) 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 (Mary et al., 2015). De plus, le processus d'alignement des chromosomes, encore mal compris, est en partie contrôlé par la kinésine-8 via une activité dépendante de la longueur des microtubules. Il semblerait donc que cette kinésine soit capable de fournir une information spatiale le long du fuseau mitotique afin de positionner correctement les chromosomes. Enfin, j'ai utilisé un modèle mathématique de la ségrégation des chromosomes 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 (Mary et al.,

2015). Moreover chromosome alignment process, which is still poorly understood, is regulated by Kinesin-8 via a length dependent activity on microtubules. This suggests that Kinesin-8 is able to provide spatial information along the mitotic spindle to properly position chromosomes. Finally, I used a mathematical model of chromosome segregation in order to test quantitatively different hypotheses of chromosome centering process.

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

Remerciements

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Table des matières

Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des acronymes	xvii
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	12
1.2.6 Les différents types d'attachements	13
1.3 La métaphase : point d'orgue de la division cellulaire	16
1.3.1 La congression des chromosomes	16
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	Comment modéliser le mouvement des chromosomes ?	25
1.4.2.1	Types de forces en jeux	26
1.4.2.2	L'équation du mouvement	27
1.4.2.3	Application au fuseau mitotique	30
1.4.3	L'assemblage du fuseau mitotique	31
1.4.4	La dynamique des chromosomes	34
1.5	La levure à fission : un organisme modèle pour l'étude du cycle cellulaire	39
1.6	Problématique	42
2	Résultats	45
2.1	« Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations »	45
2.2	Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase	68
2.2.1	La reconstruction des trois chromosomes de la levure à fission : un challenge ?	68
2.2.1.1	Détection par fit gaussien	69
2.2.1.2	Reconstruction des trajectoires	72
2.2.1.3	Résumé du workflow de reconstruction des trajectoires .	79
2.2.2	L'état de cohérence du mouvement des kinétochores frères	79
2.2.3	Analyse du mouvement par « Mean Square Displacement »	84
2.2.3.1	La MSD, un outil pour accéder aux différents phénomènes gouvernant un mouvement	84
2.2.3.2	Mesure de la MSD appliquée au mouvement de Cen2-GFP	86
2.3	Modélisation bio-mécanique de la ségrégation des chromosomes	90
2.3.1	<code>kt_simul</code> : l'implémentation numérique du modèle de ségrégation des chromosomes	90
2.3.2	Un modèle de congression alternatif	91
2.3.3	Vers un modèle d'attachement à trois états	95

3 Discussion	101
3.1 L'approche multidisciplinaire comme méthode d'étude en biologie cellulaire	101
3.2 La dynamique des chromosomes en mitose	103
3.2.1 Le mécanisme de congression des chromosomes	103
3.2.2 La régulation du mouvement des chromosomes	105
3.2.3 Vers un modèle global de la division cellulaire	109
A Annexes	113
A.1 Exemple d'utilisation de <code>kt_simul</code>	113
A.2 Le complexe DAM1 favorise l'attachement microtubule-kinétochore	117
A.2.1 Strucure de Dam1 et son rôle dans la régulation de l'attachement	117
A.2.2 La congression et les oscillations des chromosomes sont deux mécanismes indépendants chez la levure à fission	118
A.3 Paramètres minimums reproduisant un mouvement oscillatoire	121
A.3.1 Un modèle naïf du mouvement d'un chromosome	121
A.3.2 Étude des trajectoires avec des techniques d'analyse du signal . .	124
A.3.3 Optimisation des paramètres	126
Bibliographie	129

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 » (Virchow, 1860) de Rudolf Virchow .	2
1.2	Les différentes étapes du cycle cellulaire. Les phases S et G2 préparent la division cellulaire qui a lieu à la phase M.	4
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.	7
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	9
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).	10
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)	12
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).	12
1.8	Structure de l'attachement kinétochore-microtubule. A. Vue schématique de la structure du complexe NDC80 ainsi que sa localisation dans le kinétochore. B. Interaction non contrainte entre des complexes NDC80 (en rouge) avec différents microtubules (en vert) (Zavtsev et al., 2014).	13

1.9 Les différents types d'attachements des microtubules aux kinétochores. Le seul attachement correct pour le fuseau mitotique est l'attachement amphitérique aussi appelé attachement bi-orienté. Les autres attachements sont généralement corrigés durant la mitose.	14
1.10 Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT. Quand les deux kinétochores frères sont éloignés (schéma de droite), Aurora B ne peut pas atteindre les protéines du kinétochore (en vert) et donc déstabiliser l'attachement KT-MT.	15
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)	16
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)	17
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.	20
1.14 Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase (mitose fermé). Les flèches correspondent aux forces appliquées sur les différents éléments du fuseau mitotique.	22
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'activité de l'ubiquitine ligase APC/C. Une fois tous les kinétochores correctement attachés, l'APC/C dégrade la sécurine, ce qui active la séparase qui clive le complexe protéique de la cohésine.	23

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)).	25
1.17 Schéma des trois éléments mécaniques fondamentaux : la masse, l'amortisseur et le ressort (adapté de Howard (2001)). Les ordres de grandeurs correspondent à la magnitude des forces rencontrées au niveau moléculaire : forces élastiques pour le ressort, forces visqueuses pour l'amortisseur et force gravitationnelles pour la masse.	28
1.18 L'équation du mouvement décrit l'évolution spatial d'un objet au cours du temps sous l'action de plusieurs forces qui lui sont appliquées. Le terme inertiel peut être omis dans le cas d'un objet évoluant dans un système très visqueux pour des nombres de Reynolds très bas.	29
1.19 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) . .	30
1.20 Une simulation numérique permet de résoudre l'équation du mouvement et ensuite accéder à l'évolution des positions de chaque objet au cours du temps.	31
1.21 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.	32
1.22 Temps moyen de capture de tous les chromosomes en fonction du nombre de chromosomes total pour trois modèles différents <i>in silico</i> : 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).	32
1.23 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 amphitélique (box couleur saumon) avec le temps en explorant différents états d'attachement. . . .	34

1.24 Différents modèles de types d'attachement entre le microtubule et le kinétochore (Civelekoglu-Schooley and Cimini, 2014). A. « Hill sleeve model » qui suppose l'existence d'un nombre fini de sites d'attachements 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'attachement se fait par un complexe protéique non moteur appelé NDC80. Il fait office de coupleur dynamique.	36
1.25 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 <i>in vivo</i>	37
1.26 Morphologie de la levure à fission. A. Vue en microscopie électronique à balayage de <i>S. pombe</i> (Morgan, 2007). B. Vue en microscopie optique à champ large en fond clair. La barre correspond à 8 μm dans les deux vues.	40
1.27 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.	41
1.28 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.	41
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.	69

2.2	Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions. A. Cette image a été générée <i>in silico</i> 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.	70
2.3	Précision de la détection des blobs. A. Superposition d'une trajectoire de chromosome et pôle simulée <i>in silico</i> (en rouge) avec la trajectoire reconstruire par détection de blob (en vert). B. Distribution de la distance entre les blobs simulés et les blobs détectés.	71
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).	72
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.	73
2.6	Le tracking est l'étape de liaison des objets d'intérêts dans le temps. Sans cette étape il est impossible de savoir si un objet est le même qu'un autre dans deux temps différents.	73
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).	74

2.8	Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochores. A. La reconstruction est basée sur une implémentation développée dans le cadre de cette étude appelé scikit-tracker . B. Reconstruction avec le plugin Fiji nommé TrackMate.	75
2.9	Algorithme de tracking pour un chromosome.	76
2.10	Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ses deux pôles. .	77
2.11	Interface graphique de correction manuelle des trajectoires. A. Le début de l'anaphase peut être modifier manuellement. B. Chaque trajectoire peut être modifié à l'aide d'une interface simple et intuitive.	78
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.	79
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.	80
2.14	Direction des kinétochores frères en metaphase. Trajectoires des pôles (rouge et vert) et des kinétochores frères (bleu et rose) en métaphase dans une cellule sauvage. Le pas de temps de l'acquisition est de 100ms. . . .	81
2.15	Temps passé dans les différents états de cohérence dans diverses conditions. WT désigne une cellule sauvage. <i>klp6Δ</i> , <i>klp5Δ</i> et <i>klp56Δ</i> désigne différents mutants de la kinésine-8 qui possèdent tous le même phénotype (voir Section 2.1 pour plus de détails). TBZ désigne une drogue, le thiabendazole qui inhibe les oscillations des chromosomes en métaphase. Le nombre de cellules utilisées pour cette analyse est n = 24 pour WT, n = 18 pour <i>klp6Δ</i> , n = 12 pour <i>klp5Δ</i> , n = 26 pour <i>klp56Δ</i> , n = 19 pour WT+TBZ, n = 14 pour <i>klp6Δ</i> +TBZ.	82

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. $klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$ 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 $klp6\Delta$, n = 12 pour $klp5\Delta$, n = 26 pour $klp56\Delta$, n = 19 pour WT+TBZ, n = 14 pour $klp6\Delta$ +TBZ.	83
2.17	Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques. Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMsd_anomalous_diffusion.svg	85
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	86
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. . .	87
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. . .	88
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 <code>scipy.stats.linregress</code> de la bibliothèque python <code>scipy</code> . 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.	89

2.22 Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique. Différence de vitesse d'exécution théorique entre une implémentation parallélisée et une implémentation séquentielle. Un algorithme parallélisé (en bleu) utilise les différents coeurs de la machine pour exécuter plusieurs simulations en même temps. Donc une machine possédant deux coeurs exécute en théorie les quatre simulations deux fois plus vite qu'un algorithme non parallélisé (en rose).	91
2.23 Schémas et exemple de trajectoire <i>in silico</i> du mécanisme d'alignement avec et sans force dépendante de la longueur.	92
2.24 Distribution de l'alignement relatif des chromosomes en anaphase <i>in vivo</i> (dans les cellules WT, n=52 et klp6 Δ , n=63) et <i>in silico</i> pour l'hypothèse 1 (avec, n=60 ou sans la force dépendante de la longueur, n=60) et <i>in silico</i> 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.	92
2.25 Schémas et exemple de trajectoire <i>in silico</i> du mécanisme d'alignement avec et sans taux d'attachement dépendant de la longueur.	94
2.26 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).	96
2.27 Modèle d'attachement à trois états. Les trois états prennent en compte les différentes observations faites entre la génération de la force au niveau du kinétochore et la dynamique des microtubules.	97
A.1 Exemple de trajectoire générée par <code>kt_simul</code> . 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.	115
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.	116

A.3 Structure du complexe DAM1. A. Schéma de la strucute et du positionnement du complexe DAM1 lorsque il forme un anneau autour du microtubule. B. Exemple d'une image de microscopie électronique (EM) montrant une vue de l'extrémité finale d'un microtubule entourée d'un complexe DAM1 (Westermann et al., 2006). C. Complexe DAM1 purifié et attaché à des microtubules stabilisés par du taxol et visualisé par EM (Westermann et al., 2005). D. Complexe DAM1 incubé 48h dans une monocouche phospholipidique et visualisé par EM. Des anneaux auto-assemblés de complexe DAM1 sont visibles. Les barre d'échelles correspondent à 50nm.	117
A.4 Trajectoire du chromosome II dans la levure à fission sans Dam1. A. Kymographe de la trajectoire des deux pôles du fuseau mitotique et des deux kinétochores du chromosome II durant la métaphase et l'anaphase. B. La trajectoire reconstruite du kymographe en A.	119
A.5 Exemple de trajectoire générée par le modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les paramètres utilisés pour cette simulation sont $n_a = 10$, $k_a = 0.2$ et $k_d = 0.5$	123
A.6 Autocorrélation et transformée de Fourier d'un signal sinusoïdal bruité. Le signal généré avec la fonction sinus possède une période de 100s. Le signal orange en A correspond au signal sinusoïdal (en bleu) auquel a été ajouté un bruit blanc. B. Autocorrélation du signal orange en A. C. Transformée de Fourier du signal orange en A.	125
A.7 Quelques exemples de trajectoires avec différents paramètre du modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les trois paramètres des simulations sont affichés en haut de chaque trajectoires. Les points rouges correspondent aux 4 premiers minimum locaux pour l'autocorrélation et aux quatre premiers maximum locaux pour la transformée de Fourier.	127

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

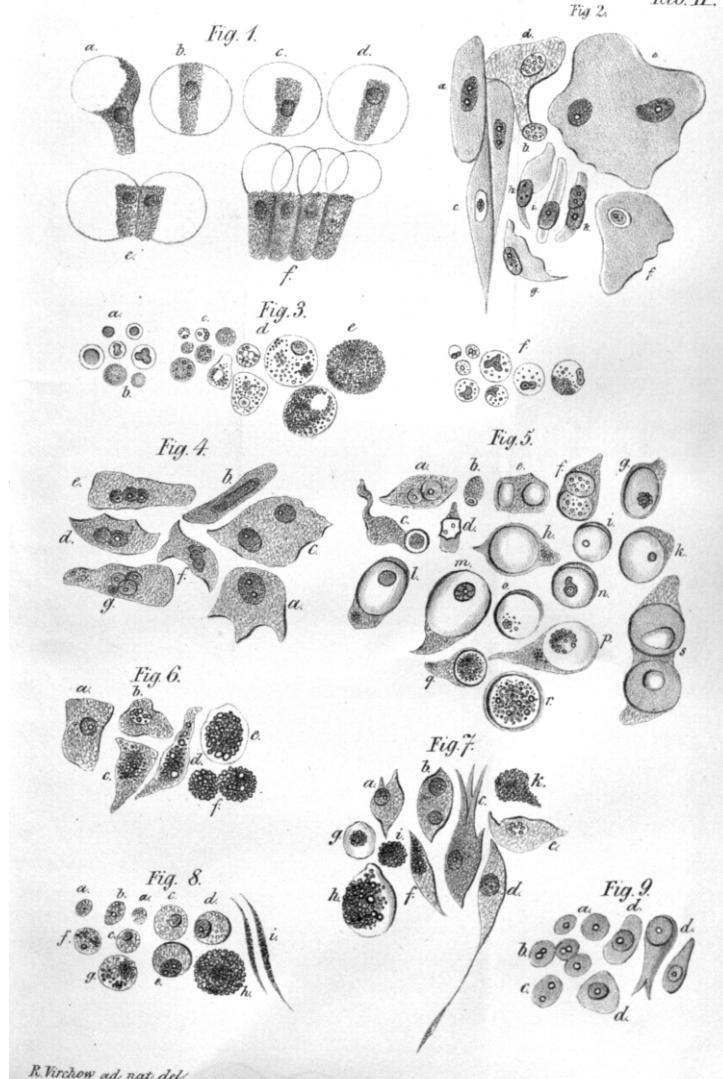
La cellule est un objet complexe que l'Homme, depuis longtemps maintenant, essaie de comprendre. En effet c'est en 1665 que Robert Hooke, un savant anglais, observa pour la première fois au microscope des « petites unités structurelles » qu'il décrira plus tard dans un ouvrage intitulé « *Micrographia* » (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 » (Virchow, 1860) de Rudolf Virchow

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

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

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

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

1.1 La vie d'une cellule

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

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

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

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

- une phase de croissance (**phase G1**) durant laquelle la cellule va augmenter 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 d'organisme) doit être dupliqué avec une grande précision afin que les deux cellules filles se voient transmettre la même information génétique.
- une phase de préparation de la division cellulaire (**phase G2**) durant laquelle la cellule relance la synthèse de protéine et croît rapidement afin de préparer sa division. Cette phase est importante car 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.

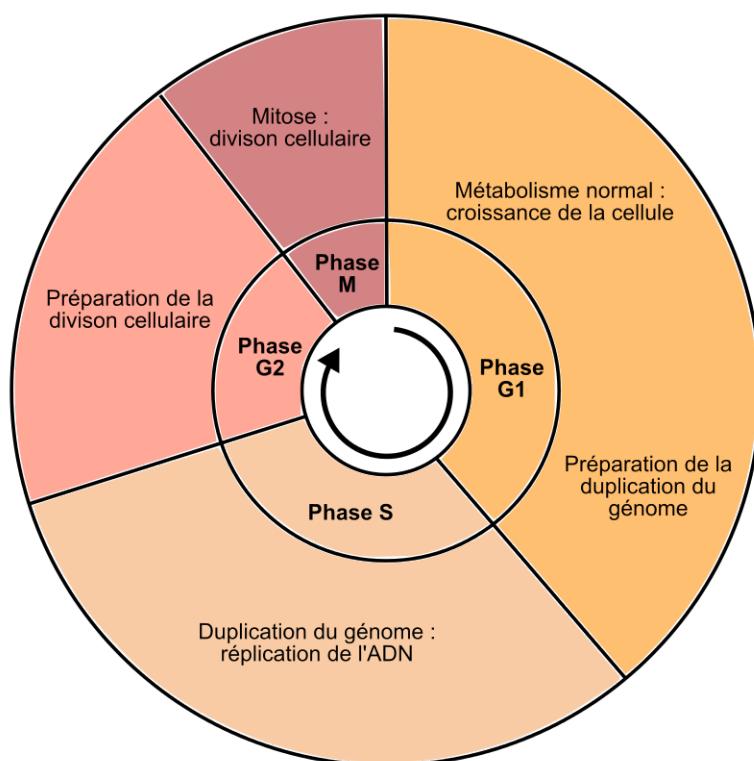


Figure 1.2: Les différentes étapes du cycle cellulaire. Les phases S et G2 préparent la division cellulaire qui a lieu à la phase M.

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 déclencher l'assemblage du fuseau mitotique.

1.2.1 Les phases de la mitose

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

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

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

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

Note: certains fuseaux mitotiques 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.

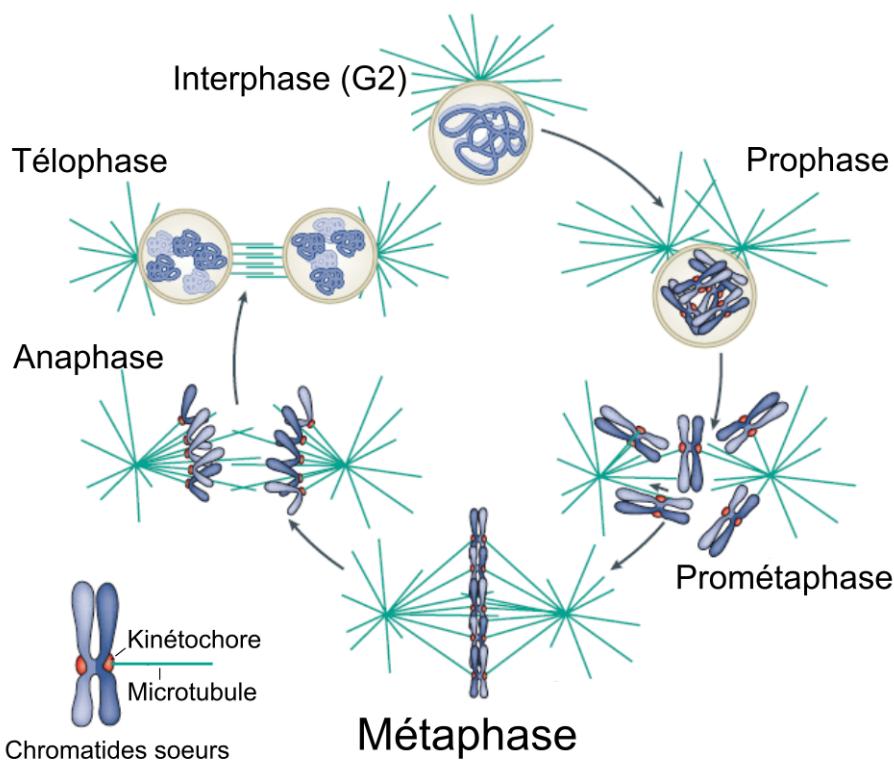


Figure 1.3: Les différentes étapes de la mitose (adapté de Cheeseman and Desai (2008)). Durant les cinq phases de la mitose la cellule établit un fuseau mitotique par élévation de ces deux pôles (en vert) puis doit répartir la même quantité de chromosomes (en bleu) à chacun des pôles.

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.

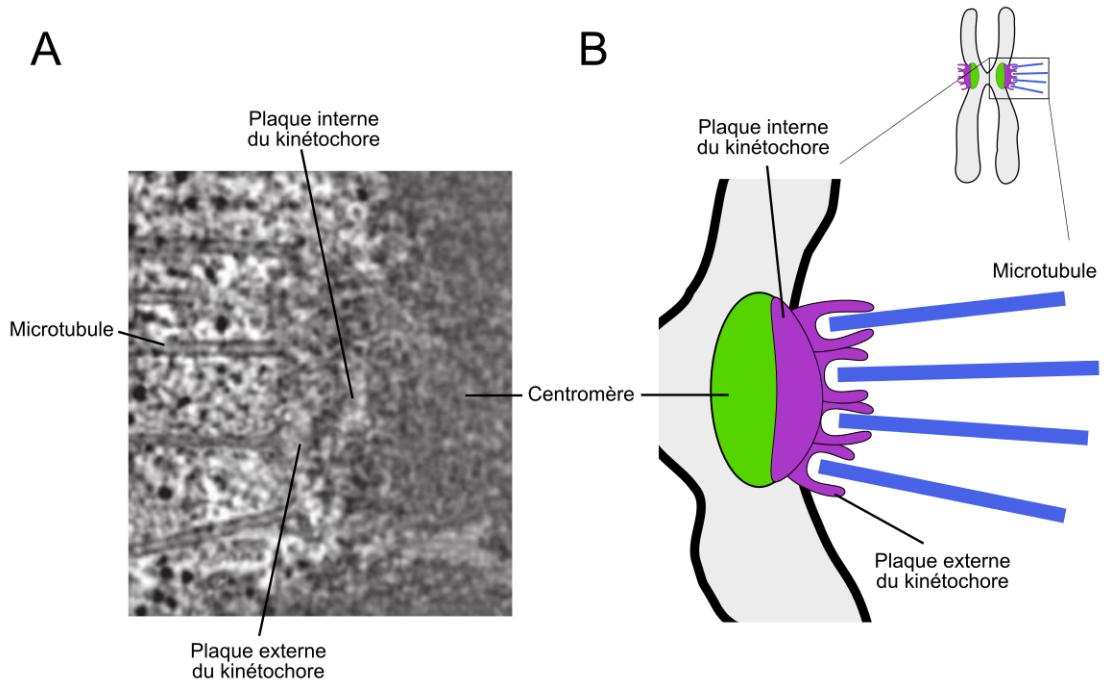


Figure 1.4: Structure d'un kinétochore. **A.** Vue d'un kinétochore humain de côté par microscopie électronique (McEwen et al. (2007)). **B.** Schéma des différentes plaques d'un kinétochore

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 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 α) et d'extrémité moins pour celle chargée en GDP donc moins dynamique (coiffée par la tubuline β).

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

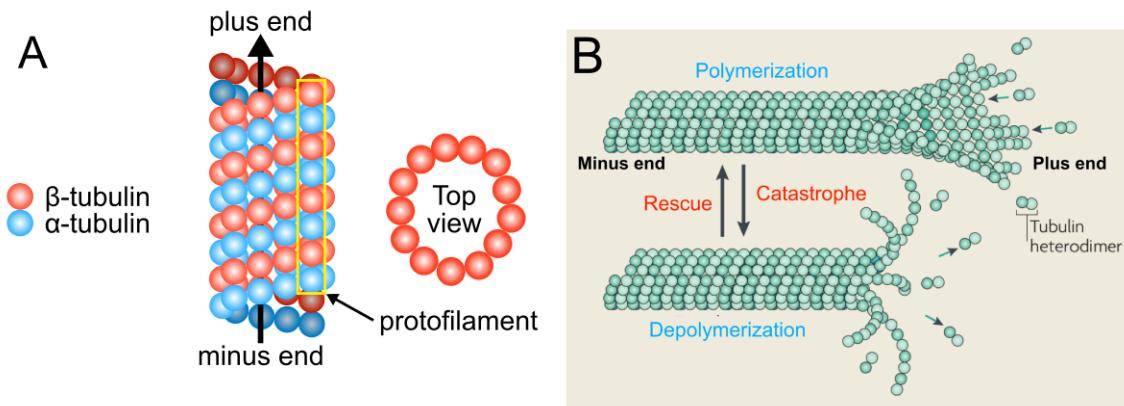


Figure 1.5: Structure et dynamique du microtubule. **A.** Schéma présentant l'organisation d'un microtubule. **B.** Les microtubules sont des structures hautement dynamiques qui passent très souvent d'un état à un autre (Walczak et al., 2010).

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 bour-

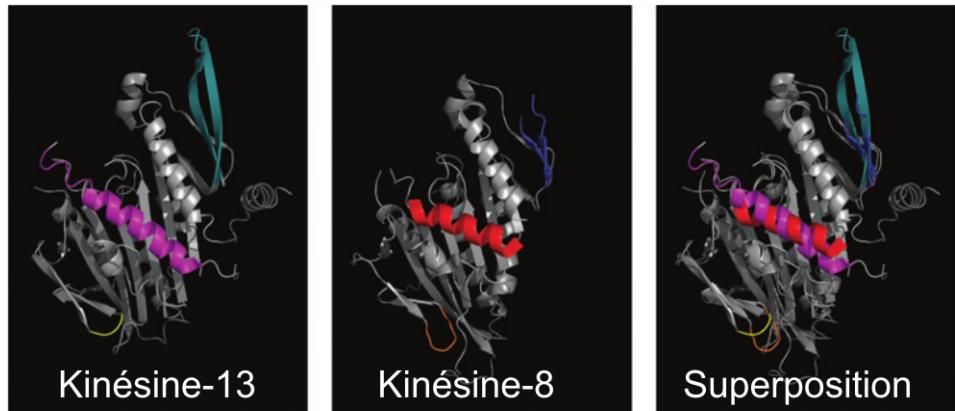


Figure 1.6: Vue en trois dimensions de la kinésine-13 (MCAK) et de la kinésine-8 (Kif18a) chez des cellules humaines. La troisième vue montre une superposition des deux protéines. (Walczak et al., 2013)

geon, levure à fission, cellule de drosophile) comme le montre la Figure 1.7.

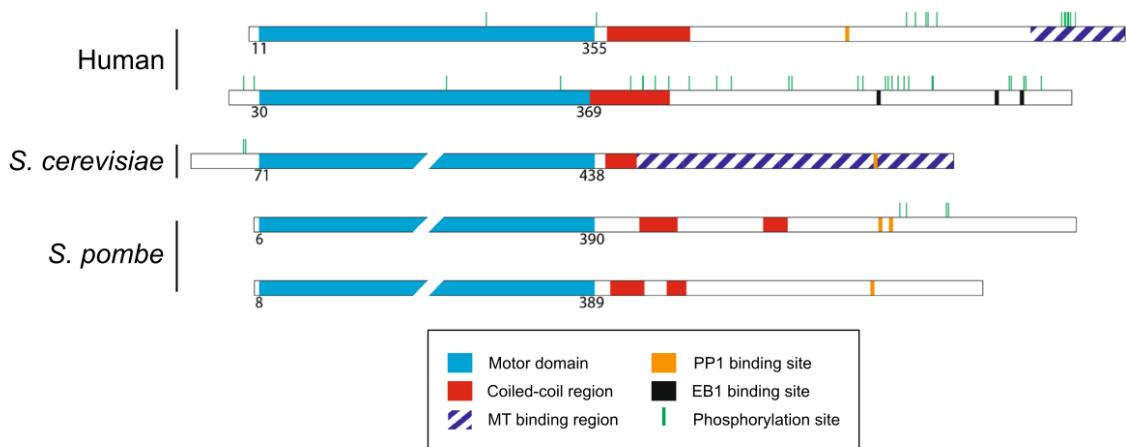


Figure 1.7: Vue schématique des domaines protéiques composant la kinésine-8 chez la cellule humaine, la levure à bourgeon et la levure à fission (Messin and Millar, 2014).

Si les 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 1.8A). L'une des extrémités qui possède un domaine pouvant s'attacher au microtubule est composée de Ndc80-Nuf2 tandis que l'autre extrémité, Spc25-Spc24, possède un domaine s'attachant à la plaque externe du kinétochore.

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

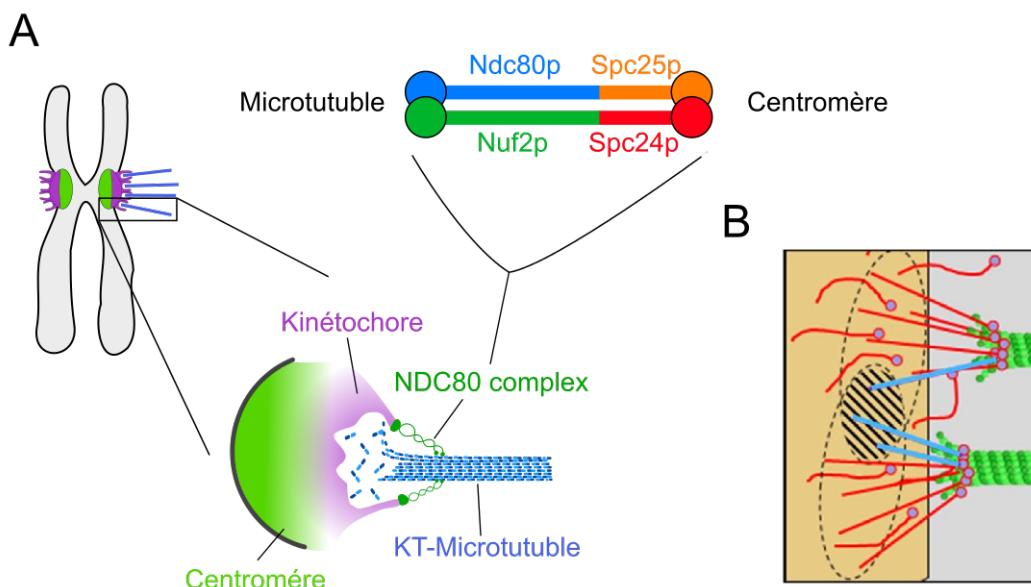


Figure 1.8: Stucture de l'attachement kinétochore-microtubule. **A.** Vue schématique de la structure du complexe NDC80 ainsi que sa localisation dans le kinétochore. **B.** Interaction non contrainte entre des complexes NDC80 (en rouge) avec différents microtubules (en vert) (Zaytsev et al., 2014).

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

1.2.6 Les différents types d'attachments

L'association des kinétochores frères avec leurs pôles respectifs s'appelle un attachement amphitélique, 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.

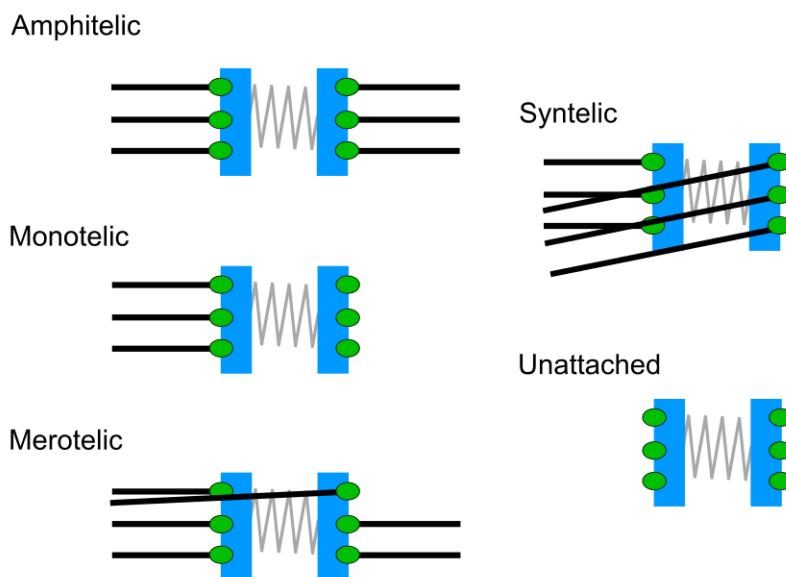


Figure 1.9: Les différents types d'attachements des microtubules aux kinétochores. Le seul attachement correct pour le fuseau mitotique est l'attachement amphitétrique aussi appelé attachement bi-orienté. Les autres attachements sont généralement corrigés durant la mitose.

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 frères sont placés dos à dos dans des directions opposées. Il en résulte que si l'un des kinétochores est accroché à un pôle, l'autre kinétochore sera alors plus susceptible de s'associer avec le pôle opposé.

Dans les années 90, Nicklas et al. montrèrent dans un expérience de micromanipulation sur des chromosomes de spermatocyte de sauterelle, que l'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 kinétochores est grande, due à une tension élevée, Aurora B n'aurait pas accès aux protéines du kinétochore et ne pourrait donc pas déstabiliser l'attachement en déphosphorylant ces substrats (Tanaka et al., 2002).

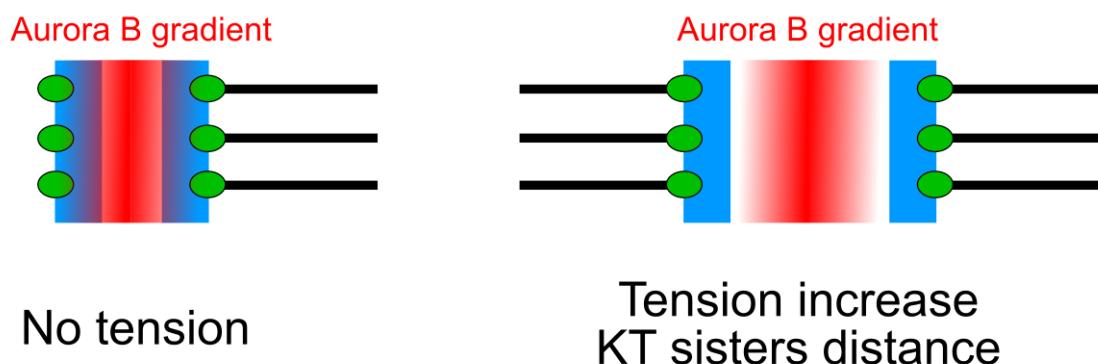


Figure 1.10: Le mécanisme de déstabilisation de l'attachement KT-MT. Quand les deux kinétochores frères sont éloignés (schéma de droite), Aurora B ne peut pas atteindre les protéines du kinétochore (en vert) et donc déstabiliser l'attachement KT-MT.

Ces mécanismes ne peuvent néanmoins pas corriger les attachements mérotéliques. En effet les deux kinétochores étant partiellement attachés aux deux pôles, le fuseau exerce quand même une tension à travers le centromère. Le déséquilibre de tension se situe alors au niveau du kinétochore. Bien que ces mécanismes de correction 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 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).

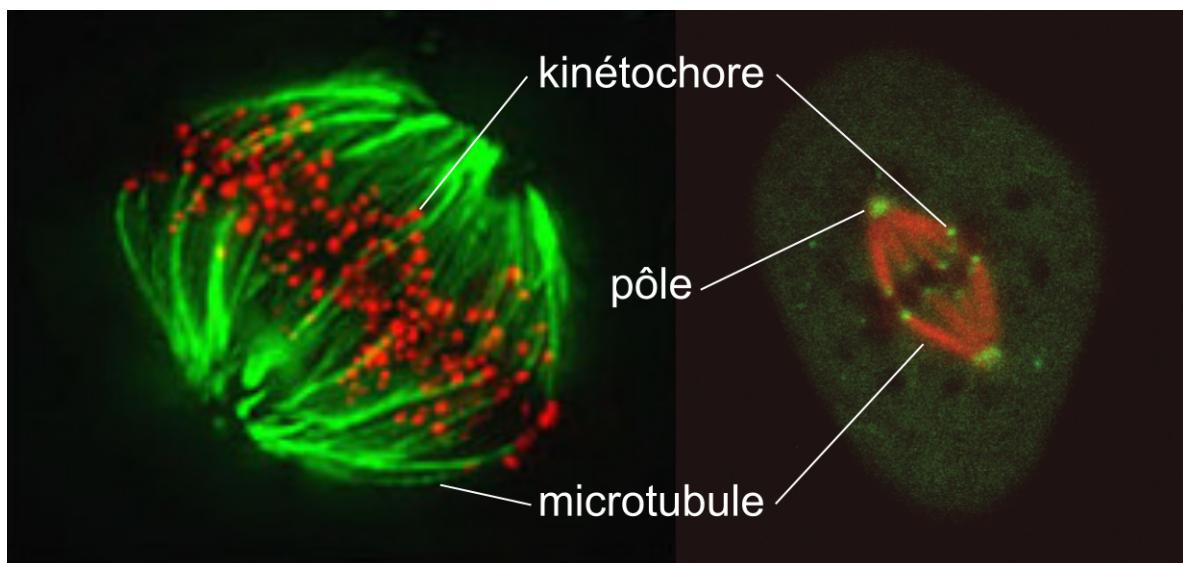


Figure 1.11: Deux cellules en métaphase (cellule HeLa à gauche et cellule Ptk1 à droite). Pour les deux cellules les kinétochores de l'ensemble des chromosomes sont marqués respectivement en rouge et vert tandis que les microtubules sont marqués respectivement en vert et rouge. (Huang et al., 2008; Wan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

1.3.1 La congression des chromosomes

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

Bien que les mécanismes évolutifs responsables de la mise en place de l'alignement des chromosomes restent inconnus, on constate que dans de nombreuses cellules eucaryotes les chromosomes s'alignent pour former une plaque métaphasique. Les mécanismes impliqués

dans cet alignement sont de mieux en mieux compris (voir Auckland and McAinsh (2015) pour une revue).

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

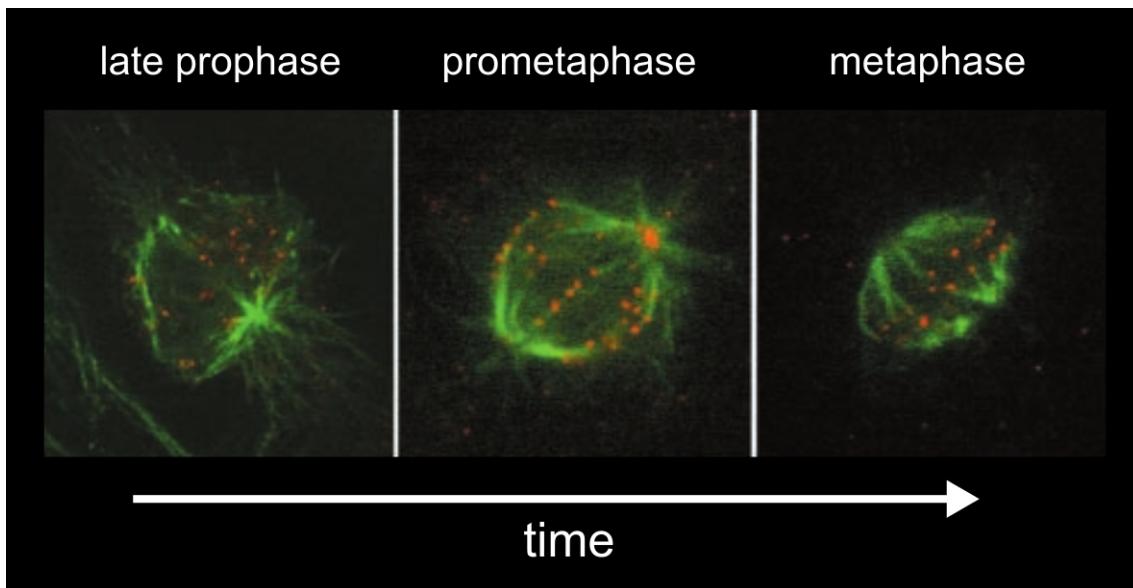


Figure 1.12: Cellule humaine (RPE1) en début de mitose. Les kinétochores (en rouge) sont alignés à la fin du processus durant la métaphase. On peut deviner les deux pôles du fuseau en suivant où les microtubules (en vert) convergent. (DeLuca et al., 2002)

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

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

P.

Une autre étude montre que dans des cellules humaines, une accumulation de l'homologue de la kinésine-8 (Kif18A) proportionnelle à la taille du microtubule, sur le kinétochore opposé au pôle connecté (on parle de « *anti-poleward* kinetochore » ou « *kinetochore AP* » en anglais) 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'accumulation de la protéine Kif18A sur le kinétochore AP réduit la dynamique du microtubule (Du et al., 2010; Stumpff et al., 2011).

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

1.3.2 Le mouvement des chromosomes

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

Deux mécanismes sont nécessaires pour produire ce mouvement :

- En premier lieu, les kinétochères frères doivent être soumis à une force pour se déplacer. Cette force proviendrait majoritairement de l'attachement microtubules - kinétochères. Plusieurs modèles proposent différents mécanismes capables de générer une force (Civelekoglu-Scholey et al., 2006; Joglekar and DeLuca, 2009; McIntosh, 2012; Powers et al., 2009). Le modèle stipulant que l'énergie proviendrait de la dépolymérisation des microtubules et serait transmise par une protéine capable de maintenir l'attachement du kinétochore avec le microtubule qui dépolymérise (le complexe NDC80 et le complexe DAM1 possiblement) représente en fait une version moderne d'un modèle théorique établi dans les années 1980, appelé le modèle de Hill (Hill, 1985). Ces différents mécanismes sont détaillés en Section 1.4.4.
- Une fois que le chromosome est mis en mouvement, un mécanisme doit pouvoir réguler sa dynamique afin de contraindre ses déplacements de va et vient et de favoriser le maintien de son alignement au milieu du fuseau mitotique. Ce mécanisme

encore mal compris est probablement dû à la contribution de plusieurs phénomènes comme l'instabilité directionnelle des kinétochores (Skibbens et al., 1993), le « microtubule poleward flux » (Mitchison, 1989, 1992), le stretch dû au mouvement relatif des kinétochores frères (Maddox et al., 2003; Skibbens et al., 1993, 1995), le gradient de concentration de certaines protéines (Gardner et al., 2008; Jaqaman et al., 2010; Mayr et al., 2007; Stumpff et al., 2008; Varga et al., 2006) ou encore l'instabilité dynamique des microtubules (Amaro et al., 2010; Tirnauer and Canman, 2002).

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

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

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

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

Par exemple certains chromosomes chez les eucaryotes supérieurs présentent des mouvements très instables sans oscillations apparentes (Burroughs et al., 2015; Wan et al., 2012). De plus dans les cellules HeLa, dans 30% des cas le premier kinétochore qui « switch » n'est pas le leading kinétochore mais le trailing kinétochore (Burroughs et al., 2015).

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

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

En 2015, Burroughs et al. ont proposé un nouveau mécanisme qui complète le modèle standard. Ils partent de l'observation faite que la tension seule ne pourrait expliquer

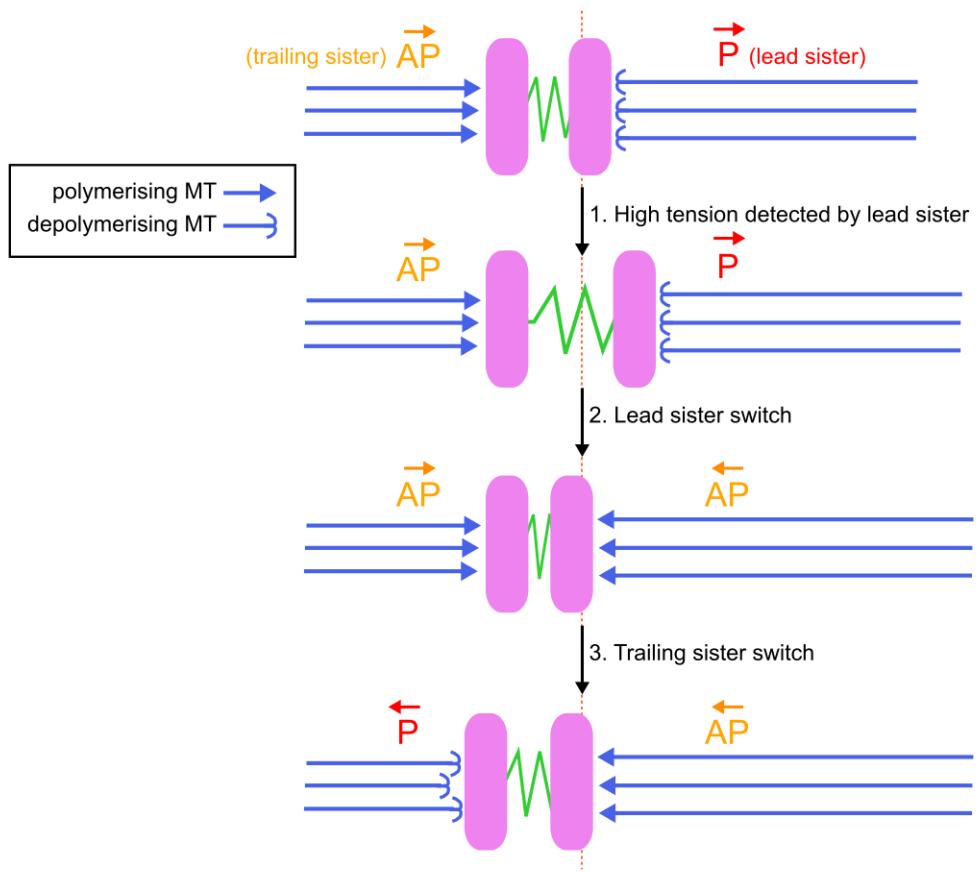


Figure 1.13: Modèle standard du changement de direction des kinétochore frères. Le leading kinétochore en se déplaçant plus vite augmente la tension et donc la distance entre les deux kinétochore. L'augmentation de tension bascule le leading kinétochore d'un état **P** à un état **AP**. Il en résulte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

le déclenchement du changement de direction. En se basant sur des observations très précises de l'évolution de la distance inter-kinétochore autour de l'événement de « switch », ils stipulent qu'une horloge régulerait le taux de catastrophe et de rescue des microtubules kinétochoriens. Cette régulation influencerait les forces exercées sur les kinétochores en mouvement et modifierait la tension entre les deux kinétochores (en accord avec le modèle standard).

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

1.3.3 Le fuseau mitotique : un objet sous contrainte

La métaphase est un moment très particulier de la mitose car c'est le moment où le fuseau atteint un état quasi-stationnaire. 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'équilibrent entre elles. Le fuseau est dans un état d'attente qui sera rompu aussitôt que l'équilibre des forces est brisé par la dégradation de la cohésine sonnant alors le début de l'anaphase.

Pour donner une idée des forces en jeu, Nicklas a mesuré 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.

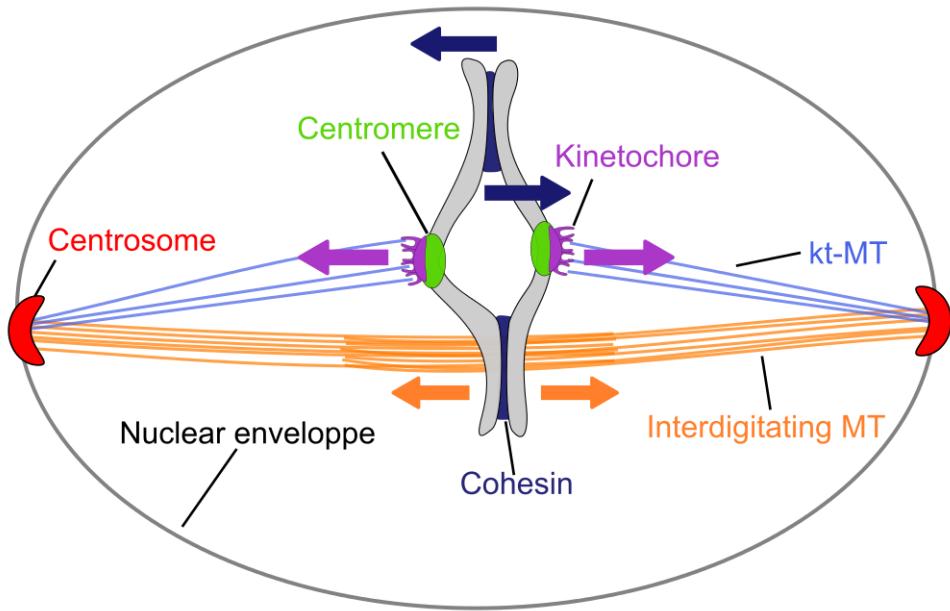


Figure 1.14: Schéma d'un fuseau mitotique en métaphase (mitose fermé). Les flèches correspondent aux forces appliquées sur les différents éléments du fuseau mitotique.

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).

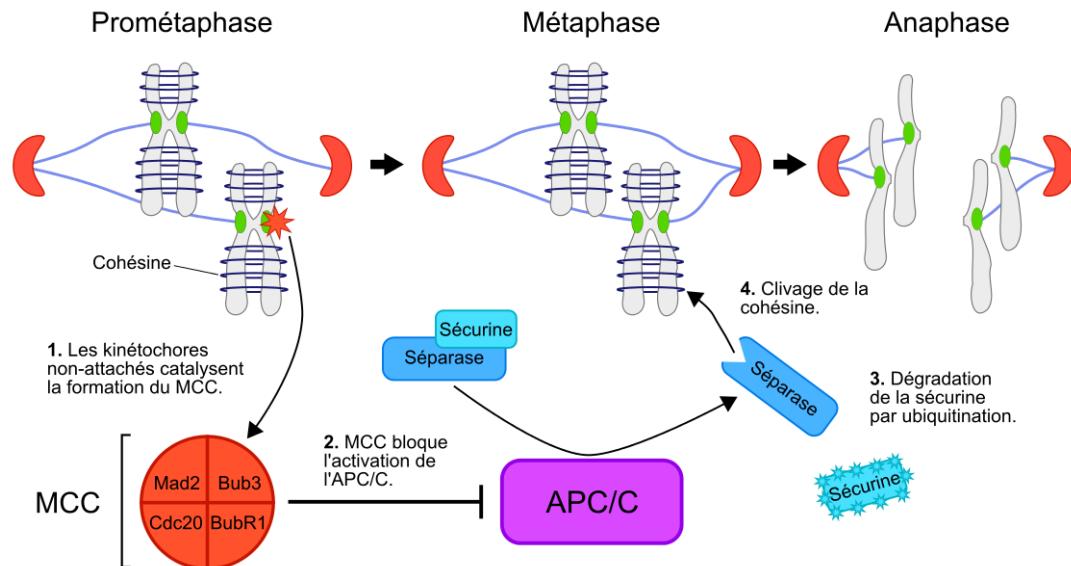


Figure 1.15: Le mécanisme d'action du SAC. Les chromosomes non-attachés recrutent le MCC au niveau du kinétochore. Le MCC bloque l'activité de l'ubiquitine ligase APC/C. Une fois tous les kinétochores correctement attachés, l'APC/C dégrade la sécurine, ce qui active la séparase qui clive le complexe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

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 ses expériences. Une déduction logique lui permet donc de bâtir un « modèle » qualitatif du processus qu'il étudie. Ce modèle est parfois représenté sous la forme d'un schéma à la fin d'un article ou d'une présentation.

Un modèle mathématique est la version quantitative de ce modèle-schéma décrivant un processus biologique (Figure 1.16).

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

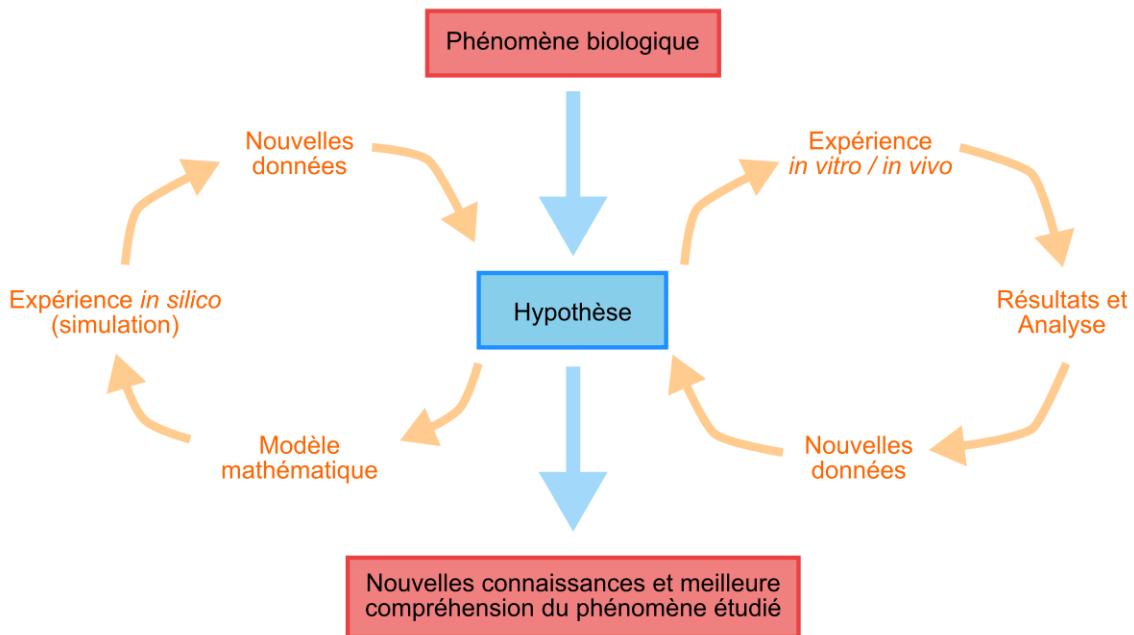


Figure 1.16: Schéma reproduisant un workflow expérimental possible lors de l'étude d'un phénomène biologique par une approche de modélisation (adapté de Woelke et al. (2010)).

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 Comment modéliser le mouvement des chromosomes ?

Tout système mécanique peut se modéliser en résolvant les équations des forces appliquées sur le système. Cette approche a été utilisée pour la première fois par Scholey et al. afin de modéliser le mouvement des chromosomes durant la mitose (Civelekoglu-Scholey et al., 2006). Par la suite, l'équipe de 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).

1.4.2.1 Types de forces en jeux

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

- les forces **magnétiques**, d'amplitude très faible au niveau moléculaire, sont provoquées par un champs magnétique qui s'applique sur des protons possédant un moment magnétique.
- un objet de masse m subit une force **gravitationnelle** de magnitude mg , où g est l'accélération causée par la gravité. Au niveau cellulaire cette force est très petite.
- une force **centrifuge** est subi par un objet en rotation. Sa magnitude vaut ma_c , où a_c correspond à l'accélération centrifuge. On peut aussi noter que la force centripète est la force opposée à la force centrifuge qui empêche un objet en rotation de « fuir » le centre.
- une force **optique** est une force de collision correspondant à une pression optique dû au moment cinétique des photons. Les photons peuvent donc exercer une force quand ils sont diffractés par un objet. Cette force est très faible dans la nature, par exemple si une molécule absorbe 10^9 photons par seconde (cela correspond à un laser puissant), la force optique ne sera que de $10^{-6}pN$.
- les forces **thermiques** sont un autre type de force de collision dues au choc sur un objet par une multitude d'objets de taille plus faible. Par exemple une protéine en suspension dans de l'eau va subir une force thermique à cause du choc des molécules d'eau à sa surface. L'ensemble des collisions provenant de toutes les directions, il en résulte une force totale net aléatoire. La force appliquée sur une protéine de $100kDa$ est de l'ordre de $500pN$. Cette force gouverne un processus physique appelé mouvement brownien ou encore marche aléatoire.
- les forces **électrostatiques** s'appliquent à une particule chargé q par un champ électrique E . Elle est de magnitude $F = qE$. Ces forces sont à l'origine du lien qui attache les différents atomes d'une molécule.

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

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

D'après la seconde loi de Newton, la masse provoque une accélération constante égale à $a = F/m$ où a est l'accélération, F la force appliquée et m la masse (Figure 1.17). Si on définit l'accélération a comme étant la dérivée première de la vitesse v et la dérivée seconde de la position x par rapport au temps t , on a :

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

Un amortisseur est un élément mécanique qui répond à une force appliquée en se déformant à vitesse constante avec une magnitude de $v = F/\gamma$, où γ correspond au coefficient de viscosité (Figure 1.17). Cet objet idéal est utilisé pour modéliser le mouvement d'un objet dans un fluide comme par exemple une cuillère qu'on insère dans un pot de miel. L'action de tirer rapidement la cuillère hors du pot, peut soulever le pot à cause du coefficient de viscosité élevé du miel qui va contrer la force de la cuillère tirée de manière proportionnelle à la vitesse.

Enfin, un ressort est un élément mécanique qui résiste à la déformation par une force proportionnelle à l'amplitude de la déformation. L'allongement d'un ressort par rapport à sa longueur de repos est égale à $L = F/\kappa$, où κ la constante d'élasticité et L l'allongement (Figure 1.17). Si la constante d'élasticité est indépendante de la force ou de l'extension, on dit que le ressort suit la loi de Hooke.

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

1.4.2.2 L'équation du mouvement

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

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

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

Figure 1.17: Schéma des trois éléments mécaniques fondamentaux : la masse, l'amortisseur et le ressort (adapté de Howard (2001)). Les ordres de grandeurs correspondent à la magnitude des forces rencontrées au niveau moléculaire : forces élastiques pour le ressort, forces visqueuses pour l'amortisseur et force gravitationnelles pour la masse.

$$\sum F = m \frac{d^2x}{dt^2}$$

TODO 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 1.18).

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

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

Où ρ est la densité du fluide, L la longueur caractéristique de l'objet, v sa vitesse et η sa viscosité. Quand $Re \ll 1$, cela signifie que les forces dues à la masse sont négligeables par rapport aux forces visqueuses, ce qui est le cas dans un système subcellulaire (Figure 1.18).

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

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

Equation du mouvement (en milieu très visqueux)

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

force
inertiel force
visqueuse force
élastique

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

\downarrow

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

Figure 1.18: L'équation du mouvement décrit l'évolution spatial d'un objet au cours du temps sous l'action de plusieurs forces qui lui sont appliquées. Le terme inertiel peut être omis dans le cas d'un objet évoluant dans un système très visqueux pour des nombres de Reynolds très bas.

1.4.2.3 Application au fuseau mitotique

Dans le cas du fuseau mitotique, on identifie en premier lieu, l'ensemble des différents objets qui composent le fuseau tel que les pôles, les kinétochores, les sites d'attachement, etc. Ensuite on définit les propriétés visco-élastiques décrivant chacun des objets pour ensuite définir les forces appliquées sur le système. Par exemple la force due à un attachement élastique entre les deux kinétochores (qui correspond à la cohésine) va dépendre de la position relative des deux kinétochores l'un par rapport à l'autre et du paramètre de raideur κ qui caractérise la cohésine et qui peut être déterminé *in vivo* (Figure 1.19).

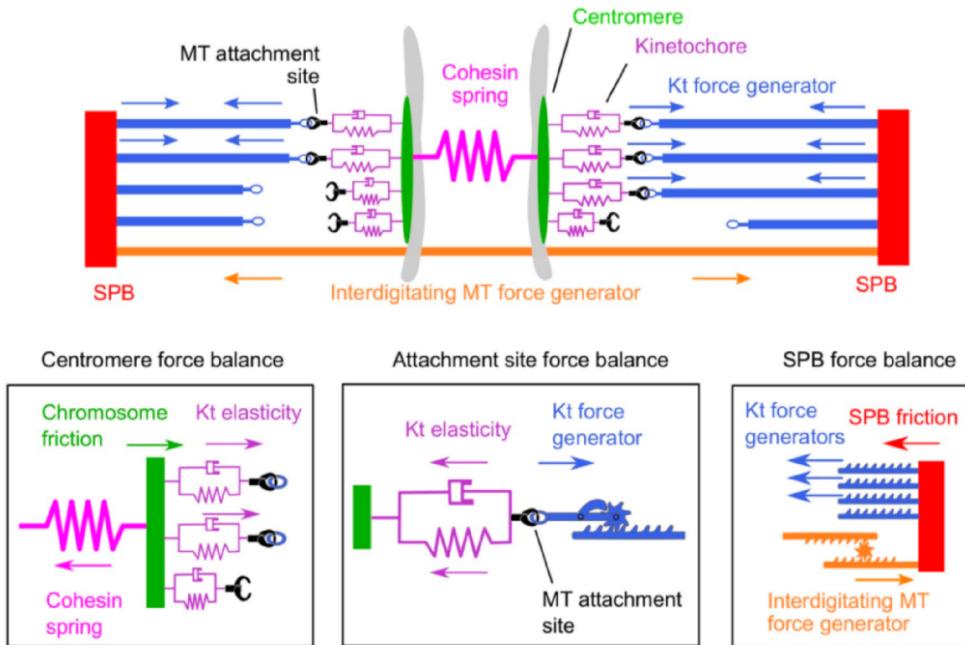


Figure 1.19: Le fuseau modélisé est composé de différents objets ayant des propriétés visco-élastique définies. On décrit aussi les forces appliquées sur les objets comme par exemple la force motrice qui tire sur un site d'attachement (en violet) quand un microtubule s'y attache (en bleu) (Gay et al., 2012)

Dans un système mécanique tel que celui-là, il est difficile de prédire la réponse du système aux forces appliquées. L'équation du mouvement assume donc qu'en chaque point de l'espace la somme des forces appliquées au système est nulle (parce que l'inertie est négligeable) :

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

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

On peut alors construire un système d'équation linéaire décrivant le système mécanique du fuseau mitotique (voir Gay et al. (2012) pour le système d'équation complet). La

résolution numérique permet alors d'accéder aux trajectoires des kinétochores et des pôles (Figure 1.20).

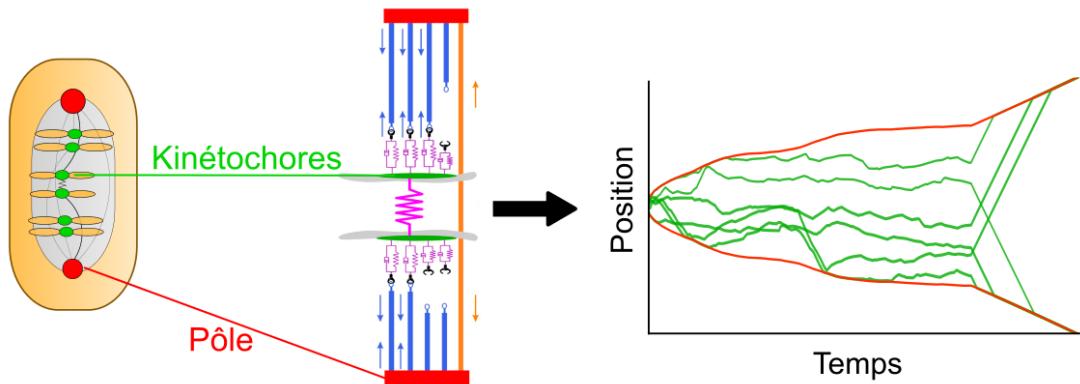


Figure 1.20: Une simulation numérique permet de résoudre l'équation du mouvement et ensuite accéder à l'évolution des positions de chaque objet au cours du temps.

1.4.3 L’assemblage du fuseau mitotique

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

Le modèle le plus répandu décrivant l’assemblage du fuseau mitotique est celui appelé « recherche et capture » (Figure 1.21). 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.

Un modèle propose que l’un de ces biais puisse être la présence d’un gradient de RanGTP autour des kinétochores (Figure 1.22). Une plus forte concentration de RanGTP stabiliseraient les microtubules et les feraient croître en direction des kinétochores (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 syntéthiques et mérotélique. En

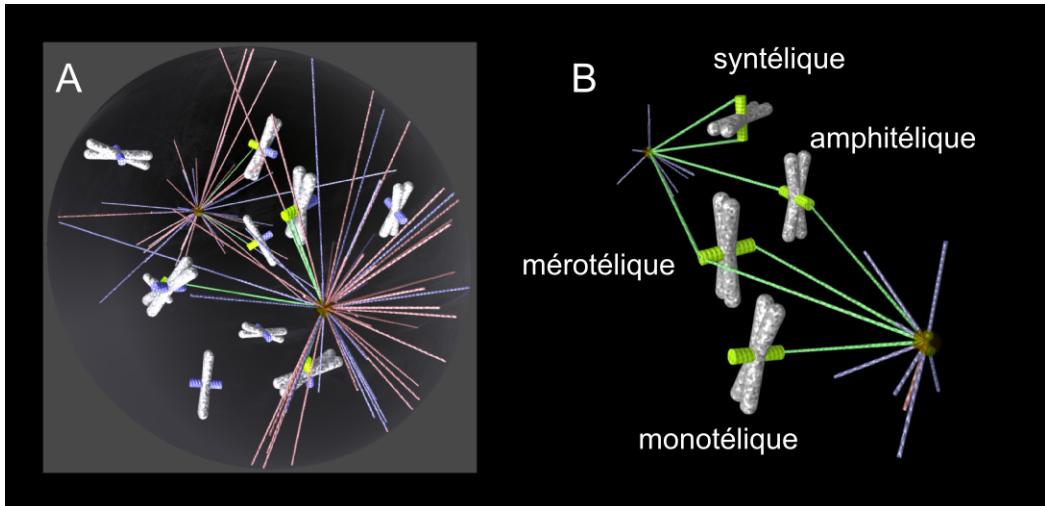


Figure 1.21: Modèle numérique de l’assemblage du fuseau (Paul et al., 2009). **A.** Des chromosomes durant la phase « recherche et capture ». Certains kinétochores sont attachés (en vert) et d’autres sont non attachés (en bleu). **B.** 4 types d’attachements possibles des chromosomes.

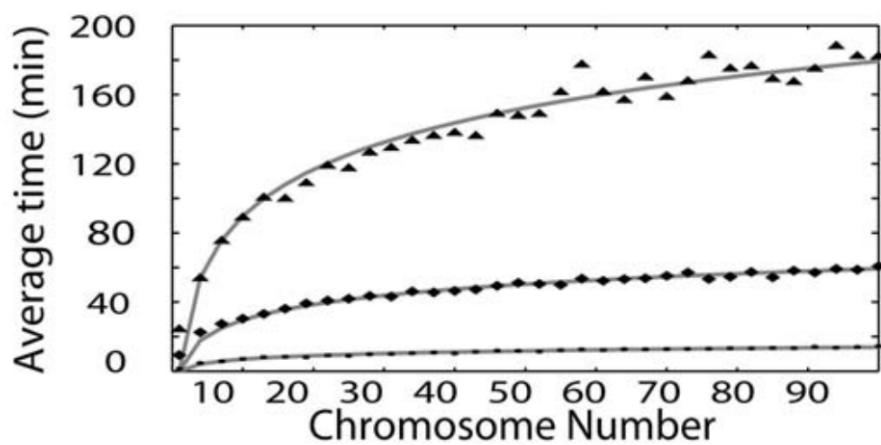


Figure 1.22: Temps moyen de capture de tous les chromosomes en fonction du nombre de chromosomes total pour trois modèles différents *in silico* : modèle non-biaisé (recherche aléatoire) avec 1000 MTs (triangles), modèle biaisé (gradient de RanGTP) avec 250 MTs (losanges), modèle biaisé avec 1000 MTs (cercles) (Wollman et al., 2005).

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 1.23A). Ce mécanisme réduit de manière importante le pourcentage d'erreurs quand il est inclus dans des simulations numériques (Mogilner and Craig, 2010; Paul et al., 2009).

Le second mécanisme serait que l'attachement amphitélique 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 syntélique sont fréquents et disparaissent souvent (Lampson et al., 2004) jusqu'à ce que seuls les attachements amphitélique 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 1.23B. 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.

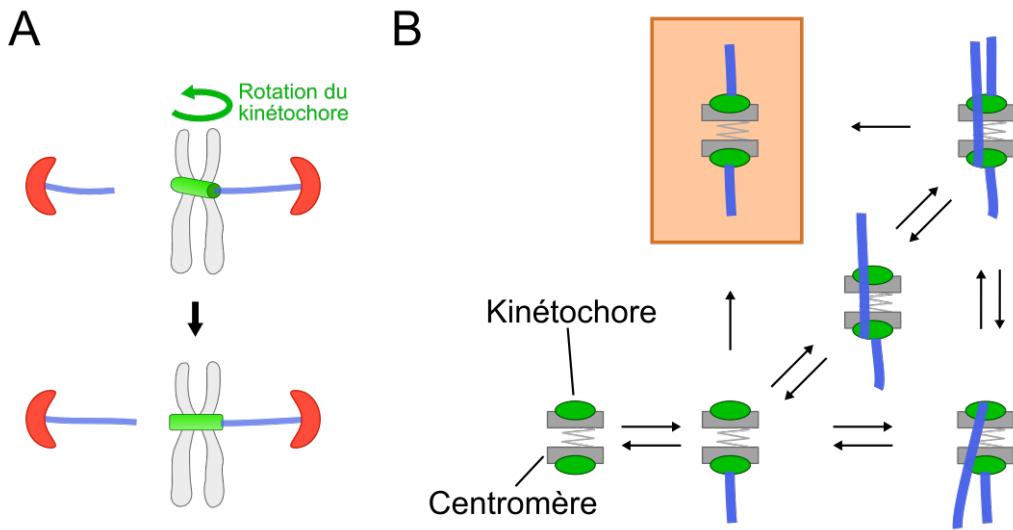


Figure 1.23: Deux mécanismes expliquant la fidélité des attachements durant le processus de « recherche et capture ». **A.** Mécanisme impliquant l'orientation du kinétochore frère en réponse à un attachement monotélique. **B.** Mécanisme évolutif qui « sélectionne » l'attachement amphitétrique (box couleur saumon) avec le temps en explorant différents états d'attachement.

1.4.4 La dynamique des chromosomes

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

L'un des phénomènes qui reste encore largement mystérieux dans le mouvement des chromosomes durant la mitose est le mécanisme qui permet au kinétochore de maintenir son attachement à des microtubules qui dépolymérisent. L'un des premiers modèles expliquant ce phénomène est le modèle de Hill (Hill, 1985). Ce modèle (« Hill sleeve model » en anglais) utilise des propriétés classiques de cinétique et thermodynamique pour montrer comment un microtubule qui dépolymérise peut rester attaché profondément dans une région du kinétochore composée de « crans » qui sont autant de mini barrières d'énergie (Figure 1.24A). Les hétérodimères de tubuline interagissent avec un nombre fini de sites d'attachements le long de cette région du kinétochore avec une affinité modérée. L'insertion est donc contrôlée par les fluctuations thermiques et le microtubule

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

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

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

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 1.24B). L'anaphase est aussi reproduite en dégradant le lien élastique entre les deux kinétochères représentant la cohésine. Ce modèle est capable de reproduire certaines propriétés du mouvement des chromosomes telles que leur vitesse de déplacement en métaphase et anaphase.

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

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

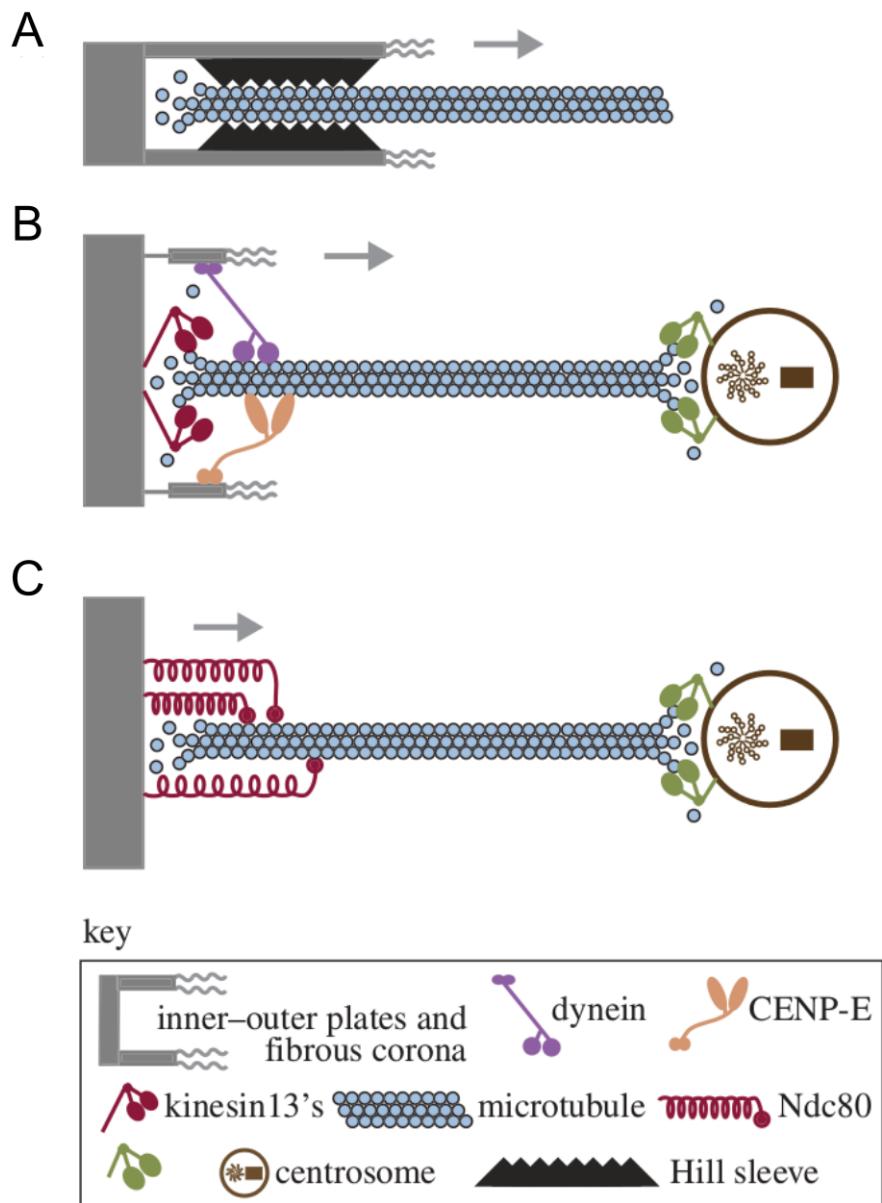


Figure 1.24: Différents modèles de types d'attachement entre le microtubule et le kinétochore (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014). **A.** « Hill sleeve model » qui suppose l'existence d'un nombre fini de sites d'attachements arrangeés en série. **B.** Une balance de force est mise en place entre différentes protéines motrices localisées aux pôles du fuseau et au kinétochore. **C.** L'attachement se fait par un complexe protéique non moteur appelé NDC80. Il fait office de coupleur dynamique.

scopiques 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.

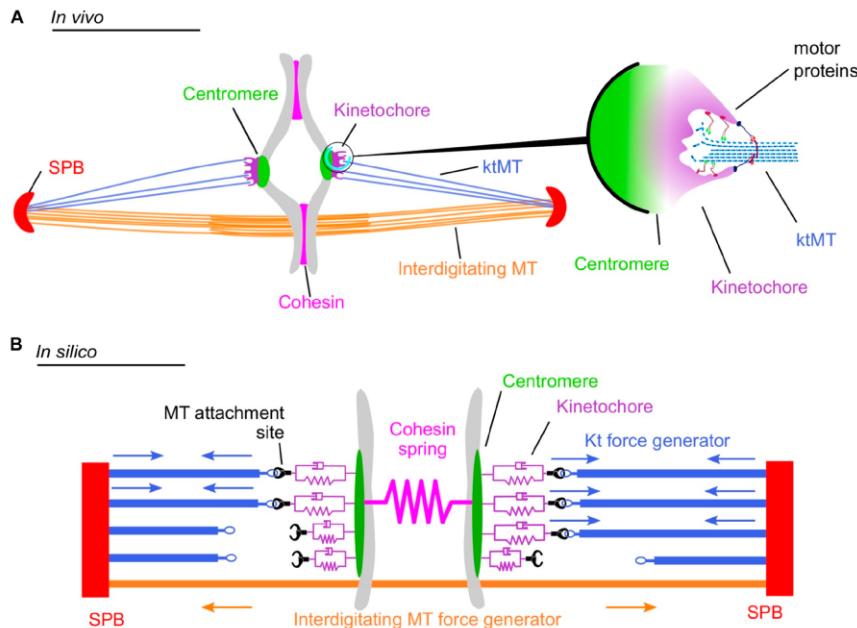


Figure 1.25: Modèle de ségrégation des chromosomes basé sur un attachement KT-MT stochastique (Gay et al., 2012). **A.** Schéma du fuseau mitotique de la levure à fission. **B.** Schéma du modèle représentant la façon dont sont agencés les différents éléments mécaniques du modèle reproduisant un fuseau 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 1.25). 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 1.24C). 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 1.24C).

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

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

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

Dans un 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 à la sa division (McIntosh et al., 2010).

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

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1.26) est une levure à division symétrique aussi appelée « levure à fission ». Elle est de forme cylindrique de 3 à 4 m de diamètre et de 7 à 10 m 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.

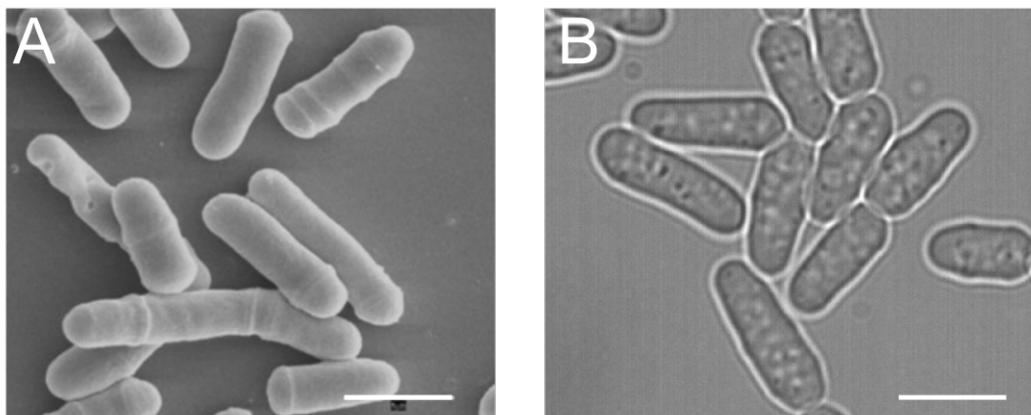


Figure 1.26: Morphologie de la levure à fission. **A.** Vue en microscopie électronique à balayage de *S. pombe* (Morgan, 2007). **B.** Vue en microscopie optique à champ large en fond clair. La barre correspond à 8 μm dans les deux vues.

Son cycle cellulaire classique est composé d'une phase G1 brève de 20min, d'une phase G2 longue de 2h et d'une phase de division (la mitose) qui dure une vingtaine de minutes (Figure 1.27). 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 ~2.5 m; la métaphase où le fuseau reste stable grâce à un mécanisme de balance de force (Gay et al., 2012), 2.5-3 m; l'anaphase A dure moins de 20s, l'allongement du fuseau est rapide, de l'ordre de 0.5 à 1 m·min⁻¹ (Fu et al., 2009); enfin l'anaphase B qui dure ~10min où le fuseau va s'allonger jusqu'à atteindre la taille de 5-6 m 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

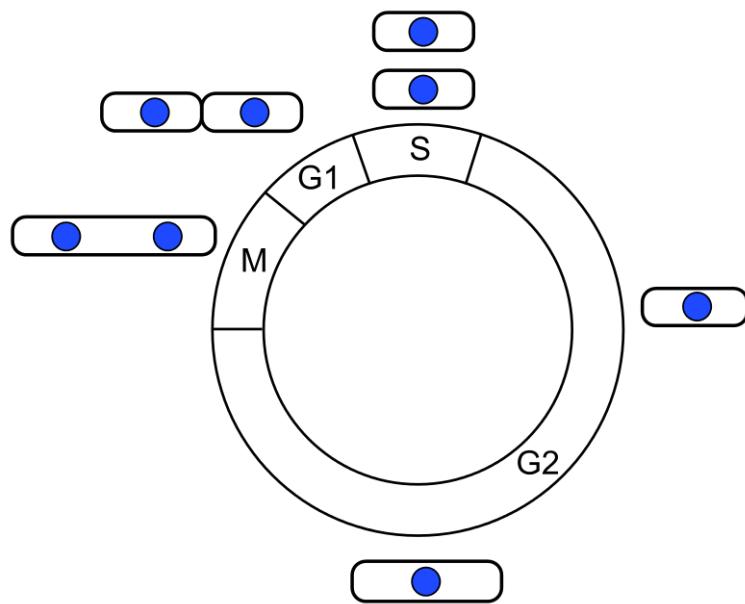


Figure 1.27: Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission. La levure à fission possède une phase G2 très longue comparé à d'autres types cellulaires.

lac (aussi appelée opéron lactose) au sein du génome. Le gène *lacI*, auquel a été ajoutée une sonde fluorescente GFP, code pour le répresseur qui va venir se fixer sur la partie du génome où a été inséré l'opéron *lac* (Figure 1.28A). 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 1.28B).

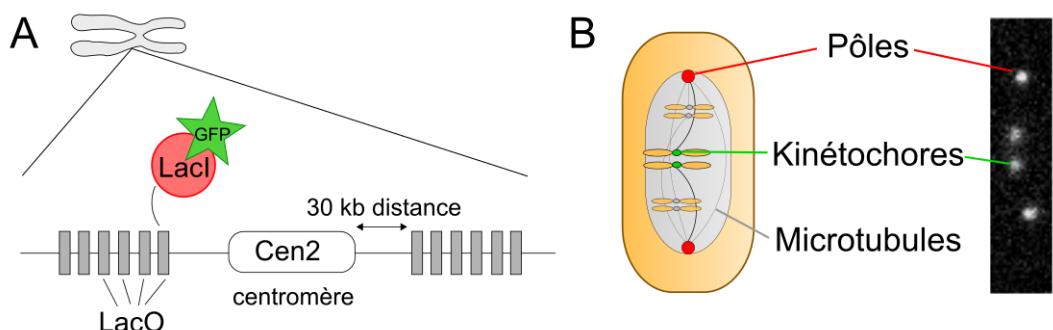


Figure 1.28: Visualisation d'un seul chromosome en microscopie à fluorescence. **A.** Système LacO/Lacl pour la visualisation d'une région spécifique d'un chromosome à l'aide d'un marqueur fluorescent de type GFP. **B.** Schéma et vue en microscopie à fluorescence d'une cellule de levure à fission marquée pour les deux pôles du fuseau et les deux 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 choses. Ici on entend par « dynamique des chromosomes », l'ensemble des processus qui gouvernent l'évolution spatiale et structurelle des chromosomes tout au long de la mitose.

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

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

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

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

2

Résultats

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

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

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

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

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

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

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

2.2 Reconstruction et analyse de la trajectoire des chromosomes en métaphase

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

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

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

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

2.2.1 La reconstruction 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 m) rend la différenciation entre les six kinétochores très difficile tout au long de la métaphase (Figure 2.1A).

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

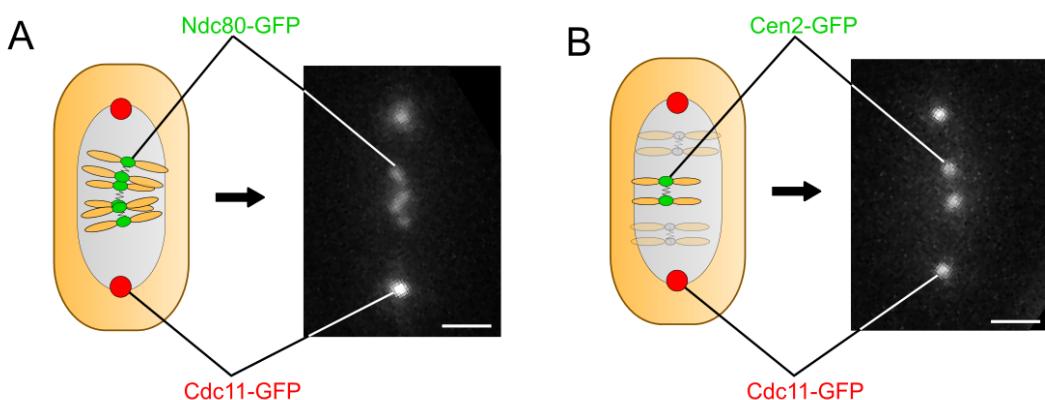


Figure 2.1: Image en microscopie à fluorescence de deux fuseaux mitotiques. **A.** Cellule marqué en GFP pour les six kinétochères (Ndc80-GFP, en vert sur le schéma) et pour les pôles (Cdc11-GFP, en rouge sur le schéma). **B.** Cellule marqué en GFP pour le centromère du chromosome II (Cen2-GFP, en vert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

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

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

2.2.1.1 Détection par fit gaussien

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

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

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

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

La qualité de la détection dépend aussi de la qualité du rapport signal/bruit de l'image ainsi que de la fidélité de la sonde fluorescente à reproduire une distribution gaussienne. Par exemple on peut remarquer que la sonde Cen2-GFP (Figure 2.2B) possède souvent une gaussienne moins bien définie que la sonde Cdc11-GFP (Figure 2.2C)). Ceci pourrait être causé par le fait que la sonde Cen2-GFP consiste en une répétition d'insertion d'un gène (LacO) 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 sur la longueur du chromosome.

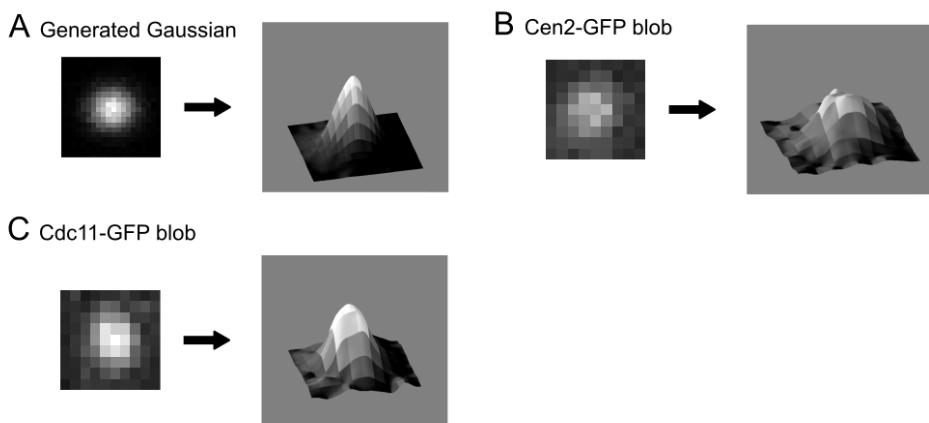


Figure 2.2: Distribution des intensités gaussiennes en deux dimensions. **A.** Cette image a été générée *in silico* par l'échantillonnage aléatoire d'une distribution gaussienne. Le surface plot (image de droite) contient une dimension supplémentaire en z dont la hauteur est proportionnelle à l'intensité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

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

2012). Son code est librement disponible.¹

Cette implémentation a été utilisée pour l'analyse des images de vidéo-microscopie durant ce travail. La précision de la détection a aussi été testée en détectant des 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 comparée (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 34 nm.

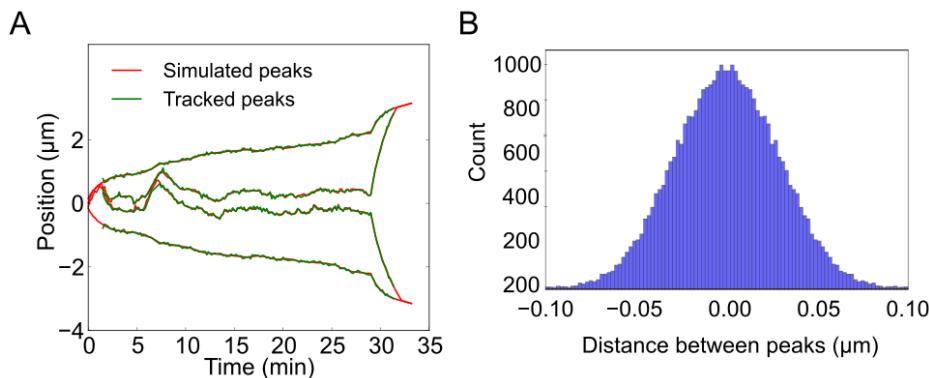


Figure 2.3: Précision de la détection des blobs. **A.** Superposition d'une trajectoire de chromosome et pôle simulée *in silico* (en rouge) avec la trajectoire reconstruite par détection de blob (en vert). **B.** Distribution de la distance entre les blobs simulés et les blobs détectés.

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

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

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

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

¹<http://git.io/vC9zf>

²<http://git.io/vCHGs>

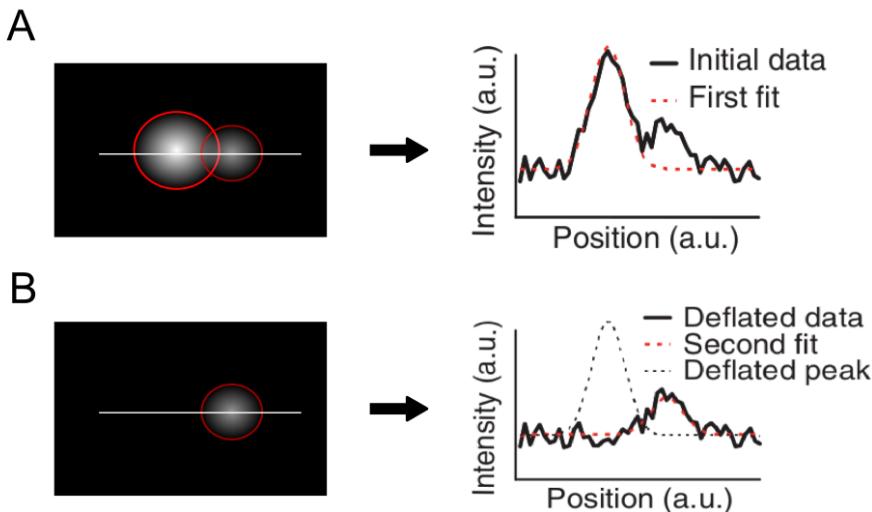


Figure 2.4: Principe de l’algorithme de détection de blob par déflation. **A.** Le premier tour de fit gaussien détecte le blob le plus grand et le plus intense. **B.** Une fois le premier blob détecté soustrait de l’image source, le second tour de fit gaussien détecte le blob plus petit et moins intense.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

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.

Une fois les blobs détectés pour chaque pas de temps, il faut encore relier 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).

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

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

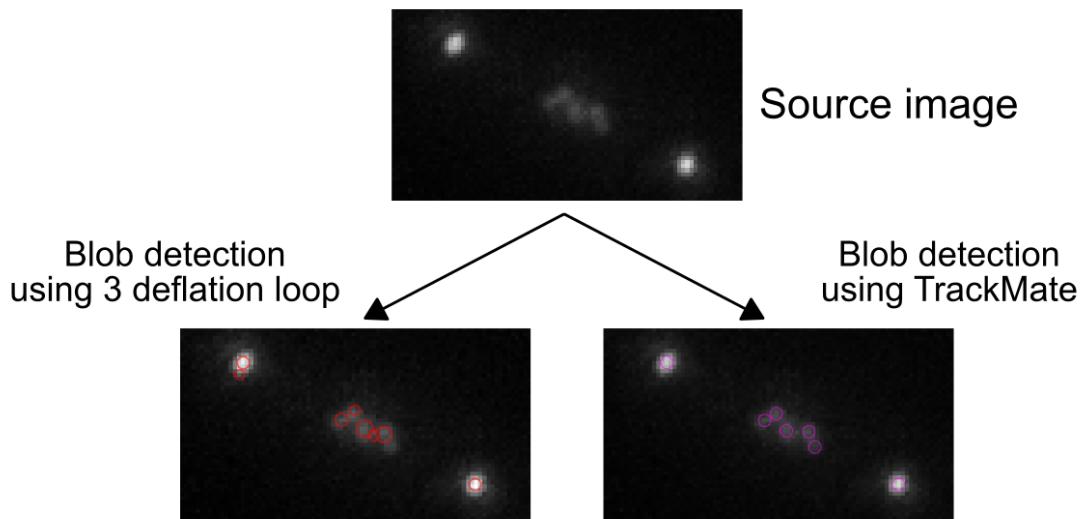


Figure 2.5: Comparaison entre le LoG détection de TrackMate et l'implémentation par déflation basé sur l'algorithme de Sergé et al. Aucun des deux algorithmes n'arrivent à détecter les six kinétochore et les deux pôles. Par contre l'algorithme de TrackMate (à droite) détecte cinq kinétochore et les deux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

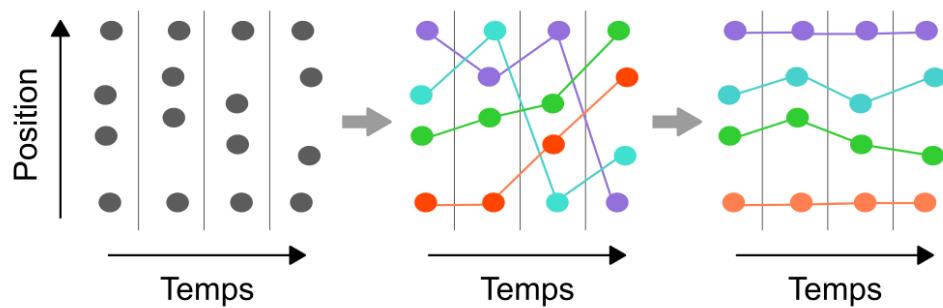


Figure 2.6: Le tracking est l'étape de liaison des objets d'intérêts dans le temps. Sans cette étape il est impossible de savoir si un objet est le même qu'un autre dans deux temps différents.

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 général 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).

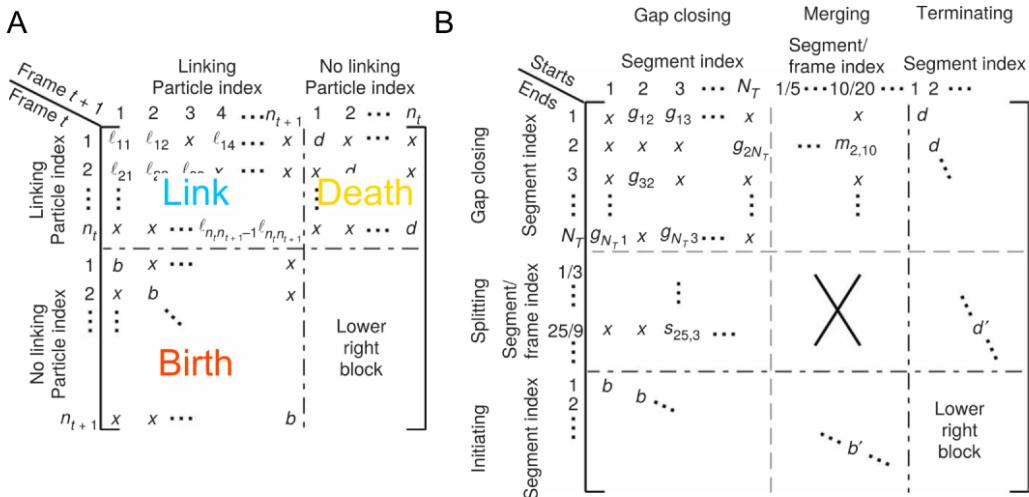


Figure 2.7: Les deux matrices de coût du LAP tracker. **A.** Matrice de coût contentant l'ensemble des liens possibles entre deux blobs pour deux pas de temps successifs t et $t+1$. Il existe donc autant de cette première matrice que de pas de temps dans la trajectoire. Le bloc en bas à droite (LRB) 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'une 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).

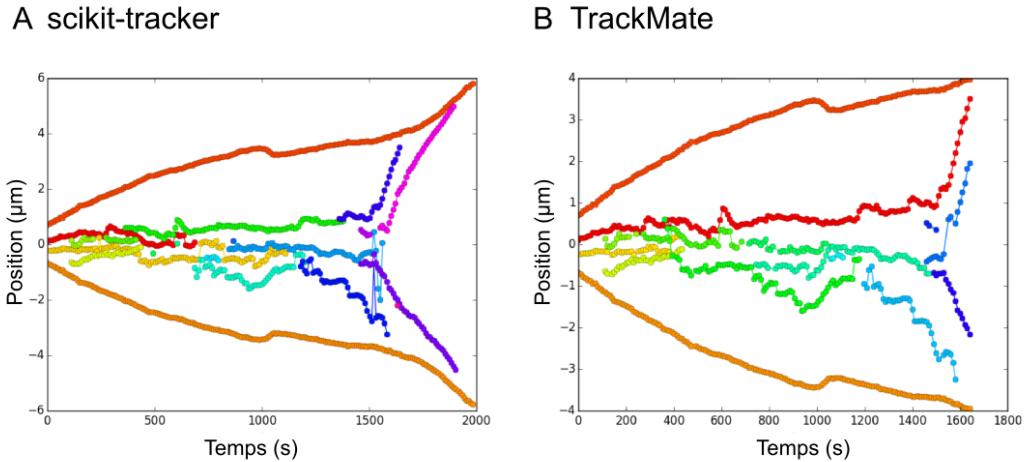


Figure 2.8: Reconstruction de la trajectoire avec six kinétochores. **A.** La reconstruction est basée sur une implémentation développée dans le cadre de cette étude appelé `scikit-tracker`. **B.** Reconstruction avec le plugin Fiji nommé TrackMate.

On observe que certains morceaux de trajectoires sont correctement reconstruits. Cependant,

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

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

Un chromosome

En observant 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 majorité des cas.

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

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

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

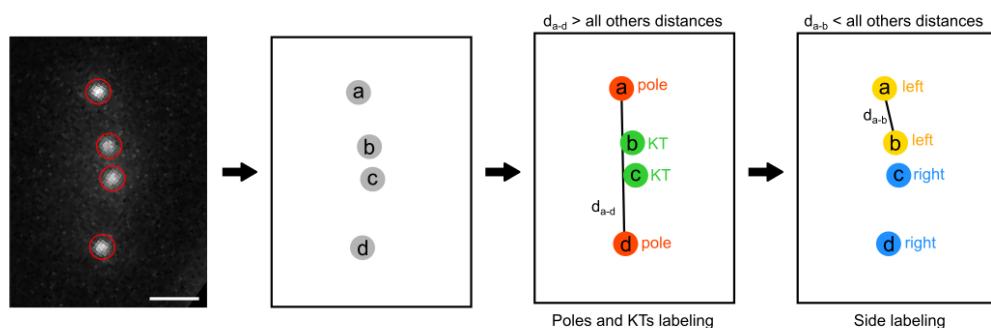


Figure 2.9: Algorithme de tracking pour un chromosome.

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.

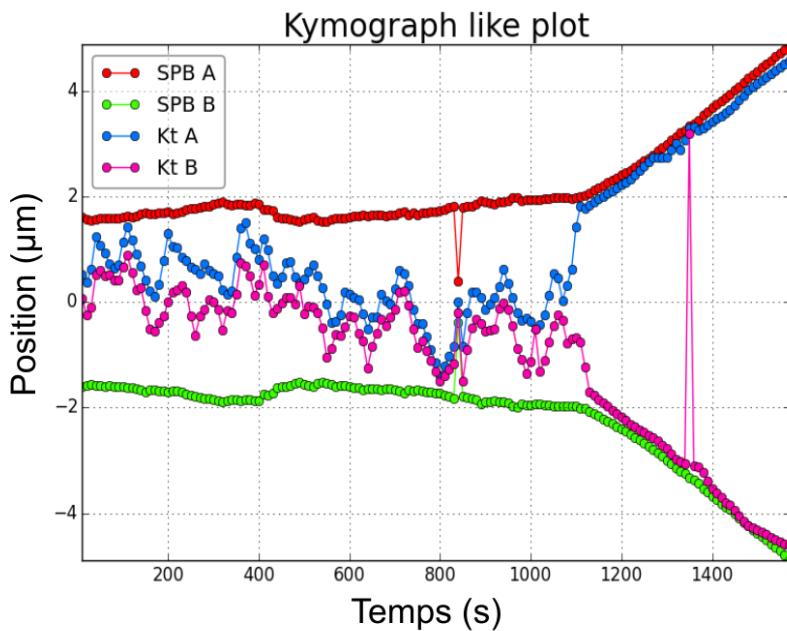


Figure 2.10: Reconstruction de la trajectoire du chromosome II et de ses deux pôles.

Interface de correction manuelle des trajectoires

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

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

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

³www.pyqtgraph.org

⁴<http://git.io/vCNxh>

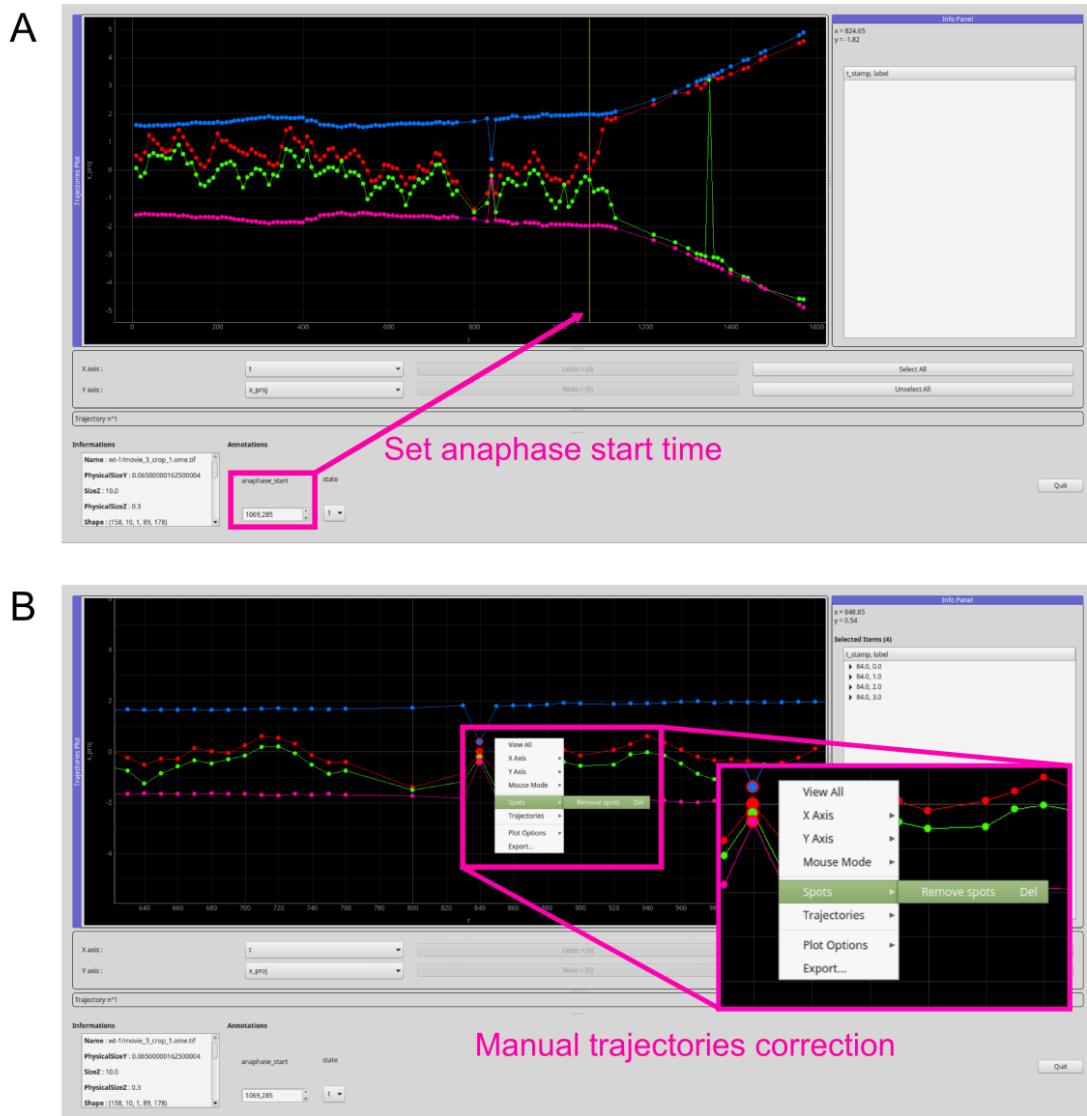


Figure 2.11: Interface graphique de correction manuelle des trajectoires. **A.** Le début de l'anaphase peut être modifier manuellement. **B.** Chaque trajectoire peut être modifiée à l'aide d'une interface simple et intuitive.

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 possède un film issu de la vidéo-microscopie à fluorescence contenant la dynamique des chromosomes et des pôles du fuseau mitotique durant la mitose. En sortie, on obtient la trajectoires de chacun des objets qui contient les positions ainsi que les propriétés géométriques des blobs pour chaque pas de temps.

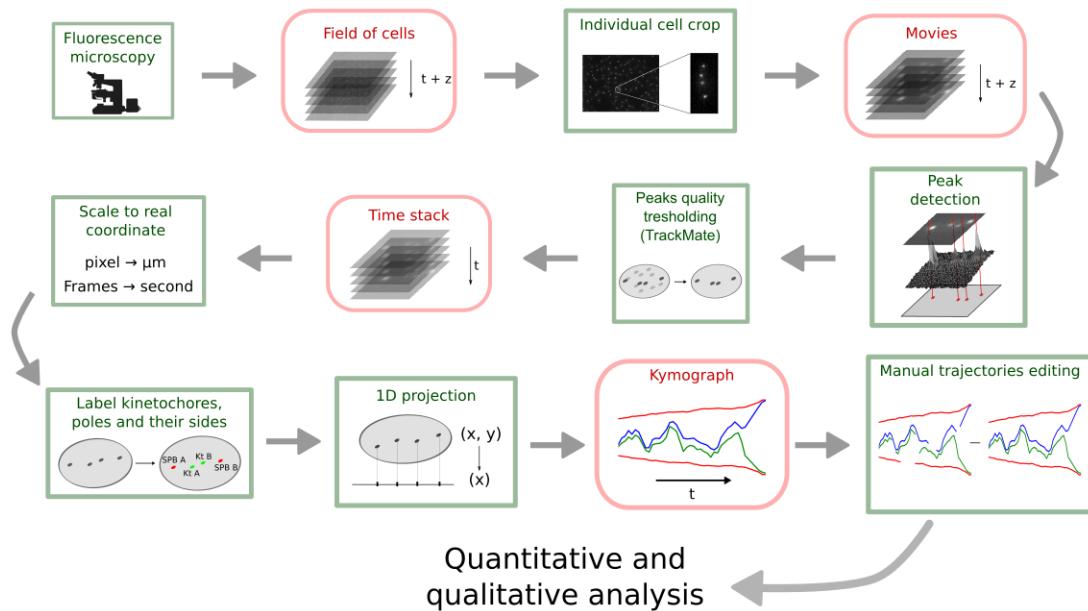


Figure 2.12: Workflow de reconstruction des trajectoires. Deux étapes nécessitent une intervention manuelle. Suite à la détection de blobs (peaks) et après la reconstruction automatique des trajectoires.

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 kinétochères frères

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

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

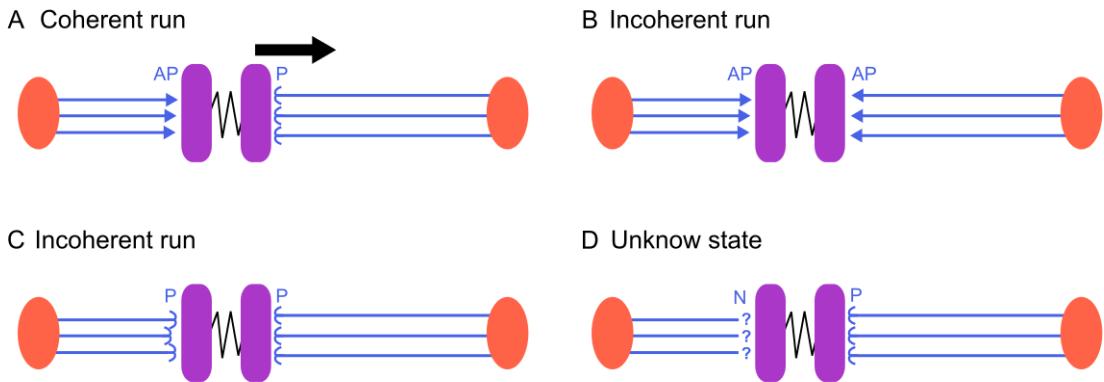


Figure 2.13: Schéma de mouvement cohérent et incohérent des kinétochores frères. **A.** Les deux kinétochores frères sont dans des états poleward et anti-poleward, le mouvement est cohérent. **B** et **C**. Les deux kinétochores frères sont dans le même état poleward ou anti-poleward, le mouvement est 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.

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

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

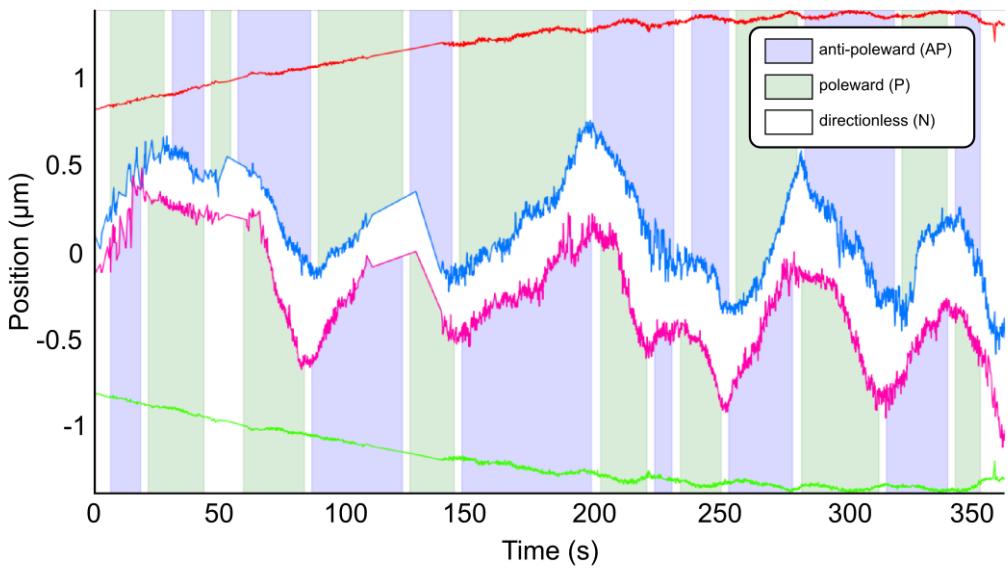


Figure 2.14: Direction des kinétochores frères en métaphase. Trajectoires des pôles (rouge et vert) et des kinétochores frères (bleu et rose) en métaphase dans une cellule sauvage. Le pas de temps de l'acquisition est de 100ms.

Plus précisément, l'état incohérent AP-AP semble privilégié alors que l'état P-P semble être le même que dans les cellules sauvages.

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

La distance inter-kinétochore peut être un bon moyen pour quantifier la tension exercée sur les kinétochores par les microtubules. De cette façon, en observant la distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions, on voit que de manière assez subtile la distribution des distances pour un état cohérent (AP-P) est en moyenne de 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 significatifs, ils pourraient supporter l'idée qu'un mouvement AP implique une force de poussée tandis qu'un mouvement P implique une force de traction sur le kinétochore.

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

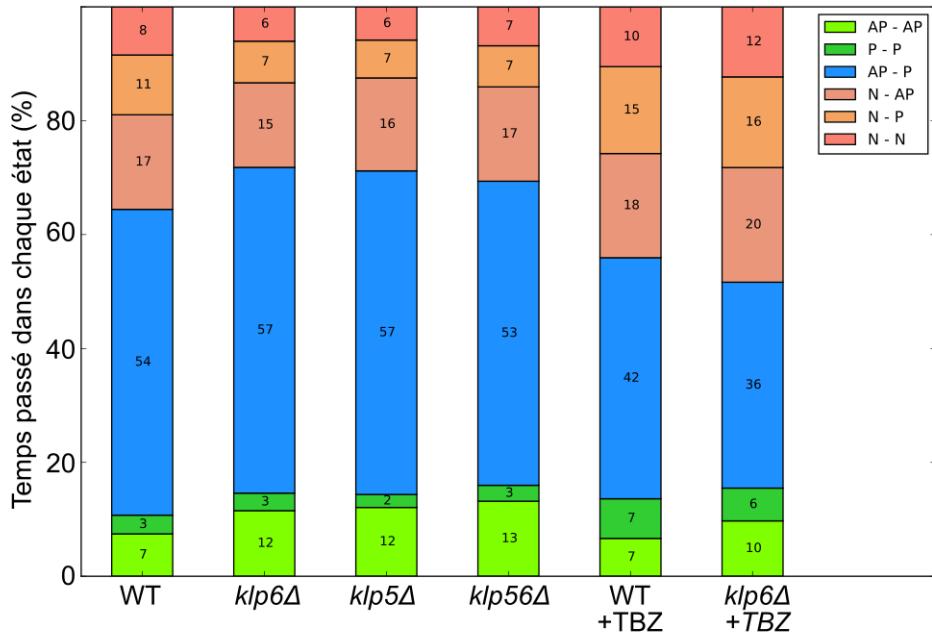


Figure 2.15: Temps passé dans les différents états de cohérence dans diverses conditions. WT désigne une cellule sauvage. *klp6Δ*, *klp5Δ* et *klp56Δ* désignent différents mutants de la kinésine-8 qui possèdent tous le même phénotype (voir Section 2.1 pour plus de détails). TBZ désigne une drogue, le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

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 d'analyser les trajectoires dans des fenêtre de temps réduite d'un facteur 10 à 100 afin de capter les propriétés biophysique sous jacentes qui contrôlent le mouvement des kinétochères au niveau moléculaire.

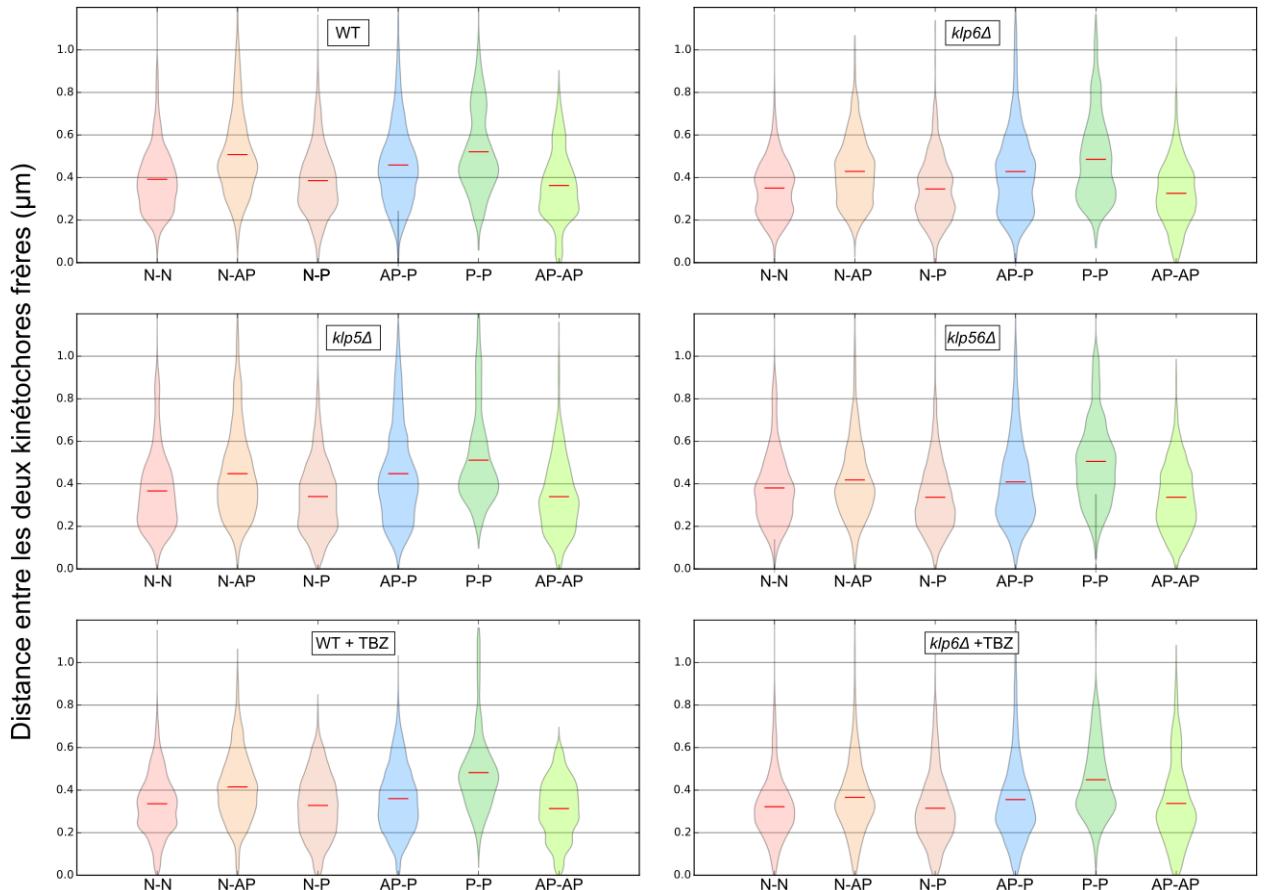


Figure 2.16: Distance inter-kinétochore en fonction de l'état de cohérence dans différentes conditions. La barre rouge des violin plots désigne la moyenne. WT désigne une cellule sauvage. $klp6\Delta$, $klp5\Delta$ et $klp56\Delta$ désignent différents mutants de la kinésine-8 qui possède tous le même 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 $klp6\Delta$, $n = 12$ pour $klp5\Delta$, $n = 26$ pour $klp56\Delta$, $n = 19$ pour WT+TBZ, $n = 14$ pour $klp6\Delta+TBZ$.

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 diffusif confiné qui est restreint dans l'espace, par exemple à cause d'une paroi cellulaire ou subcellulaire contraignant le mouvement d'une protéine.
- un mouvement dirigé qui est principalement gouverné par une force s'appliquant sur l'objet le mettant ainsi en mouvement dans une direction particulière.

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

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

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

- pour un mouvement diffusif (mouvement brownien) :

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

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

- pour un mouvement confiné et diffusif :

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

Où R_c est 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.

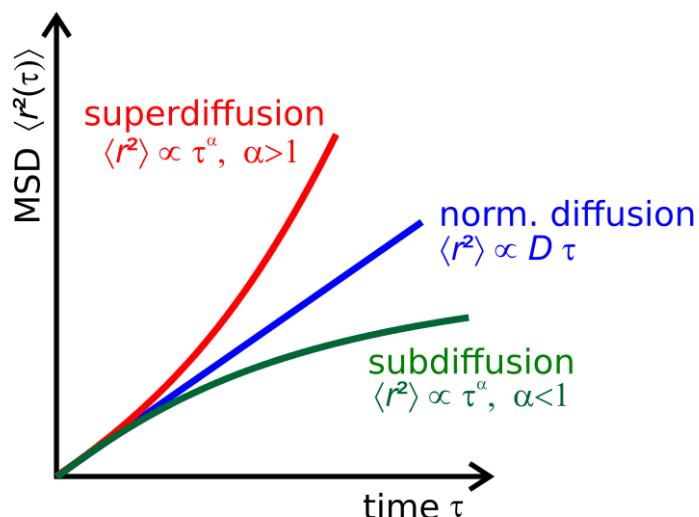


Figure 2.17: Exemple de MSD pour trois types de diffusion théoriques. Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMsd_anomalous_diffusion.svg

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 tout 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.

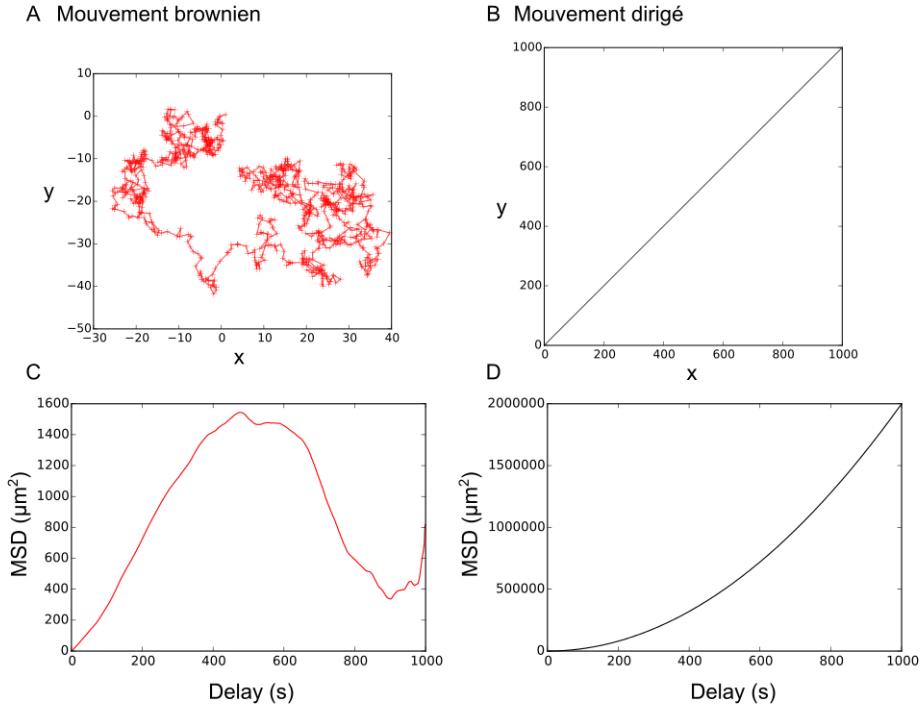


Figure 2.18: Exemple de MSD pour un mouvement dirigé et un mouvement brownien simulé. **A** et **B**. Évolution des positions d'une particule en deux dimensions dans le cas d'un mouvement respectivement brownien et dirigé simulé. **C** et **D**. MSD correspondant aux mouvements en **A** et **B**.

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). Toute la difficulté est de trouver la bonne technique pour remonter aux équations à partir des données. 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 déletées pour la 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 confirme qu'une force nette plus faible est appliquée dans ces conditions dû à un attachement plus faible des kinétochores aux microtubules. Les kinétochores seront alors soumis à un confinement forcé du fait des moindres forces s'exerçant sur elles. Cette observation confirme que l'attachement est primordial dans la génération de la force au niveau du kinétochore.

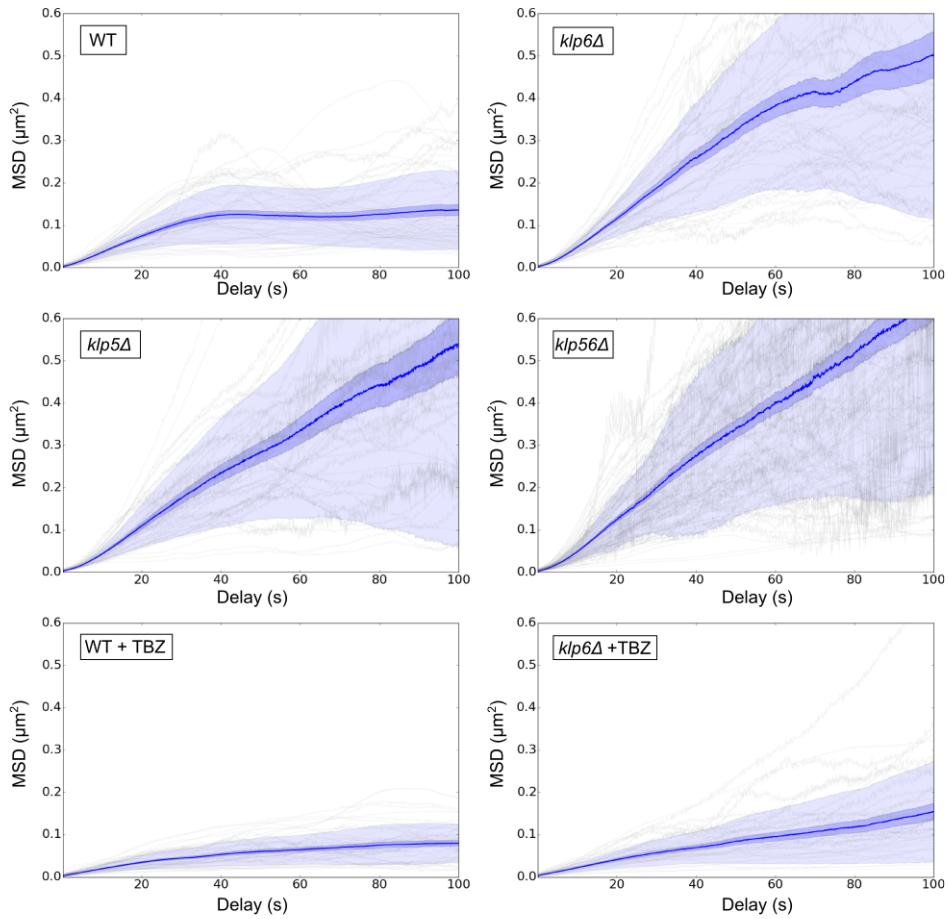


Figure 2.19: MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La ligne bleu foncé représente la MSD moyenne pondérée par le nombre de pas de temps pour un délai donné. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente 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 dû à la force appliquée au niveau des kinétochores. Cette pente serait alors caractéristique d'un mouvement dirigé.

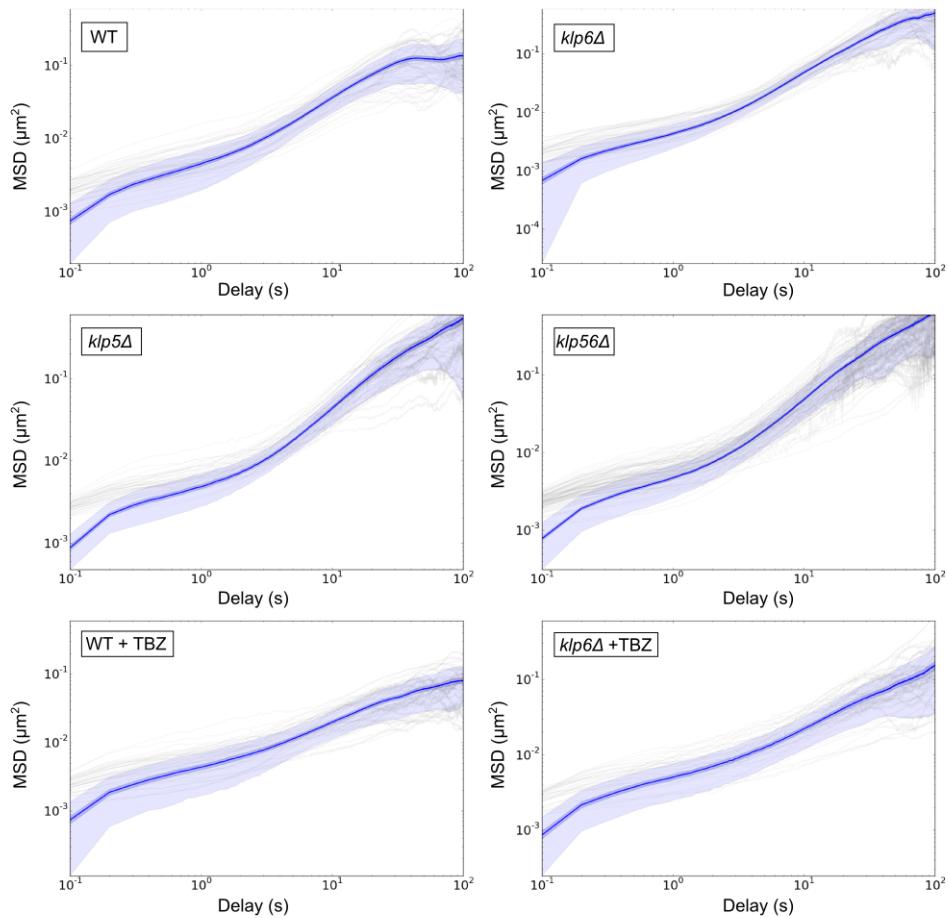


Figure 2.20: MSD en log-log pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. L'erreur en bleu clair représente l'erreur standard de la moyenne tandis que l'erreur en bleu très clair représente la déviation standard. Les MSD en gris correspondent aux MSD individuelles de chacune 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 comparée aux MSD sans TBZ. Cela pourrait signifier que

les kinétochores en présence de TBZ sont soumis des forces plus faibles probablement à cause de l'effet du TBZ sur la dynamique des microtubules. Cela souligne le rôle capital des microtubules dans la génération de la force au niveau des kinétochores. On note aussi que cette observation est confirmé par l'analyse des oscillations (Mary et al., 2015). Pour confirmer ce résultat il faudrait mesurer cette troisième pente en faisant varier les concentrations de TBZ et regarder si une corrélation existe.

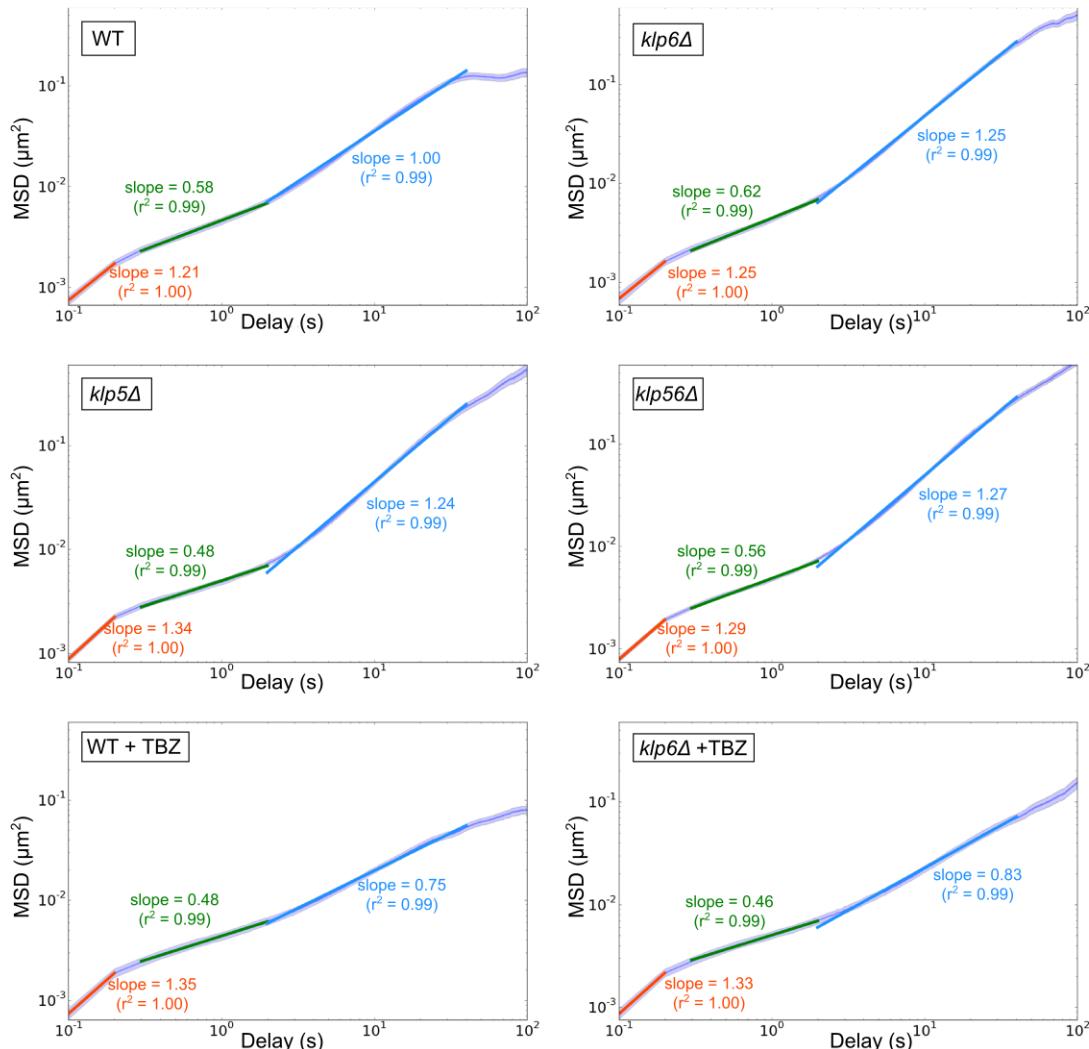


Figure 2.21: Régression linéaire sur des MSD pour différentes trajectoires de Cen2-GFP sous différentes conditions. La régression linéaire a été faite en utilisant la fonction `scipy.stats.linregress` de la bibliothèque python `scipy`. Les temps choisis pour les trois différentes régressions sont : de 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 phénomènes mis 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 quels sont les mécanismes sous-jacents responsables de la régulation de ces mouvements. L'approche « modèles de connaissance », qui s'inspire de la mécanique du point, 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 `kt_simul` : l'implémentation numérique du modèle de ségrégation des chromosomes

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

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

L'exécution d'un grand nombre de simulations peut prendre du temps, c'est pour cela qu'a été aussi ajouté à `kt_simul`, des fonctions permettant la répartition de différentes simulations sur différents coeurs de la machine qui les exécute (Figure 2.22). La parallélisation permet une réduction drastique des temps de calcul sans avoir à requérir à un puissant cluster, souvent cher et difficile d'accès. Ainsi une station de travail classique, 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.

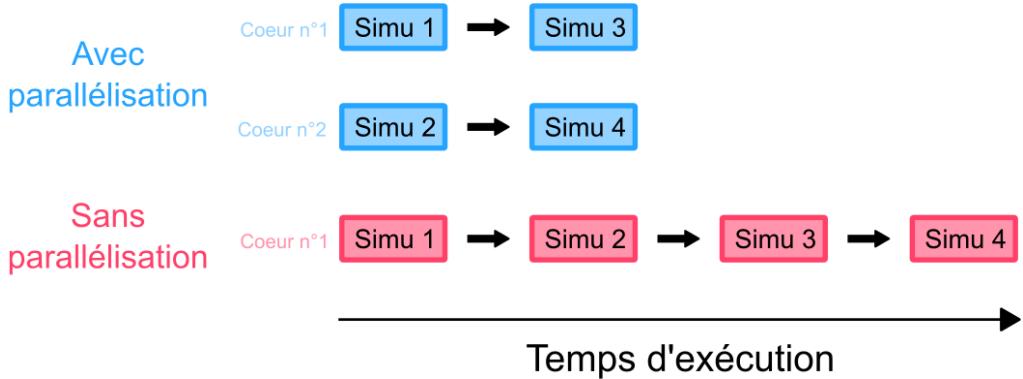


Figure 2.22: Schéma décrivant le principe de la parallélisation en informatique. Différence de vitesse d'exécution théorique entre une implémentation parallélisée et une implémentation séquentielle. Un algorithme parallélisé (en bleu) utilise les différents cœurs de la machine pour exécuter plusieurs simulations en même temps. 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 et le mouvement des chromosomes.

2.3.2 Un modèle de congression alternatif

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

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

L'hypothèse 1, présentée dans ce travail (Section 2.1), est principalement basée sur des observations *in vivo* et *in vitro* montrant que la kinésine-8 s'accumule de manière plus importante 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 études effectuées dans différents organismes (cellule humaines, levure à fission et levure à bourgeon) ne s'accordent pas sur le paramètre exact de la dynamique des microtubules qui est modifié par la kinésine-8, toutes s'accordent

Hypothesis 1 : Length-dependent pulling force

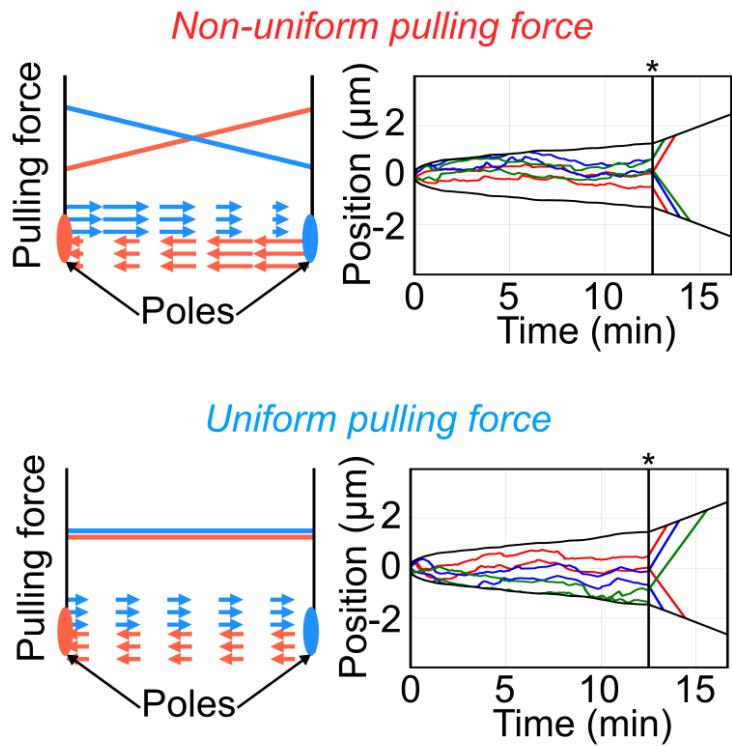


Figure 2.23: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans force dépendante de la longueur.

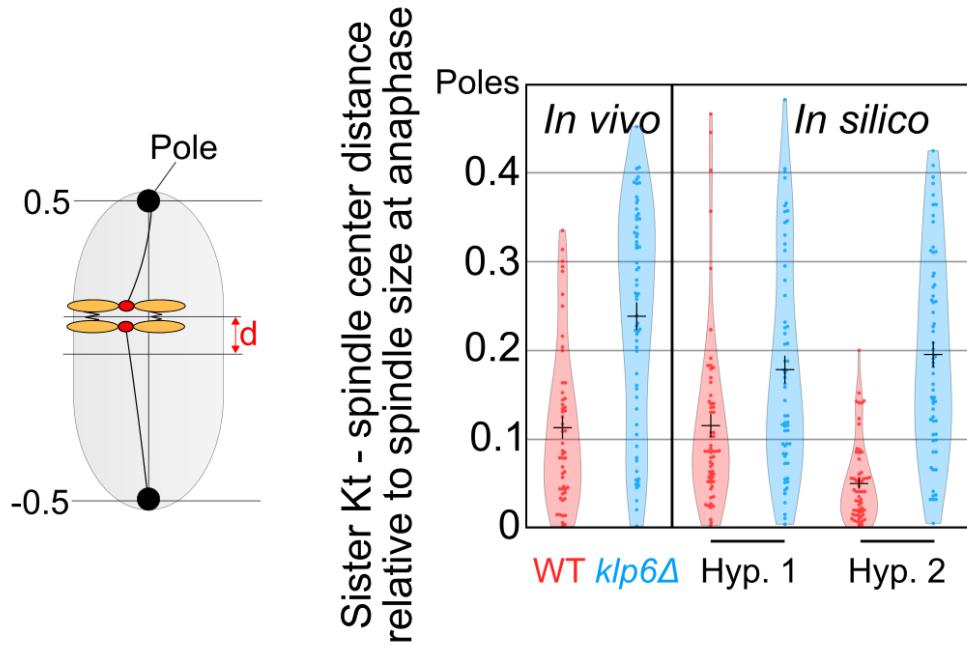


Figure 2.24: Distribution de l'alignement relatif des chromosomes en anaphase *in vivo* (dans les cellules WT, $n=52$ et $\text{klp6}\Delta$, $n=63$) et *in silico* pour l'hypothèse 1 (avec, $n=60$ ou sans la force dépendante de la longueur, $n=60$) et *in silico* pour l'hypothèse 2 (avec, $n=60$ ou sans la force dépendante de la longueur, $n=60$). Une distance proche de 0 signifie que le chromosome est positionné au milieu du fuseau mitotique.

à dire que la kinésine-8 possède une activité dépolymérisatrice et régule la longueur des microtubules (Messin and Millar, 2014; Walczak et al., 2013).

La force dépendante de la longueur, décrite par l'hypothèse 1, peut donc s'expliquer par le fait que si un microtubule possède une densité plus élevée de kinésine-8 à une extrémité, il produira une force de traction plus élevée sur le kinétochore. Bien que cette hypothèse reproduise de manière fidèle l'alignement ainsi que l'absence de chromosomes retardataires en anaphase (Figure 2.24 et aussi Figure 7 de l'article en Section 2.1), le mécanisme proposé est encore très phénoménologique et le lien entre force de traction et kinésine-8 reste largement hypothétique.

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

L'hypothèse 2 est 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 n'est pas uniforme mais suit une distribution de type « distribution en cloche » (possédant un paramètre de position et un paramètre d'échelle) comme une distribution gaussienne par exemple.

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

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

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

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

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

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

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

Puisque nous n'avons pas accès à la distribution des extrémités des microtubules au sein du fuseau, une distribution suivant une loi de Cauchy a été choisi (Figure 2.25). Ce

type de distribution est préféré par rapport à une distribution gaussienne plus classique à cause de sa longue queue qui permet de ne pas interdire les attachements proches des pôles. On définit $n_{dep}(d_{KT})$ comme suit :

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

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

Hypothesis 2 : Length-dependent KT-MT attachment

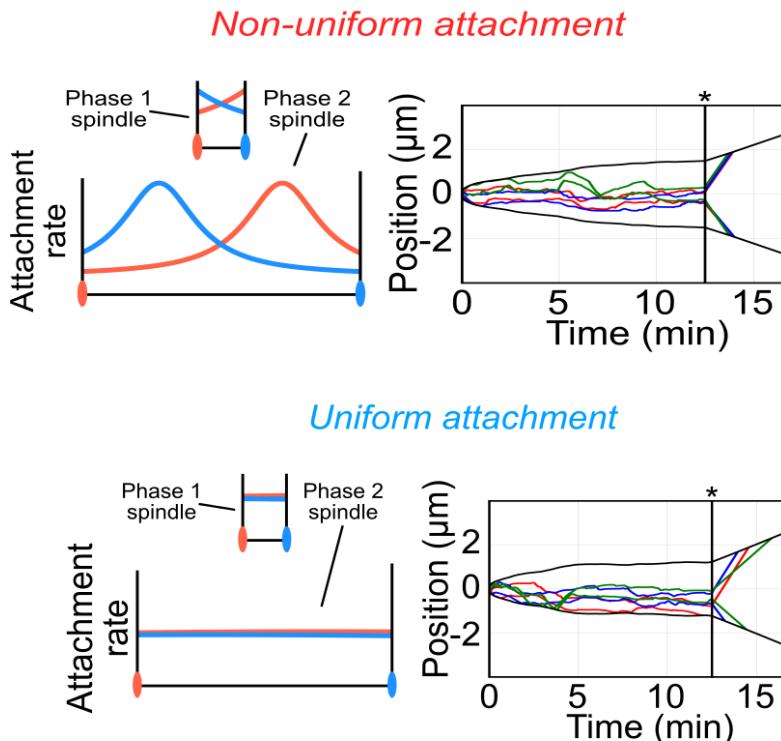


Figure 2.25: Schémas et exemple de trajectoire *in silico* du mécanisme d'alignement avec et sans taux d'attachement dépendant de la longueur.

Ni le modèle initial (Gay et al., 2012), ni les deux hypothèses développées ici ne sont cependant suffisantes pour reproduire l'amplitude des oscillations 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.

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

2.3.3 Vers un modèle d'attachement à trois états

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

On rappelle que le modèle initialement développé par 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 » et produire une force en direction du pôle, soit « OFF » et ne produire aucune force (Figure 2.26). Le passage entre les deux états se fait de manière stochastique avec en plus deux mécanismes de corrections qui peuvent modifier les constantes d'attachement et de détachement (voir Gay et al. (2012) pour le fonctionnement de ces deux mécanismes de corrections).

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

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

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

Un des mécanismes possible générant la force de poussée (« pushing force » en anglais) serait le cliquet brownien (« brownian ratchet » en anglais) dans lequel les fluctuations thermiques permettrait l'ajout de dimères de tubuline à l'extrémité plus des microtubules

Attached & Shrink : Force ON

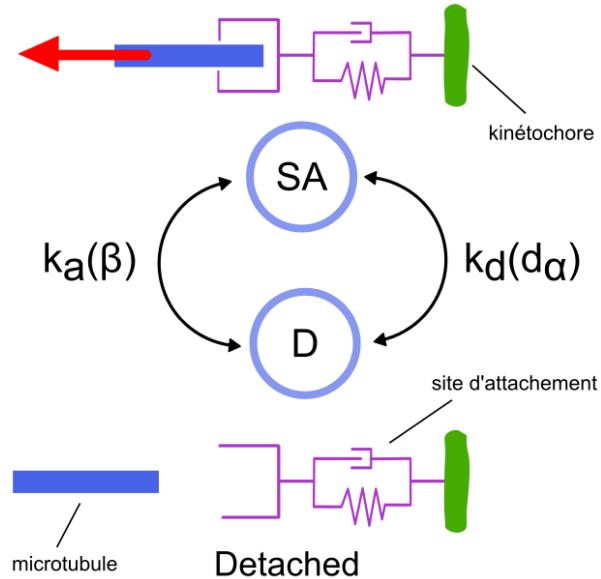


Figure 2.26: Modèle d'attachement à deux états. Le passage d'un état à l'autre se fait de manière stochastique et est régulé par deux mécanismes de corrections gouvernés par les deux paramètres β et d_α (Gay et al., 2012).

(Peskin et al., 1993). Par ailleurs, bien que les forces de poussées ont été observées *in vivo* (Skibbens et al., 1993), il est supposé que leur contribution aux mouvements des chromosomes soient très minoritaires (Khodjakov and Rieder, 1996; Waters et al., 1996) et que la force de traction soit l'acteur majeur gouvernant le mouvement des chromosomes (Inoué and Salmon, 1995).

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

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

L'implémentation de ce modèle suppose donc que le passage de D à GA (et inversement) et de D à SA (et inversement) sont toujours dirigés par les deux mécanismes déjà décrits

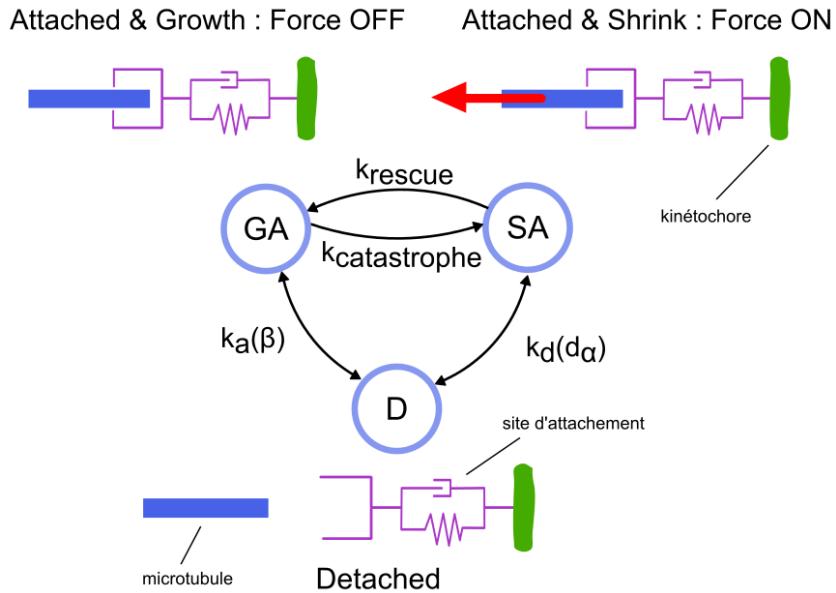


Figure 2.27: Modèle d'attachement à trois états. Les trois états prennent en compte les différentes observations faites entre la génération de la force au niveau du kinétochore et la dynamique des microtubules.

dans Gay et al. (2012) et dépendant des mécanismes de correction des attachements 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 de polymérisation à un état de dépolymérisation) du microtubule attaché et que le passage de SA à GA soit gouverné par le taux de rescue, k_{rescue} , (passage d'un état de dépolymérisation à un état de polymérisation) du microtubule attaché (Figure 2.27).

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

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

Ainsi le système introduit un mécanisme de communication entre les deux kinétochères frères et on suppose alors que les oscillations proviennent directement de la capacité des kinétochères à détecter l'état dans lequel ils sont (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 :

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

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

GUILLAUME: JAI DU MAL A ME SOUVENIR/COMPRENDRE PK ON A CONSTRUIT 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 SEPLIQUER 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 paramètres ajoutés par ce modèle a rendu très difficile leur optimisation 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 ont été tentées mais sans succès.

Il est probable que ce modèle à trois états, bien que complexe, soit capable de reproduire une partie du mouvement des chromosomes observées *in vivo*. Cependant, il manque encore 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 il ne resterait 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.

3

Discussion

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

L'explosion des données générées par la biologie dans les années 2000 a basculé cette discipline dans une nouvelle ère. Avant les chercheurs manquaient de données sur lesquelles travailler ou dépensaient énormément de temps et d'argent à générer une quantité 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 échelles de temps géologique sur lesquels sont basées ces processus.

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

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

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

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

- La biologie en est la clé de voûte, étant à la base de la problématique étudiée : la compréhension des mécanismes responsable de la dynamique des chromosomes durant la mitose.
- L'approche biophysique a permis à la fois d'appliquer des techniques d'analyses provenant de la physique (comme la MSD par exemple) afin de mieux comprendre la façon dont les chromosomes bougent, mais aussi de tester des hypothèses mécaniques *in silico* sur la façon dont les chromosomes se positionnent le long du fuseau mitotique.
- Enfin, l'outil informatique permet la conception de programmes d'analyse automatique, documentés et libre d'accès. Ces deux derniers points étant à la base d'une recherche 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, même si elle se généralise dans les laboratoires, a permis d'explorer de nouvelles hypothèses à l'origine de la régulation de la dynamique des chromosomes durant la mitose chez la levure.

3.2 La dynamique des chromosomes en mitose

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

3.2.1 Le mécanisme de congression des chromosomes

L'alignement des chromosomes au milieu du fuseau mitotique est une observation faite dans une grande majorité des cellules eucaryotes. Cette régulation spatiale implique qu'au moins un des processus régulant la dynamique des chromosomes soit capable de « détecter » la position du chromosome le long du fuseau.

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

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

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

La première est que comme les autres homologues de la kinésine-8, Klp5 et Klp6 s'accumulent de façon dépendante de la longueur le long des microtubules. Bien que cette hypothèse ait été observée dans des microtubules nucléaires en mitose chez la levure à fission (Mary et al., 2015), elle reste controversée car la haute processivité *in vitro* de Klp5 et Klp6 n'a pas été observée (Erent et al., 2012; Grissom et al., 2009) comme chez les autres homologues de la kinésine-8; la cellule humaine et la levure à bourgeon (Stumpff et al., 2011; Varga et al., 2006). Cela pourrait s'expliquer par le fait que Klp5 et Klp6 agissent en formant un hétérodimères (Unsworth et al., 2008) et que des modifications essentielles ou bien l'ajout de composants encore non-identifiés manqueraient

durant les étapes d'expression et de purification *in vitro* (Messin and Millar, 2014). De plus une étude *in vivo* sur des microtubules cytoplasmiques a montré que Klp5 et Klp6 augmentent le taux de catastrophe des microtubules d'une manière dépendante de leurs longueurs (Tischer et al., 2009).

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

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

Ce modèle gros grain est donc basé sur une hypothèse très forte du lien entre la force et la dépolymérisation du microtubule. De plus les mécanismes moléculaires générant cette forces ne sont pas intégrés dans le modèle.

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

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

Cette hypothèse moins forte que celle de l'influence de la kinésine-8 sur la génération de la force au kinétochore a été testé *in silico* (voir Section 2.3.2).

En effet, l'intégration de cette hypothèse se fait par la modulation spatiale du taux d'attachement des kinétochères. Cette distribution non-linéaire est censé reproduire la distribution des extrémités plus des microtubules. Dans le cas de la présence de la

kinésine-8, la distribution est supposée être en forme de cloche tandis qu'en son absence la distribution est supposée linéaire.

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

Une première tentative d'implémentation de l'hypothèse alternative était basée sur les distributions observées par microscopie électronique des microtubules du fuseau mitotique (Ding et al., 1993; Ward et al., 2014). Cependant, il a été impossible de reproduire des trajectoires de chromosomes similaires à celles observées *in vivo*.

La distribution en forme de cloche a donc été choisie de manière arbitraire et ses paramètres optimisées afin de reproduire l'alignement observé *in vivo* (voir Section 2.3.2).

Les premiers résultats montrent que cette hypothèse alternatif arrive à reproduire la congression des chromosomes de la même manière qu'avec la première hypothèse (Mary et al., 2015).

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

3.2.2 La régulation du mouvement des chromosomes

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

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

soit dépendant de la concentration de Kif18a (donc de la longueur dû à sa processivité sur le microtubule).

Ce travail de thèse montre que l'amplitude des oscillations des chromosomes chez des cellules *S. pombe* délétees pour la protéine Klp6 est plus important que dans des cellules sauvages (voir la Figure 2 dans Mary et al. (2015)). De plus il est observé chez ces même cellules que Klp6 permet la congression des chromosomes, de la même manière que chez les cellules humaines avec Kif18a.

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

Cependant, ce travail a aussi montré que l'inhibition des oscillations des chromosomes a un effet seulement minime sur leur congression le long du fuseau mitotique. Un résultat non détaillé montre aussi qu'il existe un mutant chez la levure à fission (le mutant *dam1Δ*) qui n'exhibe pas d'oscillations mais dont les chromosomes sont alignés en métaphase (voir l'annexe en Section A.2). Ensemble ces deux résultats vont donc l'encontre de l'hypothèse proposé par Stumpf et al..

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

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

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

Ce centrage très tôt en prométaphase a déjà été décrit chez des cellules de mammifères (Kapoor et al., 2006) et a montré que ce processus était dépendant de CENP-E (kinésine-7). Il est par ailleurs intéressant de noter que Grissom et al. ont proposé que la kinésine-8 chez la levure à fission pourrait partager des propriétés communes avec la kinésine-7 absente chez ce dernier (Grissom et al., 2009). Cela serait alors un exemple du principe stipulant qu'à travers un vaste ensemble phylogénique, le fuseau mitotique et ses composants préservent leurs fonctions mais pas nécessairement l'identité de leurs protéines (McIntosh et al., 2002).

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

Cependant, bien que les deux modèles de congression proposés ne reproduisent pas les oscillations, cela ne signifie pas que celles-ci ne jouent pas nécessairement un rôle dans la congression. Il serait donc intéressant de pouvoir reproduire les oscillations des chromosomes *in silico* afin d’étudier plus finement leurs possibles impacts sur la congression.

Mais le mécanisme de génération du mouvement reste encore mal compris et il est donc encore difficile de modéliser mathématiquement et de manière fidèle le mouvement des chromosomes dans un cadre générale de la ségrégation des chromosomes (Gay et al., 2012).

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

L’un des challenges auquel a à faire la cellule dès lors qu’une force est générée au niveau des kinétochères frères et la régulation qu’exerce l’un des kinétochères par rapport à son frère. En effet l’état de cohérence entre les deux kinétochères doit être synchronisé afin de pouvoir générer un mouvement le plus efficace possible. TODO A REFORMULER

L’origine de cette synchronisation est encore inconnue bien QUE des études proposant des hypothèses de processus actifs basées sur la détection de la force et la présence d’une horloge moléculaire au niveau du microtubule existent (Armond et al., 2015; Burroughs et al., 2015; Vladimirov et al., 2013). TODO A REFORUMLER ETRE CRITIQUE ILS NE PROPOSENT PAS DE MECANISME

Une idée alternative est que l’instabilité directionnelle des chromosomes (Skibbens et al., 1993) est une propriété inhérente des kinétochères et que le changement d’un état P-AP ou AP-P est indépendant de toutes influences extérieures. Dès lors la synchronisation serait le résultat de l’émergence d’une dynamique gouvernée par l’instabilité dynamique des microtubules couplée au kinétochore. Ce modèle appelé « dumb kinetochore model » discuté par Khodjakov et al. (Khodjakov et al., 1999) est soutenu par l’observation qu’une partie significative des kinétochères frères sont dans un état d’incohérence chez la levure à fission (voir l’annexe Section 2.2.2) et que 20% des trajectoires de chromosome chez la cellule HeLa exhibent des mouvements « hautement stochastiques » (Burroughs et al., 2015).

Il est possible de tester ces modèles de régulation des mouvements P et AP par deux approches différentes. La première serait de concevoir un modèle mathématique simple et

TODo VIRER « from scratch » afin de comprendre les mécanismes fondamentaux capable de produire des mouvements oscillatoires. Une première tentative d’implémentation naïve est disponible dans les annexes en Section A.3. Cet modèle est composé de trois paramètres : un taux d’attachement, un taux de détachement ainsi que le nombre de site d’attachements par kinétochore. Les premiers résultats semblent indiquer que ces trois paramètres ne sont pas suffisant pour obtenir un mouvement régulier et qu’il manque probablement des mécanismes plus complexes de régulation des attachements.

Une autre possibilité serait de poursuivre l’implémentation du modèle d’attachement à trois états dans le modèle initiale de ségrégation des chromosomes sur lequel est basé ce travail (Gay et al., 2012) (voir Section 2.3.3). TODO ICI DISCUTER AVEC GUIL-LAUME

Pour finir, on note que les études faites sur le mouvement et les oscillations des chromosomes a presque toujours été faite sur des eucaryotes supérieurs et rarement chez des organismes tel que la levure à fission.

Pourtant il est intéressant de souligner que les mouvements observés chez les levures sont irréguliers (Mary et al., 2015; Stephens et al., 2013) comparés à ceux observés chez les cellules eucaryotes supérieurs tel que les cellules humaines (Jaqaman et al., 2010). Cependant, ces cellules peuvent aussi posséder des chromosomes exhibant des mouvements irréguliers (Burroughs et al., 2015).

Dès lors il devient important de se poser la question de savoir non pas comment les chromosomes oscillent mais bien quel mécanisme peut expliquer une diversité aussi vaste de mouvement des chromosomes; aussi bien les oscillations régulières que les mouvements irréguliers.

Plusieurs différences pourraient expliquer le mouvement irrégulier observé chez les levures. Tout d’abord la taille du fuseau est beaucoup plus faible, tout comme le nombre de microtubules attachés. Les chromosomes seraient donc soumis à un éventail de forces plus restreintes et seraient donc plus sensible aux phénomènes stochastiques qui gouvernent la dynamique du fuseau à ces échelles.

Une autre hypothèse pourrait s’expliquer par la différence de structure des protéines composant les microtubules (la tubuline α et β). En effet si on suppose que le mouvement est en partie dû à l’instabilité dynamique des microtubules alors leurs structures doivent jouer un rôle crucial dans la régulation de cette dynamique. Il faudrait mettre au point une étude *in vitro* afin de comparer les différentes type de tubuline α et β chez différents organismes ainsi qu’une analyse bioinformatique afin de comparer leurs différences de structures d’un point de vue phylogénique. TODO A VIRER ?

CHEZ POMBE TELOMERE STRUCTURE CHROMATIDE SOEUR PAS RESOLU

PAS DE CHROMOKINESINE TELOMERE ACTEUR DE LA SEGREGATION MUNTANT AVEC DEFAUT INTEGRER CA DANS LA DYNAMIQUE

TODO: GUILLAUME DAUTRE IDEES (même les plus folles !!!) ???

3.2.3 Vers un modèle global de la division cellulaire

La modélisation mathématique n'est pas une fin en soi et ne peut en aucun cas servir de preuve formelle expliquant un mécanisme moléculaire. Elle est au même titre que des expériences *in vivo* et *in silico*, une façon alternative pour proposer une hypothèse expliquant un mécanisme.

Par exemple dans le cas de la congression, les deux modèles numériques de congression proposés ouvrent des pistes sur les possibles mécanismes moléculaires participant à la congression des chromosomes en métaphase.

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

Les buts de ce travail sont multiples.

Tout d'abord afin de pouvoir généraliser à la cellule entière et à différents organismes, il faut modifier la géométrie pour l'instant en une dimension à une géométrie en trois dimensions.

Par la suite l'idée serait de reproduire la ségrégation des chromosomes chez *C. elegans* qui à la particularité de posséder des chromosomes holocentriques dont les centromères s'étendent sur toutes la longueur des bras des chromosomes. Le challenge ici sera donc de positionner correctement dans la géométrie du modèle l'ensemble des sites d'attachements le long des chromosomes. TODO TAS MIEUX ?

Le but final est fusionner le modèle de ségrégation avec un modèle de positionnement du fuseau mitotique au sein du cytoplasme. En effet, l'orientation du fuseau est un processus actif soumis à des forces corticales (Pecreaux et al., 2006).

Ce modèle de division cellulaire pourra alors étudier le lien entre les forces positionnant le fuseau mitotique avec les forces générées à l'intérieur du fuseau au niveau des kinétochores. En effet il n'a encore jamais été montré si la ségrégation des chromosomes pouvait être influencé par ce type de processus.

Pour finir la généralisation du modèle à deux organismes ouvre la voix vers une modélisation globale capable d'expliquer la diversité des mitoses observées chez différents

organismes.

A

Annexes

A.1 Exemple d'utilisation de kt_simul

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

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

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

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

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

```

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

# Launch simu
meta.simul()

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

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

```

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

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

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

```

from kt_simul.gui.animation import Animator

anim = Animator(meta)
anim.play()

```

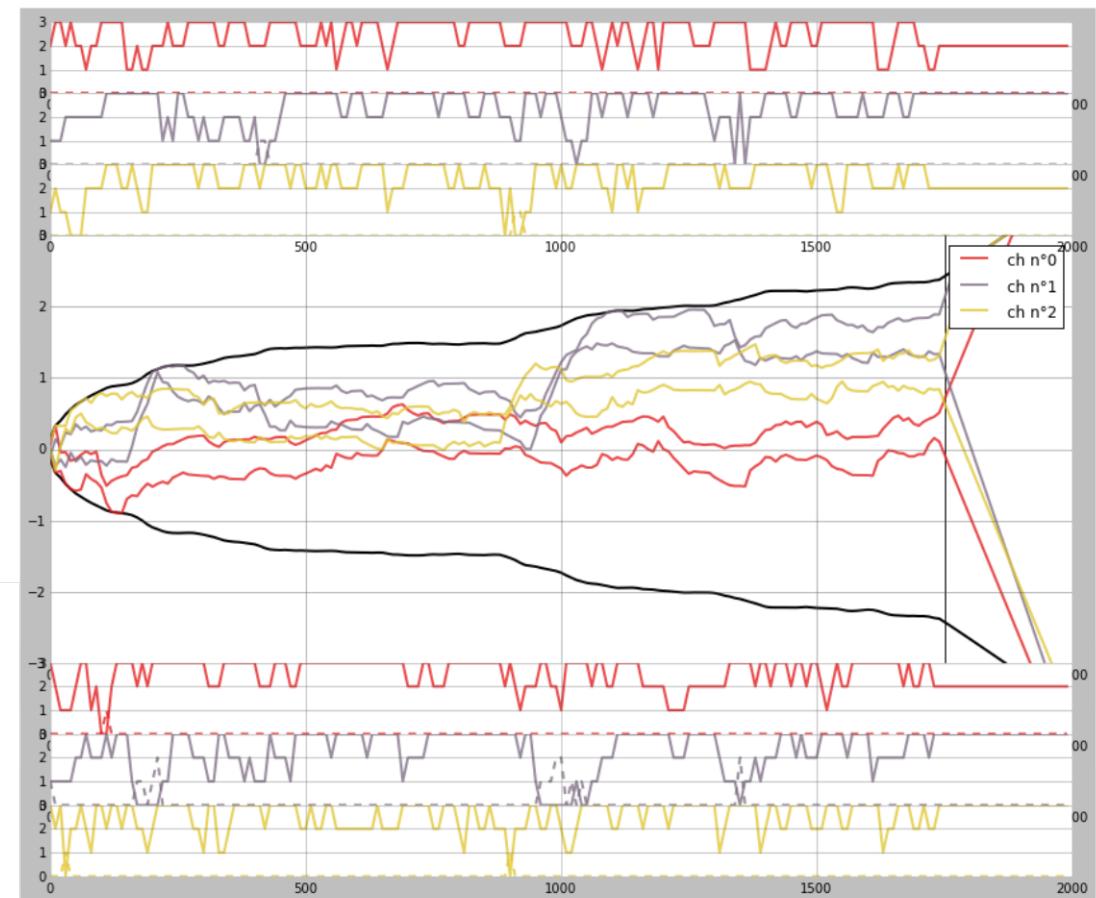


Figure A.1: Exemple de trajectoire générée par kt_simul. En plus de l'évolution de la position (axe des ordonnées) en fonction du temps (axe des abscisses), on visualise aussi les états d'attachements de chaque kinétochore sur les panneaux supérieurs et inférieurs.

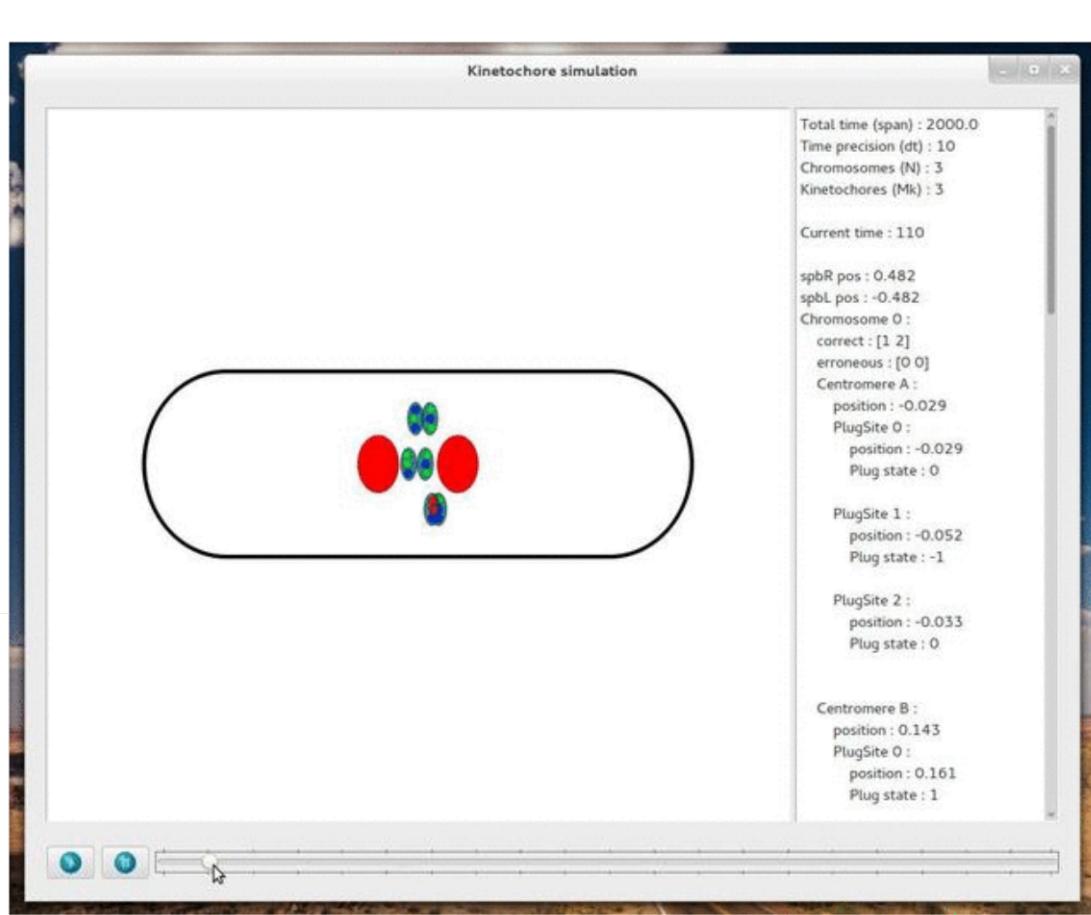


Figure A.2: Animation graphique d'une simulation. L'interface graphique permet de suivre la dynamique en temps réel à l'aide d'un « slider » en bas qui permet de changer le temps. Le panneau à droite permet d'avoir une vue détaillée de la position et de l'attachement de chaque site d'attachement.

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

A.2.1 Strucure de Dam1 et son rôle dans la régulation de l'attachement

La protéine Dam1 a été pour la première fois identifiée chez la levure à bourgeon comme une protéine crucial pour le maintien de l'intégrité structurelle du fuseau mitotique (Hofmann, 1998)

Par la suite, il a été montré que des complexes composés de DAM1 pouvaient former des structures en anneaux *in vitro* (Westermann et al., 2005) autour des microtubules (Figure A.3).

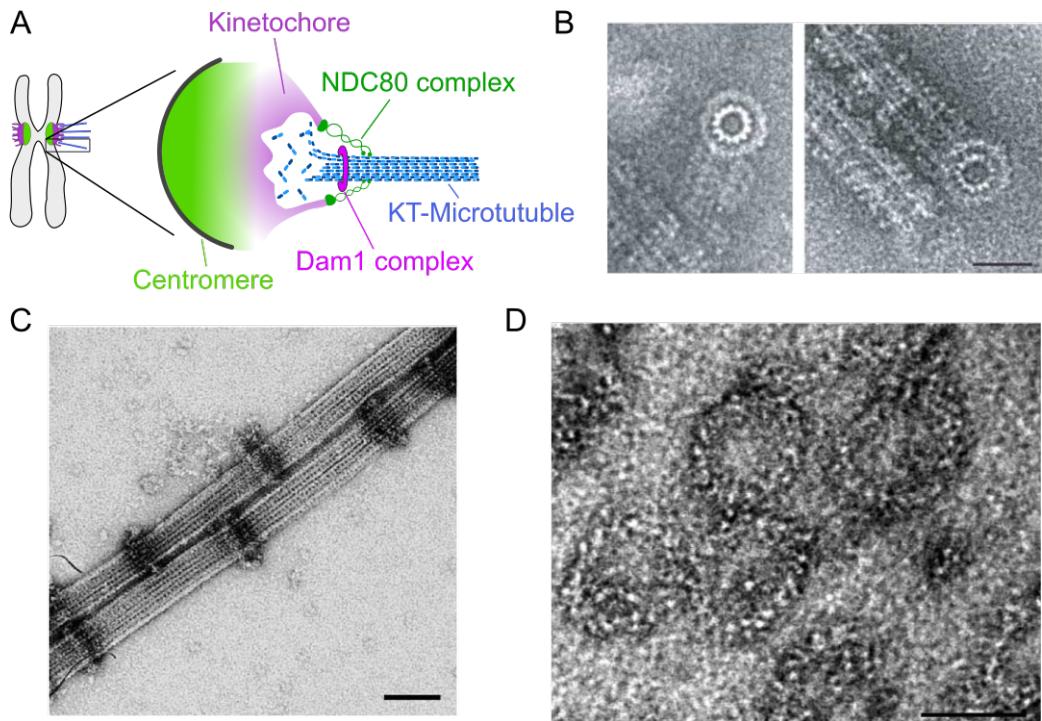


Figure A.3: Structure du complexe DAM1. **A.** Schéma de la strucute et du positionnement du complexe DAM1 lorsque il forme un anneau autour du microtubule. **B.** Exemple d'une image de microscopie électronique (EM) montrant une vue de l'extrémité finale d'un microtubule entourée d'un complexe DAM1 (Westermann et al., 2006). **C.** Complexe DAM1 purifié et attaché à des microtubules stabilisés par du taxol et visualisé par EM (Westermann et al., 2005). **D.** Complexe DAM1 incubé 48h dans une monocouche phospholipidique et visualisé par EM. Des anneaux auto-assemblés de complexe DAM1 sont visibles. Les barre d'échelles correspondent à 50nm.

Cependant c'est dans une autre étude que le rôle essentiel du complexe DAM1 dans l'attachement kinétochore-microtubule fut décrit (Westermann et al., 2006). En effet les auteurs ont montré (Figure A.3) par vidéo-microscopie à fluorescence que des anneaux de DAM1 peuvent se déplacer vers l'extrémité plus d'un microtubule sur plusieurs micromètre sans se détacher. Ils proposent alors que la protéine Dam1 joue un rôle important dans l'attachement kinétochore-microtubule et agit comme un système capable de convertir l'énergie mécanique générée par un microtubule en une force appliquée sur le kinétochore afin de générer un mouvement.

Des oligomères de Dam1 de plus petite tailles sans structure en anneau ont aussi été identifiées **in vitro** chez la levure à bourgeon (Gestaut et al., 2008). Ces assemblages appelés « patchs » sont cependant capable de diffusés le long du microtubule ainsi que de suivre son extrémité pendant sa dépolymérisation (Gestaut et al., 2008).

La protéine Dam1 est conservé chez la levure à fission et se localiste de la même façon que son homologue de la levure à bourgeon au niveau des kinétochores et des microtubules nucléaires. Cependant une étude *in vivo* a montré par microscopie quantitative que en moyenne seulement 7-8 copies de Dam1 étaient présent au kinétochore (Gao et al., 2010). Les auteurs proposent donc Dam1 est capable de modifier la dynamique des microtubules kinétochoriens sans structure en anneaux mais plutôt à travers des « patchs » de petite tailles.

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

Bien que Dam1 soit absent chez les eucaryotes supérieurs comme la cellule humaine, une autre protéine, Ska1, a été décrite comme pouvant jouer un rôle similaire à Dam1 (Schmidt et al., 2012). Différentes études ont été en mesure de montrer que les complexes Ska1 et NDC80 forment un système intégré capable de coupler le mouvement des chromosomes à la dépolymérisation des microtubules (Daum et al., 2009; Gaitanos et al., 2009; Hanisch et al., 2006; Raaijmakers et al., 2009; Schmidt et al., 2012; Theis et al., 2009; Welburn et al., 2009).

A.2.2 La congression et les oscillations des chromosomes sont deux mécanismes indépendants chez la levure à fission

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

par les microtubules durant la mitose (Gachet et al., 2008).

L'analyse des trajectoires des chromosomes en métaphase et anaphase chez la levure à fission sans la protéine Dam1 montre que cette protéine n'est pas requise pour la ségrégation des chromosomes mais est nécessaire pour observer des mouvements oscillatoires comme observé chez la souche sauvage (Figure A.4).

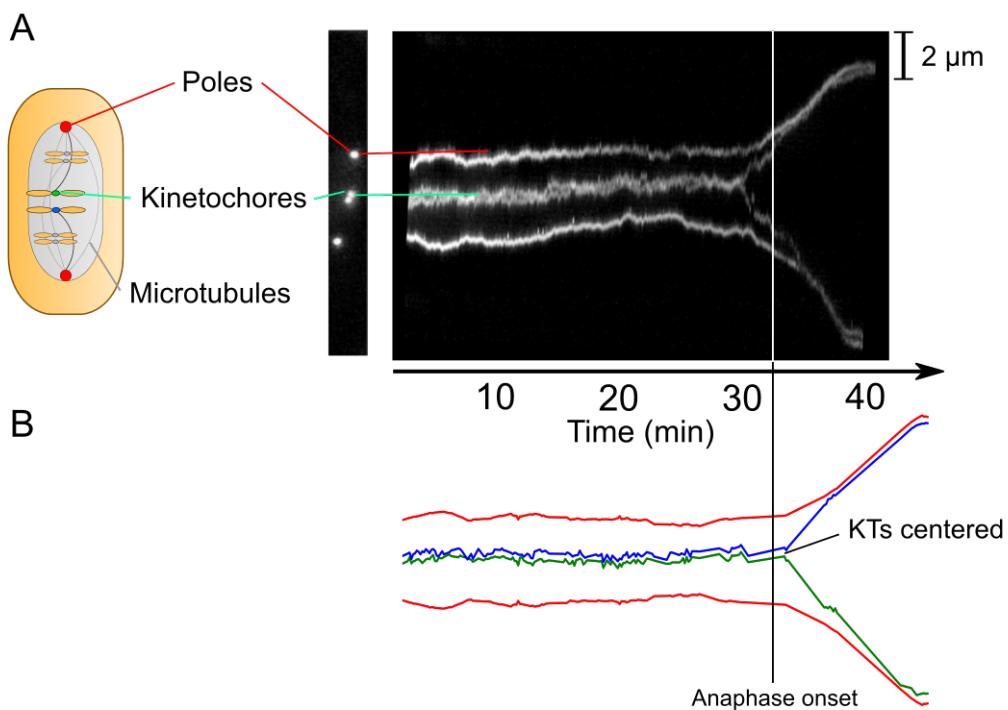


Figure A.4: Trajectoire du chromosome II dans la levure à fission sans Dam1. **A.** Kymographe de la trajectoire des deux pôles du fuseau mitotique et des deux kinétochores du chromosome II durant la métaphase et l'anaphase. **B.** La trajectoire reconstruite du kymographe en **A**.

On note aussi que bien les chromosomes n'oscillent pas, ils sont centrés au milieu du fuseau mitotique. Cette observation confirme celle faite durant l'analyse des trajectoires des chromosomes en présence d'une drogue stabilisatrice des microtubules (Thiabendazole ou TBZ) à des concentrations nanomolaires montrant que le centrage des chromosomes étaient indépendant des oscillations (Mary et al., 2015). Ce résultat va à l'encontre d'une étude similaire chez des cellules HeLa proposant que la congression est contrôlé par une diminution du mouvement des chromosomes (Stumpff et al., 2008).

A.3 Paramètres minimums reproduisant un mouvement oscillatoire

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

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

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

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

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

Une implémentation numérique en Python est disponible ci-dessous.

```
import numpy as np

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

```

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

```

On peut ensuite visualiser la trajectoire obtenue (Figure A.5) avec le code suivant.

```

import matplotlib.pyplot as plt

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

```

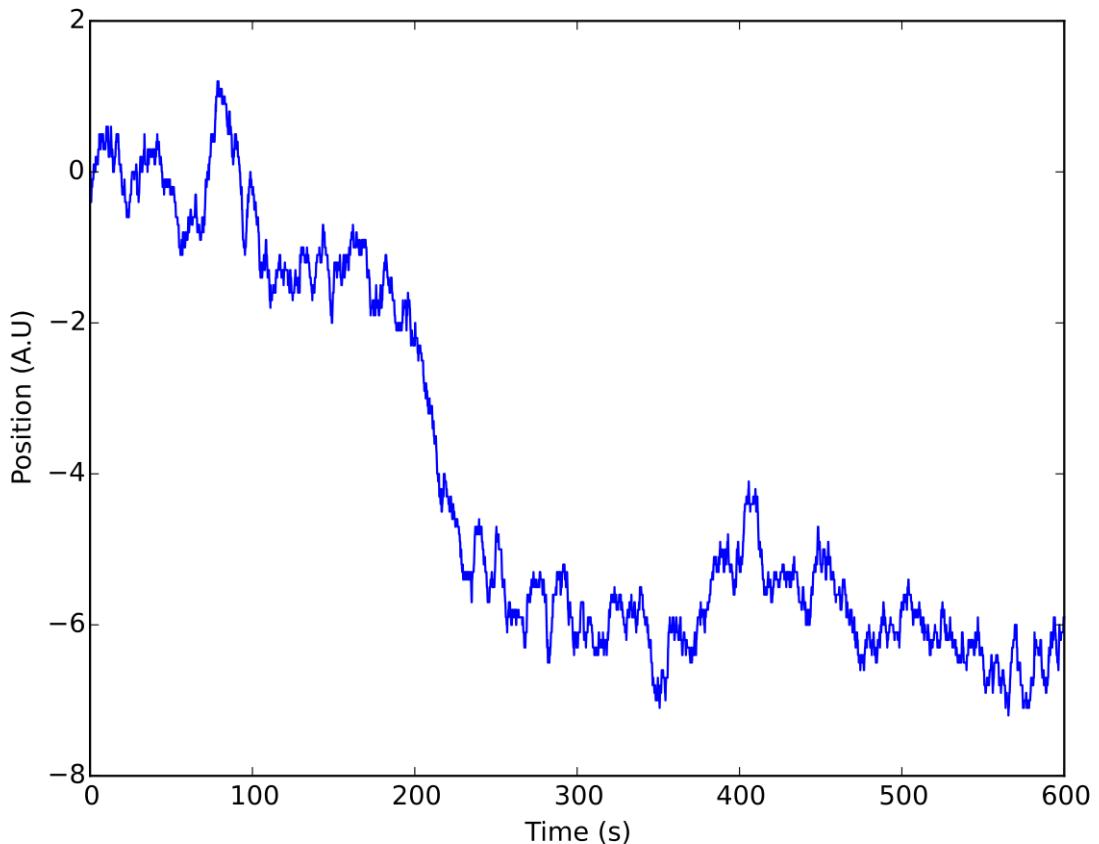


Figure A.5: Exemple de trajectoire générée par le modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les paramètres utilisés pour cette simulation sont $n_a = 10$, $k_a = 0.2$ et $k_d = 0.5$.

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

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

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

Ces deux outils permettent par exemple de détecter la fréquence fondamentale d'un signal sinusoïdal généré auquel on a ajouté un bruit tel que l'analyse dans l'espace temporel rend cette fréquence indétectable (Figure A.6).

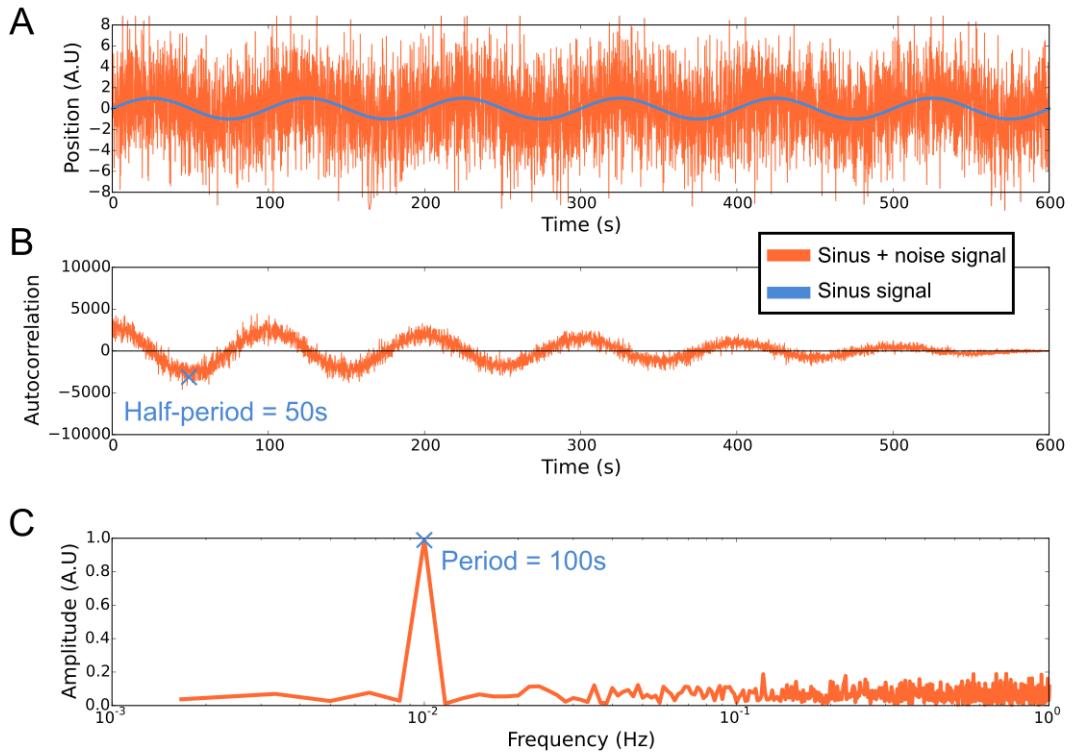


Figure A.6: Autocorrélation et transformée de Fourier d'un signal sinusoïdal bruité. Le signal généré avec la fonction sinus possède une période de 100s. Le signal orange en **A** correspond au signal sinusoïdal (en bleu) auquel a été ajouté un bruit blanc. **B.** Autocorrélation du signal orange en **A**. **C.** Transformée de Fourier du signal orange en **A**.

A.3.3 Optimisation des paramètres

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

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

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

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

Bien que quelques simulations exhibit des mouvements periodiques, aucun des jeux de paramètre testés n'a été capable de reproduire de manière significative un mouvement régulier. La figure Figure A.7 montre quelques exemples de trajectoires simulées avec leurs autocorrélations et transformées de Fourier associées.

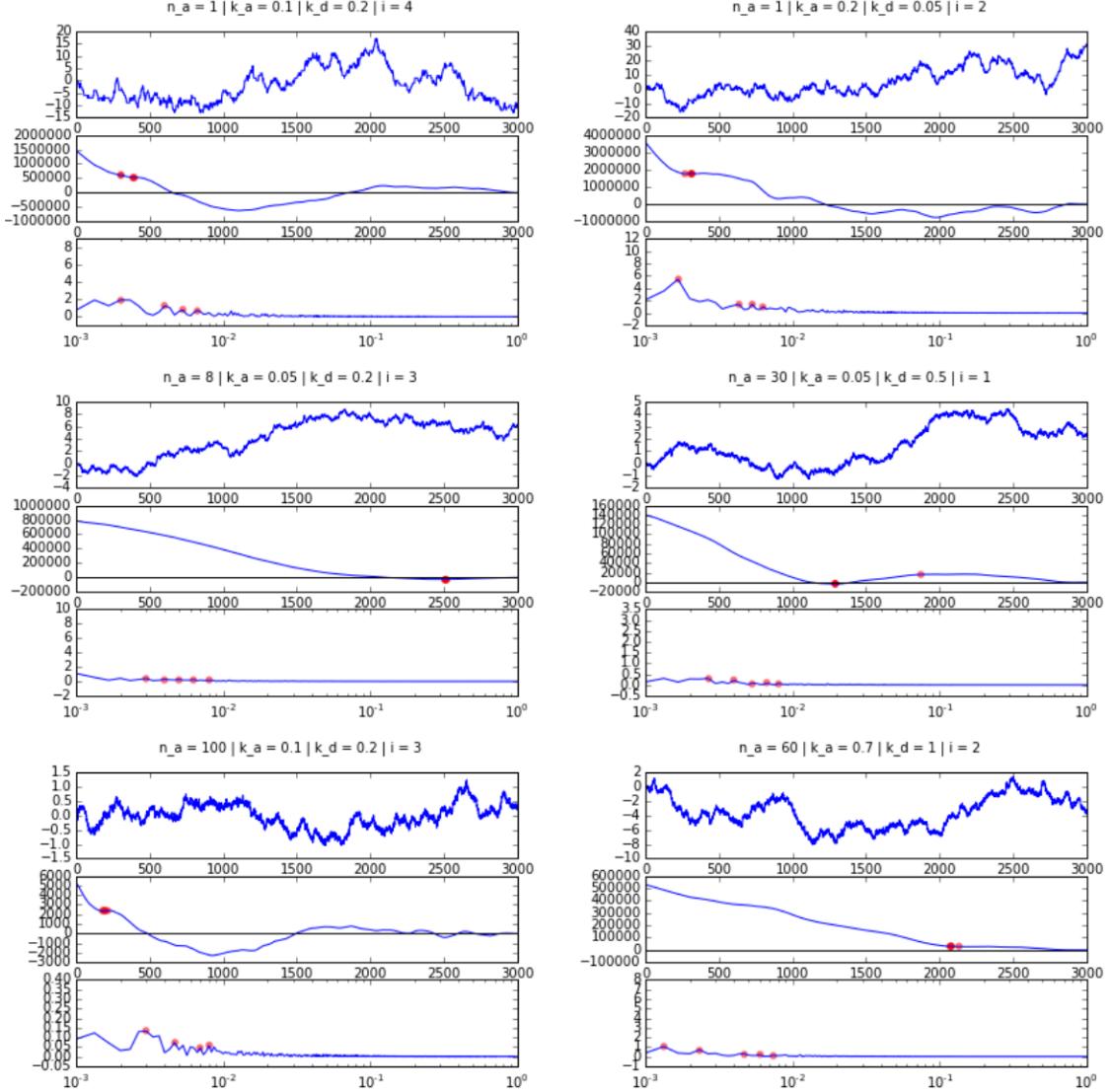


Figure A.7: Quelques exemples de trajectoires avec différents paramètres du modèle naïf du mouvement d'un chromosome. Les trois paramètres des simulations sont affichés en haut de chaque trajectoire. Les points rouges correspondent aux 4 premiers minimum locaux pour l'autocorrélation et aux quatre premiers maximum locaux pour la transformée de Fourier.

Bibliographie

- Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (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.
- Brouhard, G.J., and Hunt, A.J. (2005). Microtubule movements on the arms of mitotic chromosomes: polar ejection forces quantified in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13903–13908.
- 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.

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

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

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.

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

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

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

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

Cell 127, 969–982.

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

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

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

Erent, M., Drummond, D.R., and Cross, R.a. (2012). S. pombe kinesins-8 promote both nucleation and catastrophe of microtubules. PLoS ONE 7, e30738.

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.

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

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

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

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

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

Garcia, M.A., 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.

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

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

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

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

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

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.

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

Hooke, R. (2003). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies*

Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries Thereupon (Dover Publications).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kapoor, T.M., Lampson, M. a, Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase

- plate before biorientation. *Science* (New York, N.Y.) *311*, 388–391.
- Ke, K., Cheng, J., and Hunt, A.J. (2009). The Distribution of Polar Ejection Forces Determines the Amplitude of Chromosome Directional Instability. *Current Biology* *19*, 807–815.
- Keener, J.P., and Shtylla, B. (2014). A mathematical model of force generation by flexible kinetochore-microtubule attachments. *Biophysical Journal* *106*, 998–1007.
- Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (1996). Kinetochores moving away from their associated pole do not exert a significant pushing force on the chromosome. *The Journal of Cell Biology* *135*, 315–327.
- Khodjakov, A., Gabashvili, I.S., and Rieder, C.L. (1999). 'Dumb' versus 'smart' kinetochore models for chromosome congression during mitosis in vertebrate somatic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* *43*, 179–185.
- Khodjakov, A., La Terra, S., and Chang, F. (2004). Laser microsurgery in fission yeast; role of the mitotic spindle midzone in anaphase B. *Current Biology : CB* *14*, 1330–1340.
- 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., Pecreaux, J., Tournier, S., and Gachet, Y. (2015). Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations. *Journal of Cell Science* *128*, 3720–3730.
- Mayr, M.I., Hümmert, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G., and Mayer, T.U. (2007). The Human Kinesin Kif18A Is a Motile Microtubule Depolymerase Essential for Chromosome Congression. *Current Biology* *17*, 488–498.
- McCleland, M.L., Kallio, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Kestner, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Gorbsky, G.J., and Stukenberg, P. (2004). The Vertebrate Ndc80 Complex Contains Spc24 and Spc25 Homologs, which Are Required to Establish and Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment. *Current Biology* *14*, 131–137.
- McEwen, B.F., Dong, Y., and VandenBeldt, K.J. (2007). Using electron microscopy to understand functional mechanisms of chromosome alignment on the mitotic spindle. *Methods in Cell Biology* *79*, 259–293.
- McIntosh, J.R. (2012). Motors or dynamics: what really moves chromosomes? *Nature Cell Biology* *14*, 1234.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *18*, 193–219.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., Morphew, M.K., Efremov, A.K., Zhudenkov, K., Volkov, V.A., Cheeseman, I.M., Desai, A., Mastronarde, D.N., and Ataullakhanov, F.I. (2008). Fibrils Connect Microtubule Tips with Kinetochores: A Mechanism to Couple Tubulin Dynamics to Chromosome Motion. *Cell* *135*, 322–333.
- McIntosh, J.R., Volkov, V., Ataullakhanov, F.I., and Grishchuk, E.L. (2010). Tubulin depolymerization may be an ancient biological motor. *Journal of Cell Science* *123*, 3425–3434.
- Messin, L.J., and Millar, J.B. a (2014). Role and regulation of kinesin-8 motors through the cell cycle. *Systems and Synthetic Biology* 205–213.
- Miranda, J.J.L., De Wulf, P., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules. *Nature Structural & Molecular Biology* *12*, 138–143.
- Mitchison, T. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from

photoactivation of fluorescence. *The Journal of Cell Biology*.

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

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

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

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.

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

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

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

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). REGULATORY GENES CONTROLLING MI-

TOSIS 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.

Pecreaux, J., Röper, J.-C., Kruse, K., Jülicher, F., Hyman, A.A., Grill, S.W., and Howard, J. (2006). Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators. *Current Biology : CB* *16*, 2111–2122.

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

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

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

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

Raaijmakers, J.A., Tanenbaum, M.E., Maia, A.F., and Medema, R.H. (2009). RAMA1 is a novel kinetochore protein involved in kinetochore-microtubule attachment. *Journal of Cell Science* *122*, 2436–2445.

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

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.

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

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

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

Schmidt, J.C., Arthanari, H., Boeszoeremenyi, A., Dashkevich, N.M., Wilson-Kubalek, E.M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, R.a., Bathe, M., et al. (2012). The Kinetochore-Bound Ska1 Complex Tracks Depolymerizing Microtubules and Binds to Curved Protofilaments. *Developmental Cell* *23*, 968–980.

Sergé, A., 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.

Stephens, A.D., Snider, C.E., Haase, J., Haggerty, R.a., Vasquez, P.a., Gregory Forest,

M., and Bloom, K. (2013). Individual pericentromeres display coordinated motion and stretching in the yeast spindle. *Journal of Cell Biology* *203*, 407–416.

Stumpff, J., Dassow, G. von, Wagenbach, M., Asbury, C., and Wordeman, L. (2008). The Kinesin-8 Motor Kif18A Suppresses Kinetochore Movements to Control Mitotic Chromosome Alignment. *Developmental Cell* *14*, 252–262.

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

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

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

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

Theis, M., Slabicki, M., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Sontheimer, J., Kittler, R., Heninger, A.-K., Glatter, T., Kruusmaa, K., Poser, I., et al. (2009). Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *The EMBO Journal* *28*, 1453–1465.

Tien, J.F., Umbreit, N.T., Gestaut, D.R., Franck, A.D., Cooper, J., Wordeman, L., Gonen, T., Asbury, C.L., and Davis, T.N. (2010). Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *Journal of Cell Biology* *189*, 713–723.

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

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

Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S., and Toda, T. (2008). Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper

microtubule dynamics. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 5104–5115.

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).

Vladimirou, E., Mchedlishvili, N., Gasic, I., Armond, J., Samora, C., Meraldi, P., and McAinsh, A. (2013). Nonautonomous Movement of Chromosomes in Mitosis. *Developmental Cell* *27*, 411–424.

Walczak, C.E., Mitchison, T.J., and Desai, A. (1996). XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* *84*, 37–47.

Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *11*, 91–102.

Walczak, C.E., Gayek, S., and Ohi, R. (2013). Microtubule-Depolymerizing Kinesins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *29*, 130722103520007.

Wan, X., Cimini, D., Cameron, L.a., and Salmon, E.D. (2012). The coupling between sister kinetochore directional instability and oscillations in centromere stretch in metaphase PtK1 cells. *Molecular Biology of the Cell* *23*, 1035–1046.

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

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

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

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

Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., Stout, J.R., Leblanc, C., Shaw, S.L., Gardner, M.K., and Walczak, C.E. (2011). Kif18A uses a microtubule binding site in the tail for plus-end

localization and spindle length regulation. *Current Biology* *21*, 1500–1506.

Wei, R.R., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 5363–5367.

Welburn, J.P., Grishchuk, E.L., Backer, C.B., Wilson-Kubalek, E.M., Yates, J.R., and Cheeseman, I.M. (2009). The Human Kinetochore Ska1 Complex Facilitates Microtubule Depolymerization-Coupled Motility. *Developmental Cell* *16*, 374–385.

West, R.R., Malmstrom, T., and McIntosh, J.R. (2002). Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *Journal of Cell Science* *115*, 931–940.

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

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

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

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

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

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

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.