



HAL
open science

Analyse temps-fréquence en mécanique cellulaire et adaptabilité du fuseau mitotique

Benjamin Mercat

► **To cite this version:**

Benjamin Mercat. Analyse temps-fréquence en mécanique cellulaire et adaptabilité du fuseau mitotique. Autre [cond-mat.other]. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1S124 . tel-02003535

HAL Id: tel-02003535

<https://theses.hal.science/tel-02003535>

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Physique

Ecole doctorale
Sciences de la matière (SDLM)

Benjamin Mercat

Préparée à l'unité de recherche UMR 6290 IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes

**Analyse
temps-fréquence
en mécanique
cellulaire et
adaptabilité du
fuseau mitotique**

Thèse rapportée par :

Marie-Hélène VERLHAC

Directeur de recherche, Collège de France /
rapporteur

Manuel THÉRY

Directeur de recherche, CEA / *rapporteur*

**et soutenue à Rennes
le 4 octobre 2016**

devant le jury composé de :

Jean-François JOANNY

Professeur, ESPCI / *examineur*

Loïc LE MARREC

Maître de conférences, IRMAR / *examineur*

Yannick GACHET

Directeur de recherche, CBI / *examineur*

Roland LE BORGNE

Directeur de recherche, IGDR / *examineur*

Jacques PÉCRÉAUX

Chargé de recherche, IGDR / *directeur de thèse*

Hélène BOUVRAIS

Chargé de recherche, IGDR / *co-directeur de thèse*

Remerciements

À Manuel Théry et Marie-Hélène Verlhac, les rapporteurs ainsi que Yannick Gachet, Loïc Le Marrec, Roland Le Borgne et Jean-François Joanny, les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux de thèse et d'accepter de les évaluer au terme de ces trois années.

À Jacques Pécréaux et Hélène Bouvrais, mes directeurs de thèse, pour m'avoir encadré et guidé durant cette thèse. Je vous remercie du temps précieux que vous m'avez consacré, des conseils scientifiques dont vous m'avez fait part pendant ces trois années ainsi que de l'aide que vous m'avez apporté afin d'améliorer mon discours oral tant dans sa clarté et que dans sa compréhension par tous.

Aux équipes de Marc Tramier, Sébastien Huet et Grégoire Michaux pour nos échanges lors des réunions de laboratoire, qui ont permis de faire évoluer ce travail de thèse, ainsi que pour leur convivialité et leur bonne humeur lors des moments « hors sciences » comme les repas à 11h30, qui permettaient de se changer les idées.

À tous les membres de l'institut, pour leur écoute et leur intérêt pendant les séminaires malgré l'originalité de mon approche d'étude basée sur un outil physique. Une mention spéciale pour les doctorants et notamment Claire et Hafida. Une mention encore plus spéciale pour Géraldine sans qui je serais administrativement perdu.

À Laurent, Sylvain et Xavier pour leur patience durant mon apprentissage des méthodes de biologie et leurs explications souvent bienvenues après des séminaires parfois trop spécialisés pour moi.

À Yann, pour les discussions scientifiques ou sportives qui m'ont permis de sortir la tête de mes expériences pour voir ce qui se passe à côté.

À mes parents pour leur soutien et leur aide, notamment pour s'occuper d'Eliott durant la période de rédaction. Merci de m'avoir permis de continuer mes études jusqu'à maintenant, de ne pas avoir paniqué quand j'ai arrêté en licence 3 pour aller faire de la modélisation. Un grand, grand merci.

À mes beaux parents, qui se sont également occupés d'Eliott pour soulager Perrine.

À mes deux soeurs, Agathe et Mathilde pour toute l'aide et le soutien que vous nous apportez.

Aux Gars, bien que nous ne nous soyons pas beaucoup vus dernièrement, je sais que vous êtes là et cela compte. Particulièrement à Yann et Nico pour tous les moments de détente sportifs ou non.

À Perrine, pour ton soutien inébranlable durant ces trois années et surtout durant cette dernière année. Tu as toujours été là pour t'occuper de moi et d'Eliott alors que tu vis toi aussi avec beaucoup de pression en ce moment. Merci, merci.

À Eliott : je doute que tu lises cela un jour, mais ta présence a été essentielle dans la réussite de cette thèse, chacun des moments passés à jouer avec toi ont été de formidables moments de détente.

Abstract

The mitotic spindle ensures the correct segregation of the sister chromatids to maintain ploidy in daughter cells. The spindle comprises dynamical microtubules (alternating polymerizing and depolymerizing), a variety of molecular motors, crosslinkers and regulators. Although the molecular grounds of spindle structure is well known, the link to its functions remains elusive, calling for including the dynamics of its components and their interactions. These questions were mostly investigated by *in silico* or *in vitro* approaches. But a detailed characterizing of spindle mechanics, in physiological conditions, is missing. We propose an image processing based and non invasive method combined to an heuristic model to measure mechanical parameters of the mitotic spindle along time.

We tracked fluorescently labeled spindle poles at high temporal and spatial resolutions and measured the fluctuations of spindle length, *in vivo*. We computed their power density spectrum using short time Fourier transform (sliding window) —a blueprint of spindle mechanics. Such a spectrum is then fitted with a Kelvin-Voigt model with inertia (a spring, a damper and an inertial element in parallel). We validated this method by recovering the mechanical parameters over time from simulated data and calibrated it using laser and genetically induced spindle cuts.

We characterized the mitotic spindle of the one-cell embryo of nematode *C. elegans*. Metaphase appeared dominated by damping element, consistent with the slow spindle elongation observed, but in contrast with the common thought that a mechanism maintains the spindle length during metaphase. At anaphase onset, all three parameters collapsed, before increasing about 30 s later to reach a regime where damping dominated again, suggesting the overlapping spindle microtubules may play a minor role in early anaphase spindle

elongation. In perspective of understanding how spindle mechanics emerges from spindle molecular players interactions, we depleted one gene per spindle sub-structure —overlapped microtubules, kinetochore microtubules, central spindle and astral microtubules. We successfully recovered some known behaviors but under a new angle and with additional data offered by our method.

This method paves the way not only towards understanding the fundamentals of spindle mechanics, superseding the degenerated modeling based on the sole spindle length, but also towards accounting for spindle functional robustness towards defects such as poly- or aneu-ploidy.

Key words : mitotic spindle, cell mechanics, short time Fourier transform, spindle adaptality and robustness

Résumé

Le fuseau mitotique assure la ségrégation des chromatides sœurs et le maintien de la ploïdie des cellules filles. Le fuseau est composé de microtubules dynamiques (qui polymérisent et dépolymérisent continuellement), de nombreux moteurs moléculaires, d'agents de réticulation et de régulateurs. Bien que la structure du fuseau au niveau moléculaire soit connue, son fonctionnement reste délicat à comprendre, et nécessite la prise en compte de la dynamique de ses composants et leurs interactions. Les approches utilisées pour répondre à ces problématiques sont jusqu'à maintenant plutôt des approches *in silico* et *in vitro*. Il manque aujourd'hui une caractérisation de la mécanique du fuseau dans son contexte physiologique. Nous proposons une méthode non invasive basée sur de l'analyse d'images, combinée à une modélisation heuristique pour mesurer les paramètres mécaniques du fuseau durant toute la division.

Nous avons suivi les pôles du fuseau marqués par une protéine fluorescente avec une fréquence d'acquisition rapide et une bonne résolution spatiale, ce qui nous a permis d'accéder aux fluctuations de la longueur du fuseau *in vivo*. Avec la transformée de Fourier aux temps courts, nous avons calculé leurs densités spectrales de puissance —leurs signatures mécaniques. Ces spectres ont alors été ajustés avec un modèle Kelvin-Voigt avec inertie (un ressort, un amortisseur et un terme inertiel en parallèle). Nous avons validé la méthode par des expériences numériques où nous avons retrouvé les évolutions des paramètres sur des données simulées. De plus, nous avons calibré cette méthode en utilisant la rupture du fuseau induite par micro chirurgie laser ou par la génétique.

Nous avons caractérisé le fuseau de l'embryon unicellulaire du nématode *C. elegans*. La métaphase apparaissait dominée par l'amortisseur, ce qui est cohérent avec la lente élongation du fuseau que nous observons, mais contraste avec l'idée répandue de l'existence d'un mécanisme de maintien de la longueur du fuseau durant la métaphase. Au passage en anaphase, les trois paramètres mécaniques chutent, avant de réaugmenter environ 30 secondes après la transition pour atteindre de nouveau un régime dominé par l'amortisseur, ce qui suggère que les microtubules interpolaires jouent un rôle mineur durant l'élongation du fuseau en début d'anaphase. Dans la perspective de comprendre le lien entre la mécanique du fuseau et les interactions des acteurs moléculaires, nous avons partiellement supprimé un gène par sous-

structure du fuseau —microtubules interdigités, microtubules kinétochoriens, fuseau central et microtubules astraux. Nous avons alors retrouvé des comportements connus mais sous un nouvel angle avec des données supplémentaires offertes par notre méthode.

Cette méthode va non seulement permettre la compréhension fondamentale de la mécanique du fuseau, en dépassant la modélisation du fuseau basée uniquement sur la longueur, mais va aussi permettre d'aller vers la prise en compte de la robustesse de fonctionnement du fuseau mitotique face aux défauts tels que la poly- ou l'aneu-ploïdie.

Mots clés : fuseau mitotique, mécanique cellulaire, analyse de Fourier à courts terme, adaptabilité et robustesse du fuseau

à Perrine et Eliott

Sommaire

Sommaire	ix
Liste des figures	xiii
Acronymes	xvii
I Introduction	1
Avant-propos	3
1 Division cellulaire, organismes modèles et fuseau mitotique	7
1.1 La division cellulaire	7
1.1.1 Les principales étapes de la division cellulaire	7
1.1.2 Divisions symétriques et asymétriques	11
1.1.3 Pourquoi étudier la division cellulaire ?	12
1.2 Les organismes modèles	13
1.2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> , organisme modèle pour l'étude de la division cellulaire	14
1.2.2 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> un organisme modèle pour l'étude des interactions uniques dans le fuseau mitotique	18
1.2.3 La complémentarité des deux modèles d'étude	19
1.3 Le fuseau mitotique	21
1.3.1 Ses principaux composants	21
1.3.2 Les forces mécaniques au sein du fuseau ou supportées par le fuseau	27
1.3.3 Les fonctions essentielles du fuseau mitotique	27
1.3.4 État de l'art des études sur la mécanique du fuseau mitotique	29
1.4 Conclusion	33

2 Les micro-mouvements analysés par les mathématiques et la physique : une mine d'informations pour la biologie	35
2.1 Les fluctuations, une source d'informations précieuses	35
2.2 Comment extraire les informations contenues dans les fluctuations ?	38
2.2.1 L'analyse spectrale est un outil puissant du traitement du signal . .	38
2.2.2 Les outils mathématiques pour l'analyse de fluctuations	39
2.2.3 Récapituler notre compréhension dans une approche réductionniste : la modélisation	41
2.2.4 Les paramètres et modèles classiques en modélisation mécanique . .	43
2.3 Conclusion	45
II Méthode d'analyse des fluctuations de la longueur du fuseau et modélisation de sa mécanique au cours de la mitose	47
Motivation générale	49
3 Analyse des fluctuations par les transformées de Fourier	51
3.1 Mesure de la longueur à haute résolution	52
3.2 Analyse des fluctuations de longueur au cours du temps	54
3.2.1 Mérites et limitations des approches par les déplacements quadra- tiques moyens, les ondelettes et les transformées de Fourier	54
3.2.2 Analyse temps-fréquence de la longueur du fuseau par les transfor- mées de Fourier à court terme	57
3.2.3 Fenêtrage du signal en vue de la modélisation	60
4 Modélisation de la densité spectrale de puissance des fluctuations de longueur du fuseau mitotique	65
4.1 Motivation du modèle mécanique heuristique du fuseau mitotique	66
4.1.1 Eléments mécaniques pris en compte pour modéliser le fuseau mi- totique	66
4.1.2 Terme stochastique, le "bruit"	68
4.1.3 Conclusion : modèle utilisé lors de cette étude	70
4.2 Choix de la méthode pour réaliser l'ajustement	72
4.2.1 Convolution du modèle à la volée	72
4.2.2 Approche de la densité spectrale expérimentale par le modèle via le maximum de vraisemblance.	74
4.2.3 Estimation des erreurs standards sur les paramètres du modèle issus de l'ajustement et de la qualité de l'ajustement	77

4.3	Implémentation	77
4.3.1	Reformulation du modèle pour une optimisation efficace	77
4.3.2	Automatisation et performance.	83
4.4	Conclusion	85
 III Résultats : validation et application au fuseau mitotique		87
 5 Validation et calibration de l'analyse S3		89
5.1	Les fluctuations de longueur du fuseau mitotique sont correctement récapitulées par un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie	89
5.1.1	Les fluctuations de longueur du fuseau sont d'origine biologique	89
5.1.2	Influence du marquage des centrosomes	91
5.1.3	Quel modèle pour récapituler la densité spectrale de puissance ?	92
5.2	Influence de la taille des fenêtres : caractérisation détaillée <i>versus</i> résolution temporelle	97
5.2.1	Analyse de l'optimisation numérique	98
5.3	La caractérisation par les fluctuations rend bien compte de la mécanique du fuseau à l'échelle cellulaire	100
5.3.1	Analyse de simulations d'élongation du fuseau mitotique	100
5.3.2	Sensibilité aux perturbations de la mécanique du fuseau <i>in vivo</i>	106
5.3.3	Calibration via des coupes génétiques du fuseau et microchirurgie laser	108
5.4	Conclusion	112
 6 Étude du fuseau mitotique par la méthode S3		113
6.1	Caractéristiques mécaniques du fuseau mitotique au cours de la mitose	114
6.2	La longueur du fuseau en métaphase principalement contrôlée par le frottement visqueux	117
6.3	Vers une étude fonctionnelle du fuseau mitotique	118
6.3.1	Forces trouvant leur origine aux kinétochores	118
6.3.2	Forces trouvant leur origine au niveau de la zone interdigitée	122
6.3.3	Forces trouvant leur origine au niveau du cortex	125
6.3.4	Forces trouvant leur origine au niveau du fuseau central	130
6.4	Généralisation de la méthode S3 : application au fuseau mitotique de la levure <i>S. pombe</i> , expériences préliminaires	132
6.5	Conclusion	136

IV Discussion/Perspectives	137
7 Discussion	139
7.1 L'analyse des fluctuations de longueur une approche adaptée à l'étude du fuseau mitotique	139
7.1.1 Analyse des fluctuations de la longueur pour étudier la mécanique du fuseau	140
7.1.2 Suivi temporel de la mécanique du fuseau et modélisation des fluctuations par un modèle Kelvin-Voigt avec inertie	140
7.1.3 La méthode S3, un outil d'analyse mécanistique intra cellulaire généraliste	141
7.2 Dissection de la mécanique du fuseau mitotique par la méthode S3	142
7.2.1 La méthode S3 suggère un fuseau dominé par la viscosité et hors équilibre	142
7.2.2 Déconnexion des deux pôles du fuseau en anaphase précoce	143
7.2.3 L'inertie du fuseau et la dynamique des acteurs	143
7.3 L'analyse S3 pour déchiffrer le rôle mécanique des acteurs moléculaires du fuseau	143
7.4 Modèle hypothétique : réaction en chaîne et rupture du fuseau au passage en anaphase	144
8 Perspectives	147
Annexes	149
Annexes	149
A.1 Matériels et méthodes	149
A.1.1 Culture de <i>C. elegans</i>	149
A.1.2 Gènes rendus silencieux par interférence d'ARN	149
A.1.3 Vidéo microscopie et analyse d'images pour le suivi des trajectoires des centrosomes	149
A.1.4 Embryons fixés	150
A.1.5 Calcul scientifique	150
A.2 Textes intégraux de deux articles importants pour la mise en place de l'outil S3	151
Références bibliographiques	195

Liste des figures

Introduction

I-1	Schéma illustrant le cycle cellulaire	8
I-2	Description de la structure du fuseau mitotique réalisée par Walther Flemming en 1882	9
I-3	Schéma illustrant les cinq phases principales de la mitose.	10
I-4	Divisions asymétriques chez le nématode et la drosophile	12
I-5	Différentes étapes du développement du nématode <i>C. elegans</i>	15
I-6	Chorégraphie de la première division asymétrique de <i>C. elegans</i>	17
I-7	Vue en microscopie électronique à balayage de cellules de la levure <i>S. pombe</i>	19
I-8	Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission	20
I-9	Schéma du fuseau mitotique	22
I-10	Cycle de la dynamique des microtubules	24
I-11	Structure du fuseau mitotique durant le cycle	28
I-12	Principales erreurs d'attachement des chromosomes.	29
I-13	Approche d'études en biologie en utilisant la modélisation mathématique.	42
I-14	Trois modèles mécaniques classiques	45

Méthodes

II-1	Analyse des fluctuations, analogie avec les trajectoires à vélo.	50
II-2	Longueur du fuseau	54
II-3	Déplacements quadratiques moyens pour les longueurs du fuseau des embryons contrôlés.	55
II-4	Analyse en ondelettes des embryons contrôlés.	56
II-5	Densité spectrale de puissance pour les embryons contrôlés.	57
II-6	Signal typique de la longueur du fuseau étendu périodiquement sans fenêtrage	59
II-7	Fenêtres de Hann dans les espaces direct et fréquentiel	61

II-8	Signal et son extension périodique après multiplication par la fenêtre de Hann	61
II-9	Spectre obtenu avec l'utilisation des fenêtres glissantes	63
II-10	Modèle de densité spectrale de puissance	67
II-11	Illustration de la nécessité de la pondération.	75
II-12	Exemple d'ajustement avec les algorithmes du simplexe et de Newton	80
II-13	Comparaison des résultats entre algorithmes du simplexe et de Newton.	81
II-14	Ajustement du spectre expérimental des fluctuations de longueur du fuseau mitotique	82
II-15	Ajustement du spectre expérimental de la mécanique du fuseau	83
Résultats		
III-1	Densité spectrale de puissance pour les embryons fixés et embryons vivants	90
III-2	Analyse S3 d'embryons dont les pôles du fuseau sont marqués via la γ -tubuline ou la protéine péri-centriolaire SPD-2.	92
III-3	Schéma du modèle de Zener	93
III-4	Valeurs de la fonction de coût pour l'ajustement des spectres du fuseau d'embryons non-traités avec les modèles de Zener, Kelvin-Voigt et Kelvin-Voigt avec inertie	94
III-5	Paramètres de l'ajustement du spectre du fuseau d'embryons non-traités avec le modèle Zener	95
III-6	Variances de la longueur du fuseau par le calcul direct et par l'estimation de l'analyse S3.	96
III-7	Analyse S3 de la longueur du fuseau d'embryons non-traités utilisant 3 tailles de fenêtre	97
III-8	Cartes de convergence du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie	99
III-9	"Programme graphique" générant des longueurs de fuseau mitotique <i>in silico</i>	102
III-10	Simulation pour tester la précision de la méthode S3	103
III-11	Simulation pour étudier l'influence de l'amplitude du bruit stochastique	104
III-12	Expérience de déplétion forte de CLS-2	107
III-13	Relaxation du centrosome postérieur après la coupe de l'hémifuseau antérieur par microchirurgie laser	109
III-14	Relaxation du centrosome postérieur après la coupe génétique du fuseau	110
III-15	Résultats des mesures du temps caractéristique avec 3 méthodes.	111
III-16	Analyse des embryons non traités	115

LISTE DES FIGURES

III-17	Estimation des forces développées par élément	117
III-18	Rôle et localisation de CLS-2 dans l'embryon de <i>C. elegans</i>	119
III-19	Expérience de déplétion de CLS-2	120
III-20	Expérience de déplétion de CLS-2 (fort)	121
III-21	Localisation de BMK-1 dans l'embryon de <i>C. elegans</i>	123
III-22	Expérience de déplétion de BMK-1	124
III-23	Complexe trimérique générateur des forces corticales	125
III-24	Expérience de déplétion de GPR-1/2	126
III-25	Expérience de déplétion de NMY-2	129
III-26	Rôle et localisation de SPD-1 dans l'embryon de <i>C. elegans</i>	130
III-27	Expérience de déplétion de SPD-1	131
III-28	Comparaison <i>S. pombe</i> vs <i>C. elegans</i>	132
III-29	Densité spectrale de puissance pour les cellules fixées et les cellules vivantes chez <i>S. pombe</i>	133
III-30	Évolution temporelle des paramètres mécaniques du fuseau chez <i>S.</i> <i>pombe</i>	135

Discussions/Perspectives

IV-1	Schéma récapitulant la cascade de réactions suite au passage en anaphase	146
------	--	-----

Acronymes

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AFM : *Atomic Force Microscope*
- APC : *Anaphase Promoting Complex*
- ARN : Acide RiboNucléique
- CLASP : *CLIP-associated protein*
- CGC : *Caenorhabditis Genetics Center*
- DFT : *Discrete Fourier Transform*
- MAPs : : *Microtubule-Associated Protein*
- MCP : Moindres Carrés Pondérés
- MT : Microtubule
- MTOCs : *Microtubule organizing centers*
- PBS : *Phosphate Buffer Saline*
- PCM : *Pericentriolar Material*
- PSD : *Power Spectral Density*
- PSF : *Point Spread Function*
- S3 : *Spindle Spectral Signature*
- SAC : *Spindle Assembly Checkpoint*
- SOPs : *Sensory Organ Precursor*
- SPB : *Spindle Pole Bodies*

Partie I

Introduction

Avant-propos

La division est un événement majeur de la vie cellulaire; elle permet le développement des organismes pluri-cellulaires et la survie de tous les organismes. Depuis la première description en 1882 par W. Flemming, qui fut le premier à proposer que des filaments soient capables d'attraper les chromosomes pour les répartir dans les cellules filles, jusqu'à aujourd'hui, les études de la division cellulaire ont permis d'en apprendre davantage sur les mécanismes génétiques et biochimiques, et dans une moindre mesure les aspects mécaniques, impliqués. Ces études furent essentielles, non seulement pour comprendre le développement des organismes mais aussi pour lutter contre le cancer, qui est "la maladie du siècle". En effet, les cellules cancéreuses peuvent être la conséquence de défauts survenus lors de divisions cellulaires, comme une mauvaise partition des chromosomes dans les cellules filles (aneuploïdie) ou une cytodierèse effectuée au mauvais endroit conduisant à de mauvaises identités cellulaires. Ainsi, mieux comprendre la division cellulaire est aussi un enjeu pour la lutte contre le cancer et l'identification par exemple de nouvelles cibles des traitements anti-cancéreux.

Au centre de la division cellulaire, la structure responsable de la ségrégation précise et fidèle des chromosomes et de leur répartition correcte au sein des cellules filles est le fuseau mitotique. L'importance du fuseau mitotique durant la division cellulaire a conduit les chercheurs en génétique ainsi qu'en biologie cellulaire et moléculaire à centrer leurs études sur son assemblage, sa structure et les interactions biochimiques non seulement en son sein mais aussi avec les autres acteurs de la division cellulaire. Il en résulte aujourd'hui une bonne connaissance de sa composition et de sa structure et une compréhension partielle de ses fonctions. Toutefois, sa mécanique a été peu étudiée par la communauté des chercheurs. Or, des travaux récents suggèrent un rôle important des aspects mécaniques, notamment des microtubules¹ en interaction avec des moteurs moléculaires (capables de "marcher" sur ces microtubules et de développer des forces), des agents de réticulation (pouvant coupler de manière dynamique les microtubules) ainsi que de régulateurs. Ce nombre limité d'études de la mécanique du fuseau résulte du grand nombre d'acteurs

¹Microfilaments semi-rigides alternant aléatoirement entre allongement et raccourcissement

moléculaires participant à son bon fonctionnement, de la complexité de leurs interactions et de la diversité des cellules. De plus, la grande dynamique au cours de la division a rendu difficile les études expérimentales de sa mécanique jusqu'à très récemment. Ainsi cet aspect dynamique, difficile à capturer, a été peu pris en compte dans les précédentes études du fuseau et semble pourtant primordial pour comprendre ses différentes fonctions depuis la capture des chromosomes jusqu'à leur ségrégation dans les cellules filles en passant par la correction des erreurs d'attachement des chromosomes en métaphase et anaphase. Ainsi, le fuseau peut être vu comme un système complexe¹, qui est hors-équilibre (en perpétuel "mouvement") et les méthodes de la physique statistique semblent donc bien adaptées pour l'étudier.

L'équipe d'accueil de ma thèse, CeDRE (une ingénierie inverse de la division cellulaire), se propose de répondre aux questions biologiques liées à la division cellulaire avec une approche interdisciplinaire. L'aspect ultra-dynamique de la division cellulaire, les mouvements des chromosomes et la chorégraphie du fuseau mitotique couplés à la rapidité de détection et de correction des erreurs d'attachement des chromosomes semblent indiquer que la mécanique joue un rôle important lors de la division. Cet aspect a notamment été mis en avant avec les études du point de contrôle de l'assemblage du fuseau, (SAC pour 'Spindle Assembly Checkpoint') permettant le passage en anaphase, qui via une tension au kinétochore va tester le bon attachement des chromosomes. L'équipe souhaite comprendre la robustesse et l'adaptabilité de la division cellulaire (propriétés à l'échelle cellulaire) à l'aide notamment de mesures à l'échelle microscopique et de simulations, en faisant l'hypothèse que la dynamique des acteurs de la division cellulaire joue un rôle majeur. Ainsi, l'interdisciplinarité de l'équipe CeDRE avec la présence de biologistes, de (bio)physiciens et d'un statisticien est un avantage pour aborder une telle question.

C'est dans cette optique que j'ai effectué ce travail de thèse. J'ai étudié *in vivo* le fuseau mitotique dans son contexte physiologique pour en déterminer le comportement mécanique. Nous avons pour cela utilisé la première division asymétrique de l'embryon du nématode *Caenorhabditis elegans* comme le parfait modèle pour une étude physique. Nous avons aussi utilisé *Schizosaccharomyces pombe* comme un organisme secondaire complémentaire au nématode *C. elegans* via une collaboration avec l'équipe de Sylvie Tournier et Yannick Gachet. Pour comprendre comment les composants du fuseau participent à son comportement mécanique, nous avons développé une méthode innovante d'étude des micro-variations de longueur du fuseau mitotique, qui satisfait deux conditions : une ré-

¹on ne peut pas déduire le comportement global directement de la somme des comportements individuels effectué de chaque composant.

solution temporelle de l'évolution de la mécanique du fuseau pour étudier sa régulation ; une approche non perturbative pour approcher le fuseau et sa robustesse dans un contexte physiologique. Cette méthode, nommée '*Spindle Spectral Signature*' (S3) est axée sur l'utilisation de la microscopie, de l'analyse d'image et d'outils de traitement du signal avancés. Nous récapitulons enfin les caractéristiques mécaniques par un modèle.

Chapitre 1

Division cellulaire, organismes modèles et fuseau mitotique

Ce travail de thèse est à la frontière entre la biologie et la physique. Afin de faciliter la compréhension des non biologistes je vais débiter cette introduction par une description rapide de la division cellulaire. Ensuite je décrirai le modèle d'étude, le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Enfin je détaillerai les aspects structuraux et mécaniques du fuseau mitotique, ainsi que ses principaux rôles dans la division cellulaire. Je finirai par décrire les différentes approches déjà utilisées afin de comprendre ses aspects mécaniques au cours de la division.

1.1 La division cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en deux parties distinctes, l'interphase et la mitose aussi appelée phase M (Fig. I-1). Durant l'interphase, la taille de la cellule augmente lors de la phase G1, la cellule réplique son ADN lors de la phase de synthèse S et synthétise des protéines nécessaires à la division lors de la phase G2. La phase M, la mitose, est l'étape de la division cellulaire au cours de laquelle la cellule, dite cellule mère se divise en deux cellules filles.

1.1.1 Les principales étapes de la division cellulaire

Les premières descriptions détaillées de la mitose sont dues à l'allemand Walther Flemming en 1882 [Flemming, 1882], ses dessins, remarquables de précision, décrivent l'évolution de la structure du fuseau lors des différentes étapes de la division (Fig. I-2). La génétique moléculaire moderne a révélé quelques-uns des mécanismes moléculaires contribuant aux mouvements des chromosomes et à la morphogénèse du fuseau mitotique [McIntosh, 1991;

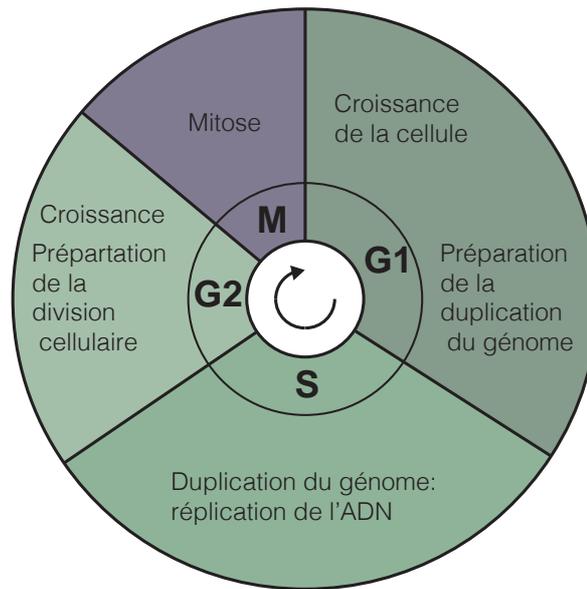


Figure I-1 – Schéma illustrant le cycle cellulaire

McIntosh, 2011].

Il existe deux types de divisions cellulaires : la mitose où les chromosomes des cellules filles sont identiques en nombre et nature à ceux de la cellule mère et la méiose concourant à la génération des gamètes, où le nombre de chromosome est réduit de moitié. Durant ce travail de thèse je me suis concentré sur l'analyse de la mitose uniquement.

1.1.1.1 La mitose

La mitose est un processus présent dans les cinq règnes et dont les grandes étapes sont communes et au nombre de cinq [Alberts et al., 2015]. Elle permet à partir d'une cellule mère d'obtenir deux cellules filles génétiquement identiques (Fig. I-3) :

- La **prophase**, durant laquelle le matériel génétique (l'ADN) se condense en formant les chromosomes tels que nous les connaissons. Simultanément, les deux centres d'organisations des microtubules (MTOC), d'où émergent ces microtubules en astère, se séparent. Dans le cas de mitoses ouvertes, à la fin de cette phase, l'enveloppe nucléaire se désagrège, alors qu'elle reste intacte dans les mitoses fermées.
- La **prométaphase**, le fuseau s'assemble par la focalisation des microtubules et la capture des chromosomes. Ainsi, petit à petit chaque chromosome voit chacune de ses chromatides reliées au pôle qui lui fait face par l'intermédiaire des microtubules.
- La **métaphase** est le moment où le fuseau finit de s'assembler. Les chromo-

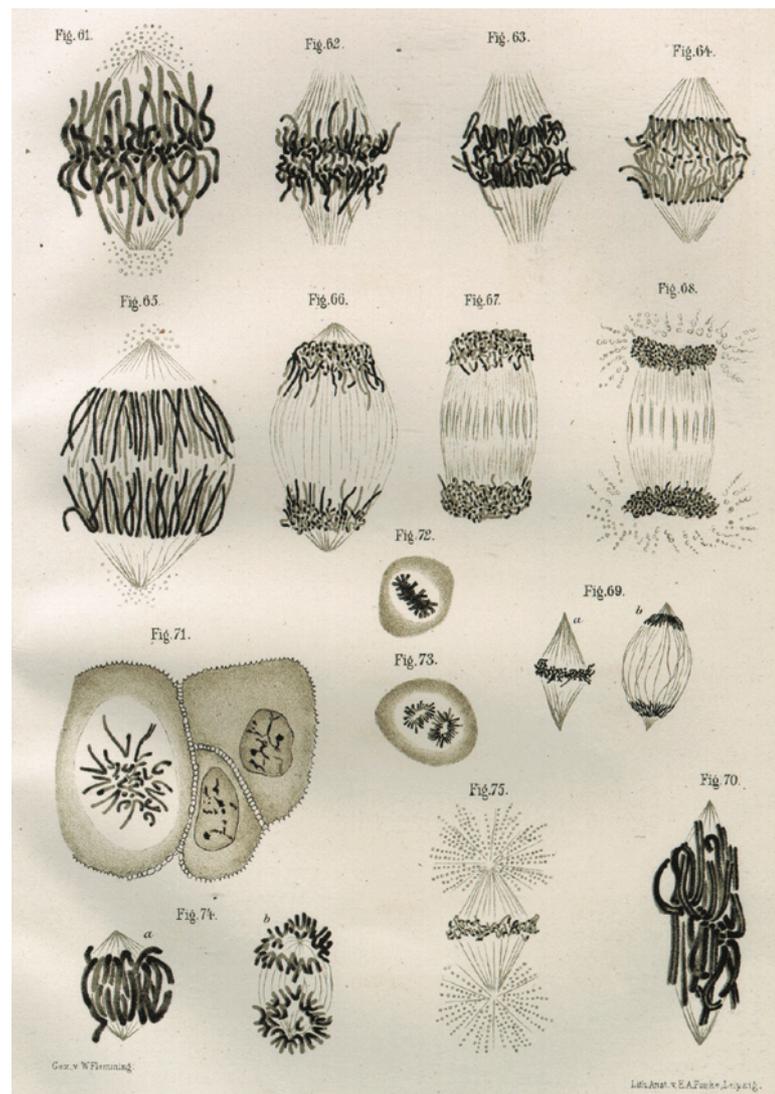


Figure I-2 – Description de la structure du fuseau mitotique réalisée par Walther Flemming en 1882 [Flemming, 1882].

somes condensés se rassemblent à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique¹. La validation d'un point de contrôle d'attachement des chromosomes (détaillé dans la section 1.3.3) permet le passage en anaphase.

- L'**anaphase** est la période durant laquelle les chromatides soeurs se séparent et migrent vers leurs pôles respectifs, grâce notamment à la dépolymérisation des microtubules qui les relient aux pôles du fuseau et aux différentes forces au sein du fuseau. Cette ségrégation est induite par l'activation de l'APC (Anaphase Promoting Complex)[Peters, 2006] qui entraîne une cascade de réactions pour venir dégrader

¹alignement des chromosomes dans un plan perpendiculaire à l'axe des pôles du fuseau

la cohésine liant les chromatides soeurs. On observe aussi souvent un éloignement des pôles du fuseau. Chez certains organismes cette phase est divisée en deux : l'anaphase A, où seul les chromatides sont en mouvement et rejoignent les pôles du fuseau; et l'anaphase B où les pôles s'éloignent l'un de l'autre.

- La **télophase** est la dernière étape de la division cellulaire. Les chromatides soeurs entament leur décondensation, l'enveloppe nucléaire se reforme si elle s'était rompue (mitoses ouvertes). Pour finir, grâce à la formation d'un anneau contractile d'actomyosine, la cytotodièrese va conduire à la séparation des cytoplasmes des deux cellules filles.

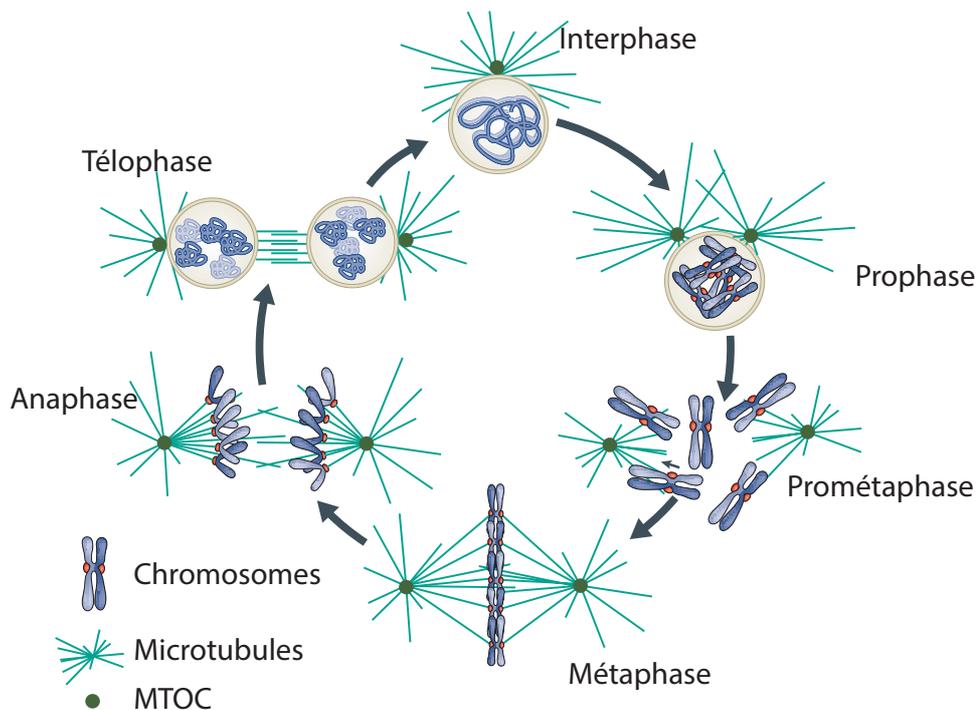


Figure I-3 – Schéma illustrant les cinq phases principales de la mitose en l'absence de nucléation au kinétochore (mitose ouverte chez le nématode). (Adaptée de [Cheeseman and Desai, 2008])

La mitose donne ainsi lieu à de nombreux mouvements intra-cellulaire. Nous voyons donc ici l'intérêt d'une étude micro-mécanique du fuseau afin d'analyser le rôle des forces permettant ces mouvements.

1.1.2 Divisions symétriques et asymétriques

Chez les organismes pluri-cellulaires, il existe deux variantes de la mitose, une symétrique et une asymétrique, dont les fonctions diffèrent.

Division symétrique C'est la division la plus courante. Elle permet, à partir d'une cellule mère, la formation de deux cellules filles identiques à celle-ci. Elle permet les phases de prolifération durant le développement et notamment l'élaboration des réservoirs de cellules souches [Morrison and Kimble, 2006].

Division asymétrique Cette division permet la génération de cellules filles différentes, en terme de taille et de composition intra-cellulaire, qui auront alors des destins distincts. Différents mécanismes permettent de conduire à une différenciation des cellules filles comme l'a montré Horvitz et ses co-auteurs [Horvitz and Herskowitz, 1992]. L'asymétrie de la division peut être intrinsèque. Il peut y avoir une asymétrie des facteurs qui déterminent l'identité cellulaire et/ou une asymétrie du plan de division conduisant à deux cellules filles dont la taille diffère. La division asymétrique peut également être extrinsèque lorsqu'elle est initiée par la signalisation cellulaire, les cellules filles se différenciant sous l'influence d'une autre cellule [Gillies and Cabernard, 2011].

La division asymétrique joue un rôle majeur dans le développement en engendrant une diversité cellulaire nécessaire au bon développement des organismes pluricellulaires [Betschinger and Knoblich, 2004]. Elle joue également un rôle important dans l'auto-renouvellement des cellules souches chez l'adulte [Neumuller and Knoblich, 2009]. Ainsi, la division asymétrique permet la création de deux cellules : une qui garde un caractère souche; et l'autre dite précurseur spécialisé, qui va se différencier en cellule spécialisée. Ce type de division permet de maintenir le nombre de cellules souches dans l'organisme plus ou moins constant lors de la production de cellules différenciées.

La lignée des cellules précurseurs des organes sensoriels (SOPs) chez la drosophile est un exemple classique de divisions asymétriques. Elle conduit à cinq types de cellules distincts: la glie, le neurone, la gaine, le poil et la *socket*. Durant l'établissement des SOPs, il y a deux variantes de divisions asymétriques. La première apparaît durant la première division (cellule pI) : le fuseau est symétrique et les deux cellules filles sont différentes en contenu protéique [Roegiers et al., 2001] (Fig. I-4-b). La seconde variante est une division asymétrique par la position du fuseau (cellule pIIb) conduisant à la génération de deux cellules filles qui diffèrent à la fois au niveau de leurs tailles et de leur contenu cytoplasmique. L'asymétrie de ces deux divisions est générée par différents niveaux d'activité des récepteurs transmembranaires NOTCH des deux cellules filles [Knoblich,

2008; Schweisguth, 2004].

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, notre organisme modèle, sur les 949 divisions successives durant le développement de l'embryon vers un nématode adulte, 807 sont des divisions asymétriques permettant ainsi la mise en place de lignées cellulaires différentes pour la formation du ver [Horvitz and Herskowitz, 1992]. Je détaillerai la première division, asymétrique, de l'embryon de *C. elegans* dans la section 1.2.1.4 (Fig. I-4-a).

Du point de vue biophysique, la division asymétrique est très intéressante, notamment lorsque l'asymétrie provient d'une différence de taille des cellules filles. Cette différence indique souvent un déséquilibre de force. Ce déséquilibre est alors une source d'informations sur les aspects mécaniques de la division.

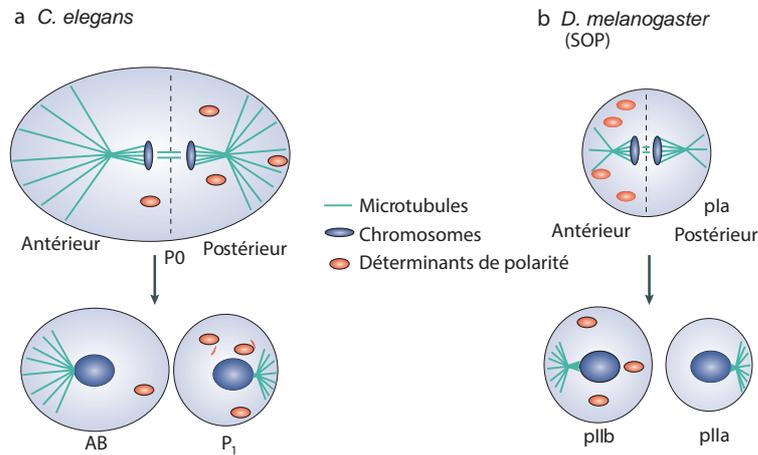


Figure I-4 – Division asymétrique chez le nématode et la drosophile. a) Première division asymétrique de l'embryon uni-cellulaire de *C. elegans* avec la formation de deux cellules filles de tailles différentes, une grande AB et une petite P1, b) Première division asymétrique de la lignée des cellules précurseurs des organes sensoriels (SOP) de la drosophile conduisant à deux cellules filles de tailles différentes pIIa et pIIb. (Adaptée de [Gonczy, 2008])

1.1.3 Pourquoi étudier la division cellulaire ?

Les divisions cellulaires doivent être finement contrôlées au cours du développement afin de permettre le respect du plan d'organisation¹ de l'organisme multicellulaires. Cette régulation est un processus conservé au cours de l'évolution ; cela implique que les mécanismes identifiés sur des organismes modèles, peuvent être transférés à l'humain offrant

¹Ensemble de caractéristiques formant la structure de base des membres d'un phylum animal.

par exemple de nouvelles informations sur les dérégulations de la mitose pouvant être à l'origine de pathologies diverses dont les cancers. L'élucidation des mécanismes de division cellulaire est donc cruciale pour la recherche médicale. Dans une perspective thérapeutique, deux motivations peuvent être mises en avant:

- Les défauts de la division cellulaire conduisent à l'établissement de cellules aneu- ploïdes¹. L'aneuploïdie est un marqueur des cellules cancéreuses [Thompson et al., 2010] et est corrélée avec un mauvais pronostic et une résistance aux traitements médicamenteux induite par la plasticité du génome. Ainsi comprendre les mécanismes conduisant à l'aneuploïdie est un défi important pour la carcinogénèse.
- Les cellules cancéreuses présentent des défauts, qui devraient conduire à leur mort par apoptose, ce qui n'est pas toujours le cas. La mécanique du fuseau semble jouer un rôle dans la robustesse et l'adaptabilité de la division cellulaire. Elle permet à la cellule de poursuivre sa division malgré des perturbations internes (instabilité chromosomique, erreur d'attachement des chromosomes, altération du nombre de chromosomes, etc.) ou externes (agents antimitotiques). Identifier ces mécanismes de robustesse permettrait de les cibler dans une perspective thérapeutique.

1.2 Les organismes modèles

Les études de la division cellulaire peuvent être réalisées sur des cellules en culture ou des organismes modèles. Les premières permettent l'utilisation de cellules humaines directement. Toutefois, ces cellules sont le plus souvent immortalisées et adoptent alors un comportement particulier, intermédiaire entre les cellules saines et cancéreuses. De plus, l'environnement de la cellule va conditionner sa division [Gillies and Cabernard, 2011; Castanon and Gonzalez-Gaitan, 2011]. Grâce aux organismes modèles, il est possible de faire des études *in vivo*, qui s'avèrent être pertinentes pour l'humain.

Afin d'étudier la division cellulaire et plus précisément la mécanique du fuseau mitotique, nous avons choisi d'utiliser deux organismes modèles complémentaires. Le premier est le nématode *C. elegans*, dont la première division est asymétrique ; le second est la levure *S. pombe*, dont la division cellulaire est symétrique. Ainsi, ils nous permettent de travailler sur les deux types de division en plus d'être tous les deux des modèles d'étude de la division cellulaire bien établis, que je vous présente ci-dessous.

¹mauvais nombre de chromosome

1.2.1 *Caenorhabditis elegans*, organisme modèle pour l'étude de la division cellulaire

1.2.1.1 Un organisme modèle utilisé en biologie depuis plus de 50 ans

Ce nématode hermaphrodite est un système expérimental introduit en 1974 par Sydney Brenner pour étudier le fonctionnement du système nerveux tirant avantage du grand nombre de cellules neuronales (302 sur les 1090 cellules présentes à l'âge adulte) [Brenner, 1974]. Il est rapidement devenu un des organismes modèles le plus utilisé dans différents domaines de la biologie allant des études sur le développement, la mort cellulaire et le vieillissement jusqu'à son utilisation en génétique pour le développement de la technique d'interférence d'ARN. Les "pères" du modèle *C. elegans*, Sydney Brenner, John Sulston et Robert Horvitz, ont reçu le prix Nobel en 2002. De même, Andrew Fire et Craig C. Mello reçurent le prix Nobel de médecine en 2006 pour leur découverte de l'interférence d'ARN chez *C. elegans*. Le nématode *C. elegans* est le premier organisme pluri-cellulaire, dont le génome a été entièrement séquencé en 1998 [Consortium, 1998].

1.2.1.2 Un cycle de vie rapide

Une des particularités de *C. elegans*, qui est avantageuse pour un organisme modèle, est sa capacité à se développer très rapidement entre 15 et 25°C. À température ambiante (20°C), il ne faut que 3 jours à un oeuf pondu par un adulte pour donner à son tour un adulte capable de pondre des oeufs [Oegema and Hyman, 2006]. Ce développement rapide facilite les manipulations génétiques du type croisement entre deux souches et font donc gagner du temps pour les expériences. Durant son développement, l'animal croît en taille passant d'une longueur de 50 μm pour l'embryon unicellulaire à environ 1 mm pour le ver à l'âge adulte (Fig. I-5). Le cycle de vie de *C. elegans* comprend une phase embryonnaire, conduisant à la formation d'une larve L1 capable de se nourrir, et une phase post-embryonnaire de développement avec trois mues successives, qui produisent les larves L2, L3 et L4, puis une dernière mue produisant l'adulte capable de se reproduire. Le ver vit en général durant une vingtaine de jours une fois adulte [Riddle et al., 1997]. Les différentes étapes de sa vie sont facilement identifiables par l'observation de sa morphologie. Cela est un avantage lors des manipulations expérimentales. Ainsi il est possible d'envisager de nombreuses expériences impliquant des mutations, des croisements ou des déplétions de protéines afin d'étudier le fuseau mitotique.

1.2.1.3 Les avantages du nématode *Caenorhabditis elegans*

Le nématode *C. elegans* est un organisme modèle offrant de nombreux avantages :

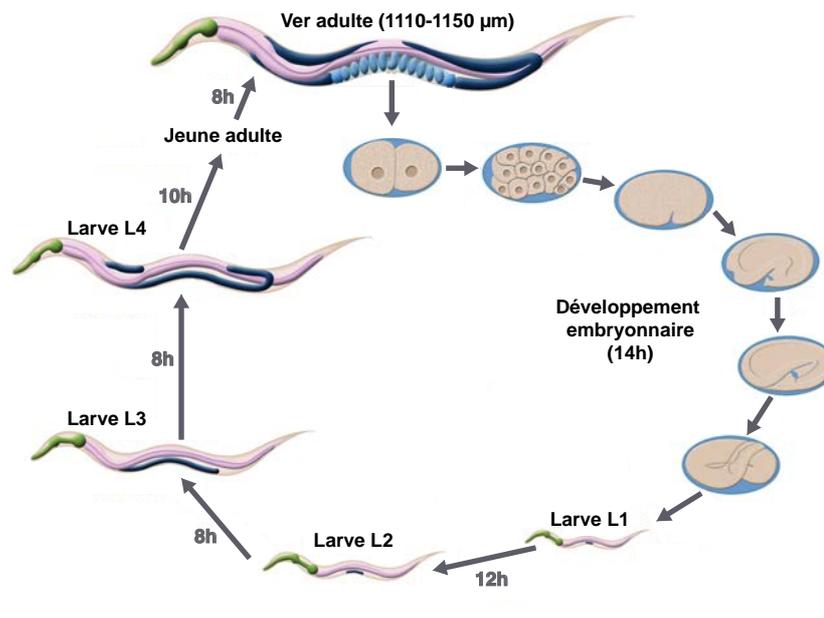


Figure I-5 – Différentes étapes du développement du nématode *C. elegans*. (Adaptée de [Oegema and Hyman, 2006])

- Il est facile à cultiver de par son mode de nutrition et sa petite taille. Ainsi, en laboratoire, les animaux sont élevés dans des boîtes de pétri sur un milieu d'agarensemencé avec une souche de bactéries *Escherichia coli* souche OP50 [Riddle et al., 1997]. Les températures optimales de culture sont comprises entre 12 et 25° C.
- Il est possible de conserver et maintenir à long terme des souches ou mutants obtenus par congélation et conservation à -80°C . Ainsi le *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC Université Minesota USA) une biobanque pour la recherche, possède plus de 12000 souches de *C. elegans* (mutants, lignées transgéniques, ...).
- La technique de suppression de gènes par interférence d'ARN a été développée chez cet organisme et y est très performante : il existe ainsi des banques de bactéries exprimant des plasmides permettant de faire de l'interférence d'ARN par nourrissage. Des criblages en génomique fonctionnelle par la technique d'interférence d'ARN ont permis de cibler un grand nombre de gènes et de visualiser leur phénotype de déplétion dans la division cellulaire suggérant leur fonction.
- La taille de l'embryon uni-cellulaire, environ $50\ \mu\text{m}$ de long et la durée de la première division (environ 15 minutes) sont adaptées à une étude par la microscopie optique. Ce point s'avère être crucial pour notre étude de la mécanique du fuseau, basée sur de la microscopie optique. Par ailleurs, il faut attendre maximum 5 min après la

dissection du ver pour pouvoir observer une division.

- Sa première division, très stéréotypée, est utile pour réaliser notre étude car elle permet d'obtenir des résultats très reproductibles et donc peu entachés de variabilité biologique.
- L'attachement des microtubules aux chromosomes présente la particularité d'être holocentriques¹. De plus de nombreux microtubules, s'attachent à chaque chromosome (de 10 à 50 microtubules par chromosomes [O'Toole et al., 2003; Redemann et al., 2016]). Ainsi les chromosomes du nématode peuvent être vus comme un "zoom" de la région centromérique de chromosomes humains [Stear and Roth, 2004].
- Du point de vue de la biophysique cette division, présente de nombreux mouvements intra-cellulaires ; cet aspect facilite grandement la quantification de la dynamique ou des forces, nécessaire à une analyse biophysique du fuseau mitotique.

1.2.1.4 La première division asymétrique de *C. elegans*

La première division de l'embryon de *Caenorhabditis elegans* est asymétrique. L'asymétrie de position du fuseau mitotique est causée par une répartition asymétrique des générateurs de force au cortex tirant sur les microtubules astraux dont la distribution est elle-même la conséquence de la distribution asymétrique des facteurs de polarité [Grill et al., 2001; Grill et al., 2003] (Fig. I-6).

La première cellule de l'embryon de *C. elegans* résulte de la fertilisation d'un ovocyte par un spermatozoïde. La protéine RhoGAP CYK-4 apportée par le spermatozoïde déstabilise le réseau d'acto-myosine et initie ainsi la polarisation de l'embryon par des protéines spécialisées [Cowan and Hyman, 2007; Goehring and Grill, 2013]. Durant la prophase de la première division, les *pronuclei*² migrent vers le centre de l'embryon jusqu'à se rencontrer : ces mouvements sont dépendants à la fois de l'action des microtubules, pour le *pronucleus* mâle mais également des contractions du cortex de l'embryon qui créent un flux au sein de l'embryon favorisant ainsi le mouvement du *pronucleus* femelle [Strome and Wood, 1983]. Après leur rencontre les *pronuclei* effectuent une rotation et se placent au centre de la cellule [Oegema and Hyman, 2006]. Ensuite durant la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se désassemble au moins partiellement [Portier et al., 2007]. Cela permet la capture des six chromosomes holocentriques par les microtubules formant le fuseau mitotique par le mécanisme de *search and capture* [Kirschner and Mitchison, 1986a]. Les

¹La région centromérique où les microtubules peuvent s'attacher aux chromosomes par l'intermédiaire des kinétochores est répartie tout le long des chromosomes.

²Les noyaux des deux gamètes male et femelle ne possédant qu'une copie de chaque chromosome.

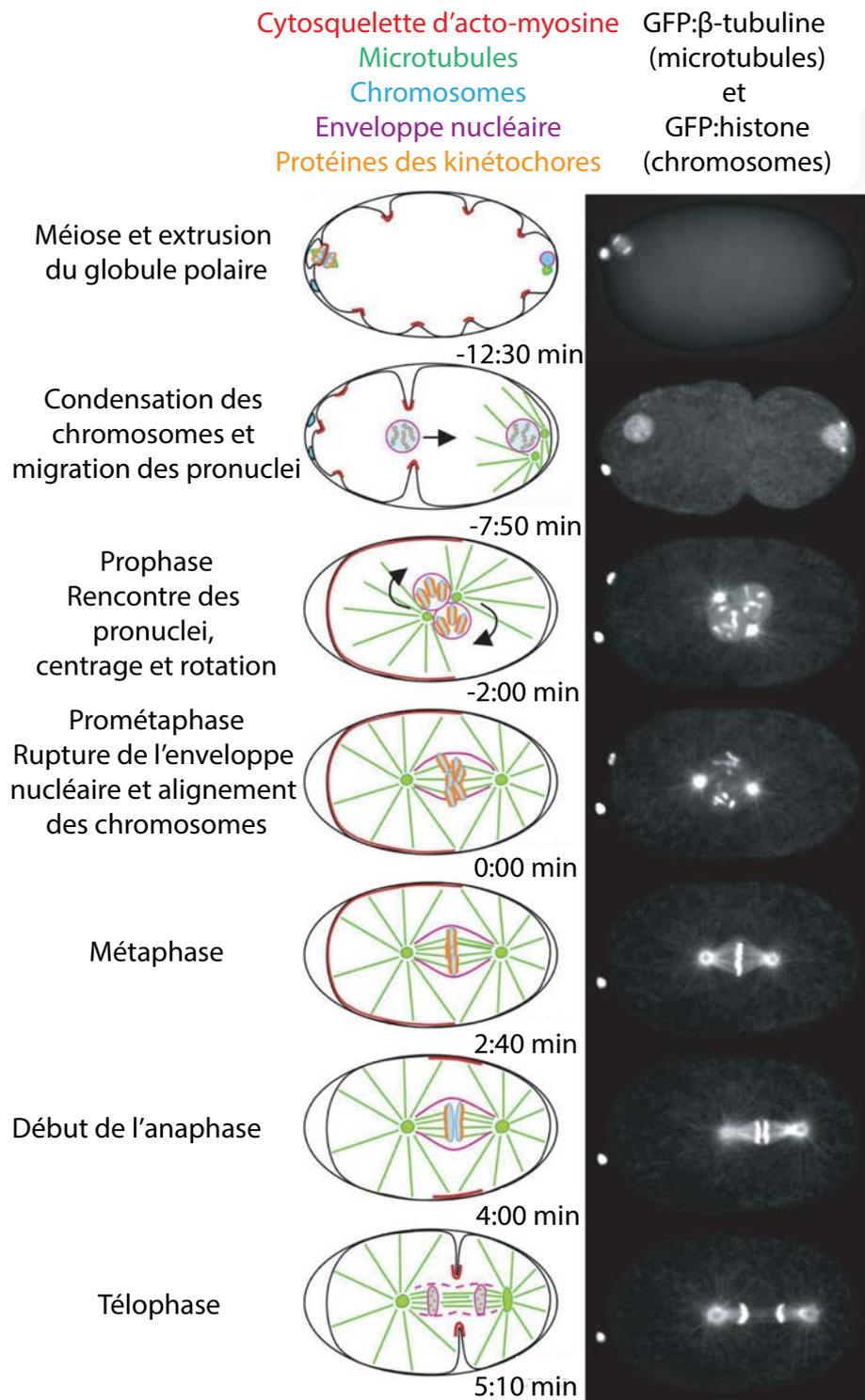


Figure I-6 – Chorégraphie de la première division asymétrique de *C. elegans* (Adaptée de [Oegema and Hyman, 2006])

chromosomes s'alignent ensuite pour former la plaque métaphasique durant la métaphase. A partir de là, une fois le point de contrôle de l'attachement des chromosomes (SAC¹) satisfait la cellule passe en anaphase et les chromatides soeurs se séparent sous l'action des microtubules du fuseau. Ces microtubules exercent une force (en particulier grâce à la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens) afin de répartir correctement les chromatides de chaque côté de la cellule. Simultanément, le fuseau mitotique se déplace vers le côté postérieur [Pecreaux et al., 2006] sous l'action des complexes générateurs de forces actifs à la périphérie de la cellule, dont la repartition est asymétrique au cortex [Grill et al., 2003]. Ceux-ci tirent sur le fuseau mitotique via les microtubules astraux [Pecreaux et al., 2006; Redemann et al., 2010]. La position finale du fuseau participe au positionnement du sillon de cytokinèse [Rappaport, 1971]. Durant la telophase, ce sillon va progresser et séparer totalement les deux cellules filles. Nous aurons alors à la fin de cette division deux cellules, une grande nommée AB, qui va continuer à se diviser symétriquement (lignée somatique²), et une petite P1, qui va elle continuer à se diviser de façon asymétrique (lignée germinale³) (Fig. I-6).

Pour compléter notre étude, nous nous sommes intéressés à un autre organisme modèle dont la division est symétrique, *Schizosaccharomyces pombe*, avec une structure de fuseau différente, qui s'avère être complémentaire de celle observée chez *C. elegans*.

1.2.2 *Schizosaccharomyces pombe* un organisme modèle pour l'étude des interactions uniques dans le fuseau mitotique

La levure à fission *S. pombe* est un micro-organisme eucaryote en forme de bâtonnet (Fig. I-7), de 3 à 4 μm de diamètre et de 7 à 10 μm de long, qui se développe sur les racines des arbres ainsi que dans les sols. Les cellules grandissent uniquement par leurs extrémités et se divisent par fission médiane (d'où son nom de levure de fission), produisant deux cellules filles de taille égale.

1.2.2.1 Modèle établi de division symétrique

Isolée pour la première fois en 1890 par P. Lindler à partir de bière de millet, la levure *S. pombe* fut établie comme organisme modèle par Urs Leupold [Leupold, 1957] en 1957 et a notamment été utilisée pour l'étude du cycle cellulaire et de sa régulation. Grâce à leurs travaux sur les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire chez la levure, Paul Nurse et Tim Hunt ont obtenu le prix Nobel de médecine en 2001. Le séquençage de son génome a été

¹Spindle assembly checkpoint (cf section 1.3.3)

²Cellules formant le corps d'un organisme pluri-cellulaire

³Cellules participant à la formation des cellules reproductrices

publié en 2002 faisant de *S. pombe* le sixième organisme eucaryote séquencé [Wood et al., 2002]. Une particularité de la levure à fission est que sa division est fermée contrairement à la plupart des eucaryotes supérieurs (dont elle ne fait pas partie), c'est-à-dire que la division se réalise alors que l'enveloppe nucléaire est toujours présente.

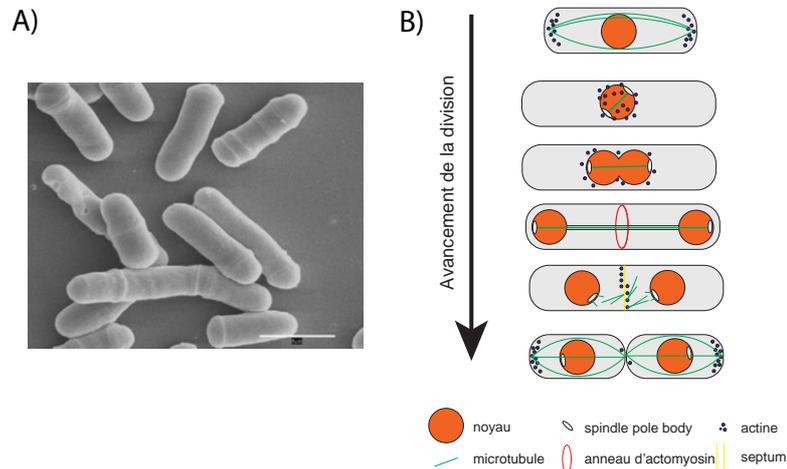


Figure I-7 – A) Vue en microscopie électronique à balayage de cellules de la levure *S. pombe*, la barre d'échelle correspond à $8\mu\text{m}$ [Morgan, 2007], B) Schéma d'avancement de la mitose fermée de la levure. Adapté [Selhuber-Unkel et al., 2009]

1.2.2.2 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire de la levure à fission est rapide et dure environ 3h à 20°C avec notamment une phase G2 longue et la séparation des cellules en phase S et non en fin de phase M (Fig. I-8). La mitose est classique, avec une anaphase, qui est divisée en deux parties, une anaphase A et une anaphase B. L'anaphase A dure moins de 20 secondes avec la taille du fuseau, qui reste constant, et les chromosomes, qui se déplacent à une vitesse de l'ordre de 0.5 à $1\ \mu\text{m}/\text{min}$ vers chacun des pôles du fuseau. À l'inverse, durant l'anaphase B, le fuseau s'allonge pendant une dizaine de minutes.

1.2.3 La complémentarité des deux modèles d'étude

Ces deux modèles diffèrent par le nombre d'acteurs au sein du fuseau : très nombreux chez *C. elegans*, ils sont bien plus faibles chez *S. pombe*, qui présente ainsi un fuseau plus petit. Outre les microtubules astraux présents chez *C. elegans* et absents dans la levure, le fuseau de cette dernière est bien moins fourni en microtubules interpolaire et kinétochoriens que le fuseau du nématode. Chez *C. elegans*, 6 à 50 microtubules sont

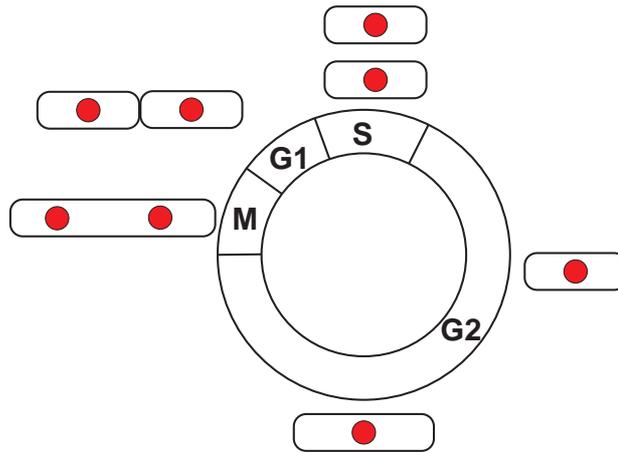


Figure I-8 – Schéma du cycle cellulaire de la levure à fission *S. pombe*. Les points rouges sont les noyaux des cellules.

attachés à chaque chromatide [Redemann et al., 2016], alors que, chez *S. pombe*, seulement 3 microtubules se fixent à chaque chromatide [Courtheoux et al., 2009]. À cela s'ajoute la différence en nombre de chromosomes (seulement 3 chez *S. pombe* contre 6 chez *C. elegans*), ce qui majore la différence numérique des acteurs impliqués. Ainsi, ces deux organismes permettent des approches différentes pour une étude biophysique de leur fuseau, avec une approche "comportements collectifs" chez le nématode *C. elegans* due au grand nombre d'acteurs, et une approche "comportements individuels" chez *S. pombe*. La première division chez *C. elegans* est asymétrique avec le positionnement du fuseau mitotique réalisé par l'intermédiaire des nombreux microtubules astraux connectant les pôles du fuseau au cortex cellulaire et permettant ainsi la transmission des forces de traction. Elles sont à l'origine des nombreux mouvements des pôles du fuseau ainsi que de son élongation. Chez *S. pombe*, à l'inverse, la division est symétrique avec peu de microtubules dirigés vers la périphérie de la cellule et donc certainement des forces de traction moindres voire inexistantes appliquées aux pôles. Ainsi seules les forces générées dans le fuseau permettent de séparer les chromosomes.

Une autre différence entre les deux modèles est l'attachement des chromosomes par les microtubules kinétochoriens. Chez *C. elegans*, les chromosomes sont holocentriques, ce qui signifie que les points d'ancrage des microtubules du fuseau sur les chromosomes sont répartis sur toute la hauteur du chromosome. Cela fait du chromosome du nématode un zoom de la région centromérique du chromosome humain [Redemann et al., 2016]. À l'inverse, l'attachement des chromosomes chez *S. pombe* est monocentrique, les kinétochores étant regroupés dans une région unique et réduite du chromosome. Cela participe à la possibilité d'étude dite "d'événements uniques" dans la levure, alors que nous pourrions

accéder aux comportements collectifs grâce au fuseau de *C. elegans*.

1.3 Le fuseau mitotique, structure au coeur de la mitose

Durant la mitose, les microtubules du fuseau mitotique vont capturer les chromosomes et les répartir dans les deux cellules filles. Pour accomplir cette fonction, il est composé, non seulement des microtubules, mais aussi de moteurs moléculaires capables d'exercer des forces et de déplacer les microtubules, afin par exemple d'allonger le fuseau lui permettant ainsi de séparer les chromatides sœur lors de l'anaphase. Cependant une question subsiste : comment tous ces composants interagissent-ils afin d'accomplir ces fonctions ? En effet, il est connu que les composants du fuseau mitotique sont très dynamiques : les microtubules polymérisent et dépolymérisent continuellement [Mitchison and Kirschner, 1984]; les moteurs s'attachent et se détachent des microtubules de manière stochastique avec des taux dépendants de la force qu'ils exercent. Cet aspect dynamique des acteurs du fuseau est indispensable à la compréhension de sa fonction, notamment au vu de la rapidité de la division et des nombreux mouvements et événements à gérer tels que la détection et la correction des erreurs d'attachement des chromosomes.

1.3.1 Ses principaux composants

Dans cette partie je vais décrire les principaux acteurs du fuseau. Comme par la suite mon étude s'orientera principalement sur le fuseau mitotique de la première division du nématode *C. elegans*, je vais mettre en avant les spécificités de cet organisme modèle.

1.3.1.1 Les pôles du fuseau comme source de microtubules

Le fuseau mitotique apparaît comme une structure bipolaire dont les pôles sont des centrosomes chez *Caenorhabditis elegans*. Ces sont les centres organisateurs de microtubules (MTOCs, 'MicroTubule Organizing Centers'). Les images de microscopie électronique suggèrent que 2000 microtubules émanent des pôles formant à la fois le fuseau, ou rejoignant le cortex [Redemann et al., 2016; O'Toole et al., 2003].

Les centrosomes sont constitués chacun de deux centrioles: un centriole dit père, qui s'est dupliqué en préalable de la mitose formant un centriole dit fils. Les centrioles pères proviennent du spermatozoïde lors de la fertilisation. Autour des deux centrioles de chaque centrosome, se trouve une matrice peri-centriolaire (PCM, 'pericentriolar material') d'où les microtubules vont nucléer afin de former un aster [Meraldi and Nigg, 2002; Bornens, 2002].

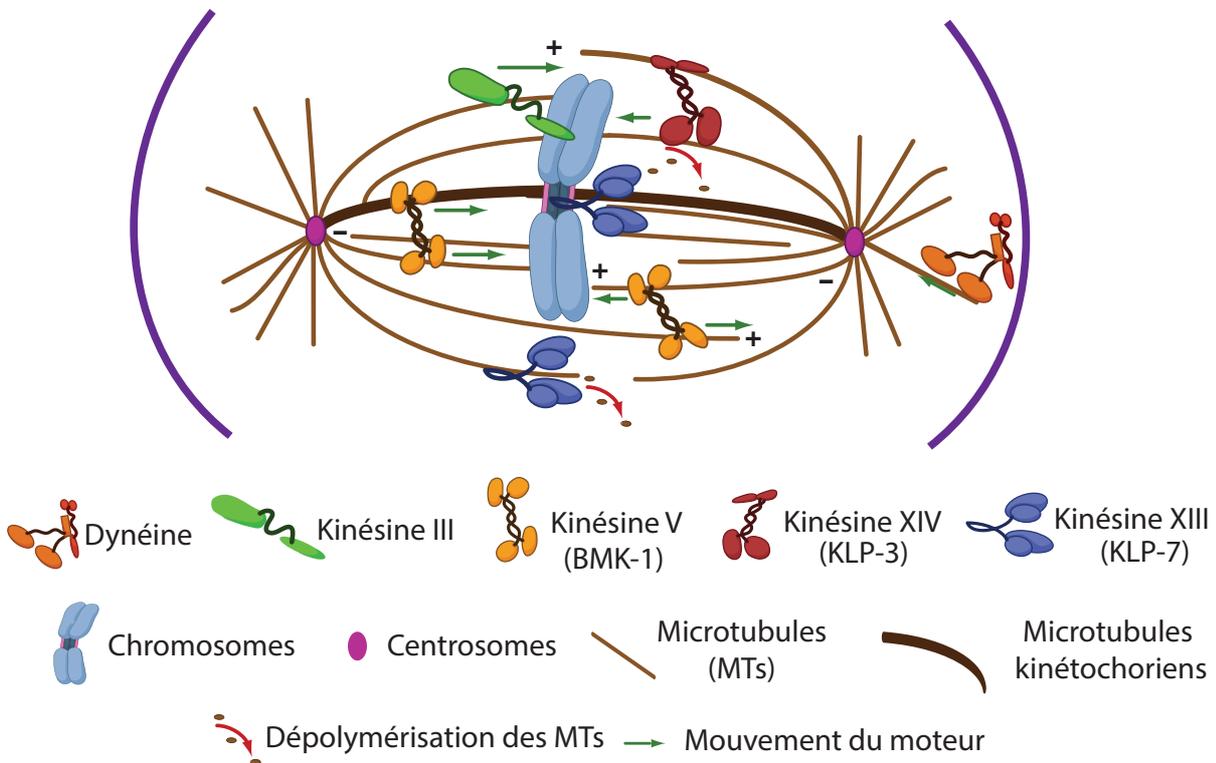


Figure I-9 – Schéma du fuseau mitotique avec ses principaux acteurs. (Adaptée de [Loughlin et al., 2008])

De part leur rôle d'organisation des microtubules, les centrosomes sont le noeud de la plupart des forces qui s'appliquent sur le fuseau, aussi bien celles provenant de la périphérie que celles internes au fuseau. Il paraît pertinent d'étudier leurs mouvements pour rendre compte de ces forces.

1.3.1.2 Les microtubules comme acteurs majeurs du fuseau mitotique

Nucléés à partir des centrosomes, les microtubules jouent un rôle structural et mécanique très important dans l'assemblage et les fonctions du fuseau. Ce sont des filaments, qui forment de longs tubes cylindriques creux de 25 nm de diamètre [Nogales, 1999]. Chaque filament est généralement composé de 11 protofilaments [Chalfie, 1982] chez l'embryon de *C. elegans*. Les protofilaments sont des polymères linéaires composés d'hétérodimères de tubuline (tubuline α et tubuline β). Dans les microtubules présents lors de la mitose, les protofilaments s'arrangent parallèlement, mais légèrement décalés, imposant une chiral-

ité naturelle (Fig. I-10). On distingue ainsi une extrémité (-) et une extrémité (+) pour chaque microtubule. Cette polarité va non seulement influencer les interactions des microtubules avec les autres acteurs de la division, comme par exemple les moteurs moléculaires qui marchent vers une extrémité donnée, mais aussi leurs assemblages avec l'addition ou la soustraction des hétérodimères plus rapide à leurs extrémités (+)[Akhmanova and Hoogenraad, 2005]. En plus du rôle structural, les microtubules sont très dynamiques et cet aspect est indispensable au fonctionnement du fuseau.

La dynamique des microtubules au coeur des propriétés d'adaptabilité du fuseau Les microtubules sont caractérisés par une instabilité dynamique, à savoir une alternance stochastique entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation. Cette instabilité dynamique est une propriété clé dans la capacité d'organisation des microtubules, notamment en permettant d'explorer l'espace intracellulaire [Mitchison and Kirschner, 1984; Desai and Mitchison, 1997; Kirschner and Mitchison, 1986b]. Chez *C. elegans* la vitesse de polymérisation des microtubules est extrêmement rapide, environ $0.6 \mu\text{m/s}$ et celle de dépolymérisation $0.8 \mu\text{m/s}$ [Srayko et al., 2005; Kozlowski et al., 2007]. Le passage d'une phase de croissance à une phase de décroissance est appelé "catastrophe", alors que l'inverse est nommé "secours"(Fig. I-10). Cette instabilité dynamique permet aux microtubules de s'adapter rapidement à l'environnement, à la phase de la division cellulaire. Par ailleurs, la dynamique des microtubules peut être régulée en temps et en espace. Srayko et ses collaborateurs ont montré que les vitesses de croissance et de décroissance étaient modulées en fonction de la phase de la mitose, par différents acteurs moléculaires [Srayko et al., 2005].

Nous voyons ici que la dynamique des microtubules est un facteur à prendre en compte dans l'analyse que nous souhaitons mettre en oeuvre. Les vitesses rapides observées ici nous imposent un taux d'acquisition très rapide.

Les différents rôles de microtubules au sein du fuseau Au sein du fuseau mitotique, nous pouvons distinguer deux familles différentes des microtubules.

- Les microtubules **kinétochoriens** : Chez *C. elegans*, ce sont les microtubules qui vont des pôles du fuseau jusqu'aux chromosomes, auxquels ils s'attachent par l'intermédiaire des kinétochores. Le kinétochore est un assemblage supramoléculaire de protéines, qui permet de faire le lien entre les microtubules et les chromosomes au niveau de régions spéciales de ces derniers. Ces régions sont les centromères : des segments de chromatine qui permettent l'attachement des microtubules par leurs extrémités (+) [Alberts et al., 2015]. Cette zone est particulière chez *C. elegans*, car les chromosomes sont holocentriques, ce qui signifie que les régions centromériques

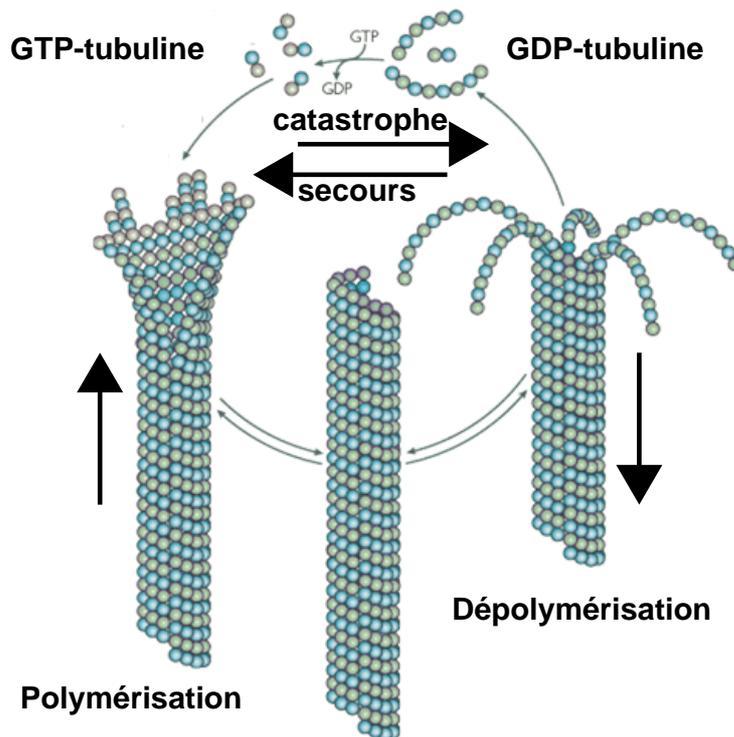


Figure I-10 – Cycle de la dynamique des microtubules. (Adaptée de [Akhmanova and Steinmetz, 2008])

sont réparties tout au long du chromosome, à l'inverse de la majorité des organismes, qui ont des chromosomes monocentriques¹. Les microtubules kinétochoriens sont au centre des fonctions du fuseau mitotique, particulièrement de la séparation des chromatides soeurs. Ainsi, le lien correct entre ces microtubules et les chromosomes est primordial (cf section 1.3.3)(Fig. I-9).

- Les microtubules **interpolaires** aussi appelés interdigités: chaque microtubule interpolaire provient d'un des 2 pôles du fuseau et ils longent un microtubule venant de l'autre pôle de manière anti-parallèle². Ils forment ainsi la zone médiane (*mid-zone*) et sont reliés par l'intermédiaire de moteurs moléculaires ou des agents de réticulation.

En anaphase, les microtubules forment une structure appelée "fuseau central" (*centralspindle*), qui permet notamment l'élongation du fuseau mitotique et la séparation des chromatides soeurs [Verbrugghe and White, 2004; Nahaboo et al., 2015].

Nous voyons donc le rôle central des microtubules pour les fonctions mécaniques de la

¹Les centromères sont rassemblés au même endroit sur le chromosome

²par rapport à la polarité des microtubules

cellule, en particulier au sein du fuseau dont ils sont des acteurs importants.

1.3.1.3 Les moteurs moléculaires et régulateurs des microtubules aussi appelés MAPs ("*Microtubules associated proteins*")

Les "*Microtubules associated proteins*" (MAPs) peuvent être divisés en deux groupes : celles qui auront principalement un rôle moteur et celles qui auront une activité de régulateur.

Les moteurs moléculaires Les moteurs moléculaires du fuseau, appelés kinésines et dynéines, sont capables de convertir l'énergie chimique provenant de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Il existe 21 kinésines chez *C. elegans*, répartis en 14 sous-familles. Initialement décrites comme des molécules permettant le transport de charges dans le cytoplasme en les déplaçant le long des microtubules, certaines kinésines sont désormais connues pour leur rôle dans la régulation de la dynamique de microtubules. Les kinésines des familles I à XII correspondent aux kinésines avec un mouvement dirigé vers l'extrémité (+)[Cole et al., 1994; Kashina et al., 1996], alors que la sous-famille XIII contient les kinésines dépolymérasés et la sous-famille XIV les kinésines se déplaçant vers l'extrémité (-). Pour illustrer ce propos je vais rapidement décrire les quelques protéines des différentes familles qui pourront être réutilisées durant mon étude.

Chez *C. elegans*, il n'y a qu'un seul représentant des kinésines V capable d'allonger le fuseau. Cette protéine est BMK-1 qui relie les microtubules antiparallèles. Il a été montré que durant l'élongation rapide du fuseau elle limite la vitesse d'élongation (rôle de frein) [Saunders et al., 2007].

Les kinésines de la famille XIV se déplacent dans la direction opposée aux kinésines V, vers l'extrémité (-) des microtubules et contribueraient au raccourcissement du fuseau mitotique [Braun et al., 2009]. Un représentant de cette sous famille est KLP-3 orthologue à NCD chez la drosophile [Siddiqui, 2002]. Elle serait impliquée dans la séparation des chromosomes [Khan et al., 1997].

En dehors de ces deux familles, nous retrouvons chez *C. elegans* une chromokinésine, KLP-19, dont le rôle semble être d'orienter les chromatides soeurs [Powers et al., 2004]. Elle est indispensable au bon attachement des microtubules aux chromatides soeurs.

La protéine KLP-7, de la famille des kinésines XIII, agit aussi sur les microtubules par une voie différente. En effet, KLP-7 va induire une dépolymérisation des microtubules [Srayko et al., 2005]. Un modèle a été proposé, où les protéines KLP-7, l'orthologue de MCAK, régulent l'attachement des microtubules kinétochoriens et la tension au sein du fuseau [Connolly et al., 2015].

Dans l'aspect dynamique et mécanique du fuseau, en plus des protéines ayant un rôle moteur au sein du fuseau, il y a celles qui vont réguler la dynamique des microtubules ou des moteurs, ou qui vont permettre la formation de faisceaux de microtubules.

Principales protéines non motrices impliquées dans le fuseau agissant sur les microtubules. Il existe de nombreuses protéines n'ayant pas de rôle moteurs et qui modifient par exemple la dynamique des microtubules. Ainsi, ZYG-9 (homologue à XMAP215) va accroître le taux de polymérisation des microtubules [Albertson, 1984; Kemphues et al., 1986]. Cela va entraîner la présence de long microtubules au sein du fuseau mitotique.

Dans la famille des CLASP, la protéine CLS-2 nous intéresse particulièrement. C'est un facteur de secours. En effet, il agit sur la dynamique des microtubules kinétochoriens et des microtubules astraux [Espiritu et al., 2012]. Elle est impliquée dans la ségrégation des chromosomes et son absence cause la séparation rapide des pôles du fuseau mitotique [Espiritu et al., 2012; Dumont et al., 2010; Maton et al., 2015].

Enfin, d'une toute autre nature, la protéine SPD-1 permet la création de faisceaux de microtubules en particulier après le passage en anaphase [Verbrugghe and White, 2004]. Elle agit avec ZEN-4 dans la mise en place du fuseau central. SPD-1 est l'orthologue chez *C. elegans* de *ase1p* chez *S. pombe* qui est très impliqué dans l'élongation du fuseau mitotique en anaphase B chez la levure [Fu et al., 2009]. Elle participe également à la correction des erreurs d'attachement des chromosomes après le passage en anaphase [Courtheoux et al., 2009].

Ces acteurs aux rôles variés montrent la complexité du fonctionnement du fuseau mitotique, avec beaucoup d'interactions entre chaque composant. Il est quasi impossible d'envisager un modèle d'analyse du comportement du fuseau représentant chaque composant et chaque interaction, cependant, il est envisageable d'adopter une approche gros-grains en regroupant les composants en fonction de leur rôle au sein du fuseau.

À ces différentes MAPs, interagissant avec les microtubules du fuseau, qui vont réguler la mécanique et la dynamique du fuseau, se rajoute l'environnement externe du fuseau.

1.3.1.4 L'environnement du fuseau

Chez le nématode *C. elegans*, une partie des microtubules, que nucléent les MTOCs, croissent en direction du cortex : ce sont les microtubules astraux. Ils vont rejoindre le cortex cellulaire et participer aux mécanismes permettant d'orienter et positionner le fuseau mitotique au cours de la mitose [Hyman, 1989]. Les moteurs moléculaires dynéines associés à un complexe trimérique avec LIN-5/NuMA et GPR-1/2 /LGN [Gonczy et al., 1999; Nguyen-Ngoc et al., 2007] de protéines ancrées au cortex vont tirer sur les microtubules

astraux et participer ainsi à l'élongation du fuseau [Pecreaux et al., 2006]. La répartition inégale et asymétrique des régulateurs de protéines G, les protéines GPR-1 et GPR-2, plus concentrées dans le coté postérieur de l'embryon [Park and Rose, 2008; Riche et al., 2013], qui va déséquilibrer les forces exercées sur les pôles du fuseau avec plus de forces sur le pôle postérieur que sur l'antérieur [Grill et al., 2003]. L'environnement du fuseau pourrait jouer un rôle durant la division, il serait donc intéressant d'observer si l'environnement peut modifier le comportement du fuseau.

En conclusion le fuseau mitotique est une structure hautement dynamique avec de nombreuses interactions mécaniques participant à son fonctionnement. Ces interactions se font sous forme de forces qui sont soit internes au fuseau soit externes provenant de la périphérie.

1.3.2 Les forces mécaniques au sein du fuseau ou supportées par le fuseau

Nous pouvons, pour plus de clarté, diviser les forces au sein du fuseau en trois groupes distincts. Le premier regroupe les forces trouvant leur origine au niveau de la zone interdigitée du fuseau mitotique. Le second comprend les forces trouvant leur origine au niveau des kinétochores, créées par la dynamique des microtubules par exemple . Enfin, le troisième groupe inclut les forces externes au fuseau trouvant leur origine au cortex de la cellule par exemple et qui agissent sur les MTOCs par l'intermédiaire des microtubules astraux. Ces différents jeux de forces sont donc à prendre en compte pour une analyse mécanique du fuseau mitotique.

Ces forces et leurs effets sont au coeur du fonctionnement du fuseau mitotique : elles permettent de remplir les différents rôles dont il a la charge.

1.3.3 Les fonctions essentielles du fuseau mitotique

Durant la division, le fuseau évolue dans sa structure (Fig. I-11). Il finalise sa mise en place en métaphase, une fois que tous les chromosomes sont bien attachés à chaque pôle du fuseau via les microtubules kinétochoriens. Le modèle établi de mise en place de fuseau mitotique est le modèle de *"search and capture"*. Il est permis par la présence des MTOC et est basé sur l'instabilité des microtubules [Kirschner and Mitchison, 1986b]. Les MTOC nucléent des microtubules dans toutes les directions dans le cytoplasme qui lorsqu'ils rencontrent un kinétochore s'attachent à celui-ci. L'attachement au kinétochore est également soumis à un équilibre dynamique [Holy and Leibler, 1994]. Comme les microtubules proviennent des deux pôles, ils forment alors un fuseau bipolaire.

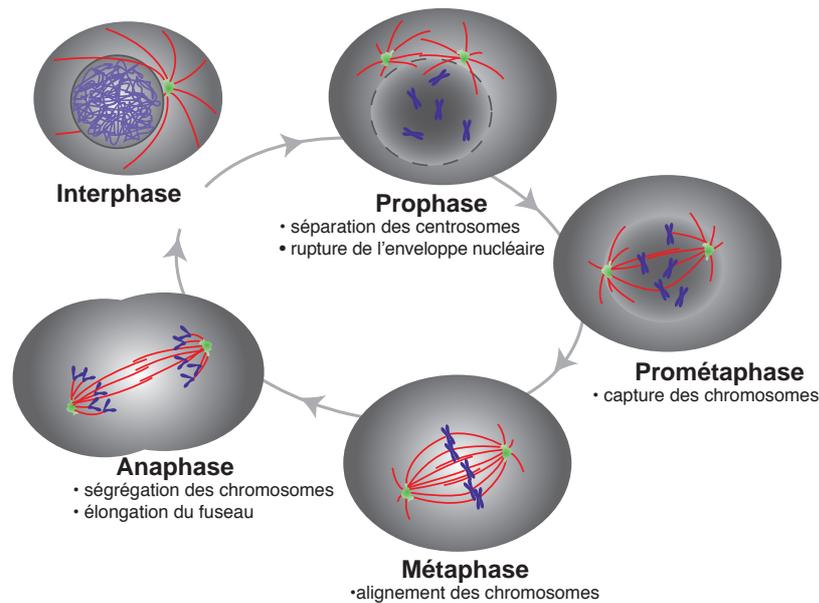


Figure I-11 – Structure du fuseau mitotique au cours de la mitose avec les microtubules en rouge, les chromosomes en bleu et les pôles du fuseau en vert. (Adaptée de [Gadde and Heald, 2004])

La mise en place correcte du fuseau est primordiale pour le bon déroulement de la mitose. En effet, il arrive parfois que des erreurs se produisent notamment dans l'attachement des chromosomes par les microtubules. Il existe plusieurs sortes d'erreurs d'attachement : (1) les attachements monotéliques, où seule une chromatide est attachée à un pôle du fuseau (2) les attachements syntéliques, où les deux chromatides sont attachés au même pôle, et (3) les attachements mérotéliques où une chromatide est attachée aux deux pôles du fuseau, (Fig. I-12).

Il est essentiel pour la cellule de détecter ces erreurs d'attachement. C'est le rôle d'un point de contrôle nommé "*spindle assembly checkpoint*" (SAC). En effet, le SAC va tester l'attachement des chromosomes en détectant la mise sous tension des kinétochores par les microtubules [Musacchio and Hardwick, 2002; Pesenti et al., 2016]. Sans tension, le SAC n'est pas satisfait et bloque le passage en anaphase. Par contre, une fois satisfait le SAC va activer une cascade biochimique, qui dégrade le complexe qui lie les deux chromatides sœurs ensemble, permettant le passage de la cellule en anaphase. Les attachements monotéliques et syntéliques vont induire un défaut de tension important qui sera détecté par le SAC. Au contraire, l'attachement mérotélique trompe le SAC, car il n'induit pas de différence de tension notable [Cimini et al., 2001; Thompson et al., 2010]. Courthéoux et al. ont montré que la correction des attachements mérotéliques, chez *S. pombe*, avait lieu une fois passé en anaphase grâce à l'action de forces mécaniques [Courthéoux et al.,

2009] . Cela n'a pas été démontré pour le moment chez *C. elegans* et une étude mécanique du fuseau en métaphase et en anaphase pourrait nous renseigner sur les mécanismes de correction des attachements mérotéliques chez *C. elegans*.

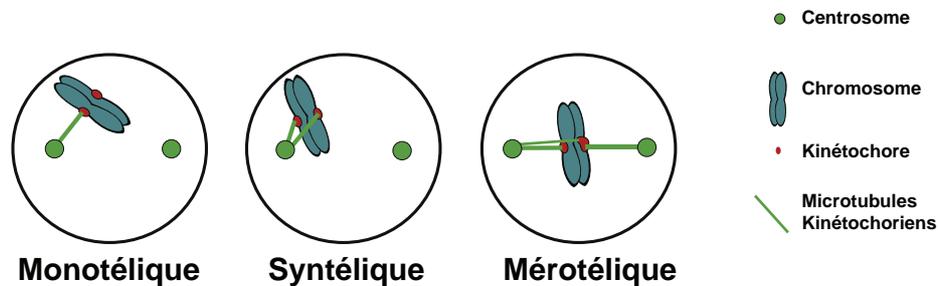


Figure I-12 – Principales erreurs d'attachement des chromosomes. (Adaptée de [Thompson et al., 2010])

Ainsi cela suggère un rôle centrale de la mécanique, à la fois pour générer les déplacements nécessaires à la mise en place du fuseau mais également pour la détection et la correction des erreurs d'attachement. Ces dernières peuvent, si elles ne sont pas corrigées, avoir un impact catastrophique sur les cellules filles.

1.3.4 État de l'art des études sur la mécanique du fuseau mitotique

Comme nous l'avons vu, le fuseau mitotique est complexe avec de multiples interactions entre ses composants. Les forces mécaniques s'appliquant au fuseau jouent un rôle central dans la réalisation de la division cellulaire. Une meilleure compréhension de leurs influences pourrait nous permettre une meilleure compréhension du fonctionnement du fuseau mitotique. Nous pouvons classer les études de la mécanique du fuseau en trois parties. En premier, les approches dites *in silico* qui permettent par des simulations numériques de tester des hypothèses de fonctionnements. Ensuite, les approches *in vitro* qui permettent souvent de réaliser plus simplement des manipulations mais qui parfois son loin des conditions physiologiques. Enfin les études *in vivo* qui ont l'avantage *a priori* de laisser le fuseau dans son contexte physiologique, mais qui sont plus complexes à mettre en place.

1.3.4.1 Approches *in silico* associées à des mesures expérimentales

Nous allons expliquer ce type d'approches par quelques exemples. Jonathan Ward et ses collaborateurs [Ward et al., 2014] en 2014, ont cherché à comprendre comment le fuseau

de *S. pombe*, durant l'anaphase B, pouvait s'allonger malgré les forces compressives en présence. Pour cela, ils ont reproduit le comportement du fuseau de la levure à fission à l'aide de l'outil de simulation *cytosim*, développé par François Nedelec [Francois and Dietrich, 2007]. Ils ont mis en évidence que la structure allongée du fuseau durant l'anaphase B est le système minimal permettant de créer les forces nécessaires à la séparation des chromatides soeur. Cette étude se limite à l'anaphase B où le fuseau s'allonge mais sa structure n'évolue pas durant cette phase.

Une autre approche *in silico* a permis d'explorer les différents mécanismes d'assemblage du fuseau en prenant en compte non seulement la vitesse d'assemblage mais aussi la précision de cet assemblage à savoir l'attachement correct des chromosomes avec un nombre très faible d'erreurs d'attachement de type monotélique, syntélique ou mérotélique [Paul et al., 2009]. Les auteurs ont montré que la croissance non-biaisée des MTs n'était pas suffisante: ils suggèrent une importance des mouvements des chromosomes et de leur rotation lors de leur première capture en complément d'une croissance des microtubules, qui est biaisée spatialement.

Ces deux exemples montrent la puissance des études *in silico*. Elles permettent de reproduire en modèle certains aspects du fonctionnement de fuseau. Cependant dans les deux cas, les auteurs ne prennent pas en compte l'évolution temporelle du fuseau. Wollman et ses collaborateurs, en 2008 ont développé une méthode d'ingénierie inverse pour comprendre le rôle de chacun des éléments du fuseau lors de son assemblage, en métaphase et anaphase [Wollman et al., 2008]. En se basant sur les caractéristiques des composants majeurs du fuseau obtenues par des études *in vitro*, ils ont cherché à reproduire le fonctionnement du fuseau. Ils ont alors simulé différents modèles d'interactions des composants du fuseau et les ont comparés aux observations expérimentales chez l'embryon de drosophile *in vivo* disponibles c'est à dire la longueur du fuseau au cours de la division sous différentes conditions. L'objectif était d'identifier les acteurs importants du fuseau et le modèle permettant de reproduire les observations expérimentales. Ils ont ainsi pris en compte six forces et leur régulation au cours des phases de la mitose nécessaires à la modélisation : les forces corticales en prométaphase ; les forces exercées par les chromosomes en prométaphase ; la même force en anaphase ; les forces générées par la polymérisation des microtubules kinétochoriens en prométaphase, en métaphase et enfin en anaphase. Les auteurs ont montré qu'à partir de six combinaisons de ces éléments, ils étaient capables de reproduire les observations expérimentales. Le fait de ne pas trouver une combinaison unique est cependant un problème pour comprendre réellement le fonctionnement du fuseau mitotique. La longueur seule du fuseau n'apparaît pas comme une donnée suffisante pour discriminer les différents modèles. Cela illustre le besoin d'aller plus loin que l'observation de la seule longueur du fuseau. Ainsi, pour pouvoir valider

cette approche et choisir une unique combinaison ou un modèle unique, nous avons besoin de résultats expérimentaux supplémentaires et quantitatifs. Cette source d'informations complémentaires peut être les fluctuations de longueur du fuseau en plus de la longueur au cours de la division.

1.3.4.2 Approches *in vitro*

En 2009, T. Itabashi et al. ont développé un outil de sondage basé sur un microscope à force atomique, afin d'appliquer des forces de l'ordre du nanoNewton pour perturber un fuseau méiotique, obtenu *in vitro* à partir d'extraits d'oeufs de xénope, et d'en mesurer ensuite la déformation. L'analyse de ces expériences a permis de lier la déformation observée du fuseau à sa mécanique. Ils ont montré que le fuseau adoptait un comportement de matériaux viscoélastiques pour de faibles compressions et un comportement plastique pour de fortes compressions, suggérant une capacité d'adaptation aux forces [Itabashi et al., 2009]. Cette étude a permis de mettre en évidence la capacité du fuseau à s'adapter aux forces et ouvre la voie à l'étude de la robustesse de la division.

En 2011, Shimamoto et al. ont étudié les propriétés viscoélastiques d'un fuseau en métaphase assemblé à partir d'extraits d'oeufs de xénopes [Shimamoto et al., 2011]. Ils ont utilisé une aiguille rigide pour appliquer une force contrôlée au fuseau mitotique et une aiguille souple dont la déformation leur a permis de mesurer les forces au sein du fuseau. Les résultats obtenus en réponse à une force mécanique appliquée le long du grand axe du fuseau ont suggéré une domination de la mécanique du fuseau par la viscosité c'est à dire l'absence de mécanisme de maintien de sa longueur. A l'opposé, l'application d'une force le long du petit axe du fuseau a conduit à un changement de forme du fuseau et une persistance de la force appliquée au fuseau : ils ont donc proposé la présence d'éléments élastiques agissant le long du petit axe. À l'aide de perturbations biochimiques, les auteurs ont pu montrer que ce sont les activités des moteurs moléculaires et des protéines de réticulation qui causaient le comportement visqueux de la réponse du fuseau aux perturbations. De même, en bloquant l'assemblage des microtubules, Shimamoto a pu mettre en évidence que les microtubules interdigités participaient au comportement visqueux et élastique du fuseau. Au final, ils ont modélisé la mécanique le long du grand axe par un amortisseur et celle le long du petit axe par un solide de type Zener¹ (Fig. I-14-C). Encore une fois cette mesure directe de la mécanique du fuseau était très intéressante mais perturbait fortement le fuseau. De plus l'utilisation d'extraits d'oeufs de xénope ne permettait pas l'observation du fuseau dans son environnement normal.

En 2013, Takagi et ses collègues ont appliqué une force d'étirement aux pôles d'un fuseau en métaphase à l'aide de micro-aiguilles calibrées [Takagi et al., 2013]. Ils ont

¹modèle comprenant un amortisseur et un ressort en série, plus un ressort en parallèle.

trouvé que la réponse mécanique à ces perturbations le long de l'axe long du fuseau pouvait être décrite à l'aide d'un modèle de type Zener, et ont pu mesurer les valeurs des paramètres du modèle. Ils ont trouvé des valeurs de raideur des ressorts égales à 0.4 nN/ μm et 5.2 nN/ μm , ainsi qu'un coefficient de friction égal à 41 nN.s/ μm . Cependant, comme pour les autres expériences de cette section, l'utilisation d'extraits d'oeufs de xénope couplée à de larges perturbations ne prenaient pas en compte les interactions de la cellule avec le fuseau.

En 2014, Brugués et Needleman ont utilisé, des mesures des fonctions de corrélation de l'orientation des microtubules, de leurs densités sur des fuseaux arrêtés en métaphase assemblés à partir d'extraits d'oeufs de xénopes [Brugues and Needleman, 2014]. Les auteurs ont développé à l'aide de leurs observations expérimentales une modélisation type gel actif du fuseau mitotique, c'est à dire une vision nouvelle du fuseau dont les microtubules reliés entre eux par les moteurs moléculaires et les agents de réticulation forment un gel capable de générer des forces par la consommation d'énergie. Ils proposent un modèle récapitulant les propriétés du fuseau par deux paramètres évoluant suivant les perturbations moléculaires, pouvant alors expliquer le fonctionnement du fuseau. Les auteurs résument ainsi la complexité moléculaire du fuseau, sa dynamique et sa structure par une description simple. Cette étude oriente aussi sur l'état hors-équilibre du fuseau.

Ces différentes études renforcent toutes les connaissances sur le fuseau mitotique. Cependant, la nature *in vitro* des fuseaux étudiés ne permet pas d'affirmer l'applicabilité des observations pour un fuseau dans son contexte physiologique. Il faut donc, en parallèle des études *in vitro* réaliser des travaux *in vivo*. En effet, le lien entre la possibilité de réaliser une fonction n'implique pas le fait qu'elle soit réellement utilisée *in vivo*.

1.3.4.3 Approches *in vivo*

La troisième catégorie d'approches pour appréhender le fonctionnement du fuseau mitotique sont des études menées *in vivo*. Ainsi Garzon-Coral et co-auteur utilisent des méthodes perturbatrices telles que les pinces magnétiques¹ [Garzon-Coral et al., 2016]. Ils ont montré qu'il existe au sein de l'embryon uni-cellulaire de *C. elegans* une extraordinaire machinerie génératrice de forces, qui maintient le fuseau au centre de la cellule, et que ces forces dépendent à la fois du nombre de microtubules, de leurs dynamiques et de la taille de la cellule. Ils ont par ailleurs modélisé le centrage par un modèle Kelvin Voigt dont ils ont mesuré les valeurs de raideurs de ressort et de coefficient visqueux qui sont respectivement 16 pN/ μm et 137 pN.s/ μm . Ces travaux proposent une approche *in vivo* qui permet d'étudier le positionnement du fuseau et des acteurs en jeu dans ce positionnement. En parallèle nous avons utilisé une méthode non-perturbative de traitement

¹Utiliser un champ magnétique pour manipuler des structures intra-cellulaire.

du signal basée sur de l'analyse d'images pour valider de manière non perturbative ces résultats et montrer à la fois leur pertinence physiologique et que le maintien au centre de la cellule du fuseau était également dépendant des propriétés mécaniques des microtubules astraux en croissance (i.e. n'interagissant pas avec les moteurs ancrés au cortex) [Pecreaux et al., 2016]. Sous l'action des forces de compression qui en découlent, les microtubules vont flamber¹, se courber générant alors une boucle de rétroaction rendant le centrage du fuseau mitotique plus précis.

Ces études *in vivo* permettent d'étudier le fuseau dans un contexte proche du physiologique. Elles prennent ainsi en compte les multiples interactions du fuseau avec son environnement. Ici, elles s'intéressent à la mécanique du positionnement du fuseau, pour le moment aucune méthode ne permet l'étude de la mécanique du fuseau *in vivo*.

1.3.4.4 Le fonctionnement du fuseau mitotique au centre des recherches en biologie, une vision en évolution

Auparavant les aspects biochimiques du fuseau donnait une vision de structure statique, c'est à dire que les composants une fois liés ne bougent plus. Toutefois, il apparait que les composants du fuseau sont dynamiques : les moteurs s'attachent et se détachent en permanence, les microtubules polymérisent et dépolymérisent continuellement, etc. Ainsi aujourd'hui, la vision de la mécanique du fuseau connaît le même type de transition. Depuis une vision où les forces en jeu s'équilibrent en permanence (quasi-statique) et donc un déplacement et une élongation quasi à l'équilibre [Wollman et al., 2008], émerge une vision d'un équilibre métastable, cinétique où les forces sont hors équilibres et où le fuseau est en lente évolution [Needleman et al., 2010; Bruges and Needleman, 2014; Prost et al., 2015].

1.4 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre toute la complexité du fuseau mitotique. Il est composé de nombreux moteurs, de microtubules et de régulateurs qui agissent les uns sur les autres et dont les caractéristiques dynamiques évoluent au cours de la division. C'est pourquoi la stratégie qui a été longtemps adoptée est d'expliquer les phases de la division séparément perdant alors l'aspect d'évolution au cours de la division. Ainsi, dans ce travail de thèse nous nous proposons de mettre au point une nouvelle méthode d'analyse du comportement mécanique du fuseau mitotique tout au long de la division en laissant le fuseau dans un contexte physiologique pour ouvrir la porte à de nouvelles approches de modélisation.

¹Fléchir sous l'action d'une force de compression

Chapitre 2

Les micro-mouvements analysés par les mathématiques et la physique : une mine d'informations pour la biologie

Dans le chapitre précédent, j'ai présenté les différentes stratégies expérimentales possibles afin d'étudier le fuseau mitotique. Nous souhaitons développer un outil d'analyse qui permette à la fois d'observer le fuseau dans son contexte physiologique, c'est-à-dire sans perturbation, mais aussi de ne pas nous limiter à une étude statique du fuseau, c'est-à-dire prendre en compte sa dynamique et son évolution au cours de la division. Nous avons précédemment mis au point une méthode permettant d'analyser le centrage du fuseau au cours de la métaphase de manière non perturbative [Pecreaux et al., 2016]. Cette méthode était basée sur l'analyse des fluctuations¹ de position du fuseau pour décrire la précision de son maintien au centre de la cellule à l'aide de traitement du signal. Nous souhaitons sur cette base perfectionner la méthode pour une mesure de l'évolution mécanique au cours du temps. En effet, les fluctuations sont une source d'informations importantes, plus complète que l'analyse de la longueur du fuseau seule. Ce n'est pas la première utilisation des fluctuations pour révéler la mécanique d'un système. Je voudrais donc ici proposer un rapide tour d'horizon de ces travaux motivant l'intérêt pour les fluctuations.

2.1 Les fluctuations, une source d'informations précieuses

Quelques exemples industriels: les fluctuations en réponse à une stimulation renseignent sur la structure L'analyse précise des vibrations générées par une machine-outil permet de détecter préventivement des pannes potentielles. Ainsi, tout changement de la fréquence ou d'autres caractéristiques des vibrations indiquent une

¹L'étude des vibrations du centre de fuseau mitotique

détérioration au sein de la machine. Cela permet assez simplement et à moindre coût de prévenir des dommages sévères en anticipant les problèmes. Cela se nomme la "maintenance conditionnelle".

Dans la construction immobilière, les études des vibrations permettent de détecter les fréquences propres d'un bâtiment ou d'une structure et de les modifier en fonction des risques géophysiques. Une stimulation à la fréquence propre entraînerait des dégâts très importants. Cela permet ainsi d'éviter les catastrophes, telles que celle du pont de Tacoma aux États-Unis en 1940, qui, à cause de fortes rafales de vent, est entré en résonance¹, s'est mis à osciller très fortement et s'est finalement effondré. Des récits rapportent que la marche synchronisée d'un détachement de l'armée aurait entraîné l'effondrement d'un pont à cause des vibrations causées. L'étude des vibrations est ainsi cruciale pour le monde industriel, soit pour suivre l'usure et donc de prévenir des dégâts plus importants, soit pour anticiper les problèmes de résonance des bâtiments et donc diminuer les risques pour les populations.

Ces premiers exemples montrent l'importance de l'étude des vibrations dans le domaine industriel pour anticiper les pannes ou les problèmes. Chez les organismes vivants, les vibrations sont aussi utilisées par des organes dédiés à leur perception.

Les organismes vivants perçoivent les vibrations via le toucher et l'audition : l'étude des fluctuations dans ces systèmes nous renseignent sur leur fonctionnement L'audition et l'équilibre sont basés sur la capacité des cellules ciliées de l'oreille interne à détecter de minuscules stimuli mécaniques. Dans son étude sur l'oreille interne, Martin et ses collaborateurs ont ainsi caractérisé les propriétés mécaniques des cils par l'observation de leurs oscillations en fonction des forces appliquées [Martin et al., 2000]. Ils ont ainsi pu montrer que les cils présentaient une raideur négative dans une gamme de fréquence au coeur de leurs régions mécano-sensibles qui jouait un rôle dans l'amplification des stimuli mécaniques de l'oreille. L'audition repose sur l'amplification non linéaire du stimulus pour améliorer sa sensibilité et sa sélectivité. En 2004, Nadrowski et al. ont étudié l'instabilité oscillatoire des cils [Nadrowski et al., 2004]. Ils ont montré par une modélisation que les fluctuations actives² des cils étaient dominées par les oscillations dues au mouvement Brownien des molécules du fluide. Ils ont également observé que les fluctuations des cils restreignaient la sensibilité à l'intervalle d'amplitudes des stimuli, pour lesquels la réponse du cils était optimale. Les auteurs ont mis en évidence que les fluctuations permettaient aux cils de fonctionner à proximité d'un optimum de mécano-sensibilité.

¹Oscillation d'un système à une fréquence particulière qui entraîne la détérioration

²Volontaires

Au delà des systèmes sensoriels, les fluctuations comme outil d'investigation
En mécanique intracellulaire, un objet central d'étude est le cytosquelette. Il permet de maintenir la forme de la cellule en supportant de nombreuses forces internes et externes. Les filaments, qui le composent, ont donc souvent été étudiés et notamment avec la volonté de mesurer leur paramètre de rigidité. Dès 1993, Gittes et al., par l'analyse des fluctuations de la forme des filaments *in vitro*, ont pu mesurer le module de Young¹ de l'actine [Gittes et al., 1993]. Cette étude a permis de montrer que, pour les microtubules, ce module était proche de celui d'un plastique rigide et donc que la flexibilité des cellules était due au glissement des filaments les uns par rapport aux autres, plutôt qu'aux propriétés d'étirement des filaments.

Récemment, les oscillations de flexions des microtubules ont de nouveau été utilisées pour étudier leurs propriétés mécaniques *in vitro*. En 2015, Schaedel et al. ont soumis les microtubules à un flux hydrodynamique oscillant [Schaedel et al., 2015]. Les auteurs ont par ce mécanisme montré que au fur et à mesure de l'expérience, la courbure des microtubules augmentait et la rigidité diminuait cycle après cycle. Ils ont pu démontrer que cet assouplissement des microtubules provenait des défauts de structure préexistants. De plus, ils ont montré que les microtubules assouplis étaient capables de s'auto-réparer pour retrouver leur rigidité initiale. Dans cette étude, les oscillations furent utilisées non seulement comme source d'informations mécaniques mais aussi comme outil expérimental afin de fatiguer le filament.

En dehors des filaments du cytosquelette, les études sur les membranes ont également profité de l'analyse des fluctuations. Par exemple, Pécéréaux et al. ont analysé les fluctuations de la membrane de vésicules géantes. Pour cela, ils ont mis au point une méthode permettant une mesure directe non-invasive des spectres de fluctuations basée sur une analyse des contours raffinée. Cette méthode permet alors l'analyse des propriétés mécaniques telles que leur rigidité de courbure.

Enfin, les fluctuations sont aussi utilisées pour la calibration des pinces optiques : un outil de manipulation à force contrôlée d'objet biologique dans la cellule [Berg-Sorensen et al., 2006]. Par l'étude des spectres de fluctuations il est possible de calibrer la force en fonction des paramètres de contrôle de l'appareil.

Conclusion: Utiliser les fluctuations *in vivo*, opportunités et défis Les fluctuations apparaissent donc comme une source d'information importante sur la mécanique subcellulaire. Elles permettront par exemple d'aller plus loin que les études basées sur la longueur moyenne du fuseau [Wollman et al., 2008]. De par la nature de l'observation des fluctuations basées sur de la vidéo-microscopie, elles offrent l'opportunité d'être bien

¹Module d'élasticité d'un matériaux élastique isotrope qui relie la contrainte et sa déformation

moins perturbatrices pour les systèmes étudiés. Elles semblent alors bien adaptées pour des études de mécanique *in vivo*. C'est d'ailleurs ce que nous avons réalisé lors de l'analyse du centrage du fuseau mitotique en métaphase chez l'embryon de *C. elegans* [Pecreaux et al., 2016] (cf. section 1.3.4.3). Le défi était alors d'obtenir des précisions spatiale et temporelle adéquates pour l'observation des fluctuations, c'est à dire imager avec un fort taux d'acquisition et une précision spatiale élevée. De plus, il fallait ensuite utiliser les bons outils d'analyse du signal adaptés au problème que nous souhaitons étudier. Avant de détailler notre approche au chapitre suivant, je vais dans la section suivante résumer les principales méthodes offertes par l'analyse du signal.

2.2 Comment extraire les informations contenues dans les fluctuations ?

Les fluctuations sont un signal temporel ; il est alors naturel pour les analyser d'utiliser les outils développés pour l'analyse du signal en particulier l'analyse spectrale.

2.2.1 L'analyse spectrale est un outil puissant du traitement du signal

Il est souvent difficile d'interpréter de façon simple des signaux temporels décrivant les phénomènes physiques. L'analyse spectrale permet alors l'étude des signaux par une représentation différente et le filtrage de la partie stochastique d'un signal souvent assimilée à du bruit. Elle permet notamment d'estimer la distribution énergétique d'un signal temporel aux différentes fréquences de vibration.

Ainsi, en économie ou en météorologie, l'analyse spectrale permet de mettre en évidence de possibles périodicités indétectables sur le signal brut. Elle enrichit ainsi la compréhension de certains phénomènes de bourse ou climatologiques. En géophysique, l'analyse spectrale permet d'accéder à des informations précieuses sur les mouvements de terrain associés aux tremblements de terre et ainsi aide à les prédire [Buttkus, 2000]. En prospection minière par exemple, l'observation de la réponse du terrain à une explosion, par l'analyse spectrale, permet de détecter les différentes strates souterraines, leurs profondeurs et leurs natures (par exemple la présence ou non de pétrole). En acoustique, l'analyse spectrale est couramment utilisée pour étudier les sons et les voix en déchiffrant les différentes fréquences présentes dans le signal sonore. Nous voyons donc que de nombreux champs disciplinaires utilisent ce domaine du traitement du signal. Cela conduit à un développement important des outils et des méthodes associés. Limitée aux signaux

stationnaires¹ et basée sur la transformée de Fourier dans le cadre d'estimation de spectres non paramétriques, c'est à dire sans a priori sur le signal étudié [Kay, 1988; Fourier, 1822]. Cette analyse spectrale a connu une évolution avec l'apparition de modélisations paramétriques, c'est à dire où l'estimation du spectre repose sur un modèle et donc une connaissance a priori du processus. Enfin, ces techniques se sont adaptées à l'étude de signaux non stationnaires, avec l'apparition des méthodes temps-fréquence où les spectres de fluctuations dépendent du temps. Elles permettent ainsi de décrire un processus qui évolue au cours du temps.

2.2.2 Les outils mathématiques pour l'analyse de fluctuations

Dans cette section sont résumées les principales méthodes mises au point en analyse spectrale pour analyser un signal temporel.

La transformée de Fourier : La première méthode, qui a ouvert le champ de l'analyse spectrale est la transformée de Fourier. Les bases du formalisme de décomposition en série de Fourier ont été posées par Jean Baptiste Joseph Fourier dans son ouvrage "Théorie analytique de la Chaleur" publié en 1822 [Fourier, 1822]. Il a alors conçu l'analyse de la propagation de la chaleur comme une superposition de phénomènes périodiques simples. Dans cet ouvrage, il est le premier à avoir proposé la possibilité de décomposer le signal temporel en séries dites de Fourier, composées des fonctions trigonométriques représentant chaque fréquence, de façon à établir le spectre en fréquence du signal. C'est l'acte fondateur de l'analyse spectrale. Jean Baptiste Joseph Fourier a d'ailleurs très vite compris que sa méthode de décomposition ne se limitait pas à l'analyse de la propagation de la chaleur, mais pouvait s'adapter à d'autres signaux stationnaires ouvrant ainsi de larges champs d'applications à cet outil. Le succès de l'analyse de Fourier réside également dans le développement d'un algorithme puissant capable de calculer la valeur de la transformée de Fourier exacte très rapidement. Cet algorithme est la transformée de Fourier rapide développée par Cooley-Tukey en 1965 [Cooley and Tukey, 1965] et qui depuis a été améliorée pour être encore plus rapide et utilisable dans de nombreux contextes.

La transformée de Fourier aux temps courts : La transformée de Fourier comportait quelques limitations ; les signaux à analyser devaient notamment être stationnaires. Ainsi, pour des signaux non stationnaires, en 1946, Dennis Gabor a montré le besoin d'une nouvelle méthode permettant d'analyser ce type de signaux comme le sont la plupart des signaux temporels [Gabor, 1946]. Le problème s'est d'abord posé dans le domaine de la

¹Pas de variations dépendant du temps

communication et de la transmission de signaux audio. Jusqu'aux années 1946, l'accent était mis sur la reproduction quasi à l'identique du signal audio initial, bien que cela soit très coûteux et certainement pas nécessaire au vu des capacités auditives de l'être humain. Ainsi, dans son article, Dennis Gabor imagina un moyen de compresser les signaux audio pour les transmettre de manière plus économe tout en préservant une qualité suffisante pour que la différence avec le signal initial ne soit pas perceptible à l'oreille. Pour ce faire il suggéra de transmettre le signal sous sa forme fréquentielle et de le reconstruire pour l'écouter, avec l'idée novatrice qu'il n'avait pas à être intelligible entre temps. Et comme le signal audio est non-stationnaire, il imagina un formalisme permettant de garder la dépendance en temps du signal. Ainsi il proposa dès lors le principe d'apodisation (de fenêtrage) et de la transformée de Fourier aux temps courts. Dans ce formalisme, le signal est analysé par blocs temporels, dans lesquels le signal peut être considéré comme stationnaire. Ce procédé eut un retentissement majeur dans le domaine du traitement du signal.

La transformée en ondelettes : La transformée de Fourier à court terme permettait la représentation temps-fréquences d'un signal donné. Cependant, pour la description des signaux non stationnaires avec des changements abrupts et rapides, la transformée de Fourier nécessite un très grand nombre de coefficients. Cela est limitant pour l'analyse et la compréhension des résultats. Pour répondre à cette problématique, Jean Morlet, en 1984, a développé la décomposition en ondelettes. Celui-ci, ingénieur géologue travaillant chez Elf, prospectait du pétrole en utilisant des ondes sonores, qui traversaient et se reflétaient sur les différentes strates de la couche terrestre ; l'analyse des signaux récupérés le renseignait sur la composition du sous-sol. Pour ces analyses, il utilisait la transformée de Fourier. Cependant, les signaux sismiques contiennent de nombreux changements abrupts relatifs aux différentes strates et qui étaient très mal gérés par la transformée de Fourier. À partir de là, Jean Morlet imagina une méthode d'analyse des signaux sismiques, où il ne perdrait pas cette dépendance en espace. Il finalisa le formalisme grâce à sa collaboration avec Alex Grossmann [Grossmann and Morlet, 1984]. Cette méthode est aujourd'hui très utilisée en traitement du signal ainsi que des images : le standard JPEG-2000, en est un exemple.

Ces trois méthodes constituent les principaux outils disponibles pour l'analyse spectrale. Elles répondent à chaque fois à une problématique particulière.

Approche paramétrique : l'analyse spectrale s'est également développée avec l'arrivée d'une nouvelle approche dite paramétrique. Elle consiste à faire l'hypothèse que le signal suit un modèle donné et à estimer les paramètres de ce modèle. Cela implique toutefois une connaissance a priori du signal. En contrepartie, elle permet alors d'extraire plus

d'informations d'un signal par la connaissance apportée par le modèle. Par exemple, en imagerie médicale, l'analyse spectrale paramétrique permet de récupérer les valeurs des paramètres importants des images et d'accéder rapidement aux informations utiles pour différencier les tissus. Pour notre étude, nous avons adopté ce type de raisonnement. Ainsi, le choix du modèle est une étape très importante de notre approche.

2.2.3 Récapituler notre compréhension dans une approche réductionniste : la modélisation

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'analyse spectrale permet d'analyser des signaux temporels. Cependant, pour notre méthode, l'analyse seule des fluctuations de longueur du fuseau ne permettrait pas une compréhension simple du fonctionnement mécanique du fuseau mitotique.

Modéliser, pour quoi faire ? La modélisation consiste à proposer une représentation simplifiée d'un processus. Le modèle se focalise uniquement sur les phénomènes dominants (approche réductionniste). Le modèle peut alors être un objet : par exemple, les maquettes en modèle réduit permettent de reproduire en laboratoire les mouvements terrestres pour en analyser les caractéristiques [Daubree, 1879] . En biologie moléculaire, la modélisation permet de comprendre les différentes voies de régulation des protéines sous forme de schémas. Enfin, un modèle peut être sous forme d'équations, on parle alors de modélisation mathématique.

Pour schématiser, la modélisation peut avoir trois objectifs :

- Récapituler les données
- Prédire (simuler)
- Expliquer, mettre en lumière les causes premières

L'intérêt de faire une modélisation pour notre analyse des fluctuations de longueur du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire est ainsi de réunir les résultats sous une forme simple, compréhensible, intuitive et interprétable, où le minimum de paramètres apparaissent. La figure I-13 illustre le raisonnement scientifique pour la modélisation de processus biologiques. La modélisation se fait alors en parallèle d'une approche expérimentale *in vivo* ou *in vitro*. Le modèle apporte une vision quantitative du processus via l'estimation des différents paramètres et propriétés du système.

Modéliser, à quel niveau de détail Dans le cadre de la modélisation, il existe deux approches. L'approche ascendante ou *bottom up*, qui part du détail le plus fin, du "bas",

et remonte vers le niveau le moins détaillé, pour opérer une synthèse. À l'inverse, on parle d'approche descendante ou *top down*, qui part de l'ensemble pour le décomposer en plusieurs descriptions de plus en plus détaillées afin de déboucher vers une modélisation totale du processus étudié. Nous avons, durant ce travail de thèse, adopté une approche *bottom up* afin de modéliser le fuseau mitotique.

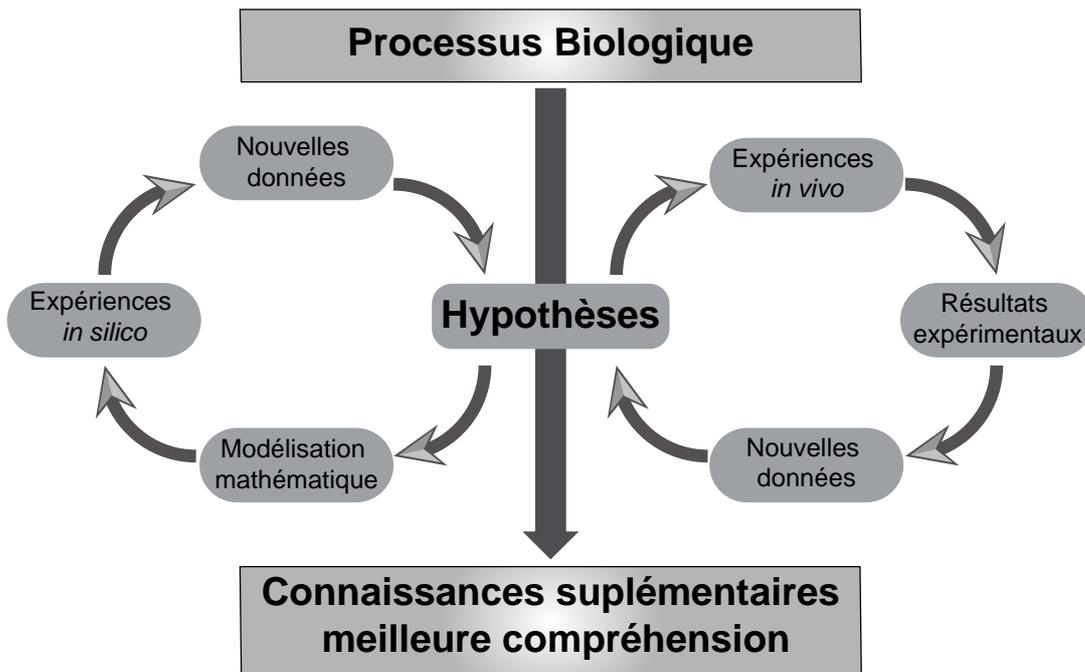


Figure I-13 – Approche d'études en biologie en utilisant la modélisation mathématique. (Adaptée de [Woelke et al., 2010])

En modélisation, nous distinguons trois types de modèles, qui varient dans leurs proportions de complexité *versus* niveau de détails.

Modèle heuristique ou empirique: approche inductive Lors de la modélisation heuristique ou empirique, ce sont les données qui suggèrent le modèle. Ces modèles ne postulent aucune connaissance a priori du système. Ils sont également appelés *modèle boîte noire* car ils ne prennent en compte que l'entrée et la sortie du système et place une boîte noire entre elles. Ces modèles sont principalement descriptifs. Ce type de modélisation ne s'intéresse qu'aux interactions du système avec l'extérieur sans prendre en compte son fonctionnement interne. L'utilisation des modèles type boîte noire est cependant limitée, car leur portée explicative est réduite.

Modèles de connaissance : approche hypothético-déductive La seconde classe de modèle sont les modèles dits de connaissance. Ces modèles sont construits à partir d'une

analyse physique, chimique ou biologique. Ils reposent sur les principes et lois régissant le champ disciplinaire ; par exemple les lois de la mécanique et de la physique statistique, pour notre étude. Un exemple de ce type de modèles est le modèle présent dans l'étude de Pécrciaux et ses co-auteurs de 2006 [Pecreaux et al., 2006]. Dans cette article le modèle est basé sur les lois de la physique statistique pour comprendre le phénomène créant les oscillations des centrosomes au cours de l'anaphase.

Modélisation à gros-grains : récapituler les détails ... La modélisation gros-grains se situe à un niveau de détail intermédiaire [Kubo et al., 2012]. Ces modèles permettent de réaliser des changements d'échelle ou de regrouper des éléments au sein d'un super élément, qui sera la synthèse des comportements des éléments individuels. Un exemple en biologie structurale est la modélisation d'un filament d'actine. L'utilisation d'un modèle gros-grains a réduit la description d'un filament composé de multiples atomes à un filament composé de gros-grains sans modéliser individuellement le comportement de chaque atome. La modélisation gros-grains est par ailleurs très utile lors des simulations souvent couteuses en calcul. En effet, elle réduit la complexité et donc réduit le nombre de calcul à effectuer. Elle est largement utilisée pour étudier les systèmes vivants.

La modélisation de connaissances à gros-grains permet d'approcher les systèmes vivants et leur complexité En biologie, au sein de systèmes vivants très complexes, il y a souvent de nombreuses fonctions redondantes. La modélisation de connaissances à gros-grains réduit le nombre de composants à modéliser en les regroupant en fonction de leurs rôles. Cela diminue la complexité pour arriver à déchiffrer les principes à l'oeuvre.

Ces modèles gros-grains sont les plus utilisés, car ils permettent une meilleure compréhension des résultats de par la simplification des systèmes vivants réduits aux fonctions importantes.

2.2.4 Les paramètres et modèles classiques en modélisation mécanique

Pour terminer cette partie d'introduction, notre étude faisant une modélisation mécanique du fuseau mitotique, il me paraît important d'illustrer les paramètres classiquement utilisés pour modéliser des systèmes mécaniques.

2.2.4.1 Les acteurs classiques

En modélisation mécanique, les trois éléments mécaniques principaux sont :

- **Ressort**, qui va résister au mouvement ou à la déformation. Il va maintenir la position et la force qu'il développe est proportionnelle au déplacement. Le coefficient de proportionnalité est appelé K la raideur.
- **Amortisseur**, qui va également s'opposer au mouvement, dont la force développée est proportionnelle à la vitesse du déplacement. Le coefficient de proportionnalité est appelé G le coefficient de viscosité.
- **Élément inertiel**, souvent dû à une masse. Il va s'opposer aux changements de direction ou de vitesse. Sa force est alors proportionnelle à l'accélération. Le coefficient de proportionnalité I est appelé inertie.

2.2.4.2 Quelques modèles rhéologiques classiques

Ils sont utilisés pour décrire le comportement mécanique d'un fluide, c'est-à-dire pour comprendre la réponse à une sollicitation mécanique.

Le modèle de Maxwell Le modèle de Maxwell est le modèle le plus simple du liquide viscoélastique¹. Il est composé d'un ressort en série avec un amortisseur (Fig. I-14-a).

Lorsqu'il est étiré, le ressort va subir l'allongement avant de dissiper l'énergie, qu'il stocke dans l'amortisseur, qui s'allongera alors. Ainsi, les contraintes relaxent et le système perd la mémoire de sa situation initiale.

Le modèle de Kelvin-Voigt Le modèle de Kelvin-Voigt est composé d'un ressort en parallèle avec un amortisseur (Fig. I-14-b).

Ce modèle se comporte comme un amortisseur aux temps courts, et comme un ressort aux temps longs.

Le modèle de Zener Le modèle de Zener est composé d'un ressort en parallèle avec un modèle de Maxwell (Fig. I-14-c).

Il peut prédire à la fois le fluage² et la relaxation de contrainte. Il fut utilisé lors de la modélisation du fuseau mitotique.

¹Comportement intermédiaire entre celui d'un solide élastique et d'un liquide visqueux

²Phénomène physique qui provoque la déformation irréversible différée d'un matériau soumis à une déformation constante.

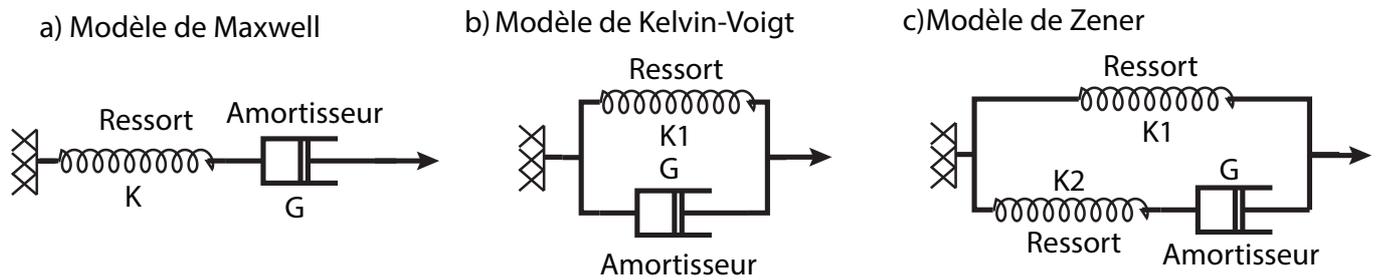


Figure I-14 – Trois modèles mécaniques classiques

2.3 Conclusion

Nous avons pu voir, dans ce chapitre, l'intérêt des fluctuations dans l'analyse de systèmes biologiques. Leur étude par l'analyse spectrale permet de tirer de nombreuses informations sur la mécanique des différentes structures. Baser notre étude sur les fluctuations nous permettra d'adopter une approche non perturbative. Nous avons également vu que l'analyse spectrale offre plusieurs possibilités pour analyser ces fluctuations sans perdre les dépendances temporelles. De plus, leur modélisation permettra une meilleure compréhension des résultats. Nous allons dans le chapitre suivant décrire la méthode, que nous avons développée.

Partie II

Méthode d'analyse des fluctuations de la longueur du fuseau et modélisation de sa mécanique au cours de la mitose

Motivation générale

Le fuseau mitotique est une structure très dynamique durant la division cellulaire. En effet, non seulement sa longueur augmente tout au long de la mitose, mais elle fluctue aussi autour de cette tendance aux temps courts avec de petites amplitudes. Ces fluctuations nous renseignent sur la mécanique du fuseau. En effet, pour analyser la mécanique du fuseau nous pouvons analyser la réponse du fuseau aux perturbations en utilisant sa longueur comme observable. Une analogie consiste à imaginer deux cyclistes qui roulent à la même vitesse sur deux terrains différents : l'un sur du sable et l'autre sur du bitume. Notre but est de déterminer la nature du terrain en observant seulement les trajectoires des vélos. S'ils avancent à la même vitesse selon une trajectoire rectiligne, nous ne pouvons pas distinguer la nature de chaque sol. Par contre, si nous imaginons que les cyclistes perturbent leurs progressions et roulent en faisant osciller rapidement le guidon comme pour rouler en zigzag (les perturbations), les trajectoires (les mesures) des deux vélos permettront de déterminer la nature du sol. Sur le bitume, le cycliste aura une trajectoire oscillante de faible amplitude et une grande fréquence, alors qu'à l'inverse sur le sable la trajectoire sera de plus grande amplitude et de plus faible fréquence (Fig. II-1). Les perturbations auront donc permis de déterminer la nature du sol. De même, en analysant précisément la réponse du fuseau à une perturbation, nous pouvons en apprendre plus sur sa mécanique. Dans notre analogie du vélo, la perturbation était externe. Toutefois, dans cette étude, nous avons recherché un moyen alternatif de perturbations, afin de rester le plus proche possible d'une situation physiologique.

Les perturbations peuvent être externes ou internes. Les premières sont créées par l'application d'une force par un dispositif additionnel, tel un microcapillaire dans l'exemple des travaux de Takagi et ses coauteurs [Takagi et al., 2013]. Cette approche a permis d'analyser la réponse du fuseau lorsqu'il est soumis à de grandes forces ou à d'importantes déformations. De là, Takagi a modélisé la mécanique du fuseau par l'analyse de sa relaxation. Cette approche est très pertinente pour comprendre comment le fuseau répond aux grandes perturbations. La modélisation via cette approche reste toutefois dans un contexte non physiologique. À l'inverse, nous souhaitons développer une méthode non invasive, qui laisse le fuseau dans une situation physiologique. Cette volonté implique de ne



Figure II-1 – Analyse des fluctuations, analogie avec la trajectoire d'un vélo. À gauche, la trajectoire du vélo après perturbations (zig-zag avec le guidon) sur le bitume, et à droite sur le sable. Les fréquences et les amplitudes des trajectoires, c'est-à-dire les réponses aux perturbations du système vélo-sol, permettent d'identifier la nature du sol.

pas créer des perturbations sur le fuseau mitotique par une action externe à la cellule. Pour cela, nous pouvons remarquer que la longueur du fuseau fluctue autour d'une longueur moyenne. Ces fluctuations de longueur sont dues à l'action des moteurs moléculaires sur les microtubules du fuseau et les microtubules astraux. Au-delà du déplacement net induit, l'alternance permanente entre l'attachement et le détachement des moteurs conduit à de petites variations de longueur du fuseau, les fluctuations. Ces attachements et détachements stochastiques peuvent être vus comme une perturbation interne du fuseau. Les fluctuations de longueur, qui en résultent, sont une source d'informations sur les propriétés mécaniques du fuseau. Nous avons développé un outil capable d'analyser les fluctuations de longueur du fuseau mitotique dues à la stochasticité des moteurs moléculaires et à la dynamique des microtubules eux-mêmes. Cet outil est non invasif et permet de caractériser précisément la mécanique du fuseau mitotique durant la division cellulaire. Je vais maintenant décrire cet outil avec comme premier chapitre l'analyse des fluctuations de longueur du fuseau par l'analyse de Fourier, puis la méthode permettant d'obtenir les valeurs des paramètres mécaniques du fuseau mitotique par une approche de modélisation.

Chapitre 3

Analyse des fluctuations par les transformées de Fourier

Un objectif majeur de ma thèse consistait à concevoir une méthode permettant de caractériser l'état mécanique du fuseau mitotique au cours de la mitose et de récapituler cette connaissance par un modèle. De plus, nous souhaitions que la méthode permette une étude du fuseau dans ses aspects dynamiques et adaptatifs au-delà donc de son comportement moyen. Cela implique de considérer la lente évolution du fuseau au cours des phases de la mitose. Enfin, nous souhaitions réaliser une étude *in vivo*, nous imposant par là même des contraintes expérimentales. Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes de l'introduction 1.3, des travaux ont permis de modéliser la micromécanique du fuseau mitotique à l'aide de protocoles expérimentaux *in vitro* [Takagi et al., 2013; Itabashi et al., 2009; Shimamoto et al., 2011]. Ces travaux étaient également des approches très perturbatives. Ils ont néanmoins permis de mettre en évidence un comportement dynamique du fuseau avec toutes les limites dues à l'utilisation de ce type de méthodes.

Ainsi, pour comprendre le fuseau *in-vivo* dans des conditions physiologiques, et tirer avantage de ces travaux, nous avons opté pour l'utilisation et le décryptage des fluctuations de la longueur du fuseau, afin de réaliser une étude *in vivo* dans des conditions les plus physiologiques possible. La caractérisation des fluctuations est possible principalement via les fonctions d'auto-corrélation et les déplacements quadratiques moyens d'une part et d'autre part l'analyse de Fourier. Cette deuxième possibilité, prenant en compte l'évolution du fuseau par l'utilisation des transformées de Fourier aux temps courts, nous est apparue plus appropriée pour permettre une modélisation des résultats en lien avec notre connaissance de la structure et du fonctionnement du fuseau mitotique.

Dans ce chapitre sur la méthode que nous avons développée, je débiterai en exposant la voie, que nous avons utilisée pour l'acquisition des données expérimentales. À partir de là, j'illustrerai et argumenterai les choix des outils de traitement du signal pour l'analyse

des fluctuations afin de bien prendre en compte l'aspect dynamique du fuseau tout au long de la division. Enfin, j'exposerai l'étape de modélisation que nous avons faite pour récapituler les résultats.

3.1 Mesure de la longueur à haute résolution

Approche Notre but était de construire une approche *bottom-up* permettant de rendre compte de l'émergence des caractéristiques mécaniques du fuseau à partir de ses composants. Cependant, ceci est rendu compliqué car le fuseau est composé d'un grand nombre d'acteurs, tels les microtubules dynamiques (qui polymérisent et dépolymérisent en permanence), et les moteurs moléculaires capables de s'attacher et de se détacher des microtubules avec des caractéristiques particulières. De plus celles-ci changent en fonction des interactions avec les autres composants. Cette structure complexe de fuseau mitotique fait que nous ne pouvons pas déterminer son comportement général par la simple superposition des comportements de chacun des acteurs moléculaires qui le composent. La seule étude des composants individuels n'est donc pas suffisante. Elle doit être complétée par l'observation du comportement du système dans son ensemble pour prendre en compte les effets collectifs issus d'interactions biochimiques et mécaniques. Ainsi, nous étudierons le couplage mécanique entre les deux pôles du fuseau, c'est à dire comment les mouvements de l'un influent les mouvements de l'autre, à partir d'expériences *in vivo*. Dans un premier temps, nous nous satisferons d'un modèle heuristique, sans décrire précisément la structure et le fonctionnement du fuseau à l'échelle moléculaire. La caractérisation de la mécanique du fuseau se basera sur sa longueur, la distance entre les deux pôles, aisément accessible expérimentalement moyennant le suivi des pôles du fuseau via un marquage approprié en microscopie de fluorescence. Comme discuté dans l'introduction (cf section 1.3.4.1), l'évolution lente de la longueur du fuseau n'est pas suffisante pour contraindre les modélisations et permettre une compréhension de l'émergence des propriétés du fuseau [Wollman et al., 2008]. Nous allons rechercher au contraire les variations rapides de sa longueur, les fluctuations, afin d'en obtenir une signature de la mécanique.

Implémentation Quelles résolutions spatiale et temporelle devons-nous atteindre pour capturer correctement la dynamique du fuseau mitotique ? La processivité des moteurs moléculaires du cortex, c'est-à-dire leur persistance à générer une force avant de se détacher reste peu connue, toutefois nous pouvons supposer que ces valeurs seront proches des temps de résidence observés au cortex, i.e. ~ 1 s pour les microtubules [Kozlowski et al., 2007] et ~ 0.5 s pour le moteur moléculaire dynéine [Rodriguez-Garcia et al., prep; Pecreaux et al., 2006]. Une résolution temporelle au-dessus de la dizaine de Hertz

paraissait donc suffisante. Nous souhaitions pouvoir appréhender la dynamique rapide des composants, tout en restant dans une approche à "gros grains" [Kubo et al., 2012] permettant une modélisation facilitée se rapprochant de celle d'un mouvement brownien. Les moteurs moléculaires se déplacent au plus rapide à une vitesse de $2 \mu\text{m/s}$ [Howard, 2001], effectuant typiquement 250 pas de 8 nm par seconde, tandis que les microtubules astraux polymérisent durant la métaphase à $0.63 \pm 0.02 \mu\text{m/s}$ et dépolymérisent à $0.84 \pm 0.18 \mu\text{m/s}$ [Kozlowski et al., 2007; Kerssemakers et al., 2006]. Ainsi une fréquence d'une dizaine de Hertz tout au plus apparaissait appropriée pour se placer dans l'hypothèse d'une modélisation à gros grains. En pratique, l'acquisition des images est réalisée par une caméra EMCCD permettant une acquisition à 33 Hz. Toutefois, l'analyse proprement dite ne considère que des fréquences jusqu'à 1 Hz à cause de la limite en résolution spatiale, que je vais expliquer ci-dessous.

Du point de vue de la résolution spatiale, nous pouvons estimer l'ordre de grandeur de l'écart type attendu (la racine carrée de la variance σ_l^2) sur la longueur du fuseau via un modèle simple à deux états (moteur attaché / moteur détaché), où les générateurs de force sont indépendants [Grill et al., 2003]. Nous obtenons $\sigma_l^2 = l_0^2 / Np(1-p)$ [Howard, 2006; Pecreaux et al., 2016] avec l_0 la longueur du fuseau, qui varie de 12 à 25 μm au cours de la mitose du zygote de *C. elegans* et p leur probabilité d'attachement estimée entre 10 et 90 %. Avec $N = 100 - 10000$ une estimation du nombre de moteurs moléculaires en action, nous obtenons un écart type entre 400 et 4000 nm, donc accessible avec notre algorithme de tracking des centrosomes [Pecreaux et al., 2006; Pecreaux et al., 2016]. Utilisant l'approche développée dans ce dernier travail, à savoir l'étude du positionnement précis du fuseau mitotique au cours de la phase de maintenance, nous avons effectué une mesure préliminaire de la variance moyenne pendant ~ 130 s en métaphase et obtenu $\sigma_l^2 = 110.1 \pm 10.8 \cdot 10^3 \text{ nm}^2$. Ainsi, la résolution du tracking disponible dans l'équipe, qui est de 10 nm sur la position des pôles du fuseau [Pecreaux et al., 2016] et donc typiquement 20 nm sur sa longueur, apparaissait suffisante.

Pour laisser le fuseau dans des conditions les plus physiologiques possible, nous avons acquis les images des embryons de *C. elegans* où les pôles du fuseau, les centrosomes, étaient marqués par des protéines fluorescentes. Pour ce faire, nous avons utilisé deux lignées, qui expriment chacune un marqueur des centrosomes : une première avec le transgène *gfp::tbg-1* sous le contrôle du promoteur *pie-1*, qui permet une expression forte dans le zygote de la γ -tubuline, et une seconde avec le transgène *spd-2::gfp*, sous contrôle de son propre promoteur, qui permet l'expression de SPD-2, une protéine impliquée dans la duplication et la maturation des centrosomes. Une imagerie avec une très faible excitation, tirant avantage de la grande sensibilité de la caméra EMCCD, nous a permis d'éviter le photoblanchiment et les photodommages. Ce dernier point fut facilement vérifiable car

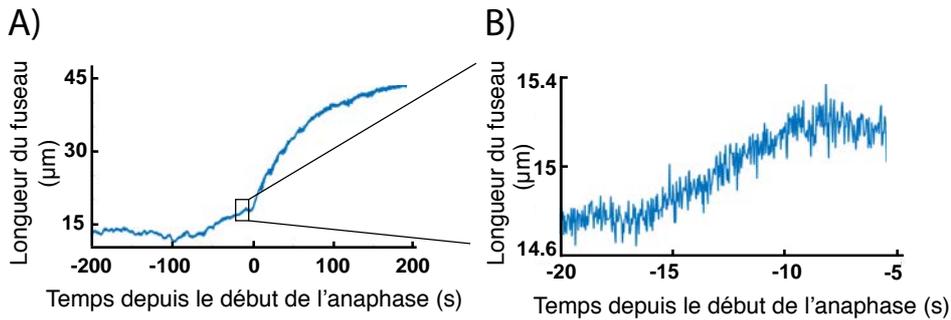


Figure II-2 – A) Longueur du fuseau au cours de la division cellulaire pour un embryon non traité (contrôle) dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline, à 18°C. Le temps de référence ($t = 0$) correspond au passage en anaphase. B) Fluctuations de la longueur sur l'intervalle correspondant au rectangle sur le panneau, soit entre 20 et 5 secondes avant le passage en anaphase.

la conservation de la cadence des divisions successives à la première division, qui sont très stéréotypées [Riddle et al., 1997] et représente un marqueur de non-toxicité [Tinevez et al., 2012]. Ainsi, nous avons pu observer les fluctuations de longueur du fuseau durant toute la durée de la division cellulaire (Fig II-2).

Nous disposons donc de l'évolution temporelle de la longueur du fuseau au cours de l'ensemble de la division à hautes résolutions spatiale et temporelle tout en nous gardant d'effets photo-toxiques. Ainsi, nous pouvons envisager l'analyse de ces données pour caractériser la mécanique et la dynamique du fuseau mitotique.

3.2 Analyse des fluctuations de longueur au cours du temps

3.2.1 Mérites et limitations des approches par les déplacements quadratiques moyens, les ondelettes et les transformées de Fourier

Une caractéristique de la longueur du fuseau au cours du temps, lorsqu'elle est observée à haute résolution, réside dans ses micro-variations d'aspect aléatoire (Fig. II-2-b). Le cytoplasme de la cellule étant visqueux (estimation de son coefficient de viscosité varie de 0.27 Pa.s à 1 Pa.s [Daniels et al., 2006; Fantana, 2011]), il est raisonnable de supposer que les fluctuations peuvent être modélisées en prenant comme source de bruit l'attachement et le détachement aléatoires des moteurs plutôt que le bruit thermique (Brownien). Pour

3.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS DE LONGUEUR AU COURS DU TEMPS

effectuer une moyenne de plusieurs embryons et réaliser une modélisation, il apparaissait opportun de séparer cette partie aléatoire de celle contrainte par les mécanismes du fuseau. Trois possibilités s'offraient à nous : l'utilisation des déplacements quadratiques moyens, l'analyse en ondelettes et l'analyse de Fourier. Nous allons maintenant examiner leurs avantages et inconvénients respectifs.

Analyse des déplacements quadratiques moyens. Une approche classique d'analyse de trajectoires de particules consiste à calculer les déplacements quadratiques moyens, typiquement $MSD = \langle (x - x_0)^2 \rangle$, avec x_0 la longueur initiale et x la longueur [Michalet, 2010]. Cette analyse permet en particulier de proposer un modèle pour le déplacement des particules, testant par exemple si les mouvements correspondent à de la diffusion libre ou dirigée. Ce type d'approche est approprié à l'analyse du déplacement d'un grand nombre de particules individuelles [Michalet, 2010]. Nous reproduisons ici le résultat d'une telle analyse pour le fuseau mitotique dans des cellules non traitées (Fig. II-3). Nous avons toutefois écarté ce type d'approche pour deux raisons : l'obtention de modèle théorique dans la théorie des systèmes dynamiques (de manière plus technique, une équation différentielle stochastique type équation de Langevin (voir section 4) apparaissait difficile, d'une part. D'autre part, il n'existe pas de méthodologie établie permettant une séparation entre les temps courts, que nous souhaitions modéliser par notre méthode et les temps longs de l'évolution du fuseau.

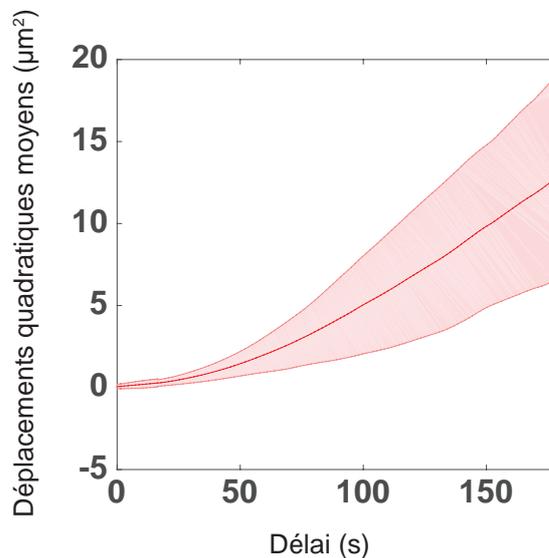


Figure II-3 – Déplacements quadratiques moyens pour les longueurs du fuseau de $n=16$ embryons contrôles dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline, à 18°C. Les barres d'erreurs sont les erreurs standards.

Analyse en ondelettes Pour l'analyse spectrale temps-fréquences de signaux non stationnaires, l'analyse en ondelettes se révèle très utile [Addison, 2002]. Cette approche permet une analyse fréquentielle/spectrale d'un train d'ondes localisé dans le temps, par contraste avec l'analyse spectrale classique. Différentes familles d'ondelettes existent offrant des avantages variés. La famille «dérivée de Gaussienne» (Eq. 3.1) apparait bien appropriée pour les types de signaux que nous analysons car elle permet la détection de discontinuités dans le signal.

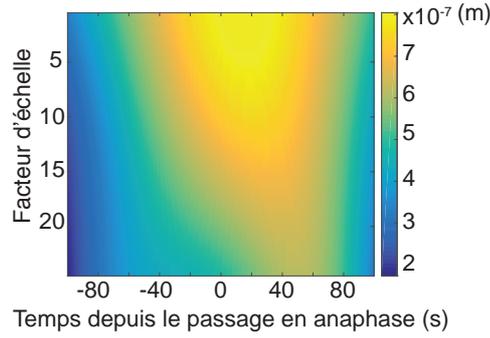


Figure II-4 – Analyse en ondelettes «dérivées de Gaussienne» pour n=16 embryons contrôlés dont les centrosomes sont marqués par la GFP::γ-tubuline, à 18°C. L'amplitude des coefficients est codée par des couleurs selon l'échelle reproduite à droite. L'axe des abscisses correspond aux temps, avec comme temps 0 la transition métaphase - anaphase. L'axe des ordonnées correspond au facteur d'échelle des ondelettes. Nous avons calculé les coefficients d'ondelettes individuellement sur chacun des embryons, et nous les avons moyennés ensuite.

$$\psi(x) = \frac{2}{\sqrt{3}}\pi^{-1/4}(1 - x^2)e^{-x^2/2} \quad (3.1)$$

$\psi(x)$ est l'équation de l'ondelette de la famille des dérivées de Gaussienne. Et la transformation en ondelettes d'un signal $x(t)$ est donnée par l'équation 3.2.

$$g(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) * \psi\left(\frac{t - b}{a}\right) dt \quad (3.2)$$

où a est le facteur d'échelle et b le facteur de position. Pour un signal temporel, a correspond globalement à la fréquence et b au moment. À titre d'exemple, nous avons calculé la transformée continue avec cette famille d'ondelettes pour les embryons non traités (contrôle) (Fig. II-4). L'analyse en ondelettes est particulièrement bien appropriée à l'analyse spectrale résolue en temps où sont recherchées quelques fréquences discrètes présentes transitoirement dans le signal. Par contre, dans le cas de la modélisation d'une distribution des fréquences sur une large gamme, comme nous l'observons sur la figure II-4, la modélisation des résultats sera complexe en comparaison de l'analyse de Fourier.

L'objectif ici étant d'ajuster un modèle sur la distribution (analyse paramétrique), nous avons aussi écarté cette approche.

Analyse de Fourier La nécessité de pouvoir interpréter les caractérisations de la mécanique du fuseau mitotique sous la forme d'une distribution plutôt que de quelques fréquences discrètes via un modèle suggère l'utilisation de l'analyse de Fourier. Toutefois, cette approche est en général mal appropriée à la séparation des temps et donc à l'analyse d'un signal variant au cours du temps. Ainsi, nous avons opté pour une analyse de type temps-fréquence par transformée de Fourier à court terme. Les détails sont discutés ci-dessous. La figure II-5 montre le spectre de densité moyen obtenu à partir du calcul de la transformée de Fourier du signal de la longueur du fuseau pour les embryons contrôles. Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai le terme "spectre" ou l'abréviation PSD (*Power Spectral Density*) pour définir la densité spectrale de puissance. Cependant sur ce spectre nous n'avons pas la dépendance en temps qu'il nous est nécessaire pour l'analyse du fuseau.

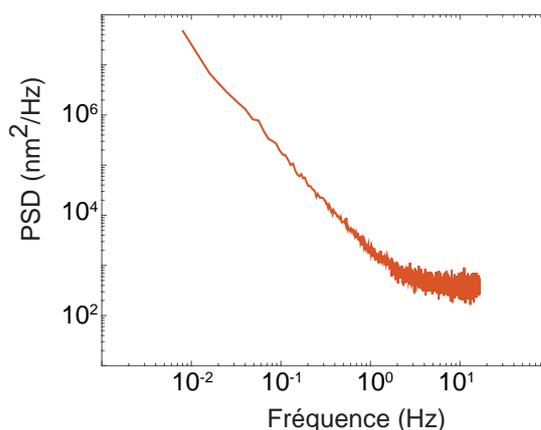


Figure II-5 – Densité spectrale de puissance pour les embryons contrôles sur les données brutes en orange. Spectre moyen obtenu pour 16 embryons contrôles où les pôles sont marqués par la GFP:: γ -tubuline, à 18°C. Le signal analysé est sélectionné en métaphase avec une fenêtre de 4096 points.

3.2.2 Analyse temps-fréquence de la longueur du fuseau par les transformées de Fourier à court terme

Afin de caractériser l'évolution de la dynamique du fuseau mitotique au cours du temps, nous nous sommes placés dans l'hypothèse d'une évolution du fuseau au cours de la mitose

lente par rapport à ses fluctuations ; ces dernières nous renseignant ainsi sur son état mécanique instantané. En d'autres termes, les temps peuvent être séparés. L'utilisation de la transformée de Fourier aux temps courts nous a permis d'implémenter cette approche. Aux temps courts, nous sommes dans l'hypothèse d'une quasi-stationnarité faible permettant l'utilisation du théorème de Wiener-Khinchin [Wiener, 1930; Khintchine, 1934] et donc l'interprétation du spectre de fluctuations comme la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation [Kubo et al., 2012]. Un soin particulier a été apporté au choix de la fenêtre pour apodiser le signal et à la normalisation¹ afin de faciliter cette interprétation. Si une analyse par transformée de Fourier à court terme semble répondre à la double nécessité de séparer les temps et d'offrir une modélisation aisée des résultats, il est important de noter que l'évolution temporelle du signal (la séparation des temps) impose un compromis entre résolution fréquentielle et temporelle (inégalité d'Heisenberg) et une implémentation soignée. Ces différents points feront l'objet des paragraphes suivants.

Justification de la stationnarité faible aux temps courts La structure du fuseau et ses principaux acteurs sont connus. En effet, il existe de nombreuses études *in vitro*, caractérisant les acteurs moléculaires, qui suggèrent que le *turn-over* des moteurs moléculaires et des agents de réticulation est rapide, de l'ordre de 0.1 – 1 s. Cela suggère que les fluctuations, qui nous renseignent sur la mécanique du fuseau, ont une dynamique rapide dans la même gamme de temps. Par contre, le comportement global du fuseau a une évolution beaucoup plus lente: son élongation se fait au plus vite à 0.5 $\mu\text{m/s}$ en début d'anaphase, alors qu'elle se limite à environ 0.02 $\mu\text{m/s}$ le reste du temps, notamment en métaphase (Fig. II-2). Il était ainsi raisonnable de supposer que la longueur reste sensiblement constante sur une durée de 15 s. Du point de vue de la fonction d'autocorrélation, il est aussi raisonnable de supposer que les processus biochimiques assurant l'avancement de la mitose et régulant les différents acteurs sont lents. Ainsi une fenêtre de 15 s paraissait là encore appropriée pour rester dans l'hypothèse d'une stationnarité faible².

Analyse d'un signal expérimental, discret et fini Ayant opté pour l'utilisation de la transformée de Fourier, nous utiliserons sa version discrète qui est adaptée à notre échantillonnage discret en temps. Afin de faciliter l'interprétation, nous avons choisi une représentation où l'intégrale du spectre de fluctuation correspond à la variance du signal.

¹Normalisation pour que l'intégrale du spectre soit égale à la variance du signal.

²Un processus est faiblement stationnaire lorsque son espérance et ses covariances sont invariantes par translation dans le temps.

Ainsi, la transformée s'écrit:

$$\hat{f}_k = \frac{\sqrt{T_e}}{N} \cdot \sum_{n=0}^{N-1} y(n) \cdot e^{-i\omega_k \frac{k}{N}} \quad \text{et} \quad \nu_k = \frac{k}{N \cdot T_e} \quad (3.3)$$

où \hat{f}_k est la transformée de Fourier discrète à la pulsation $\omega_k = 2\pi\nu_k$ avec ν la fréquence, T_e est la période d'échantillonnage, N le nombre de point et $y(n)$ le signal à analyser.

Pour son calcul sur les données expérimentales, nous avons utilisé l'implémentation FFT [Press, 2007]. La transformée de Fourier discrète se fait sous l'hypothèse que le signal est discret et périodique. Ce deuxième point implique qu'en cas d'allongement ou de raccourcissement net du fuseau, cette dérive introduira un saut entre la dernière et la première valeur de la série, dont la signature fera partie voire dominera la transformée de Fourier discrète (Fig. II-6). Cela entraînera alors inévitablement des artefacts et rendra la modélisation dans le meilleur des cas biaisée et dans le pire complètement fausse.

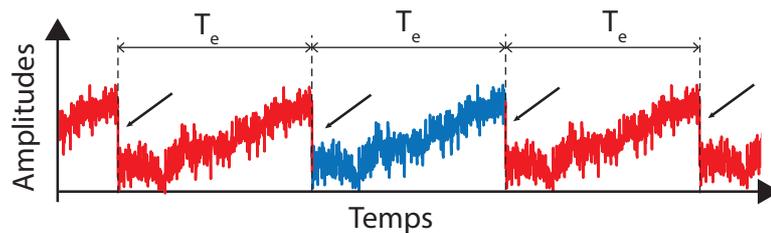


Figure II-6 – Signal typique de la longueur du fuseau (15 s en métaphase) (en bleu) et son extension périodique (en rouge) sans fenêtrage (ou de manière équivalente à une fenêtre rectangulaire), qui sera analysé par la transformée de Fourier. Nous remarquons qu'à la fin de chaque période T_e , un saut se produit (flèches noires). Sans apodisation, il ferait partie intégrante du résultat de l'analyse de Fourier bien qu'il n'ait pas de pertinence pour l'analyse de la mécanique du fuseau mitotique.

Motivation pour fenêtrer le signal et effet d'une dérive Avant de concevoir une stratégie pour contourner cette difficulté, nous avons analysé les conséquences d'un tel "saut". Le principe de superposition¹ nous permet d'isoler le saut et d'en calculer séparément la contribution. Nous avons modélisé ce saut par une distribution d'Heaviside aussi appelée fonction échelon ou marche d'escalier, et nous avons observé que ce saut crée un spectre avec une décroissance en 10^{-2} . Plus en détail, nous pouvons calculer en

¹signal d'entrée peut être décomposé par une somme de signaux de sortie simples.

transformée de Fourier le spectre d'un saut modélisé par une distribution de Heaviside.

$$\tilde{H}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} H(t)e^{-i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} \delta(t) \frac{-1}{i\omega} e^{-i\omega t} dt = \frac{1}{i\omega} \quad (3.4)$$

Et ainsi $|\tilde{H}(\omega)|^2 = 1/\omega^2$, le spectre de fluctuation, a une pente en 10^{-2} , similaire à celle attendue pour un frottement fluide (Fig. II-10). Comme cette dérive pourrait perturber l'interprétation possible de la modélisation, il était essentiel de contrôler correctement ce saut.

3.2.3 Fenêtrage du signal en vue de la modélisation

Afin de prévenir tout artefact dû à la dérive du signal, nous avons procédé à son apodisation. Cela revient à multiplier le signal brut par une fonction, dite fenêtre, dont les valeurs initiale et finale sont nulles de sorte à effacer le saut précédemment mentionné. Il existe une multitude de fenêtres aux mérites divers [Harris, 1978].

Choix de la fenêtre : La multiplication de la fenêtre dans l'espace direct revient à effectuer une convolution dans l'espace de Fourier (Eq. 3.5). Comme nous souhaitons ajuster un modèle sur la densité spectrale de puissance obtenue expérimentalement, il était préférable d'éviter d'étaler de trop nos signaux dans l'espace de Fourier (Fig. II-7). Une analogie est l'effet de la fonction d'étalement du point (PSF) en microscopie. Pour le calcul d'une image de microscopie, elle est convoluée à la distribution spatiale de molécule fluorescente, provoquant un étalement (tache d'Airy).

$$(f * g)(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} f(n-m).g(m) \quad (3.5)$$

Pour répondre à cette contrainte, nous avons utilisé la fenêtre de Hann (Fig. II-7) dont seulement trois coefficients sont non nuls en transformée de Fourier discrète (DFT), lorsque la fenêtre couvre une période. Toutefois, l'apodisation du signal modifie fortement son amplitude et les points en bordure de fenêtre contribueront au spectre moins que ceux au centre. Pour cette raison, dans l'utilisation de la transformée de Fourier aux temps courts, nous avons souhaité un recouvrement partiel des intervalles successifs considérés lors du fenêtrage glissant (cf section 3.2.3).

La fenêtre de Hann est définie dans le domaine direct par l'équation 3.6, et dans le domaine fréquentiel par l'équation 3.7 [Harris, 1978].

$$w(n) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \left(\frac{2n}{N} \pi \right) \quad (3.6)$$

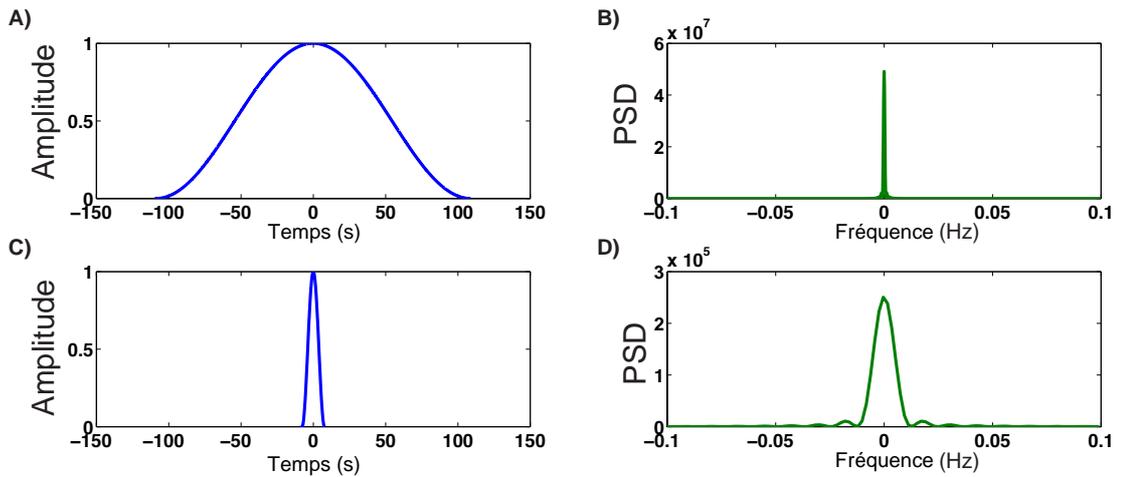


Figure II-7 – Fenêtres de Hann dans les espaces direct et fréquentiel. (A) et (B) sont les représentations graphiques d’une fenêtre de Hann s’étalant sur toute la période de la DFT dans l’espace direct (A) et l’espace fréquentiel (B), alors que (C) et (D), respectivement dans l’espace direct et l’espace fréquentiel, correspondent au cas d’une fenêtre sur un intervalle plus petit dans l’espace direct, complétée par des zéros, telle qu’utilisée dans les approches par fenêtre glissante. Notons l’étalement de la PSD entre (B) et (D) correspondant au resserrement des fenêtres en temps (A) et (C).

avec N le nombre de points de la fenêtre utilisée, n l’indice de point variant de $-N/2$ à $N/2$

$$\widehat{W}(\theta) = \frac{1}{2}D(\theta) + \frac{1}{4} \left(D\left(\theta - \frac{2\pi}{N}\right) + D\left(\theta + \frac{2\pi}{N}\right) \right) \quad (3.7)$$

où D est le noyau de Dirichlet défini par l’équation 3.8 et $\theta = 2\pi\nu T_e$.

$$D(\theta) = e^{i\theta/2} \frac{\sin\left(\frac{N}{2}\theta\right)}{\sin\left(\frac{1}{2}\theta\right)} \quad (3.8)$$

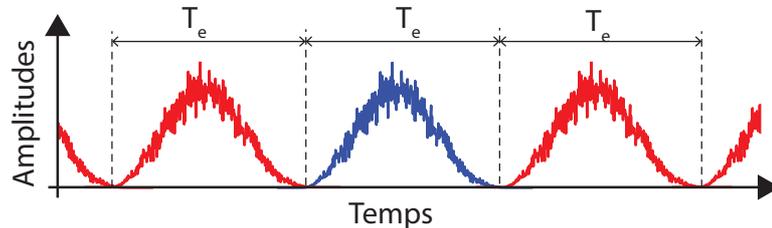


Figure II-8 – Signal (en bleu) et son extension périodique (en rouge) après multiplication par la fenêtre de Hann avec T_e la durée de la période. Le signal d’origine est le même qu’en figure II-6

Dans l’espace de Fourier, nous obtenons la signature de la mécanique du fuseau, que

nous désirons approcher par un modèle, convoluée par la DFT de la fenêtre. Dans un espace discret et fini, cette convolution s'apparente à une multiplication polynomiale, ainsi une déconvolution pouvait être imaginée à l'instar de ce qui se pratique pour les images de microscopie. Toutefois, une telle procédure propage les erreurs en particulier propage les erreurs des grandes amplitudes aux petites fréquences vers celles aux grandes fréquences, plus faibles de plusieurs ordres de grandeur. Pour cette raison, une telle approche n'était pas praticable. Ainsi, nous verrons à la section 4.2.1 qu'il faut préférer l'alternative d'une convolution du modèle à la volée lors de la procédure d'ajustement du modèle, réminiscence des ajustements pratiqués en diffraction de rayons X ou de neutrons [Lanson, 1997].

Fenêtre glissante, principe et implémentation : Comme nous le mentionnions ci-dessus, la dynamique rapide du fuseau impose de s'intéresser à une petite fenêtre de temps, typiquement 15 s par l'utilisation de transformées de Fourier aux temps courts. Compte tenu de la nécessité d'apodiser le signal, il paraissait naturel d'utiliser la stratégie des "fenêtres glissantes", qui permet une représentation temps/fréquence du spectre. Le principe consiste à utiliser une fenêtre, ici la fenêtre de Hann, dont la taille est réduite au nombre de points correspondant à l'intervalle choisi, ici 512 points, soit environ 15 s. Cette fenêtre est ensuite étendue par des zéros de part et d'autre pour atteindre le nombre de points du signal total, correspondant à la métaphase et l'anaphase, soit environ 480 secondes à $T = 18^\circ \text{C}$. La position du centre de la fenêtre est déplacée vers les temps plus tardifs (d'où l'adjectif "glissante"), ici par pas de 5 s, pour générer une famille de densité spectrale, telle celle représentée à la figure II-9. Comme le suggère l'équation 3.7, une fenêtre plus ramassée en temps, augmentant la résolution temporelle, va se trouver plus étalée en fréquence, étalant plus fortement le spectre par convolution. Dans l'analogie avec la microscopie, cela revient à ouvrir le *pinhole* d'un microscope confocal et ainsi élargir la PSF.

Transformée de Fourier aux temps courts, limitation et principe d'incertitude

Lors de l'application de la transformée de Fourier (discrète) aux signaux obtenus après multiplication par une fenêtre glissante, la gamme de fréquences accessible est limitée. D'une part, la fréquence de Rayleigh définit la fréquence minimale utilisable, qui est fonction de la taille de la fenêtre par l'expression $f_{\text{Rayleigh}} = \frac{1}{T}$ où T est la taille de la fenêtre en seconde. D'autre part, le théorème d'échantillonnage de Nyquist-Shannon nous dit que seules les fréquences en dessous de f_{Nyquist} sont exploitables pour l'analyse du spectre, avec $f_{\text{Nyquist}} = \frac{f_e}{2}$ et f_e la fréquence d'échantillonnage du signal temporel, à savoir notre fréquence d'acquisition des images microscopiques. Ainsi, dans notre cas, l'intervalle de fréquence exploitable était $0.06 \text{ Hz} \leq f \leq 16.47 \text{ Hz}$.

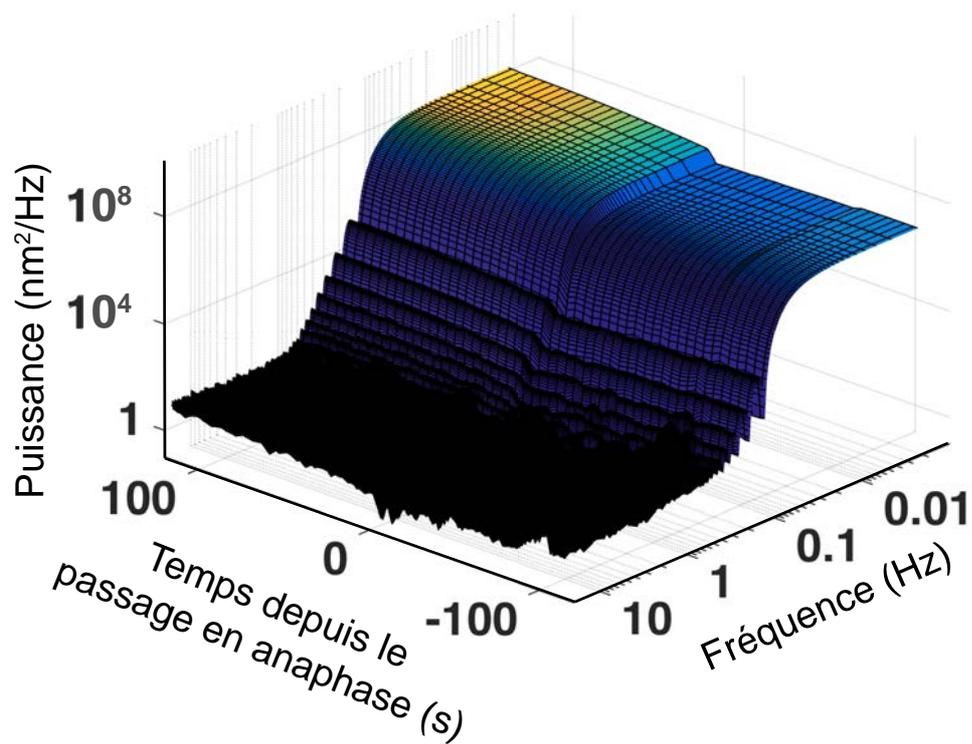


Figure II-9 – Spectre obtenu avec l’utilisation des fenêtres glissantes de 512 points pour N=16 embryons où les pôles sont marqués par la GFP:: γ -tubuline, à 18°C.

De plus, ce type d’études se heurtent également à l’impossibilité de résoudre simultanément le signal en temps et en fréquence. Le principe d’incertitude est formulé par l’équation 3.9 telle que le définit l’inégalité d’Heisenberg:

$$\sigma_t \sigma_f \geq \frac{1}{2} \quad (3.9)$$

avec σ_t et σ_f les variances temporelle et fréquentielle d’un signal donné.

Chapitre 4

Modélisation de la densité spectrale de puissance des fluctuations de longueur du fuseau mitotique

La densité spectrale de puissance, en tant que transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation, est caractéristique du mécanisme à l'œuvre. Afin d'interpréter en biophysique cellulaire les résultats obtenus, nous avons approché la densité spectrale de puissance par un modèle. Le fuseau est toutefois un système complexe. Si la connaissance de sa structure a fortement progressé, sa dynamique reste encore débattue [Dumont, 2011]. Ainsi, dans cette étude, nous nous sommes satisfaits d'un modèle heuristique, qui s'ajuste bien aux données expérimentales d'une part et d'autre part en adéquation avec notre connaissance de la structure du fuseau et de la dynamique de ses composants individuels.

L'ajustement rigoureux d'un modèle sur une densité spectrale de puissance reste délicat en particulier, car les données s'étalent sur plusieurs ordres de grandeur et car la statistique des erreurs n'est pas gaussienne comme on en fait l'hypothèse dans l'utilisation des moindres carrés [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010]. Au-delà de l'approche, l'implémentation demande elle aussi un soin particulier pour assurer une sensibilité correcte à chaque paramètre. Enfin, dans l'implémentation de cette méthode, nous avons considéré que le modèle n'était pas figé, mais au contraire appelé à évoluer avec notre compréhension du fuseau mitotique. Nous avons donc veillé à faciliter le changement de modèle. Par ailleurs, l'approche par un modèle d'une densité spectrale de puissance "fenêtrée" requiert du calcul intensif ; afin d'obtenir des résultats dans des délais raisonnables, nous avons envisagé une approche par le calcul haute performance (massivement parallèle).

4.1 Motivation du modèle mécanique heuristique du fuseau mitotique

Considérant les variations de longueur du fuseau mitotique comme un processus aléatoire, nous l'avons approché par une équation différentielle stochastique du type équation de Langevin.

4.1.1 Eléments mécaniques pris en compte pour modéliser le fuseau mitotique

Afin de caractériser la PSD et de comparer des conditions contrôles à des conditions perturbées génétiquement, nous souhaitons approcher la PSD par une fonction et en estimer les paramètres. Nous avons choisi un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie. Pour appuyer ce choix, nous présentons ci-dessous un argument heuristique d'une part et d'autre part un argument qualitatif sur la modélisation du fuseau.

Modèle heuristique du second ordre Lors d'une étude précédente, nous avons calculé la PSD des fluctuations de position des pôles du fuseau afin d'étudier le maintien du fuseau au centre de la cellule au cours de la métaphase en utilisant une fenêtre de Hann de toute la largeur du signal (soit environ 125 secondes) [Pecreaux et al., 2016]. Afin de permettre une visualisation aisée du potentiel modèle, nous avons alors déconvolué la fenêtre dans l'espace de Fourier (c.f. paragraphe 3.2.3), bien que cette déconvolution propage des erreurs des petites vers les grandes fréquences la longueur maximale de la fenêtre implique un étalement minimal dans l'espace des fréquences et ainsi une réduction a minima des problèmes de déconvolution. Cette approche demeure toutefois semi-quantitative. Nous avons observé qu'un modèle du second ordre était approprié pour l'étude du maintien du fuseau mitotique. Procédant de même pour la longueur du fuseau durant la métaphase, nous avons observé une forme de spectre similaire (Fig. II-10), qui est bien ajusté par un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie, tel que détaillé en figure II-10. La comparaison de ce modèle heuristique avec notre courbe déconvoluée montre qu'il existe un plateau aux hautes fréquences (Fig. II-5). Il correspond à la limite de résolution de notre système d'imagerie et de tracking comme expliqué précédent [Gittes et al., 1993]. Nous avons modélisé cette limite de précision par un bruit blanc gaussien additif, qui dans la densité spectrale apparaît comme un plateau. En pratique, nous avons ajouté au modèle une constante égale à la moyenne des valeurs pour les fréquences supérieures à 2 Hz en préalable à l'ajustement.

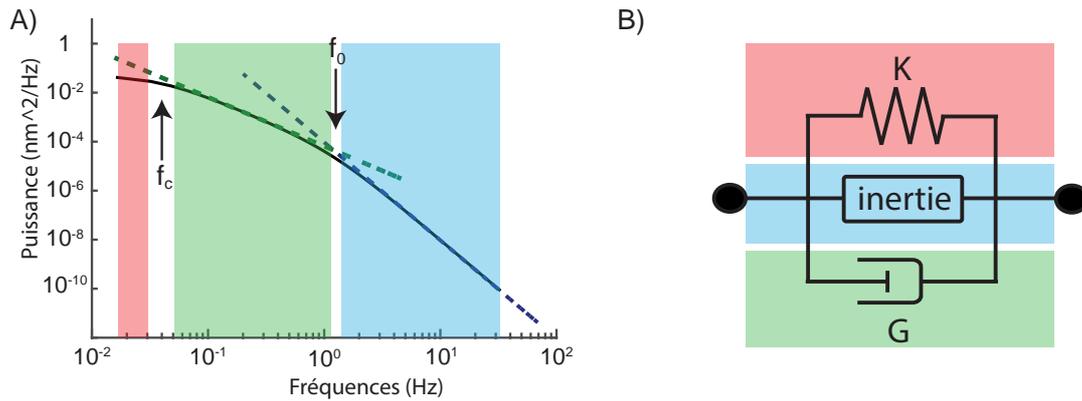


Figure II-10 – A) Densité spectrale de puissance pour un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie. La gamme de fréquences en rouge est dominée par le ressort correspondant à un hypothétique mécanisme de maintien de la longueur du fuseau. La densité spectrale y est constante. La gamme de fréquences en vert est dominée par le frottement fluide, correspondant à une décroissance avec une pente en $10^{-2} \text{ nm}^2/\text{Hz}^2$ (courbe pointillée verte), alors que celle en bleu est dominée par l’inertie et correspond à une pente en $10^{-4} \text{ nm}^2/\text{Hz}^2$ (courbe pointillée bleue). B) Modèle de Kelvin-Voigt avec inertie, où la zone rouge représente un ressort de raideur K , la zone verte un amortisseur de viscosité G et la zone bleue le terme inertiel I .

Modélisation qualitative du fuseau à partir de sa structure Des études, structurales et *in silico* notamment, suggèrent que la longueur du fuseau résulte de l’équilibre dynamique entre des générateurs de force allongeant le fuseau et d’autres contribuant à le raccourcir (cf. section 1.3.1.3). Ces modélisations utilisent des moteurs moléculaires de type kinésine ou couplent la dépolymérisation des microtubules à des structures du fuseau, pouvant être modélisées raisonnablement par une relation force–vitesse et un taux de détachement dépendant de la force. Pour ce dernier, les vitesses d’allongement et de raccourcissement du fuseau restant faibles la plupart du temps, il est raisonnable en première approximation de supposer que nous sommes proches de la force d’arrêt des générateurs de force et que nous pouvons donc linéariser la relation taux-de-détachement–force. L’ensemble de ces relations étant linéaires, la combinaison de moteurs aux propriétés variées se fait par superposition et résulte en des équations de même forme que les équations des agents individuels, mais avec des paramètres effectifs. Le positionnement du fuseau mitotique a fait l’objet d’une modélisation sur la base de ce type de composants [Pecreaux et al., 2006], proposant un modèle dit "tir-à-la-corde" (*tug-of-war*). Celui-ci, moyennant des paramètres différents, est apparu approprié pour une modélisation du fuseau de longueur y . Il s’écrit:

$$I\ddot{y} + G\dot{y} + Ky = \eta \tag{4.1}$$

où K est une raideur de ressort, G est un coefficient de frottement visqueux, I un terme inertiel et η un terme stochastique. Cela correspond au même type de modèle de Kelvin-Voigt avec inertie que ci-dessus. En conclusion, nous avons approché nos courbes par un modèle mécanique comprenant un ressort, un frottement visqueux et une inertie en parallèle. Il faut toutefois noter que les modules de ces composants mécaniques sont effectifs, ne correspondant pas forcément à un acteur unique, mais à une combinaison. De plus, ils ne sont pas nécessairement liés à l'action des composants internes au fuseau. En effet, il n'est pas exclu *a priori* que la viscosité du cytoplasme, par exemple, couple les mouvements des pôles du fuseau, ou encore que les microtubules astraux émanant de chaque pôle et en contact avec le cortex d'acto-myosine couplent mécaniquement là encore les pôles. Par ailleurs, il faut noter que l'inertie ne représente pas l'effet de la masse du fuseau, négligeable dans un système visqueux (nombre de Reynolds $\sim 10^{-6}$ [Civelekoglu-Scholey and Scholey, 2010]), mais provient de la dynamique des moteurs et de la dépendance de la processivité vis-à-vis de la force exercée [Pecreaux et al., 2006]. En effet, lorsque la force portée par ces moteurs change (la tension du fuseau change par ex.), le nombre moyen de moteurs attachés suit une phase transitoire avant d'atteindre un nouvel état d'équilibre, car ce changement a modifié la probabilité de détachement des moteurs. Cette transition est la cause de l'inertie de par le délai qu'elle introduit. Cela se retrouve aussi dans le positionnement du fuseau et est à l'origine des oscillations transverses en anaphase [Pecreaux et al., 2006].

4.1.2 Terme stochastique, le "bruit"

Les fluctuations que nous observons sont la combinaison d'un bruit et de la réponse mécanique du fuseau (au sens large, incluant les effets médiés par les microtubules astraux et l'hydrodynamique le cas échéant). Le bruit visible sur les trajectoires du fuseau (Fig. II-2) peut provenir *a priori* de deux phénomènes : l'agitation thermique à laquelle est soumise le centrosome au sein de l'embryon (un bruit thermique, qui s'apparente au mouvement brownien) d'une part et d'autre part l'attachement et le détachement stochastique des générateurs de force et agents de réticulation engagés. Qu'elle est alors l'origine de ce bruit ?

Bruit thermique et bruit dû au nombre Lorsque nous estimons la valeur de la variance du bruit brownien (i.e. agitation thermique) régissant la position des pôles du fuseau, qui est $\sim \sigma_{theo} = 10^{-14} \text{ m}^2$ [Decker et al., 2011], nous remarquons qu'elle est inférieure à celle que nous avons obtenue expérimentalement $\sigma_{exp} = 10^{-13} \text{ m}^2$ [Pecreaux et al., 2016]. Cette différence d'amplitudes de bruit suggère la présence d'une autre source de bruit. Les moteurs moléculaires s'attachent et se détachent en permanence de manière

stochastique, faisant ainsi constamment varier leur nombre. Cela cause un bruit dont l'amplitude est typiquement $\sigma_t^2 = l_0^2 / Np(1 - p)$ en utilisant un modèle binomial où l_0 est la distance entre le centrosome et le cortex, N le nombre de moteurs, p la probabilité du moteur d'être actif. Ce bruit est d'une amplitude plus importante¹ $\sim \sigma_{exp} = 4.10^{-13}m^2$ et en accord avec les observations. Il semble donc que la source du bruit que nous observons ne soit pas thermique mais majoritairement les variations du nombre de générateurs de forces agissant sur les pôles du fuseau.

Modélisation du bruit dû au nombre par un bruit blanc Des travaux de recherche sur l'oreille interne [Nadrowski et al., 2004] suggèrent que nous pouvons modéliser ce bruit par un bruit blanc. Comme le temps de corrélation attendu des moteurs est court [Howard, 2001] par rapport à la granularité temporelle que nous utilisons [Kubo et al., 2012]. Ce bruit peut se simplifier comme un bruit de moyenne nulle dont la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation suit une distribution de Dirac $\langle \eta(t)\eta(t+\tau) \rangle = 4k_B\check{T}G\delta(\tau)$ où k_B est la constante de Boltzmann, \check{T} la température effective du bruit, supérieure à la température ambiante et G le module du frottement fluide. Cette simplification s'est avérée importante dans la perspective d'une convolution du modèle à la volée (section 4.2.1).

L'estimation de la température effective a été réalisée lors de l'étude sur le centrage du fuseau mitotique réalisé précédemment dans l'équipe par l'estimation de la contribution de la dynamique des microtubules. Nous avons calculé la déviation standard de la longueur du fuseau sans prendre en compte la contribution des moteurs, ce qui est revenu à fixer une inertie nulle. Cette estimation a été faite à la fois par le modèle *tug-of-war* (Eq. 4.2) et par le modèle «deux états», où les microtubules peuvent flamber (Eq. 4.3) [Howard, 2006].

$$\langle |y|^2 \rangle = \int_0^\infty \frac{\langle |\eta|^2 \rangle}{K^2 + G^2(2\pi\nu)} d\nu = \int_0^\infty \frac{4k_B\check{T}G}{K^2 + G^2(2\pi\nu)} d\nu = \frac{k_B\check{T}}{K} \quad (4.2)$$

avec ν la fréquence.

$$\langle |y|^2 \rangle = \frac{(1-p)x_0^2}{(3-p)^2 2Mp} \quad (4.3)$$

avec x_0 est la distance entre les centrosomes et le cortex, M le nombre de microtubules engagés (estimé à 2000 [O'Toole et al., 2003]) et p la probabilité qu'un microtubule exerce une force de poussée, estimée à $p = 0.15$ [Pecreaux et al., 2016]. A cela, nous avons ajouté le mécanisme de maintien du fuseau au centre dont l'élément de raideur K (Eq. 4.4) est

¹Valeurs utilisées pour l'estimation : $l_0 = 15\mu m$, $N = 4000$ et $p = 0.15$ [Pecreaux et al., 2016]

estimé par la description au niveau microscopique [Howard, 2006].

$$K = 2Mp \frac{f_E}{x_0} (3 - p) \quad (4.4)$$

avec la force de flambage (force d'Euler) $f_E = \frac{AkTL_p}{x_0^2}$, la longueur de persistance des microtubules $L_p = \frac{EI}{kT}$, la rigidité de flexion estimée à $EI = 17.510^{-24} \text{N.m}^2$ [Cassimeris et al., 2001] et $A = \pi^2$ le facteur de géométrie correspondant à la façon dont les microtubules sont attachés aux centrosomes. Nous avons ici fait l'hypothèse que les microtubules peuvent pivoter quand les microtubules flambent [Howard, 2006]. Nous avons estimé la température effective :

$$\frac{\check{T}}{T} = A \frac{(1 - p)L_p}{(3 - p)x_0} \simeq 795 \quad (4.5)$$

Nous avons alors supposé que le fuseau était à la même température effective. Cette estimation de l'amplitude du bruit reste délicate. Toutes les valeurs des modules des différents composants mécaniques du modèle KGI seront estimées à une constante multiplicative prête (la même pour tous) dépendante de cette estimation de l'amplitude du bruit. C'est pourquoi nous proposons une représentation des résultats alternative pour nous abstraire de cette difficulté (cf section 4.3.1).

4.1.3 Conclusion : modèle utilisé lors de cette étude

Nous avons donc choisi d'approcher nos données expérimentales par un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie définie par l'équation 4.6 et schématisée par la figure II-10.

$$I(t) \frac{d^2 l(t)}{dt^2} + G(t) \frac{dl(t)}{dt} + K(t)l = \eta(t) + \sqrt{\xi} \delta(t) \quad (4.6)$$

avec l la longueur du fuseau, K la raideur de la force de centrage, G le coefficient de frottement visqueux et I l'inertie. Le second membre du modèle est η une force stochastique appliquée au niveau des centrosomes, que nous avons modélisé par un bruit blanc dont les caractéristiques sont $\langle \eta \rangle = 0$ et $\langle \eta(t)\eta(t + \tau) \rangle = 4k_B \check{T} G \delta(t)$. Nous avons explicité la variation lente des paramètres au cours du temps. Enfin ξ , représente le bruit de détection formant le plateau aux grandes fréquences.

Afin de mieux comprendre le sens de chacun des éléments, reprenons l'analogie du vélo. K peut ainsi être vu comme un ressort attaché au vélo, qui l'empêche d'avancer et qui cherche à le ramener à sa position initiale. Dans la même idée, G le coefficient de frottement visqueux peut être assimilé comme la résistance qu'oppose l'air au mouvement du vélo et qui augmentera avec la vitesse du vélo. Enfin, le terme inertiel peut être représenté par la masse : il est bien plus difficile de mettre en mouvement un vélo très

lourd comparé à un vélo léger. Cependant, cette attribution classique du terme inertiel à la masse peut prêter à confusion : dans le cas du fuseau mitotique, l'effet inertiel de la masse est négligeable et l'inertie vient de la dynamique des composants. Une autre analogie est que, si nous imaginons le mouvement d'un peloton de cyclistes, il faut un certain délai pour que ce peloton atteigne la vitesse dictée par sa tête, ce délai peut alors être assimilé à une inertie affectant l'accélération du centre de masse du peloton.

Modélisation du spectre de fluctuations Le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie tel que présenté ci-dessus produit le spectre défini par l'équation 4.7.

$$\langle |\tilde{l}|^2 \rangle = \frac{\langle |\tilde{\eta}|^2 \rangle}{I^2(2\pi\nu)^4 + (G^2 - 2IK)(2\pi\nu)^2 + K^2} + \xi \quad (4.7)$$

Nous constatons que l'utilisation de ce modèle pour approcher les spectres expérimentaux et donc obtenir des estimations des paramètres K , G et I va conduire à une dépendance linéaire de ces derniers sur l'amplitude du bruit $\langle |\tilde{\eta}|^2 \rangle$. Son estimation étant délicate, la valeur absolue de ces paramètres a une pertinence limitée. Nous avons donc souhaité favoriser une combinaison de paramètres éliminant la dépendance de l'estimation du bruit. Cette nouvelle représentation a été inspirée des mesures de spectres de fluctuation en microscopie à force atomique (AFM) [Berg-Sorensen and Flyvbjerg, 2004]. Le spectre de fluctuations dépend alors de deux fréquences de coupure f_c et f_0 (Fig. II-10) et du coefficient de diffusion D :

$$\langle |\tilde{l}|^2 \rangle = \frac{4D}{\frac{(2\pi\nu)^4}{f_0^2} + (1 - 4\pi\frac{f_c}{f_0})(2\pi\nu)^2 + (2\pi f_c)^2} + \xi \quad (4.8)$$

avec

$$f_c = \frac{K}{2\pi G} \quad f_0 = \frac{G}{2\pi I} \quad D = \frac{k_B \check{T}}{G} \quad (4.9)$$

Nous remarquons sur l'équation 4.9 que seul D est dépendant de notre estimation de la température effective.

Nous allons maintenant détailler la stratégie employée pour ajuster ce modèle aux données expérimentales. Avant cela, remarquons toutefois que les paramètres libres ont des ordres de grandeur très différents. En effet, les premiers ajustements sur les données expérimentales donnent typiquement $K = 10^{-6}\text{N}/\mu\text{m}$, $G = 10^{-3}\text{N.s}/\mu\text{m}$ et $I = 10^{-3}\text{N.s}^2/\mu\text{m}$ pour la première représentation et $f_c \approx 10^{-5}\text{Hz}$, $f_0 \approx 10^{-6}\text{Hz}$ et $D \approx 10^{-13}\text{m}^2/\text{s}$ pour la seconde. Une telle situation n'est pas souhaitable pour assurer à la régression une sensibilité égale sur chacun des paramètres libres. Suivant Norrelykke et ses coauteurs [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010], nous avons réalisé la régression dans une troisième représentation équivalente à celles ci-dessus, dite ABC dont les coefficients sont indépen-

dants d'une part, et d'autre part, dans la gamme de fréquences, qui nous intéresse, dans le cas où ils joueraient un rôle égal, ils ont des ordres de grandeur proches (cf section 4.3.1). Nous avons donc utilisé le modèle ABC lors de la régression, puis converti les résultats dans une autre représentation choisie pour sa signification physique.

4.2 Choix de la méthode pour réaliser l'ajustement

L'utilisation de la transformée de Fourier à court terme via l'application de fenêtre glissante pour l'analyse temps-fréquence des fluctuations a impliqué que la densité spectrale de puissance expérimentale était convoluée à cette fenêtre (cf section 3.2.3). L'effet de la convolution avec la transformée de la fenêtre est particulièrement visible au niveau des basses fréquences du spectre (Fig. II-11). Le modèle a dû être convolué avec la transformée de la fenêtre avant de réaliser la régression. Un autre aspect clef des régressions est la fonction de coût. Elle permet de mesurer l'ajustement du modèle pour un groupe de paramètres libres donnés. Usuellement, dans l'approche dite des moindres carrés, elle correspond à la somme des carrés des écarts d'amplitudes entre le modèle et la mesure à chaque fréquence. Toutefois, cette approche repose sur l'hypothèse que les erreurs expérimentales suivent une distribution gaussienne. Ce qui n'est pas le cas ici, comme nous allons le voir. De surcroît, les amplitudes expérimentales s'étendant sur 4 décades, elles rendent les moindres carrés impraticables autrement dit, seuls les points de forte amplitude pèseraient dans l'ajustement. Nous sommes donc repartis du principe visant à obtenir le modèle le plus vraisemblable. Enfin, comme le plateau aux grandes fréquences, qui représente la limite de résolution, n'a que peu de pertinence physique, nous n'avons pas ajusté ce paramètre. Nous en avons néanmoins fait une estimation préalable à la régression via une moyenne du signal aux hautes fréquences $\nu > 2$ Hz, comme indiqué dans la section précédente.

4.2.1 Convolution du modèle à la volée

L'ajustement a été fait par le modèle convolué. Ce calcul devant être fait à chaque estimation de la fonction de coût, nous avons donc poussé le plus possible le calcul de cette convolution de manière analytique et envisagé son implémentation massivement parallèle (cf section 4.3.2.2). Nous avons utilisé la fenêtre de Hann exclusivement comme discuté ci-dessus (Fig. II-7). Nous discuterons ici des simplifications possibles, le restant étant calculé numériquement. Nous avons souhaité garder une flexibilité sur le choix du modèle (nous avons aussi essayé un modèle Zener par exemple, (cf section 5.1.3)). Ainsi, nous avons utilisé un logiciel de calcul formel, *mathematica*, pour produire directement des fichiers de commandes en m-code, qui ont été insérés dans la régression, elle, programmée

sous *matlab*. De cette manière, nous avons aussi limité les risques d'erreur humaine dans les calculs et la programmation de fonctions complexes.

Transformée de Fourier discrète du modèle Le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie, que nous avons discuté dans la section précédente (Eq. 4.6), est une équation différentielle stochastique du type équation de Langevin. Sa transformée de Fourier discrète est donc :

$$\widehat{Y}_k = \frac{\widehat{\eta}}{-I(2\pi\nu_k)^2 + i(2\pi\nu_k)G + K} \quad (4.10)$$

Calcul de la convolution analytique : La densité spectrale de puissance s'écrit alors, en explicitant la convolution [Press, 2007]:

$$\langle |\widehat{Y} * \widehat{W}(\nu_k)|^2 \rangle = \left\langle \frac{Te}{N} \sum_{k'=0}^{N-1} \widehat{Y}(\nu_{k'}) \cdot \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k'}) \cdot \frac{Te}{N} \sum_{k''=0}^{N-1} \overline{\widehat{Y}(\nu_{k''}) \cdot \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k''})} \right\rangle \quad (4.11)$$

où les facteurs $\frac{Te}{N}$ sont des facteurs de normalisation dus à la convolution dans le domaine discret et \widehat{W} est définie par l'équation 3.7. Les sommes sont indépendantes, ainsi nous pouvons réarranger l'équation en posant :

$$\widehat{M}(\nu) = I(2\pi\nu)^2 + G(2\pi\nu) + K \quad \text{et} \quad \widehat{Y}(\nu) = \frac{\widehat{\eta}(\nu)}{\widehat{M}(\nu)}$$

nous pouvons réécrire ces équations et obtenir l'équation 4.12.

$$\langle |\widehat{Y} * \widehat{W}(\nu_k)|^2 \rangle = \left(\frac{Te}{N} \right)^2 \left\langle \sum_{k'=0}^{N-1} \sum_{k''=0}^{N-1} \left(\frac{\widehat{\eta}(\nu_{k'})}{\widehat{M}(\nu_{k'})} \right) \cdot \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k'}) * \overline{\left(\frac{\widehat{\eta}(\nu_{k''})}{\widehat{M}(\nu_{k''})} \right) \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k''})} \right\rangle \quad (4.12)$$

Après réécriture de l'équation 4.12, nous obtenons l'équation 4.13.

$$\langle |\widehat{Y} * \widehat{W}(\nu_k)|^2 \rangle = \left(\frac{Te}{N} \right)^2 \left(\sum_{k'=0}^{N-1} \sum_{k''=0}^{N-1} \frac{\langle \widehat{\eta}(\nu_{k'}) \overline{\widehat{\eta}(\nu_{k''})} \rangle}{\widehat{M}(\nu_{k'}) \overline{\widehat{M}(\nu_{k''})}} \cdot \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k'}) \cdot \overline{\widehat{W}(\nu_k - \nu_{k''})} \right) \quad (4.13)$$

Le bruit étant faiblement stationnaire, il découle de sa définition :

$$\begin{cases} \langle \eta \rangle = 0 \\ \langle |\eta|^2 \rangle = \lambda \delta(t) \end{cases} \quad (4.14)$$

que :

$$\langle \widehat{\eta}(\nu_{k'}) \overline{\widehat{\eta}(\nu_{k''})} \rangle = \lambda D(\nu_{k''} - \nu_{k'}) \quad (4.15)$$

où D est le noyau de Dirichlet tel que défini par l'équation 3.8.

En recombinaison des équations 4.15 et 4.13, nous obtenons alors la **formulation analytique de la densité spectrale de puissance du modèle convolué à la fenêtre.**

$$\langle |\widehat{Y} * \widehat{W}(\nu_k)|^2 \rangle = \left(\frac{T_e}{N} \right)^2 \left(\sum_{k'=0}^{N-1} \sum_{k''=0}^{N-1} \frac{\lambda D(\nu_{k''} - \nu_{k'})}{\widehat{M}(\nu_{k'}) \overline{\widehat{M}(\nu_{k''})}} \cdot \widehat{W}(\nu_k - \nu_{k'}) \cdot \overline{\widehat{W}(\nu_k - \nu_{k''})} \right) \quad (4.16)$$

Les sommes restantes ont été calculées numériquement à chaque évaluation de la fonction de coût lors de l'ajustement. Cela a impliqué du calcul intensif et sera traité dans la section 4.3.2.

4.2.2 Approche de la densité spectrale expérimentale par le modèle via le maximum de vraisemblance.

Nous avons la DFT du signal (la longueur du fuseau mitotique) fenêtré d'un côté et de l'autre le modèle convolué à la DFT de la fenêtre. Nous allons dans cette sous-section donner les étapes clefs de l'ajustement du modèle sur les données expérimentales pour obtenir des estimations des paramètres du modèle mécanique.

Optimisation numérique nécessaire à la régression : fonction de coût dérivée du principe de maximum de vraisemblance Ce principe consiste à maximiser la probabilité d'observer les points expérimentaux sachant qu'ils appartiennent à une distribution dont l'espérance est le spectre théorique. Afin de minimiser le bruit dû à la variabilité des échantillons biologiques, nous avons utilisé une moyenne point à point des spectres expérimentaux de N embryons, notée $\overline{P_k^{exp}}$. Ce spectre moyen suit une distribution Gamma [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010]. Ainsi, la probabilité des résultats expérimentaux sachant le modèle s'écrit :

$$\prod_k \left(p_n \left(\overline{P_k^{exp}} \mid P_k(a, b, c) \right) \right) \quad (4.17)$$

où a , b et c sont les paramètres du modèle, $p_n \left(\overline{P_k^{exp}} \mid P_k(a, b, c) \right)$ représente la probabilité de la valeur $\overline{P_k^{exp}}$ dans la distribution Gamma d'espérance $P_k(a, b, c)$ définie par l'équation

suivante :

$$p_n \left(\overline{P_k^{exp}} \mid P_k(a, b, c) \right) = \frac{\overline{P_k^{exp}}^{n-1} (n/P_k)^n}{(n-1)!} e^{-n\overline{P_k^{exp}}/P_k} \quad (4.18)$$

où n est le paramètre de forme et P_k/n le paramètre d'échelle de cette distribution Gamma. La régression a donc consisté à maximiser la probabilité de l'équation 4.17 en ajustant les paramètres (a, b, c) . Cette optimisation numérique est peu praticable dans la forme générale du maximum de vraisemblance. Nous allons voir ci-dessous qu'il existe des alternatives.

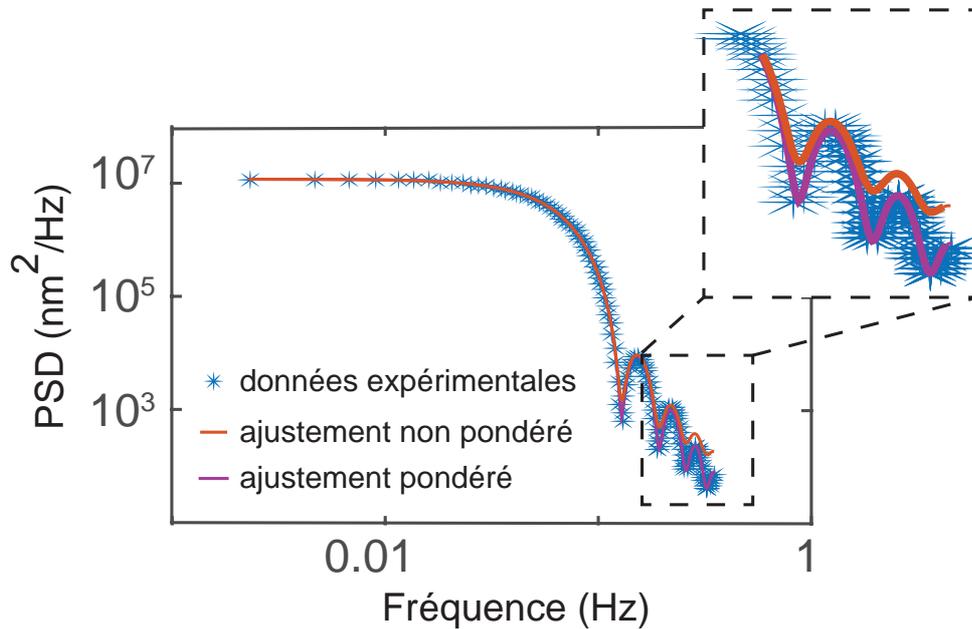


Figure II-11 – Illustration de la nécessité de la pondération. Les croix sont le spectre expérimental obtenu à partir des embryons non-traités ($N=16$, à 18°C) dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. La courbe orange est le résultat de l'ajustement avec une fonction des moindres carrés non pondérée. Seuls les points aux petites fréquences sont pris en compte de par leurs hautes amplitudes. La courbe violette est le résultat avec la pondération. La fenêtre est ici de 15 secondes.

Moindres carrés pondérés avec correction de biais comme une alternative plus efficace numériquement La méthode des moindres carrés pondérés (MCP), qui est un cas particulier de maximum de vraisemblance lorsque la distribution des erreurs expérimentales suit une distribution gaussienne, converge mieux et plus rapidement du point de vue de l'optimisation numérique¹. Norrelykke et Flyvbjerg [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010] proposent d'utiliser les moindres carrés pondérés dans le contexte de l'ajustement d'une densité spectrale de puissance. Ainsi, nous avons optimisé la fonction de coût χ^2

¹Opérations visant à minimiser la fonction de coût.

pour obtenir les estimations a_{mcp} , b_{mcp} et c_{mcp} .

$$(a_{mcp}, b_{mcp}, c_{mcp}) = \underset{\chi^2}{\operatorname{argmin}} \quad \text{avec} \quad \chi^2 = \sum_k \frac{\left(\overline{P_k^{exp}} - P_k\right)^2}{w_k^2} \quad (4.19)$$

avec w_k les poids attribués à chaque point expérimental. Toutefois, les estimateurs, qui en résultent sont biaisés. Il était nécessaire d'appliquer la correction suivante:

$$P_k(\check{a}, \check{b}, \check{c}) = \alpha P_k(a_{mcp}, b_{mcp}, c_{mcp}) \quad (4.20)$$

où $\check{a}, \check{b}, \check{c}$ sont les estimateurs corrigés et α est le facteur de correction du biais, qui dépend du choix des poids [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010]. Cette reformulation nous a donc permis d'utiliser les moindres carrés pondérés pour leur praticabilité numérique tout en conservant la rigueur de l'approche par maximum de vraisemblance.

Choix des poids dans l'approche des moindres carrés Le choix des poids qui ont servi à pondérer la fonction des moindres carrés était critique pour l'ajustement. Nous avons opté pour l'approche classique de pondération par les erreurs standards. Cependant, les estimateurs de variance utilisés pour obtenir l'estimation des erreurs standards sont peu fiables pour des petits effectifs comme c'est notre cas ($N < 10$). Ainsi, nous avons choisi de modéliser les erreurs standards. Connaissant les distributions des erreurs et en remarquant que le calcul des DFT via l'algorithme FFT a pour conséquence d'induire une erreur de 100 % de la valeur nominale pour les densités spectrales des embryons individuels [Berg-Sorensen and Flyvbjerg, 2004], il a été possible de modéliser les erreurs expérimentales. Norrelykke et al. ont de plus comparé numériquement les mérites de la modélisation des erreurs standards et de leur estimation : et il apparaît que sur de faibles effectifs tel $N = 8$, la modélisation était plus performante [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010] et les résultats sont peu différents de ceux obtenus avec l'estimateur. Nous avons donc utilisé la modélisation des erreurs dans ce travail avec :

$$w_k = P_k$$

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les différentes façons de calculer les poids de pondération de la fonction des moindres carrés vont modifier le facteur de correction du biais α . Dans le cas de la modélisation des erreurs standards, Norrelykke a montré que $\alpha = \frac{N}{N+1}$ [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010].

4.2.3 Estimation des erreurs standards sur les paramètres du modèle issus de l'ajustement et de la qualité de l'ajustement

Enfin, une fois que l'optimisation numérique a convergé, nous avons calculé les erreurs standards des paramètres obtenues. Pour cela, nous nous sommes basés de nouveau sur le travail de Norrelykke [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010], qui a proposé un calcul des erreurs sur les paramètres via une estimation de la matrice de covariance.

4.3 Implémentation

4.3.1 Reformulation du modèle pour une optimisation efficace

Modèle ABC Dans le paragraphe 4.1.3, nous avons discuté plusieurs représentations de la transformée de Fourier de notre modèle du second ordre. Si ces représentations sont équivalentes du point de vue de la physique, leurs efficacités pour permettre un ajustement diffèrent. Suivant Norrelykke et Flyvbjerg, nous avons utilisé la représentation dite *ABC* reproduite ci-dessous [Norrelykke and Flyvbjerg, 2010]:

$$P_f^{abc} = \frac{1}{a + bf^2 + cf^4} \quad (4.21)$$

En effet, ses coefficients sont indépendants d'une part, et d'autre part, dans la gamme de fréquences, qui nous intéresse, ils ont des ordres de grandeurs proches ; ainsi chacun impacte de manière égale le critère d'arrêt de l'optimisation (cf. section 4.3.1.1). Nous souhaitons convertir ensuite les résultats de la régression dans une représentation facilitant l'interprétation, d'où ces fonctions de passage (Eq. 4.24) :

$$K = 2kT \frac{\sqrt{a(b + 2\sqrt{ac})}}{\pi} \quad f_c = \sqrt{\frac{a}{b + 2\sqrt{ac}}} \quad (4.22)$$

$$G = kT \frac{b + 2\sqrt{ac}}{\pi^2} \quad D = \frac{\pi^2}{b + 2\sqrt{ac}} \quad (4.23)$$

$$I = kT \frac{\sqrt{c(b + 2\sqrt{ac})}}{2\pi^3} \quad f_0 = \sqrt{\frac{b + 2\sqrt{ac}}{c}} \quad (4.24)$$

De plus, nous souhaitons obtenir une estimation de l'erreur standard sur chaque paramètre. Ainsi, le passage vers une autre représentation s'est effectuée en propageant les erreurs via la formule :

$$\sigma^2(z(a, b, c)) = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 (cov(a, b, c))_{i,j} * (\partial z)_{i,j} \quad (4.25)$$

avec

$$\text{cov}(a, b, c) = \begin{pmatrix} (\Delta a)^2 & \Delta a \Delta b & \Delta a \Delta c \\ \Delta a \Delta b & (\Delta b)^2 & \Delta b \Delta c \\ \Delta a \Delta c & \Delta c \Delta b & (\Delta c)^2 \end{pmatrix}$$

et

$$\partial z = J_z^t \cdot J_z = \begin{pmatrix} \partial_a^2 z & \partial_a z \partial_b z & \partial_a z \partial_c z \\ \partial_b z \partial_a z & \partial_b^2 z & \partial_b z \partial_c z \\ \partial_c z \partial_a z & \partial_c z \partial_b z & \partial_c^2 z \end{pmatrix}$$

où J_z est la matrice jacobienne de z $\partial_a z = \partial z / \partial a$ la dérivé partielle de z par rapport à a et de même pour b et c , et z étant successivement les paramètres K, G, I, f_c, f_0 et D .

Optimisation sous contraintes par les Lagrangiens augmentés Toutefois, la formulation du modèle ABC est plus générale que notre modèle initial. Ainsi, nous souhaitons imposer des contraintes afin de rester dans les limites de notre modèle initial. En effet, le domaine supplémentaire n'a pas *a priori* de sens physique dans notre cas. Ainsi, nous avons imposé que les modules des différents éléments mécaniques du modèle soient positifs ou nuls, soit:

$$K \in \mathbb{R}_+^* \qquad G \in \mathbb{R}_+^* \qquad I \in \mathbb{R}_+^* \qquad (4.26)$$

$$(4.27)$$

ce qui est équivalent à

$$a > 0 \qquad b + 2\sqrt{ac} > 0 \qquad c > 0 \qquad (4.28)$$

La méthode des Lagrangiens augmentés permet d'ajouter une pénalisation à la fonction de coût afin d'imposer ces contraintes «molles» sur les paramètres. Ce choix était motivé par les difficultés que les contraintes «dures» font peser sur la convergence. La contre partie est la nécessité d'ajuster le poids associé aux contraintes par itérations avec ajustement du modèle à chaque étape. La nouvelle fonction de coût était ainsi :

$$\begin{aligned} f^{cout} = \chi^2 + \rho & \left(\max \left(0, \frac{\lambda_a}{2\rho} + \frac{a}{|a|} \right) \right. \\ & + \max \left(0, \frac{\lambda_b}{2\rho} + \frac{b + 2\sqrt{ac}}{|b + 2\sqrt{ac}|} \right) \\ & \left. + \max \left(0, \frac{\lambda_c}{2\rho} + \frac{c}{|c|} \right) \right) \end{aligned} \qquad (4.29)$$

où χ^2 est la fonction de coût initiale et les autres termes les contraintes «molles» avec λ_a , λ_b , λ_c et ρ calculés préalablement à l'ajustement :

$$\begin{aligned}\lambda_a(i) &= \max \left(0, \lambda_a(i-1) + 2\rho(i-1) \frac{a}{|a|} \right) \\ \lambda_b(i) &= \max \left(0, \lambda_b(i-1) + 2\rho(i-1) \frac{b + 2\sqrt{ac}}{|b + 2\sqrt{ac}|} \right) \\ \lambda_c(i) &= \max \left(0, \lambda_c(i-1) + 2\rho(i-1) \frac{c}{|c|} \right) \\ \rho(i) &= \begin{cases} 2\rho(i-1) & i > 1 \\ 1 & i = 1 \end{cases}\end{aligned}$$

avec i qui correspond à l'index d'itération des Lagrangiens augmentés. Ainsi, à chaque étape, (1) les contraintes étaient calculées et (2) l'optimisation / la régression était faite avec la fonction de coût augmentée ci-dessus (Eq. 4.29). La boucle des Lagrangiens augmentés s'arrêtait lorsque les résultats obtenus par la convergence de la fonction de coût n'évoluaient plus, cela étant fixé par l'équation suivante:

$$\left\| \frac{(a, b, c)_i - (a, b, c)_{i-1}}{(a, b, c)_{i-1}} \right\| < 10^{-6} \quad (4.30)$$

Imposer ces contraintes a eu un coût en terme de temps de calcul ; en effet après chaque mise à jour des paramètres des Lagrangiens augmentés nous réexécutons l'optimisation. Nous exposerons dans les sections suivantes (cf section 4.3.2) les adaptations faites en conséquence.

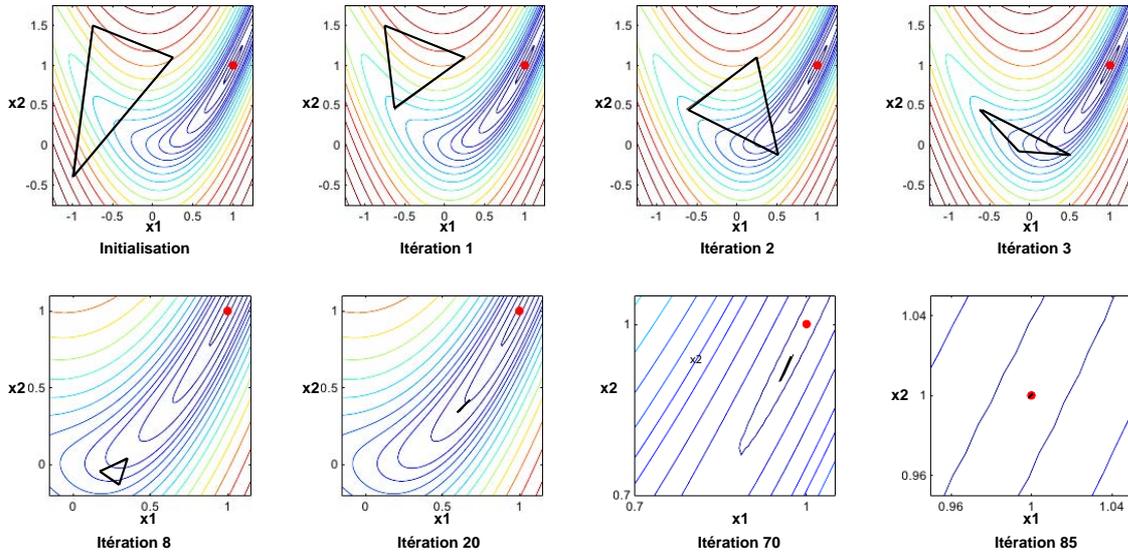
4.3.1.1 Algorithme d'optimisation et condition d'arrêt

Algorithme d'optimisation numérique Comme cela apparaît déjà, l'optimisation numérique nécessaire à la régression a été délicate à plusieurs titres : elle a dû être précise à cause de l'étalement des données, mais aussi performante d'autant plus que nous utilisons les Lagrangiens augmentés. Dans le vaste choix d'algorithmes, nous avons testé les algorithmes du simplexe et de Newton. Nous avons choisi ces deux algorithmes pour leur simplicité d'implémentation dans *matlab*, mais également pour leur complémentarité, l'algorithme simplexe étant très robuste et celui de Newton étant très précis.

En pratique, pour la méthode du simplexe, nous avons utilisé la fonction *fminsearch* pour minimiser la fonction de coût avec l'algorithme de «Nelder-Mead Simplex» [Nelder and Mead, 1965]. Cet algorithme calcule un simplexe¹ autour des valeurs initiales puis le

¹objet géométrique clos le plus simple à n dimensions, à une dimension le simplexe est une droite à deux dimensions, un triangle et à trois dimensions un tétraèdre.

A) Convergence de l'algorithme du Simplexe



B) Convergence de l'algorithme de Newton

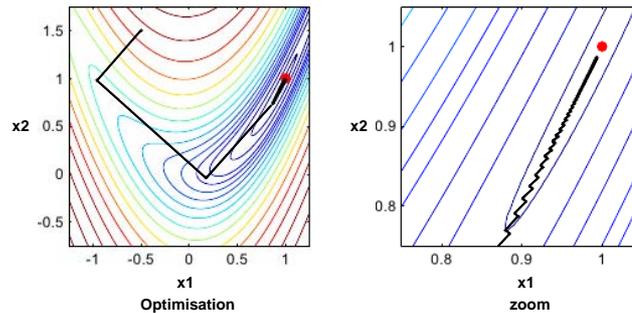


Figure II-12 – Exemple d’ajustement avec les algorithmes du simplexe et de Newton, sur la fonction de Rosenbrock $f(x_1, x_2) = (1 - x_1)^2 + \alpha(x_2 - x_1^2)^2$ avec $\alpha = 10$ pour les illustrations. Les lignes de couleurs représentent les lignes de niveau de la fonction de Rosenbrock: les maxima sont les lignes rouges et les minima les lignes bleues. Le point rouge représente le minimum de la fonction et est égal à $x_1 = 1$ et $x_2 = 1$. A) Ajustement avec l’algorithme du simplexe : Le simplexe noir indique le résultat de l’optimisation numérique. De bas en haut et de gauche à droite, la figure montre les différentes valeurs atteintes par l’ajustement au cours des itérations jusqu’à l’optimisation finale. Sur la partie basse, les graphiques ont été zoomés pour voir les nombreuses itérations en approche de la position optimale. B) Ajustement avec l’algorithme de Newton. La figure de gauche montre l’optimisation avec le "parcours" du résultat de l’optimisation au cours des itérations en noir, alors que la figure de droite est un zoom sur les dernières étapes de l’optimisation. (Adaptée de [Brunet, 2010])

déforme, le translate jusqu’au point où les sommets se rapprochant, il minimise localement la fonction de coût (Fig. II-12). Cet algorithme possède l’avantage d’être robuste et stable,

4.3. IMPLÉMENTATION

et n'a pas besoin du calcul des dérivées pour fonctionner. L'algorithme de Newton est à l'inverse réputé plus précis dans sa valeur finale ; de plus, sa convergence vers l'optimum a été formellement démontrée. Toutefois il nécessite le calcul des gradients suivant les différentes directions et ainsi converge vers le minimum. En imaginant la fonction de coût comme un plan 3D avec des vallées et des bosses, l'algorithme de Newton va suivre la plus grande pente afin d'atteindre le fond de la vallée (Fig. II-12). Dans notre implémentation, nous avons calculé les dérivés analytiquement ce qui a un impact sur les performances. Il est assez aisé de se rendre compte que cet algorithme nécessite une bonne connaissance de la fonction de coût, car il est sensible aux minima locaux. Pour ces raisons et car les itérations avec l'algorithme de Newton sont plus lentes, nous avons conçu un scénario hybride : nous avons fait dans un premier temps une optimisation par l'algorithme du simplexe afin de nous rapprocher du minimum global de la fonction de coût. Ensuite, nous utilisons cette première optimisation pour initialiser la seconde optimisation cette fois-ci avec l'algorithme de Newton. Ce scénario nous permettait de minimiser les risques de converger vers un minimum local et également de minimiser le nombre d'itérations nécessaires à l'algorithme de Newton. Nous avons comparé les résultats obtenus par cette approche avec ceux obtenus par l'algorithme du simplexe seul (Fig. II-13).

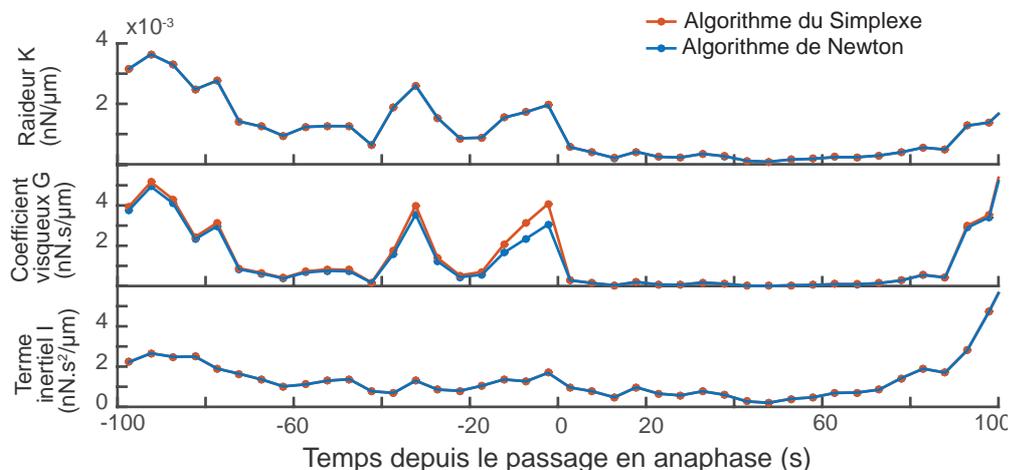


Figure II-13 – Comparaison des résultats entre les algorithmes du simplexe et de Newton. La courbe orange est le résultat obtenu par l'algorithme du simplexe et la courbe bleue celui obtenu avec l'algorithme de Newton.

En conclusion, en l'absence de gain significatif apporté par le raffinement en utilisant l'algorithme de Newton, nous avons effectué les optimisations avec l'algorithme du simplexe seul.

Condition d'arrêt Un aspect important pour assurer une estimation rigoureuse par régression est la condition testée à chaque itération pour décider à quel moment l'optimisation numérique a convergé. Les ordres de grandeurs typiques que nous obtenons pour un ajustement sur des embryons non traités sont $a \sim 10^8 \text{ nm}^{-2}.\text{Hz}$, $b \sim 10^{16} \text{ nm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ et $c \sim 10^{17} \text{ nm}^{-2}.\text{Hz}^{-3}$, et nous avons comparé l'évolution des valeurs des paramètres libres (a, b, c) entre deux itérations successives et lorsque cette variation était inférieure à 5×10^{-10} , l'optimisation s'arrêtait. Une deuxième condition d'arrêt était également une tolérance dans la variation de la valeur de la fonction de coût qui est typiquement autour de 1, si la variation était inférieure à 5×10^{-10} alors l'optimisation s'arrêtait. Au-delà des conditions d'arrêts, le nombre d'itérations était limité à 5000, et lorsque cette valeur était atteinte avant la condition d'arrêt, la régression était marquée échouée et le résultat non considéré.

Exemple d'ajustement Grâce à cette implémentation, nous avons pu réaliser les ajustements des spectres expérimentaux par le modèle convolué. Dans un premier temps nous avons réalisé l'analyse avec une grande fenêtre utilisée pour l'étude du positionnement du fuseau lors de la métaphase, comme montré par exemple sur la figure II-14. Enfin, lorsque la fenêtre est plus petite afin de nous placer dans un contexte de stationnar-

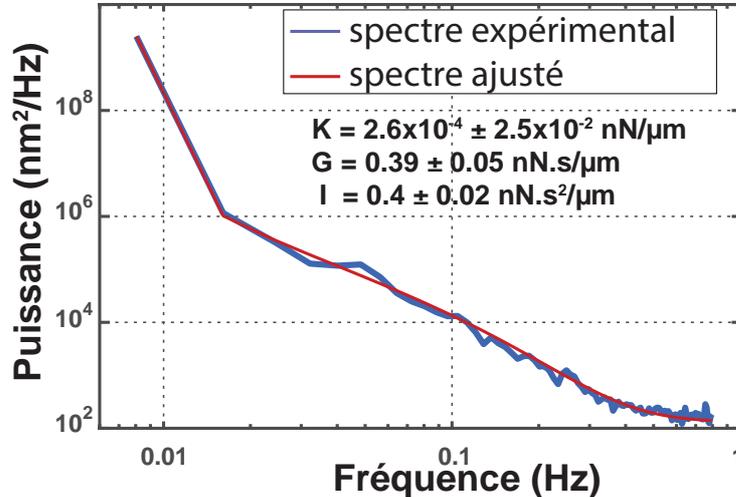


Figure II-14 – Ajustement du spectre expérimental de fluctuation de longueur du fuseau mitotique d'embryons non traités (courbe bleue) dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline ($N=16$, à $T=18^\circ\text{C}$), avec une fenêtre temporelle de 4096 points en métaphase. Le résultat de cet ajustement est indiqué en rouge avec la raideur du ressort égale à $2.69.10^{-7} \text{ N/m}$, le frottement visqueux égal à $3.95.10^{-4} \text{ N.s/m}$ et l'élément inertiel égal à $4.02.10^{-4} \text{ N.s}^2/\text{m}$.

ité faible lors de l'analyse du fuseau sur toute la division, l'ajustement reste performant

(Fig. II-15). La dernière section de ce chapitre va mettre en lumière l'implémentation

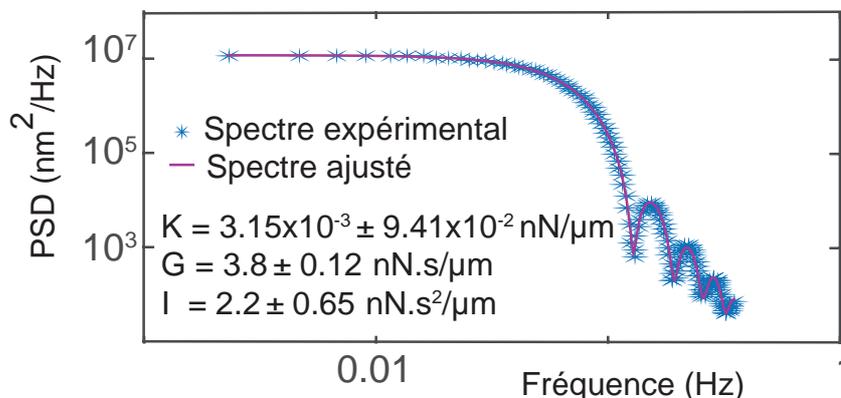


Figure II-15 – Ajustement du spectre expérimental obtenu par l'analyse des fluctuations de longueur de $N=16$ embryons non-traités où les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline à $T=18^\circ\text{C}$ (croix bleues). Ajustement par la mécanique du fuseau sur une fenêtre temporelle 512 points (courbe violette), par le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie. Le résultat de cet ajustement est : la raideur du ressort égale à $3.15 \cdot 10^{-3} \text{ nN}/\mu\text{m}$, le frottement visqueux égal à $3.8 \text{ nN}\cdot\text{s}/\mu\text{m}$ et l'élément inertiel égal à $2.2 \text{ nN}\cdot\text{s}^2/\mu\text{m}$.

du calcul scientifique afin d'accélérer le calcul de l'ajustement et que nous gardions une souplesse sur les modèles à étudier.

4.3.2 Automatisation et performance.

Dans l'utilisation de cette méthode, nous souhaitons garder la possibilité de modifier le modèle par lequel nous ajustons les spectres. Par exemple, basé sur l'analyse de la mécanique des grandes déformations du fuseau dans les extraits de Xénopes, Takagi et co-auteurs ont proposé un modèle Zener que nous avons voulu tester [Takagi et al., 2013] (cf section 2.2.4.2). Cela fut possible grâce à l'automatisation du codage du modèle via l'utilisation d'un logiciel de calcul formel. Par ailleurs, nous avons pris soin dans l'implémentation d'envisager le calcul des optimisations numériques via le calcul massivement parallèle pour rendre les Lagrangiens augmentés praticables et permettre l'analyse de conditions diverses (perturbations génétiques) dans des délais raisonnables.

4.3.2.1 Automatisation des fonctions de calcul

Afin de réaliser ce premier objectif nous avons identifié les étapes clés du calcul et j'ai opté pour l'alternative d'utiliser un logiciel de calcul formel, en l'occurrence *mathematica*. Moyennant l'écriture d'un court script reprenant les étapes du calcul identifiées précédemment, ce logiciel permet l'élaboration rapide de la formule analytique de la convolution

discrète de la fenêtre de Hann "glissante" avec le modèle biophysique (Eq. 4.16) et la génération automatique du code source nécessaire à l'ajustement et au calcul des erreurs sur les paramètres. La convolution à la volée nécessaire ici est un calcul complexe ; afin de minimiser la taille des variables stockées dans la mémoire centrale nous avons séparé le calcul des parties imaginaires et réelles afin de travailler avec des nombres réels doubles pour lesquels les performances sont bien supérieures aux valeurs de type complexe. De plus, nous avons disjoint le modèle physique interprétatif des modèles utilisés pour la régression elle-même (cf section 4.3.1) ; ainsi nous avons donc écrit un autre script permettant de générer les fonctions de passage d'une représentation à une autre. Ce script gère aussi la propagation des erreurs. Une telle approche au delà de la facilité qu'elle offre pour changer de modèle d'ajustement diminue les risques d'erreurs de calcul inhérents au calcul à la main.

4.3.2.2 Calcul massivement parallèle.

Approche du calcul massivement parallèle L'optimisation numérique nécessaire ici a impliqué des calculs intensifs. Nous avons réduit la gamme de fréquences, sur laquelle porte l'optimisation à l'intervalle $f[0 - 0.35]$ Hz, car au-delà le bruit de détection domine. La borne supérieure de cette intervalle nous prévient d'ajuster des données dominées par le bruit, mais limite l'ajustement du terme inertiel lorsque celui-ci est faible. Toutefois, cela impliquait 49 millions d'évaluations individuelles du modèle car la convolution est calculée à la volée et comprend deux sommes imbriquées (cf section 4.2.1). Ainsi, sur une station de travail performante, cela représentait environ deux heures de calcul par itération une fois le code optimisé. L'algorithme met en général 200 à 300 itérations pour converger, et nous répétions cela sur typiquement 84 pas de temps (les différentes positions de la fenêtre temporelle). Cela aurait résulté en un ajustement d'une durée de quatre ans et demi. Le modèle étant déjà relativement simple, nous n'avons pas privilégié de le simplifier, mais plutôt d'opter pour du calcul massivement parallèle.

En effet, les processeurs graphiques actuels offrent des capacités de calcul suffisantes vis-à-vis de notre problème pour un coût, qui reste modéré. Chaque membre de la somme apparaissant dans le calcul de la convolution étant indépendant, nous avons pu les calculer de manière parallèle et sommer le tout à la fin. Les calculs en eux-mêmes restant très simples, nous avons tiré profit du développement des processus graphiques (GPU) développés pour les jeux vidéo sur consoles et ordinateurs. Originellement conçus pour le calcul des graphismes, ils sont capables d'un grand nombre d'opérations d'algèbre linéaire en parallèle (sur chaque partie de l'image). La restriction à des opérations simples est la clef de leur efficacité à moindre coût. Nous avons ainsi utilisé initialement une carte Nvidia tesla C1060, comprenant 240 cœurs puis deux cartes Nvidia titan black de 2880

cœurs. Cela a ramené notre temps de calcul à ~ 2 heures pour une optimisation. Bien que la plateforme de développement *matlab* nous facilite la tâche, le code a dû être reformulé pour s'adapter à ce type de calcul.

Implementation du calcul massivement parallèle La programmation «massivement parallèle» vise à limiter les transferts de données entre la mémoire centrale de l'ordinateur et la mémoire dédiée au GPU d'une part et d'autre part à éviter de faire des calculs sur des nombres complexes. En effet, ces derniers sont beaucoup plus lents, bien au-delà de 2 fois le temps de calculs sur des réels (codés en nombre flottant à double précision). Il n'était pas possible de transférer l'ensemble des données dans la mémoire du GPU. En effet, ces processeurs bénéficient de mémoire à très haut débit (typiquement 4 fois plus que la mémoire centrale), mais en quantité limitée. Les DFT sont a priori complexes et ainsi apparaissent comme tels dans le calcul de la convolution à la volée. Pour n'utiliser que des réels, nous avons décidé d'effectuer le calcul de la convolution en quatre parties. D'abord, nous avons calculé la partie réelle et la partie imaginaire du dénominateur et du numérateur du modèle séparément pour chaque membre de la somme. Ces parties ont ensuite été recombinaées pour donner le résultat final.

L'utilisation de calcul massivement parallèle a permis de combiner notre analyse avec des approches de types «gènes candidats» tout en gardant des temps de calcul raisonnables.

4.4 Conclusion

Nous avons vu que dans le champ disciplinaire qui s'intéresse à la mécanique du fuseau mitotique, il manquait un outil capable de l'analyser sans le perturber. En nous basant sur la vidéo microscopie, nous avons comblé ce manque. Le second point crucial était dicté par l'évolution temporelle du fuseau mitotique au cours de la division. En effet, nous avons vu dans la littérature que la longueur seule du fuseau ne permettait pas de discriminer entre différents modèles et de suggérer un comportement unique. Ainsi, pour analyser la dynamique du fuseau nous avons exploité les fluctuations de longueur du fuseau et avons choisi de les analyser par les transformées de Fourier. Pour tenir compte de la perpétuelle évolution du fuseau au cours de la division, nous avons décidé d'appliquer la méthode des fenêtres glissantes et ainsi pu obtenir une caractérisation dépendante du temps.

Cela nous a permis d'analyser les fluctuations du fuseau ; cependant un simple spectre de fluctuations paraissait insuffisant pour permettre une réelle compréhension du comportement mécanique du fuseau mitotique. C'est pourquoi nous avons récapitulé ce spectre par une modélisation avec quelques paramètres. Cela va nous permettre d'étudier le

fuseau dans différentes conditions et de comprendre les influences des différents acteurs du fuseau sur son comportement général. Dans le chapitre suivant, nous détaillons les résultats obtenus à l'aide de cet outil.

Partie III

Résultats : validation et application au
fuseau mitotique

Chapitre 5

Validation et calibration de l'analyse S3

L'analyse S3 nous a permis d'étudier le fuseau mitotique dans des conditions quasi physiologiques. Les résultats ont été récapitulés dans un modèle afin de permettre une meilleure interprétation. Toutefois, au préalable, nous avons validé que les fluctuations du fuseau mitotique *in vivo* étaient bien le reflet de sa dynamique, de son activité biologique en d'autres termes, et non d'artefacts des outils biologiques ou physiques utilisés pour son investigation. Ensuite, d'une part, j'ai testé plus en profondeur le comportement de la méthode par des *expériences numériques* et d'autre part, nous avons établi que les résultats obtenus permettent bien de conclure sur le comportement du fuseau à l'échelle cellulaire et ainsi d'en apprendre davantage sur la mécanique du fuseau mitotique lors de la mitose.

5.1 Les fluctuations de longueur du fuseau mitotique sont correctement récapitulées par un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie

5.1.1 Les fluctuations de longueur du fuseau sont d'origine biologique

Nous souhaitons nous assurer de l'origine biologique des fluctuations qui sont au centre de notre outil d'analyse. Une quantification rapide des fluctuations par le calcul de l'écart type de la longueur du fuseau donne $0.8 \mu\text{m}$ pour les 16 embryons de *C. elegans* non-traités imagé à 18°C et dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Au vu de la petitesse de cette valeur, nous avons en premier lieu vérifié que les fluctuations étaient bien causées par l'activité biologique de la cellule et non par un artefact d'imagerie, de traitement ou encore par une cause externe (par exemple, une vibration du bâtiment due

au passage à proximité de trains). Pour cela, nous avons choisi d'appliquer notre outil S3 à des embryons fixés (cf annexe - A.1.4), afin de réticuler l'ensemble des protéines de la cellule et ainsi supprimer complètement les micro fluctuations dues aux mouvements des structures subcellulaires les unes par rapport aux autres. Nous avons alors suivi les trajectoires des centrosomes marqués via une GFP fusionnée à la γ -tubuline (GFP::TBG-1) dans des embryons fixés. Nous avons imagé à 18° C et pratiqué l'analyse S3, avec une taille de fenêtre de 4096 points (124 s). En effet, ce choix permet de maximiser la sensibilité et est adapté à une situation où nous n'attendons pas d'évolution du système sur des temps longs. Nous avons comparé le spectre obtenu pour les embryons fixés avec celui d'embryons vivants marqués, acquis et analysés dans des conditions identiques (Fig. III-1). Dans la gamme de fréquences d'intérêt, correspondante *a priori* à des fluctuations

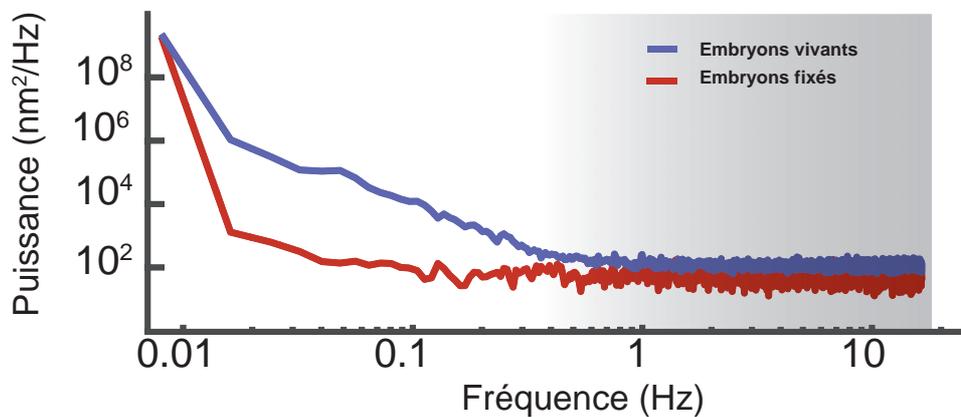


Figure III-1 – Comparaison des densités spectrales de puissance pour N=9 embryons fixés et N=16 embryons vivants dans les mêmes conditions expérimentales soit T= 18°C et d'analyse. La courbe bleue correspond au spectre obtenu pour l'étude des fluctuations d'embryons vivants et la courbe rouge le spectre obtenu avec les embryons fixés. Les spectres correspondent aux transformées de Fourier discrètes des trajectoires convoluées avec celle de la fenêtre de Hann de 4096 points soit 124 s. La zone grisée correspond aux grandes fréquences dominées par le bruit de détection (voir section 4.1.1).

d'origine biologique et située entre 0.02 Hz et 0.35 Hz (cf section 3.2.3), nous avons observé que le spectre obtenu par l'analyse des cellules vivantes est situé 2 à 3 décades au dessus de celui des cellules fixées. Cela suggère que les fluctuations proviennent bien d'un processus biologique. Pour les fréquences inférieures à la borne inférieure de cet intervalle, les deux courbes se rejoignent comme attendu car les spectres sont dominés par la contribution de la fenêtre (Hann, sur 4096 points / 124 s). Pour les fréquences supérieures à l'intervalle d'intérêt, les plateaux sont là aussi identiques dans les deux conditions expérimentales ; cela était attendu car ce plateau provient du bruit de l'algorithme de détection et de suivi

des centrosomes ; sa valeur nous renseigne sur la précision de l'algorithme. Nous avons conclu que la sensibilité de notre méthode est suffisante pour détecter les fluctuations de la longueur du fuseau au dessus des bruits de mesures. Ainsi les fluctuations sont d'origine biologique. La méthode S3, basée sur ces fluctuations, apparait un point d'entrée d'intérêt idéal pour approcher la mécanique du fuseau mitotique.

5.1.2 Influence du marquage des centrosomes

Notre étude de la dynamique du fuseau mitotique se fait via les mouvements des centrosomes qui sont eux mêmes dynamiques. En effet, du matériel péri-centriolaire est recruté tout au long de la mitose, tout du moins chez l'embryon du nématode *C. elegans* [Decker et al., 2011]. Par ailleurs, lors de nos études utilisant la méthode S3, nous avons utilisé deux marquages : celui déjà mentionné de la γ -tubuline via la (sur)expression d'un transgène *gfp::tbg-1* intégré sous un promoteur fort et ubiquitaire *pie-1* (souche TH27 [Hannak et al., 2002]) ; celui de SPD-2, une protéine impliquée dans la duplication et la maturation des centrosomes orthologue de la protéine humaine CEP192 [Oegema and Hyman, 2006], via l'expression d'un transgène *spd-2::gfp* intégré sous son promoteur endogène (souche TH231 [Pelletier et al., 2004; Kemp et al., 2004]). Ainsi, nous nous sommes interrogés sur l'influence du marquage utilisé sur notre analyse. Nous avons comparé les spectres de fluctuations du fuseau dans ces deux marquages, tout autres aspects identiques par ailleurs, en particulier la température lors de l'observation, 18°C. Nous avons utilisé des fenêtres d'une largeur de 512 points (15.5 s) (Fig. III-2).

Les résultats sont proches, suggérant une influence modeste du marquage. Nous observons toutefois deux moments, où les spectres diffèrent: à la toute fin de la métaphase et en anaphase tardive. Nous attribuons les différences observées très localisées en temps non pas à défaut de notre approche la rendant sensible au détail du marquage des pôles utilisé mais à des différences fonctionnelles entre la γ -tubuline et SPD-2 exacerbées par leur surexpression. Nous avons conclu, que le spectre observé reflétait la dynamique des éléments mécaniques, qui connectent les deux pôles, principalement le fuseau mitotique. En effet, à ce stade, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie du couplage entre les pôles, qui cause le spectre, vient de l'hydrodynamique du cytoplasme ou soit transmis par les microtubules astraux via la membrane cytoplasmique et le cortex d'actine-myosine qui la sous-tend (cf. section 4.1.1).

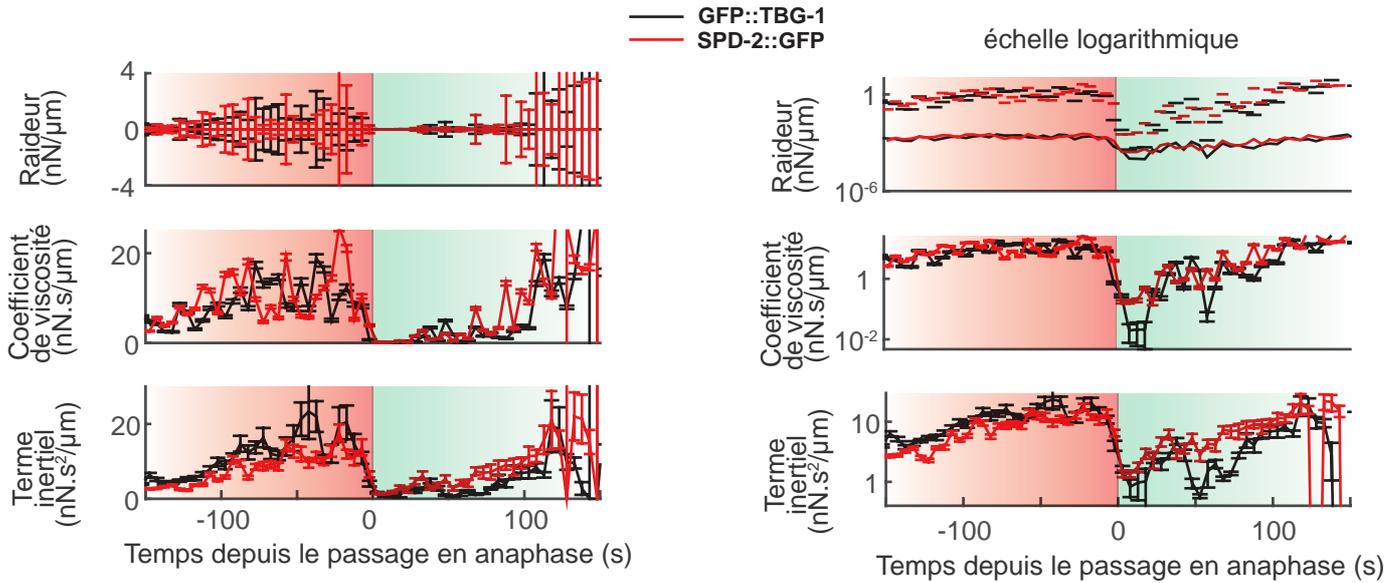


Figure III-2 – Analyse S3 de N=16 embryons marqués par GFP:: γ -tubuline (courbe noire) et N=18 embryons marqués par SPD-2::GFP (courbes rouge). Les résultats sont représentés après ajustement avec le modèle heuristique et interprétatif de Kelvin-Voigt avec inertie (cf. section II-10) ; ainsi, le panneau supérieur représente la rigidité du ressort, dénotée K , le panneau médian le module du frottement fluide, noté G , et le panneau inférieur l'inertie notée I , au cours du temps, représenté avec leurs barres d'erreurs (cf section 4.3.1). La métaphase est surlignée de rouge et l'anaphase de vert. La frontière entre les deux zones représente le début de l'anaphase, pris comme référence temporelle, et sur laquelle les trajectoires des différents embryons ont été alignées. Les courbes de droite sont les mêmes que celles de gauche représentées dans une échelle logarithmique pour mieux visualiser la raideur K .

5.1.3 Quel modèle pour récapituler la densité spectrale de puissance ?

Dans la section 4, nous avons discuté de l'opportunité d'utiliser un modèle comprenant un ressort, un amortisseur et un élément inertiel en parallèle (Fig. II-10) pour récapituler simplement les densités spectrales de puissance obtenues par l'analyse des fluctuations de la longueur du fuseau mitotique. Bien que ce modèle donne satisfaction et avant de l'utiliser pour tirer des conclusions sur la dynamique du fuseau mitotique, nous avons souhaité examiner un modèle alternatif utilisé par certains auteurs : le modèle Zener [Takagi et al., 2013].

5.1.3.1 Le modèle Zener et l'interprétation des grandes déformations

Takagi et ses co-auteurs ont étudié la relaxation du fuseau dans des extraits d'oeufs de Xénopes après avoir étiré le fuseau mécaniquement à l'aide d'un microcapillaire. Ils ont

5.1. LES FLUCTUATIONS DE LONGUEUR DU FUSEAU MITOTIQUE SONT CORRECTEMENT RÉCAPITULÉES PAR UN MODÈLE DE KELVIN-VOIGT AVEC INERTIE

modélisé la réponse mécanique à ces grandes déformations, typiquement de 10 % de la longueur nominale du fuseau à l'aide d'un modèle Zener. Dans le modèle Zener, il n'y a pas de terme inertiel mais un ressort additionnel venant limiter la contribution de l'élément de frottement fluide (Fig. III-3). En mécanique, un tel modèle est usuel pour approcher un «solide linéaire standard» tel un polymère fortement réticulé [Schmid-Schönbein et al., 1981] (cf. section 2.2.4.2). Tirant avantage de la facilité à tester un modèle alternatif

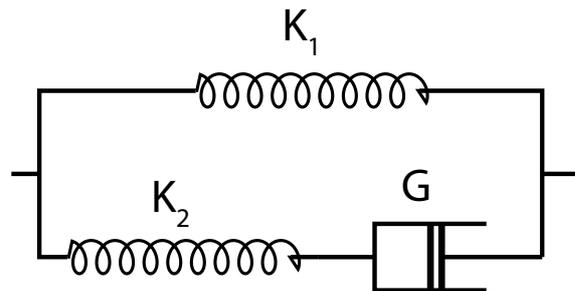


Figure III-3 – Schéma du modèle de Zener, K_1 est la raideur du ressort en parallèle du modèle de Maxwell, K_2 la raideur du ressort en série avec l'amortisseur de coefficient de viscosité G , ces deux derniers éléments formant le modèle de Maxwell.

dans la méthode S3 (cf. section 4.3.2), nous avons analysé nos résultats sur des embryons non-traités, dont les centrosomes ont été marqués via la γ -tubuline avec trois modèles distincts: le modèle de Zener, le modèle de Kelvin-Voigt et le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie.

Pour comparer l'utilisation des différents modèles nous avons tracé les évolutions des valeurs finales de la fonction de coût (Fig. III-4). Nous remarquons qu'il n'y a pas de différence entre les valeurs de la fonction coût pour l'utilisation du modèle Zener et du modèle de Kelvin-Voigt ; par contre nous observons que la valeur de la fonction de coût est plus faible lors de l'utilisation du modèle Kelvin-Voigt avec inertie principalement après le passage en anaphase. Nous avons conclu d'une part que le second ressort (K_2) dans le modèle de Zener n'apporte pas d'amélioration tandis que l'ajout d'une inertie capture mieux la mécanique du fuseau.

Nous reproduisons aussi l'évolution des paramètres issus du modèle de Zener en figure III-5. Nous pouvons noter que la variation des paramètres au cours de la métaphase et de l'anaphase est faible en comparaison de celle observée par l'utilisation du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie (Fig. III-16). Cela suggère une faible sensibilité aux évolutions du fuseau si on utilise le modèle de Zener. Enfin, l'ordre de grandeur de K_2 soit 104 N/m est très grand comparé à celui de K_1 environ 10^{-7} N/m. Cela suggère que le ressort en série de l'amortisseur joue un rôle mineur. En effet, lorsque ce ressort tend vers une

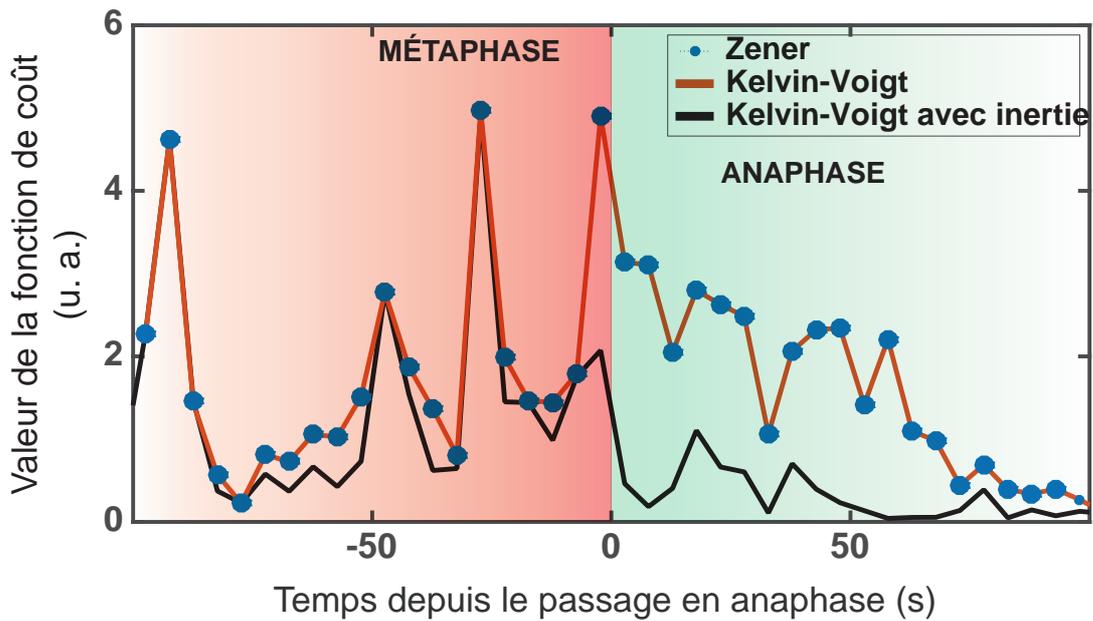


Figure III-4 – Valeurs de la fonction de coût pour l'ajustement des spectres du fuseau de $N=23$ embryons non-traités marqués par la GFP:: γ -tubuline et imagés à 23°C avec les modèles Zener (points bleus), Kelvin-Voigt (courbe orange) et Kelvin-Voigt avec inertie (courbe noire). La taille de la fenêtre était 512 points (15.5 s). La métaphase est représentée sur la figure par la zone rouge et l'anaphase par la zone verte, la frontière entre les deux zones est le début de l'anaphase, pris comme référence temporelle, et sur laquelle les trajectoires des différents embryons ont été alignées.

rigidité infinie, nous retrouvons le modèle de Kelvin-Voigt.

En conclusion, le modèle des Zener ne paraît pas approprié à l'étude des fluctuations de la longueur du fuseau. Il est probable que Takagi et ses collègues ont conclu à un comportement représenté par ce modèle car ils appliquaient de grandes déformations — menant toutefois le fuseau dans une configuration non physiologique. Ainsi, dans la suite de cette étude, nous récapitulerons les spectres à l'aide du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie.

5.1. LES FLUCTUATIONS DE LONGUEUR DU FUSEAU MITOTIQUE SONT CORRECTEMENT RÉCAPITULÉES PAR UN MODÈLE DE KELVIN-VOIGT AVEC INERTIE

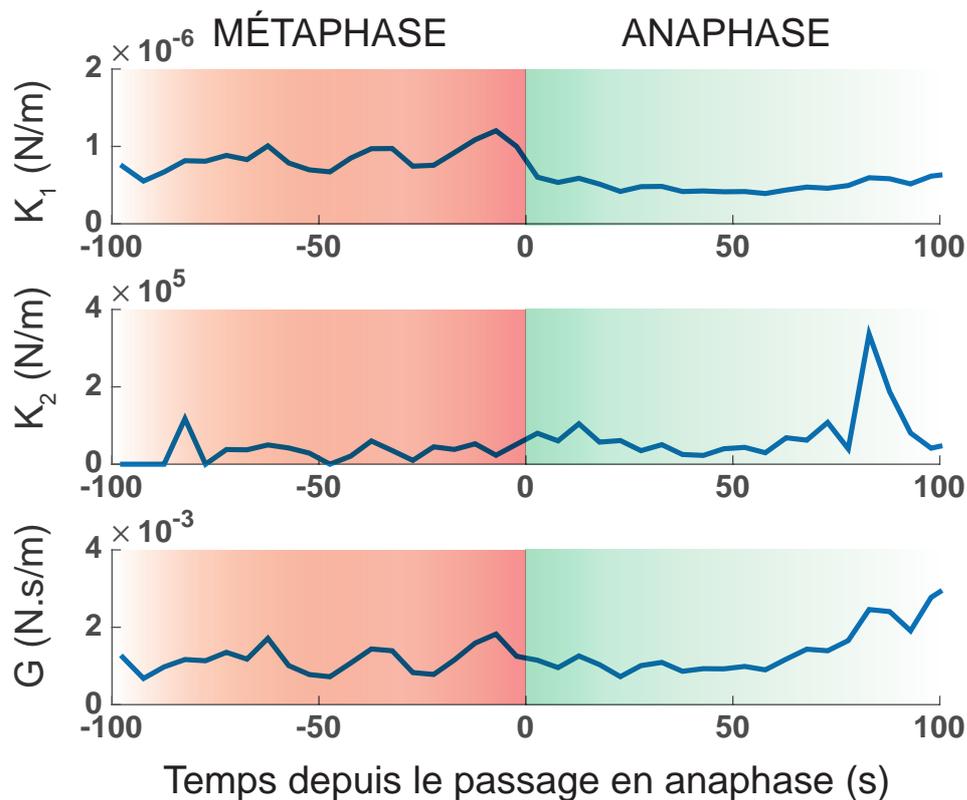


Figure III-5 – Paramètres obtenus par l’ajustement avec le modèle Zener du spectre de fluctuations de $N=23$ embryons non-traités marqués par la GFP:: γ -tubuline et imagés à 23°C . La taille de la fenêtre était 512 points (15.5 s). Le panneau supérieur représente la rigidité du ressort (K_1) au cours du temps, alors que les paramètres de l’élément composé d’un ressort (K_2) et d’un amortisseur (G) en série sont représentés respectivement dans les panneaux médian et inférieur. La métaphase est représentée sur la figure par la zone rouge et l’anaphase par la zone verte, la frontière entre les deux zones est le début de l’anaphase pris comme référence temporelle, et sur laquelle les trajectoires des différents embryons ont été alignées.

5.1.3.2 Calcul de la variance

Ayant maintenant identifié le modèle interprétatif, nous avons étudié à quel point l’analyse S3 récapitule la mécanique du fuseau. En effet, nous ne mesurons qu’une gamme de fréquences, sur laquelle se base le modèle d’une part et d’autre part l’analyse des fluctuations ne "sonde" que les petites déformations du fuseau (les petites perturbations autour de la position d’équilibre). Nous allons maintenant examiner ce premier point et reportons l’examen du second à la section 5.3.1. Pour ce faire, nous avons comparé la variance "totale" calculée sur la longueur du fuseau elle-même et la variance estimée par le modèle en l’intégrant sur toutes les fréquences. Étant donné que le fuseau évolue aux temps longs,

nous avons pratiqué cette comparaison sur des fenêtres glissantes de 512 points (15.5 s) identiques pour les deux calculs. Le résultat suggère que les variances obtenues par calcul direct et celles estimées via le modèle sont très proches (Fig. III-6). En métaphase précoce et anaphase tardive, l'adéquation est un peu moins satisfaisante. Toutefois, cela peut se comprendre par des changements structuraux du fuseau. Nous avons conclu que

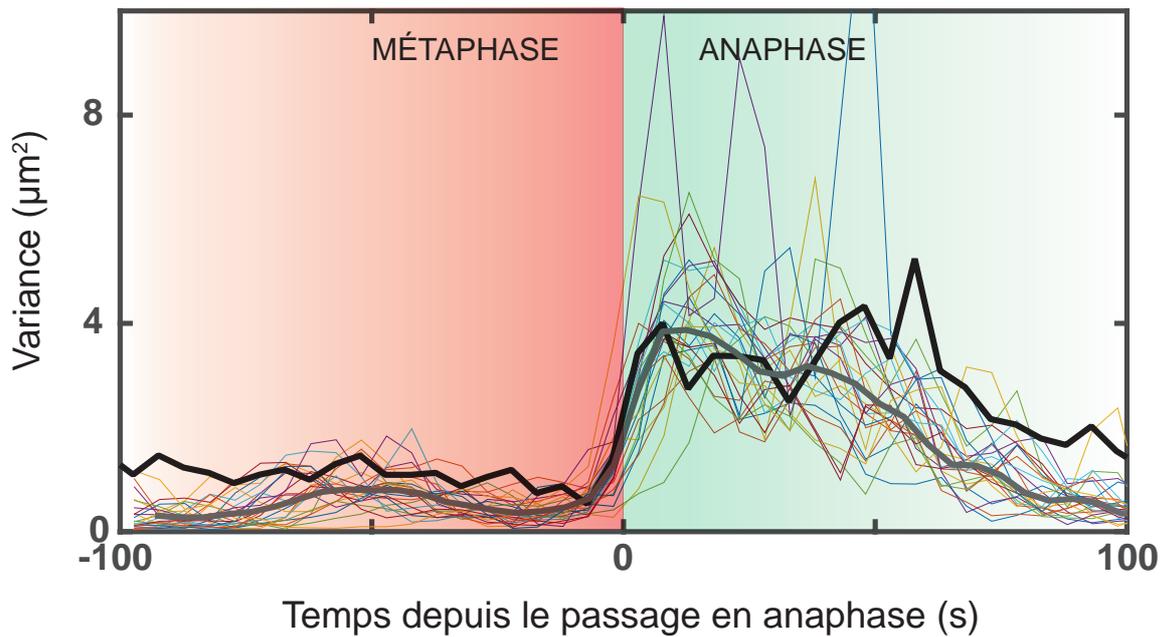


Figure III-6 – Comparaison des variances d'une part mesurées dans une fenêtre glissante sur la longueur du fuseau (courbes individuelles en traits fins de couleur, moyenne quadratique en trait épais et gris) et d'autre part estimée par intégration du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie ajusté sur les données (courbe noire). Les données sont les mêmes qu'à la figure III-16 et correspondent à $N=23$ embryons non-traités marqués via la GFP:: γ -tubuline imagés à 23°C . La métaphase est représentée sur la figure par la zone rouge et l'anaphase par la zone verte, la frontière entre les deux zones est le début de l'anaphase, pris comme référence temporelle et sur laquelle les trajectoires des différents embryons ont été alignées.

l'analyse S3 avec le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie récapitule de manière satisfaisante les fluctuations de la longueur du fuseau mitotique, ouvrant la voie à leur interprétation mécanistique.

5.2 Influence de la taille des fenêtres : caractérisation détaillée *versus* résolution temporelle

Nous avons vu précédemment dans la section 3.2.3, que le choix de la taille de la fenêtre de Hann est critique pour l'analyse. En effet, nous sommes confrontés au principe d'incertitude d'Heisenberg qui nous dit que nous ne pouvons pas être à la fois bien résolu en temps et en fréquence. Ainsi, une grande fenêtre sera précise en fréquence, permettant par exemple une meilleure précision sur le ressort mais pas en temps ne permettant pas l'analyse de la transition méta-anaphase. À l'inverse, une petite fenêtre sera précise en temps mais pas en fréquences. Comme nous nous intéressons seulement aux périodes de métaphase et d'anaphase (les seules où le fuseau mitotique est formé) et qu'elles durent au total environ 4 minutes à 18°C et 3 minutes à 23°C, nous avons testé trois tailles de fenêtres : 256 points, 512 points et 1024 points, qui correspondent respectivement à des durées de 7 secondes, 15 secondes et 30 secondes. Nous avons effectué l'analyse S3 avec ces différentes fenêtres sur le même échantillon d'embryons non-traités à 18°C dont les centrosomes sont marqués par la GFP:: γ -tubuline (Fig. III-7).. Nous remarquons que

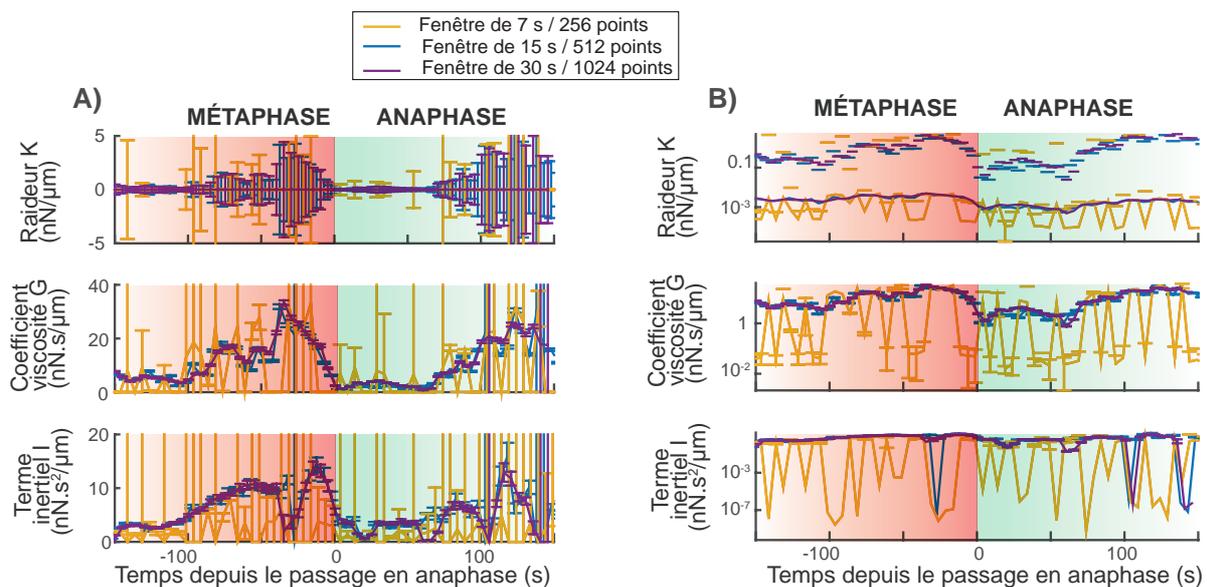


Figure III-7 – Analyse S3 de la longueur du fuseau de N=23 embryons non-traités dont les centrosomes étaient marqués par la GFP:: γ -tubuline à 23°C, utilisant 3 tailles de fenêtre. A) Les courbes jaunes correspondent à une fenêtre de 256 points (7 s), les courbes bleues correspondent à une fenêtre de 512 points (15 s) et les courbes violettes correspondent à une fenêtre de 1024 points (30 s). Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l'anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l'anaphase. B) Représentation logarithmique des résultats.

lorsque la fenêtre fait 256 points soit environ 7 secondes (courbes jaunes) les résultats ne sont plus du tout bien déterminés comme le montrent les grandes barres d'erreurs. Cela était attendu notamment car la fréquence de Rayleigh (dans ce cas $f_{Rayleigh} = 0.15$ Hz) limite la gamme de fréquences accessibles à un intervalle de 0.2 Hz. Par contre, il n'existe pas de grandes différences entre les résultats obtenus par une fenêtre de 512 points et celle de 1024 points en dehors de la métaphase tardive où le pic sur le coefficient de viscosité n'est pas résolu en temps. Cela est cohérent avec le lissage opéré par l'utilisation d'une fenêtre plus grande. La figure III-7-B permet de visualiser les mêmes résultats dans une échelle logarithmique. Lors de l'utilisation de la fenêtre de 256 points, nous remarquons alors de nombreux sauts qui montre une mauvaise détermination des paramètres.

Le meilleur compromis nous est apparu être la fenêtre de 512 points soit 15 secondes.

5.2.1 Analyse de l'optimisation numérique

Afin de renforcer notre conclusion en faveur d'une représentation correcte des fluctuations par le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie, nous avons vérifié avec quelle précision les paramètres du modèle sont déterminés par l'ajustement. Par ailleurs et comme suggéré dans la section méthode, un ajustement peut converger vers un minimum local qui ne représente pas la valeur la plus probable des paramètres du modèle (cf. section 4.2). Pour explorer cette problématique, nous avons calculé la valeur de la fonction de coût (dont la valeur doit être minimale au maximum global de vraisemblance des paramètres) pour une gamme de valeurs des paramètres autour de la valeur obtenue par l'ajustement et nous avons représenté le résultat sous forme d'un graphique où la valeur de la fonction de coût est codée par des couleurs, dite carte de convergence. Ces cartes permettent de déduire également à quel paramètre l'optimisation est la plus sensible et donc, à rebours, avec quelle précision l'ajustement détermine chaque paramètre. L'ajustement du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie se fait par l'intermédiaire de la représentation abc (cf. section 4.3.1). Nous avons fait varier les valeurs de a , b et c autour de leurs valeurs minimisant la fonction de coût. Les cartes ci-dessous sont des projections en deux dimensions pour chacun des paramètres, de la carte générale obtenue en trois dimensions.

La fonction de coût présente une vallée étroite en b , ce qui suggère que le module du frottement fluide est défini avec précision. Cela est cohérent avec le fait que la gamme de fréquences utilisée pour l'ajustement est centrée sur la région du spectre où le frottement fluide domine (Fig. II-10). De même, l'optimum de c se trouve dans une vallée plutôt resserrée et ainsi l'inertie est mesurée avec une bonne précision. Par contre, l'optimum de a se trouve dans une vallée très peu marquée. Cela se comprend puisque la région dominée par le ressort est aussi celle où s'étend la transformée de la fenêtre, et ce d'autant plus

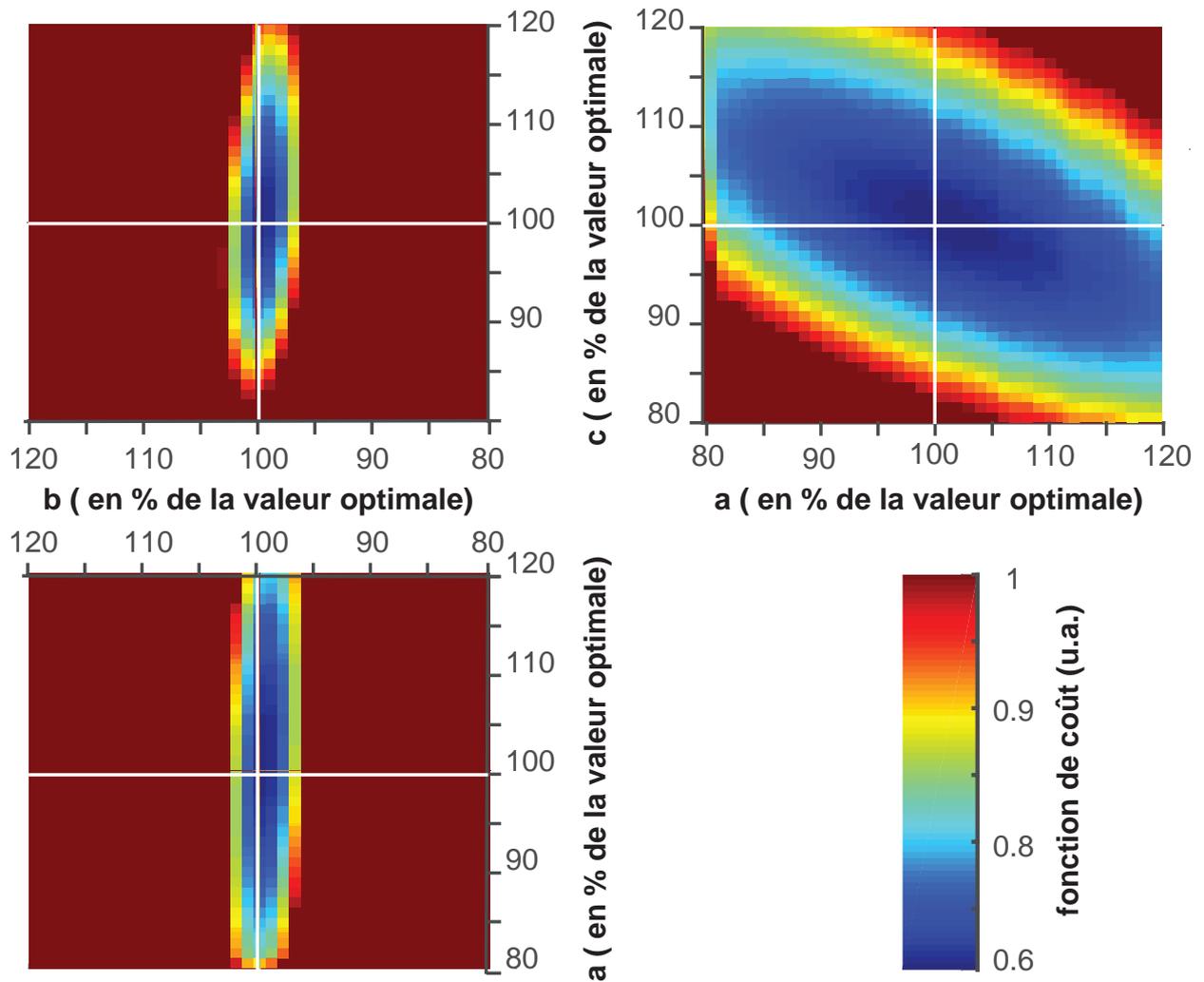


Figure III-8 – Cartes de convergence du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie dans la représentation abc . En haut à gauche, carte correspondant aux valeurs de la fonction de coût pour $a = 3.26 \times 10^4 \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}$, sa valeur optimale, b et c variant entre 80 % et 120 % de leur valeurs optimales. En haut à droite, carte correspondant aux valeurs de la fonction de coût pour $b = 1.15 \times 10^{13} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$, sa valeur optimale, a et c variant entre 80 % et 120 % de leurs valeurs optimales. En bas, carte correspondant aux valeurs de la fonction de coût pour $c = 2.76 \times 10^{14} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-3}$, sa valeur optimale, a et b variant entre 80 % et 120 % de leurs valeurs optimales. Les droites pointillées blanches représentent les valeurs optimales. Les données, sur lesquelles sont pratiqués les ajustements, sont les mêmes que celles utilisées pour les embryons non-traités de la figure III-12 et correspondent à $N=23$ embryons non-traités marqués via la GFP:: γ -tubuline imagés à 23°C .

que la fenêtre est étroite, conformément à l'inégalité d'incertitude (cf. section 3.2.3). Cela se retrouve sur la taille des barres d'erreurs qui reflètent ces différentes précisions. Nous avons conclu que notre ajustement se faisait correctement, sans problème de minima locaux et que la précision sur le frottement fluide et l'inertie sont bonnes quand celle sur le ressort est limitée en partie car nous faisons une analyse résolue en temps.

5.3 La caractérisation par les fluctuations rend bien compte de la mécanique du fuseau à l'échelle cellulaire

Nous avons établi, d'une part que l'analyse S3 de notre gamme de fréquences et son interprétation par un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie récapitulent bien les fluctuations de la longueur du fuseau *in vivo* au cours de la métaphase et de l'anaphase de la mitose. D'autre part, nous avons montré que les paramètres sont correctement définis lors de l'ajustement. Nous souhaitons donc maintenant explorer en quoi ce modèle nous permet de comprendre la mécanique du fuseau à l'échelle cellulaire.

5.3.1 Analyse de simulations d'élongation du fuseau mitotique

Les méthodes biologiques actuelles ne permettent pas de reconstituer *in vitro* un fuseau isolé aux composants mécaniques contrôlés et qui pourrait servir de référence pour tester la capacité de notre approche à retourner des valeurs connues des différents modules des composants mécaniques. Ainsi, nous avons opté pour des tests *in silico* en soumettant à notre outil des élongations de fuseau simulées numériquement. Il est clair qu'utilisant un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie dans la simulation, nous l'avons retrouvé lors de l'analyse S3. Notre questionnement a plutôt porté sur la capacité de la méthode à retrouver l'évolution temporelle des valeurs des composants décidant de son comportement à l'échelle cellulaire (macroscopique). Cette question prend un relief particulier considérant que l'analyse porte sur des mesures à l'échelle des fluctuations (microscopique).

Méthode de simulation

$$I_s(t) \frac{d^2 l(t)}{dt^2} + G_s(t) \frac{dl(t)}{dt} + K_s(t) l = \eta(t) + \sqrt{\xi} \delta(t) \quad (5.1)$$

Par la simulation numérique d'équation stochastique 5.1, nous avons créé des signaux à partir d'un modèle de Kelvin-Voigt avec inertie. Le membre gauche de l'équation modélise le comportement mécanique du fuseau alors que le membre droit modélise les

forces subites par le fuseau. Pour le membre de gauche nous avons fait évoluer dans le temps les paramètres de raideur du ressort K_s , du module de frottement fluide G_s et de l'inertie I_s . Le membre droit est la force appliquée au fuseau. La force stochastique η est simulée par un bruit blanc d'une variance égale à $k_B \check{T} G$ où k_B est la constante de Boltzmann et \check{T} la température effective est fixé à 2.3×10^5 K (cf. section 4.1.2) soit une variance de $\sim 10^{-20}$ N².s afin que les trajectoires obtenues soient le plus proche possible de nos observations biologiques. Nous avons aussi ajouté une force constante égale à 200 pN pour modéliser la force d'élongation appliquée aux pôles du fuseau par les microtubules astraux. Afin de mimer au mieux les signaux biologiques, nous avons ajouté un bruit blanc Gaussien de variance 5.10^{-15} m².s obtenue par l'observation du plateau final des spectres de fluctuation (cf. section 4.1.2). La simulation a été développée sous l'environnement *Matlab simulink* et est représentée sur la figure III-9. La résolution est faite par l'algorithme de Rosenbrock avec des pas de taille constante fixée à 0.03 s [Rosenbrock, 1963; Shampine and Reichelt, 1997]. Nous avons répété pour N=10 simulations indépendantes afin de reproduire les conditions expérimentales. Seulement le générateur de nombres aléatoires permettant de créer les bruits étant imparfait (il est extrêmement difficile de générer des nombres réellement aléatoires), il est alors important que les variations temporelles des paramètres du modèle n'interviennent pas exactement aux mêmes instants lors des différentes répétitions de la simulation. Les trajectoires ont ensuite été alignées temporellement sur un instant donné variable, comme nous le faisons pour les expériences sur le passage en anaphase.

Modulation des paramètres du fuseau Afin de tester la sensibilité de notre méthode S3 par cette technique *in silico*, nous avons fait varier les paramètres du modèle sur lequel nous effectuons l'optimisation, c'est à dire a , b et c . Seul les paramètres b et c varient dans nos simulations, nous avons laissé le paramètre a constant dans la mesure où nous avons précédemment remarqué que pour les valeurs, que nous obtenons sur les données biologiques, nous n'avons pas une bonne précision sur sa détermination. Les modulations sur b et c ne sont pas simultanées (Fig. III-10, courbes noires) pour observer si la méthode S3 est capable de récupérer non seulement la temporalité des changements, mais aussi leur amplitude. En introduisant ces paramètres au modèle de notre simulation décrite précédemment, nous avons alors généré 10 trajectoires *in silico*. Nous avons ensuite appliqué la méthode S3 sur ces trajectoires, ce qui nous a permis d'obtenir les évolutions temporelles des paramètres b et c (Fig. III-10-À, courbes bleues), et les représentations K , G et I (Fig. III-10-C, courbes bleues) et f_c , f_0 et D (Fig. III-10-B, courbes bleues).

Pour la représentation abc , modèle de l'optimisation, nous notons que la temporalité des changements des valeurs mesurées pour b et c est similaire à celle des valeurs d'entrée

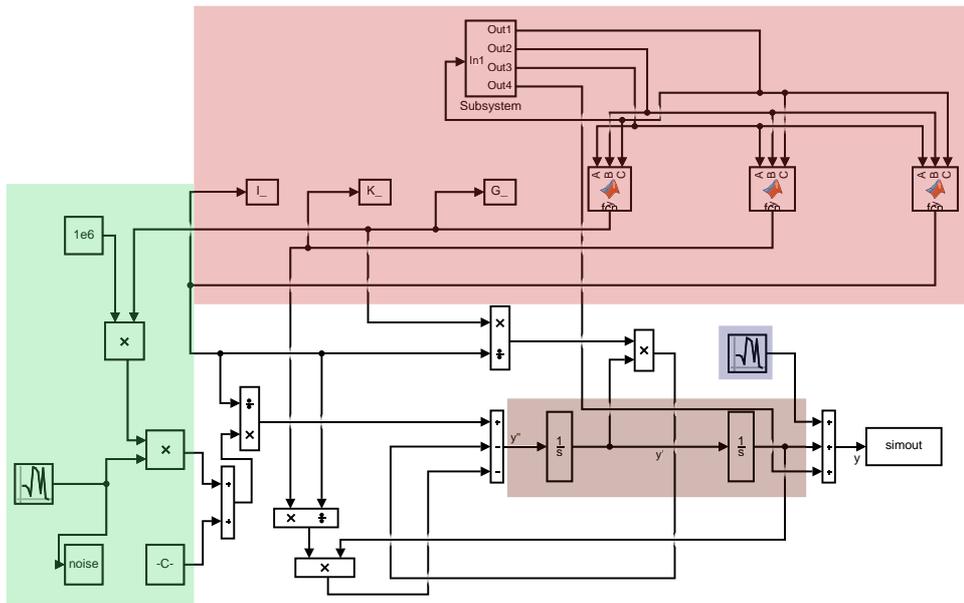


Figure III-9 – "Programme graphique" de simulation numérique (en langage *simulink*) générant des longueurs de fuseau mitotique simulées. La zone en rouge correspond aux paramètres du modèle de Kevin-Voigt avec inertie. La zone verte correspond à la génération du bruit stochastique d'attachement/détachement des acteurs du fuseau et la force constante représentant la force d'élongation du fuseau. Sur fond bleu se trouve le bruit blanc modélisant le bruit de détection visible sur le spectre comme un plateau aux hautes fréquences. Enfin, la zone en marron représente les deux intégrations successives, qui constituent le moteur de la simulation. Les fonctions de *matlab* sont regroupées dans des blocs et nous programmons la simulation en assemblant ces blocs graphiquement et en les paramétrant.

de la simulation, alors que le paramètre a reste constant comme attendu. Nous observons également que sur cette simulation les paramètres b et c ne varient pas au même instant et que cet écart est bien mesuré dans le résultat de la méthode S3 avec la chute de b entre +50 et +80 secondes et la chute de c entre -80 et -50 secondes. Concernant l'amplitude de ces variations, nous remarquons que la chute du paramètre c optimisé n'atteint pas la valeur mise en entrée de la simulation. Le fait que l'amplitude ne soit pas retrouvée peut s'expliquer par la zone du spectre qui est affectée par une modulation de c , en effet c'est la même zone que celle où le plateau final dû au bruit de détection commence à dominer, si le paramètre c chute trop bas alors nous ne sommes plus en mesure de le mesurer. Nous observons que la chute du paramètre b est surestimée par rapport à celle introduite en entrée de simulation et que cette chute semble influencer la détermination du paramètre c avec la présence d'une augmentation entre +50 et +80 secondes (Fig. III-10-À). L'influence des variations de b sur le paramètre c est attribuable à la modélisation de l'amplitude de bruit stochastique qui dépend de G et donc de b par la fonction de

5.3. LA CARACTÉRISATION PAR LES FLUCTUATIONS REND BIEN COMPTE DE LA MÉCANIQUE DU FUSEAU À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

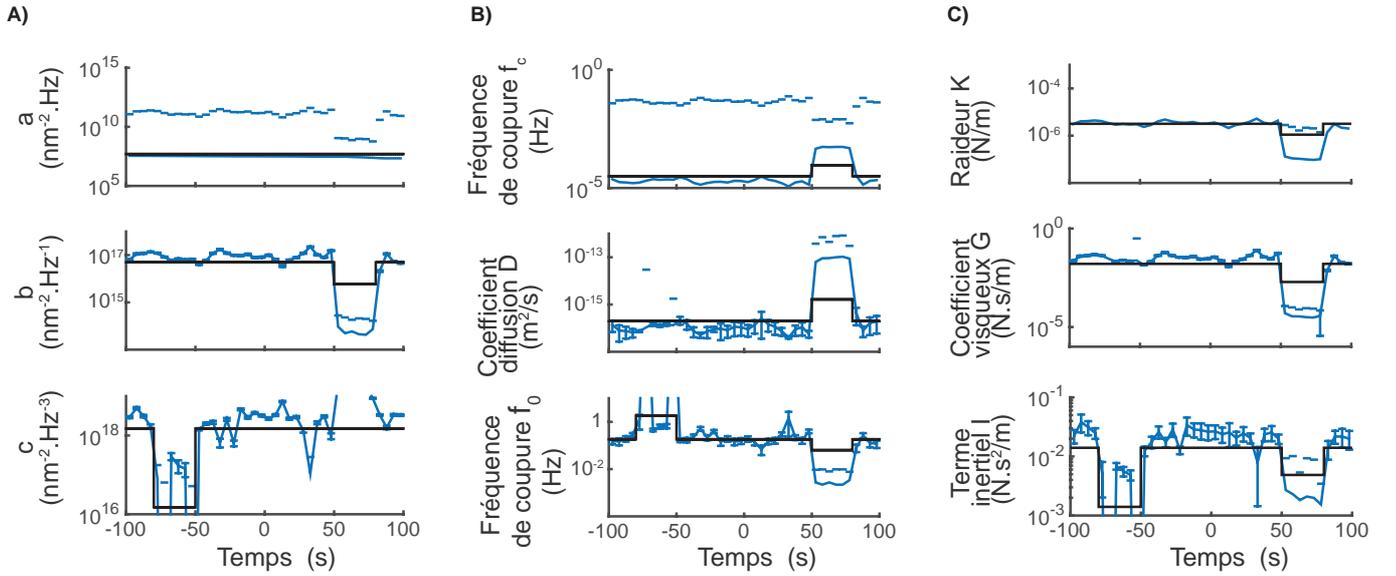


Figure III-10 – Évolutions temporelles des paramètres mécaniques introduits en entrée de la simulation (courbes noires) et obtenues après analyse par la méthode S3 des $N = 10$ trajectoires simulées (courbes bleues) dans les représentations abc (A), $f_c D f_0$ (B) et KGI (C). Dans cette simulation, le paramètre a est et égal à $5 \times 10^7 \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}$, alors que les paramètres b et c évoluent: b est égal à $5 \times 10^{16} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ et chute entre 50 s et 80 s à une valeur de $6 \times 10^{15} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$; et c est égal à $1.5 \times 10^{18} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-3}$ et chute entre -80 s et -50 s à une valeur de $1.5 \times 10^{16} \text{ nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-3}$. Tout ces graphiques sont en échelle logarithmique.

passage¹. Lors de la chute de b dans la simulation, la puissance du bruit chute également, les fluctuations générées sont de plus faibles amplitudes, et donc limitent la détection des paramètres b et c .

Pour les deux autres représentations KGI et $f_c D f_0$, nous observons que la temporalité des modulations de chaque paramètre est très bien mesurée par notre méthode S3. Notons que le terme inertiel et la fréquence de coupure f_0 présentent deux périodes de modulation de leur valeur, qui sont mesurées précisément en temps. Les résultats obtenus dans ces deux représentations soulignent de nouveau la difficulté à obtenir les valeurs précisément introduites dans la simulation; néanmoins, les tendances et ordres de grandeur sont corrects. Ces différences de valeurs pour les paramètres K , G , I et D dans leur partie constante proviennent en partie du réglage de l'amplitude du bruit stochastique dans la simulation; un point sans aucun doute délicat. Cette limite est à prendre en compte lors de l'analyse des expériences biologiques. Cependant, par l'utilisation de simulations,

¹

$$G = \frac{k_b \check{T} (B + 2(CA)^{1/2})}{\pi^2}$$

nous avons démontré la capacité de la méthode à suivre temporellement les évolutions des paramètres mécaniques du fuseau mitotique.

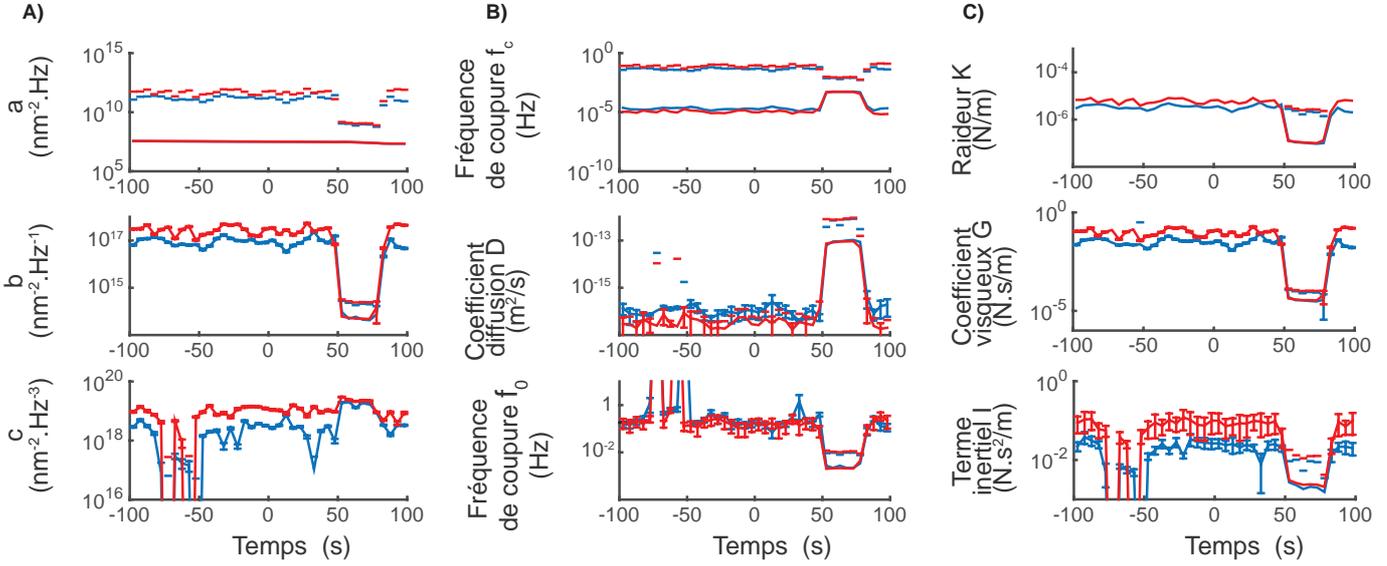


Figure III-11 – Évolutions temporelles des paramètres mécaniques obtenues après analyse par la méthode S3 de deux jeux de $N = 10$ trajectoires simulées : l'un avec un bruit stochastique dont l'amplitude est égale à $k_b \vec{T} G$ (courbes rouges) et l'autre avec un bruit stochastique dont l'amplitude est égale à $4k_b \vec{T} G$ (courbes bleues) dans les représentations *abc* (A), *fcDf0* (B), et *KGI* (C). Les autres paramètres de la simulation sont identiques avec notamment le paramètre *a* qui est constant et égal à $5 \times 10^7 \text{nm}^{-2} \cdot \text{Hz}$, alors que les paramètres *b* et *c* évoluent: *b* est égal à $5 \times 10^{16} \text{nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ et chute entre 50 s et 80 s à une valeur de $6 \times 10^{15} \text{nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$; et *c* est égal à $1.5 \times 10^{18} \text{nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-3}$ et chute entre -80 s et -50 s à une valeur de $1.5 \times 10^{16} \text{nm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-3}$. Tous ces graphiques sont en échelle logarithmique.

Modulation du bruit stochastique La seconde validation que nous avons réalisée à l'aide de l'outil de simulation est d'analyser le comportement de notre outil S3 face à un changement d'amplitude du bruit stochastique, en se demandant notamment si ce changement est visible dans une ou plusieurs représentation(s) des valeurs des paramètres mécaniques obtenues par la méthode S3. Pour cela, nous avons généré deux jeux de trajectoires simulées avec une amplitude du bruit stochastique distincte pour chaque jeu: l'amplitude du bruit de la seconde simulation est quatre fois plus faible que celle de la première simulation. Tous les autres paramètres de la simulation sont identiques entre les deux jeux et nous avons gardé les mêmes évolutions des paramètres *a*, *b* et *c* que pour l'expérience précédente (Fig. III-10).

Les résultats de cette seconde simulation sont représentés sur la Figure III-11 avec les courbes bleues pour les résultats obtenus sur le jeu de données avec un bruit stochastique élevé et les courbes rouges pour ceux obtenus sur le jeu avec un bruit stochastique faible. Nous remarquons que l'amplitude du bruit modifie significativement la valeur du module de chaque paramètre de la représentation abc de façon quasi homogène sur l'ensemble de l'évolution (Fig. III-11-À). Ce résultat était attendu étant donné que ces 3 paramètres sont dépendants du bruit stochastique. Nous notons que lorsque l'amplitude du bruit diminue, la valeur des paramètres optimisés augmente. La même observation peut être faite pour les paramètres de la représentation KGI , qui sont eux aussi dépendant du bruit (Fig. III-11-À). À l'inverse, dans la représentation $f_c D f_0$ nous remarquons que seul le paramètre D varie suivant le bruit introduit. Ce résultat valide bien que les paramètres f_c et f_0 ne sont pas dépendants de la puissance du bruit comme attendu (Fig. III-11-B). Nous pouvons également noter que lorsque l'amplitude du bruit est faible, la détermination du paramètre c est plus difficile. En effet, la chute du module de c observée entre -80 et -50 secondes est moins précise. Il semble important de garder cette observation en tête lorsque nous analyserons des données biologiques. Sur cette seconde expérience nous observons que lors de la chute de b , la méthode S3 donne accès à un minimum identique dans les deux jeux simulés. Cela semble nous indiquer que l'outil S3 n'arrive pas à estimer correctement les valeurs faibles de b . Cette seconde simulation valide donc notre dépendance avec le bruit stochastique sur les paramètres $a, b, c; K, G, I$; et D . Ainsi, pour comprendre les différences observées entre des conditions variables de nos expériences dans la représentation KGI il faut absolument compléter cette étude par l'analyse de ces mêmes données dans la représentation $f_c D f_0$ pour nous assurer que les différences que nous observons sur les paramètres K, G et I résultent d'un changement de la mécanique du fuseau et non d'une modification du bruit stochastique. Ces expériences numériques apparaissent donc primordiales dans le travail de validation de la méthode S3, car elles permettent de faire des changements contrôlés des paramètres mécaniques du système qu'il est impossible de réaliser biologiquement sans perturber le fuseau. Ainsi, nous avons pu non seulement valider notre outil en observant sa capacité à retrouver des modulations temporelles des paramètres mécaniques et sa performance face à une variation du bruit stochastique, mais également de mettre en évidence la complexité de récupérer précisément les amplitudes des variations des paramètres.

5.3.2 Sensibilité aux perturbations de la mécanique du fuseau *in vivo*

Après avoir validé notre capacité à détecter des modulations temporelles des paramètres K , G et I dans la section précédente, nous nous sommes demandés si les fluctuations étaient suffisamment sensibles pour réagir à une altération de la mécanique du fuseau. Ce point apparaissait essentiel dans la perspective d'utiliser l'analyse S3 comme outil d'investigation de la mécanique du fuseau mitotique. Afin de répondre à cette question, nous avons partiellement supprimé la protéine CLS-2 grâce à un ARN interférant administré par nourrissage d'une durée de 48h. La protéine CLS-2, de la famille des CLASP, est impliquée dans l'attachement des microtubules aux chromosomes via les kinétochores d'une part, et agit d'autre part sur les microtubules astraux sans doute en réduisant la fréquence des catastrophes [Srayko et al., 2005; Cheeseman et al., 2005; Espiritu et al., 2012] (Fig. III-12). Sa déplétion peut ainsi conduire à une rupture du fuseau en métaphase tardive [Nahaboo et al., 2015]. Nous observons une chute des paramètres du modèle dès le début de la métaphase qui continue ensuite en anaphase, peu de différences sont visibles en métaphase précoce (Fig III-12). Lors du passage en anaphase, *cls-2(ARNi)* fragilise le fuseau, qui s'allonge anormalement vite en début d'anaphase (Fig. III-12-C) et montre une zone entre les chromatides sœurs anormalement pauvre en microtubules interdigités en anaphase précoce sous *cls-2(ARNi)* [Dumont and Desai, 2012; Cheeseman et al., 2005]. Nous interprétons donc la chute des paramètres mécaniques mesurée par la méthode S3 comme un découplage des deux pôles du fuseau mitotique. Nous reportons l'étude de cette analyse S3 du point de vue de la biologie à la section 6. Ainsi, l'analyse S3 se révèle sensible aux perturbations mécaniques du fuseau. De surcroît, l'analyse est bien résolue en temps et permet d'identifier les événements majeurs dans l'évolution de la mécanique du fuseau au cours de la mitose. Cette expérience permet également de faire une observation importante pour notre étude. En effet, nous remarquons que lorsque le fuseau semble être rompu les paramètres de la méthode S3 sont très différents de ceux du fuseau contrôle, indiquant que dans le fuseau effectif de notre analyse la périphérie de la cellule n'est pas présente.

5.3. LA CARACTÉRISATION PAR LES FLUCTUATIONS REND BIEN COMPTE DE LA MÉCANIQUE DU FUSEAU À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

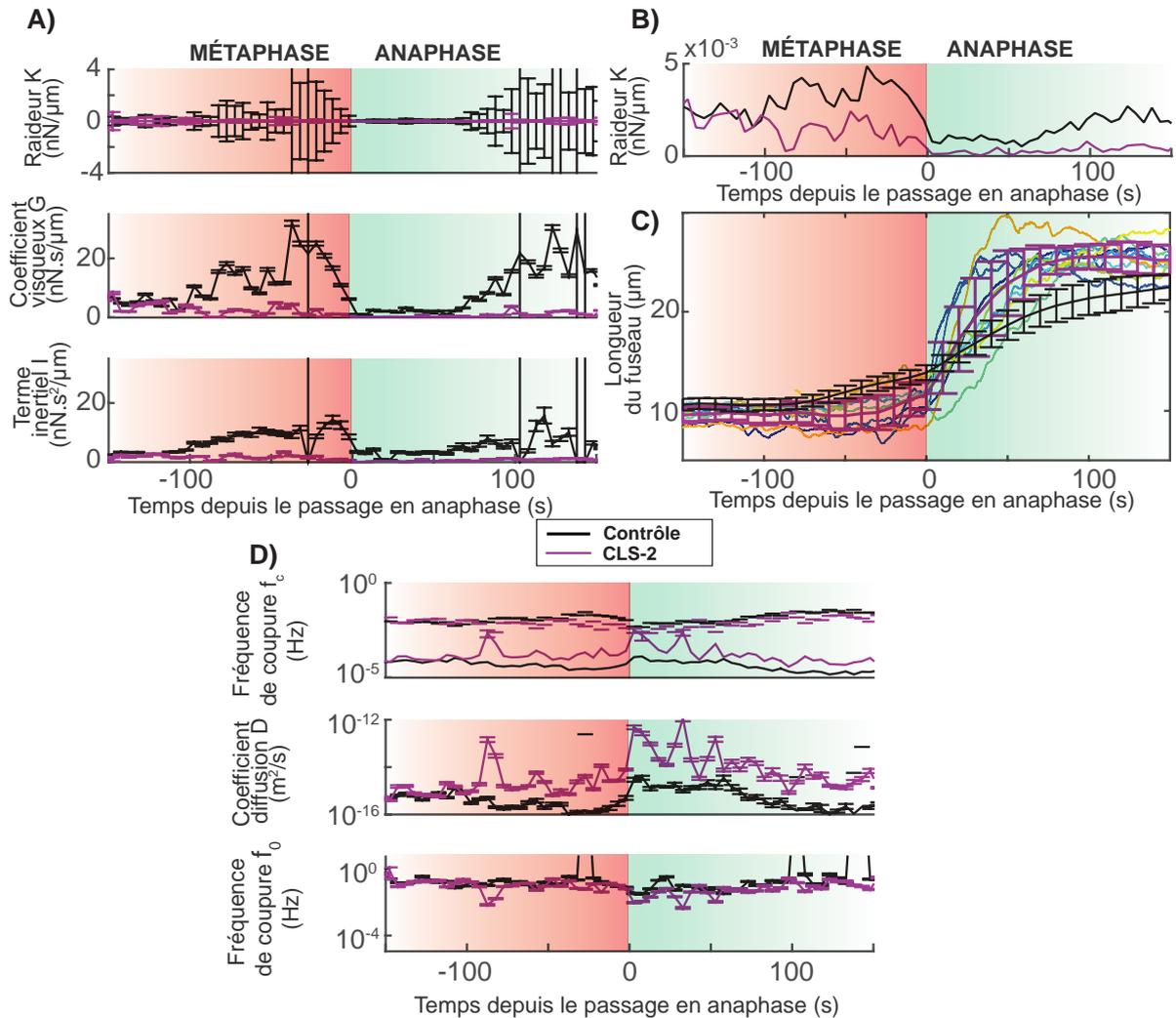


Figure III-12 – Expérience de déplétion de CLS-2 (ARNi 48h, 23°C , N=8) (courbes violettes). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les contrôles sont N=23 embryons non-traités (courbes noires). Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l’anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l’anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenus par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons de les expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupure f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

5.3.3 Calibration via des coupes génétiques du fuseau et microchirurgie laser

Avant d'utiliser l'analyse S3 pour disséquer la mécanique du fuseau, nous avons clarifié le lien entre les paramètres extraits à l'échelle microscopique, basée sur les fluctuations, et l'élongation du fuseau au cours du temps et les paramètres qui en découlent, à l'échelle macroscopique. Nous avons quelque peu abordé cette problématique via les simulations. Il n'est pas possible de mesurer les propriétés mécaniques du fuseau dans des conditions physiologiques par d'autres techniques. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux déplacements des pôles du fuseau pour cette calibration. Il n'est pas non plus possible de mesurer la raideur d'un ressort de centrage et le module du frottement fluide directement à l'échelle cellulaire, seul leur rapport formant le temps caractéristique de relaxation est accessible. C'est donc la grandeur que nous avons utilisée et mesurée par des expériences de coupe du fuseau mitotique. Nous avons observé et mesuré l'impact de la coupe du fuseau sur la position du centrosome postérieur : les 15 s après la rupture du fuseau ont permis de mesurer la valeur des paramètres mécaniques du point de vue microscopique (fluctuations), alors que le début de la relaxation visqueuse lors de la rupture nous a donné le point de vue macroscopique. Pour réaliser la rupture du fuseau, la méthode la plus classique consiste à couper le fuseau par l'utilisation d'un laser dans l'ultra-violet [Grill et al., 2001] ou l'infra-rouge [Konig et al., 2001]. Pour des raisons expérimentales, il n'était pas possible de conjointement couper les fuseaux par microchirurgie laser et mesurer finement les trajectoires des pôles. Nous avons donc adopté une approche plus indirecte : réduire fortement la quantité de CLS-2 ou SPD-1, qui sont connues pour induire une élongation rapide du fuseau mitotique assimilable à une rupture du fuseau lors de la mitose [Cheeseman et al., 2005; Verbrugghe and White, 2004]. Afin de valider que la coupe "induite génétiquement" est quasi complète, nous avons comparé la relaxation des centrosomes postérieurs après coupe dans les expériences de déplétion de CLS-2 ou SPD-1 avec celle après une coupe par microchirurgie laser.

5.3.3.1 Microchirurgie laser du fuseau et mesure du temps de relaxation du centrosome postérieur

Plus en détails, nous avons coupé l'hémifuseau antérieur en son milieu (c'est à dire entre le centrosome antérieur et la plaque métaphasique), environ 60 s après la rupture de l'enveloppe nucléaire (soit sensiblement à la mi-temps de la métaphase) pour 9 embryons aux pôles marqués par la GFP:: γ -tubuline et imagés en microscopie confocale (Leica SP5, détecteur hybride) pendant 600 s à 3.5 images/s à 23°C. La coupe a été réalisée par 3 tirs successifs de 0.279 ms chacun en utilisant un laser pulsée à 850 nm (Mai tai HP Ti:Sapphire

5.3. LA CARACTÉRISATION PAR LES FLUCTUATIONS REND BIEN COMPTE DE LA MÉCANIQUE DU FUSEAU À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

mode locked). La difficulté majeure consistait à couper le maximum de microtubules avec le minimum de puissance possible afin de ne pas créer de photo-dommage d'une part et d'autre part ne pas générer une micro-explosion (une bulle de vapeur d'eau). La coquille entourant l'embryon de *C. elegans* faite de sucres, qui diffractent donc le laser, rendait la tâche malaisée [Olson et al., 2012]. Couper un hémifuseau plutôt que le fuseau en son milieu participe à cette économie de puissance. Nous avons réalisé des contrôles en tirant dans le cytoplasme parallèlement au fuseau pour ne pas perturber les microtubules astraux et n'avons pas observé de phénotype associé. Nous avons suivi les centrosomes avec notre algorithme, extrait la trajectoire du centrosome postérieur le long de l'axe antéro-postérieur et ajusté une équation de relaxation visqueuse

$$X(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau}} + c$$

sur chaque embryon individuellement (Fig. III-13). Nous avons alors moyenné le temps caractéristique τ pour obtenir $\tau_{cut} = 40 \pm 28$ s (N=9 embryons).

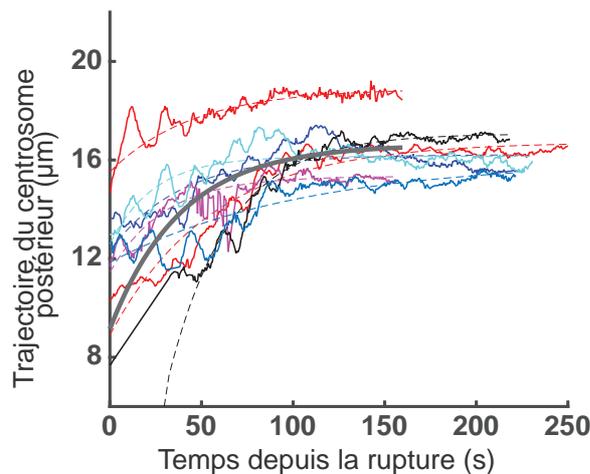


Figure III-13 – Relaxation visqueuse du centrosome postérieur le long de l'axe antéro-postérieur après la coupe de l'hémifuseau antérieur par microchirurgie laser pour N=9 embryons à 23°C. Expériences de microchirurgie laser sur l'embryon de *C. elegans*, les courbes continues (une couleur par embryon) correspondent aux trajectoires du pôle postérieur de chaque embryon obtenues après ablation laser (N=9) et les courbes pointillées correspondent à l'ajustement du modèle de relaxation visqueuse à la trajectoire de même couleur. Le temps $t=0$ s correspond au moment de la coupe. Les courbes pointillées sont les ajustements réalisés à l'aide d'une équation de relaxation. La courbe en trait gris épais correspond à la relaxation pour les paramètres moyens.

5.3.3.2 Coupe génétique pour mesurer le temps de relaxation du centrosome après rupture du fuseau

Mesure par l'ajustement de la relaxation visqueuse Ayant une référence de relaxation visqueuse après coupe grâce à la microchirurgie laser, nous avons procédé aux coupes dites génétiques. Les coupes génétiques ont été réalisées par la déplétion de CLS-2, ou SPD-1. Lors de la déplétion de l'une ou l'autre de ces protéines, le fuseau se rompt sensiblement au moment du passage en anaphase sous l'effet des forces corticales [Nahaboo et al., 2015]. Nous avons réduit la quantité des protéines par ARN interférant via un nourrissage *ad hoc* durant 48 h et avons imagé N=8 embryons traités par *cls-2(ARNi)* et N=9 traités par *spd-1(ARNi)* au microscope à champ large à 23°C. Les valeurs des temps

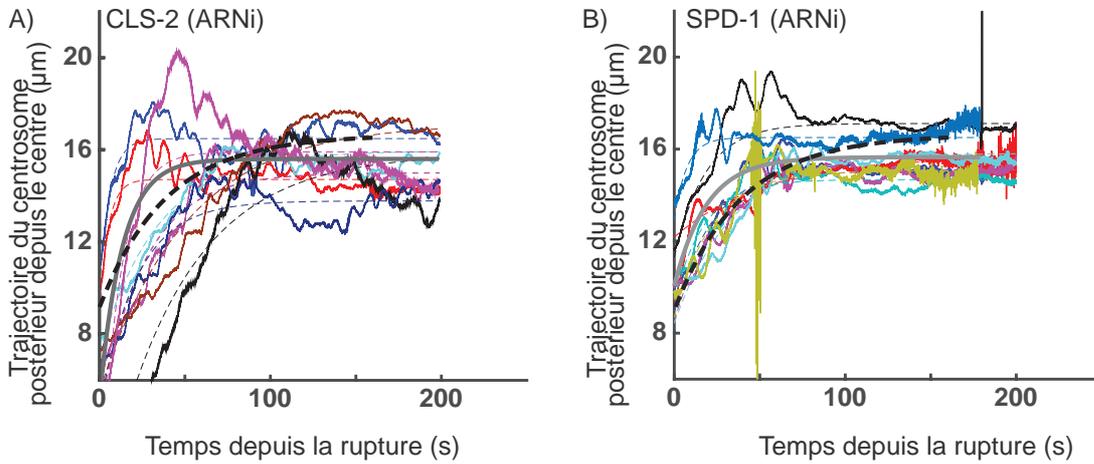


Figure III-14 – Relaxation visqueuse du centrosome postérieur le long de l'axe antéro-postérieur après induction de la rupture du fuseau génétiquement. Les pôles des fuseaux sont marqués la GFP:: γ -tubuline, et imagés à 23°C. Les lignes colorées continues représentent les embryons individuels et les lignes pointillées de même couleur l'ajustement de chaque embryon par le modèle de relaxation visqueuse. Pour permettre la comparaison, nous indiquons en noir pointillé la relaxation moyenne suite à la coupe par microchirurgie laser (voir figure III-13). (A) N=8 embryons traités par *cls-2(ARNi)* par nourrissage pendant 48 h : le temps caractéristique moyen est alors $\tau_{cut}^{cls-2} = 25 \pm 17$ s et (B) N=9 embryons traités par *spd-1(ARNi)* par nourrissage pendant 48h : le temps caractéristique moyen est $\tau_{cut}^{spd-1} = 25 \pm 13$ s.

caractéristiques de relaxation visqueuse obtenues pour les ruptures de fuseaux induites génétiquement, $\tau_{cut}^{cls-2} = 25 \pm 17$ s et $\tau_{cut}^{spd-1} = 25 \pm 13$ s, sont similaires à celle obtenue suite aux coupes des hémifuseaux antérieurs par microchirurgie laser, venant valider notre approche.

5.3.3.3 Comparaison avec les temps caractéristiques de relaxation visqueuse mesurés par l'analyse S3

Nous avons également analysé les trajectoires du centrosome postérieur par la méthode S3 et calculé le temps caractéristique de relaxation visqueuse $\tau_{S3} = K / G$. Cette valeur évolue au cours du temps et nous avons choisi la valeur, lorsque la fenêtre couvre les 15 premières secondes après la rupture.

$$\tau_{S3}^{cls-2} = 65 \pm 22 \text{ s} \quad \tau_{S3}^{spd-1} = 93 \pm 49 \text{ s}$$

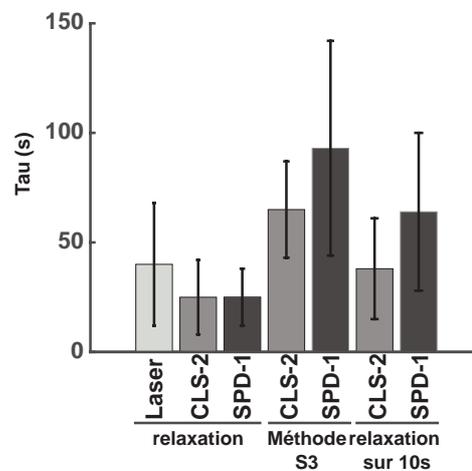


Figure III-15 – Résultats des mesures du temps caractéristique obtenus avec 3 méthodes différentes. L'histogramme beige correspond à la valeur du temps τ mesuré par l'ajustement de la relaxation visqueuse de la trajectoire du centrosome postérieur lors de la rupture du fuseau induite par microchirurgie laser. Les histogrammes gris clairs sont les valeurs de τ mesurées pour la rupture du fuseau induite par la déplétion de CLS-2 avec les trois méthodes. Les histogrammes gris foncés sont les valeurs de τ mesurées pour la rupture du fuseau induite par la déplétion de SPD-1 avec les trois méthodes.

La comparaison avec les valeurs obtenues précédemment (Fig. III-15) suggère que ces valeurs sont un peu surestimées, d'un facteur 3 à 4, ce qui reste raisonnable. Mais nous nous sommes alors demandé si le comportement de relaxation de la trajectoire du centrosome postérieur était parfaitement Hookéen¹. Nous avons alors estimé le temps caractéristique de relaxation visqueuse en ne tenant compte que des 10 premières secondes du déplacement du centrosome postérieur lors des expériences de relaxation. Nous avons alors obtenu :

$$\tau_{init}^{cls-2} = 38 \pm 23 \text{ s} \quad \tau_{init}^{spd-1} = 64 \pm 36 \text{ s}$$

Ces valeurs sont plus proches de l'analyse S3 et ne diffèrent pas significativement de celles

¹Solide Hookéen : la loi de déformation est linéaire quelle que soit la sollicitation.

obtenues sur la relaxation complète. Nous avons donc conclu que l'analyse S3 permet de retrouver des valeurs de temps caractéristiques dans les mêmes ordres de grandeur que par l'ajustement des courbes de relaxation, et qu'ainsi il est probable que les propriétés mécaniques mises en évidence via l'analyse S3 des fluctuations soient applicables au déplacement du fuseau à l'échelle cellulaire. Cela indique aussi que lors de la relaxation, la raideur du fuseau évolue, suggérant qu'il se comporte comme un solide non hookéen.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons validé la méthode S3 dans sa capacité à mesurer les paramètres mécaniques du fuseau mitotique, à l'aide du modèle de Kelvin-Voigt avec inertie modélisant le spectre de fluctuations de longueur. Plus en détails, nous avons montré que les fluctuations de la longueur du fuseau sont bien dues à un processus biologique en comparant les spectres obtenus sur embryons fixés et vivants. Nous avons également pu vérifier la faible influence du marquage des centrosomes, tout en mettant en lumière le potentiel rôle biologique du rapporteur fluorescent. Nous nous sommes également intéressés au comportement de la fonction de coût durant l'ajustement et avons déterminé que les modules de la relaxation visqueuse et de l'inertie sont mesurés avec précision, quand la raideur du ressort est seulement estimée. Nous avons montré que notre méthode est bien capable de retrouver les valeurs et l'évolution temporelle de ces modules dans des expériences numériques où nous pouvions contrôler les paramètres du système. Nous avons aussi prouvé que notre analyse est suffisamment sensible pour détecter des perturbations du fuseau. Enfin, nous avons montré que nous sommes capables de retrouver des valeurs satisfaisantes des quantités mesurés en comparaison avec d'autres techniques expérimentales lors de tests sur des données réelles. Ces premiers résultats ont permis de confirmer la pertinence d'analyser le couplage des deux pôles du fuseau mitotique pour modéliser son comportement.

Les tous premiers résultats montrés dans ce chapitre sur les différents tests de la taille de la fenêtre ou sur l'influence de la protéine utilisée pour le marquage des centrosomes semblent indiquer que le comportement mécanique du fuseau évolue tout au long de la division et que notre outil est capable de suivre son évolution au cours de la division. Cet outil ouvre maintenant de nouvelles voies d'investigations du fuseau mitotique.

Chapitre 6

Étude du fuseau mitotique par la méthode S3

Le fuseau mitotique remplit de nombreux rôles pendant la division cellulaire (cf. section 1.3.1.2). Ces fonctions se relient à un ensemble de forces qui interagissent à la fois au sein du fuseau et à la périphérie de la cellule. La méthode que nous avons développée et validée dans les chapitres précédents semble offrir une opportunité de mettre en lumière le comportement mécanique du fuseau, tout au long de la division et dans son contexte physiologique. mportement, il a pu montré qu’avec plusieurs jeux de forces ils étaient capables de retrouver l’évolution de la longueur du fuseau, sans pour autant pouvoir déterminer quel jeu était le bon. Pour ces deux raisons, la méthode que nous avons développée et validée dans les chapitres précédents semble être l’opportunité de mettre en lumière le comportement mécanique du fuseau, tout au long de la division et dans son contexte physiologique.

Nous avons voulu comprendre le comportement mécanique du fuseau mitotique chez l’embryon unicellulaire de *C. elegans* et éclairer les éléments dominants comme la viscosité chez le xénope [Shimamoto et al., 2011]. Nous avons ensuite souhaité tester l’influence des forces qui s’appliquent au fuseau et plus généralement l’influence de chacune de ses sous-structures, que nous avons ciblées par la déplétion d’une protéine connue pour y être impliquée : nous avons commencé par analyser l’influence des forces trouvant leurs origines au niveau des kinétochores, puis celles générés au niveau de sa zone interdigitée. Nous avons ensuite observé la réponse du fuseau lorsque nous perturbions son environnement en supprimant partiellement les forces de traction corticales. Enfin, nous nous sommes intéressés à la perturbation de l’établissement du fuseau central et à son impact sur la mécanique du fuseau mitotique.

6.1 Caractéristiques mécaniques du fuseau mitotique au cours de la mitose

Durant la mitose, la cellule traverse plusieurs phases durant lesquelles sa structure évolue (cf. section 1.1). Chez l'embryon de *C. elegans* la longueur du fuseau évolue durant la division ; cette évolution est d'ailleurs marquée par le passage en anaphase où la vitesse d'élongation augmente. Par ailleurs, nous remarquons que les évolutions de longueur du fuseau sont très reproductibles entre embryons, ce qui suggère une robustesse et des mécanismes de régulation (Fig. III-16-C). Nous souhaitons donc savoir si la mécanique sous-jacente du fuseau mitotique suivait elle aussi des modulations temporelles en étudiant les fluctuations de longueur du fuseau par la méthode S3.

Nous avons analysé, dans cette expérience et pour les études suivantes les fluctuations de longueur entre -150 secondes et +150 secondes depuis le début de l'anaphase. Cet intervalle nous permet d'être proche d'une référence temporelle, ce qui réduit la variabilité inter embryons. De plus, cet intervalle nous permet de centrer notre étude sur la séparation des chromatides soeurs qui est un événement majeur dans le fonctionnement du fuseau. La fenêtre utilisée pour l'étude a une largeur de 15 secondes (512 points) et glisse par pas de 5 secondes ; cela signifie que nous ne pourrions pas observer un phénomène qui aura une durée inférieure à 15 secondes. Nous avons ainsi obtenu l'évolution temporelle des paramètres du fuseau mitotique dans les représentations KGI et $f_c D f_0$ (Fig. III-16-A,B,D).

Découplage des pôles du fuseau en anaphase précoce Pour le coefficient de frottement visqueux G et le terme inertiel I , nous observons une forte modulation de leurs valeurs au cours de la mitose avec de surcroît des corrélations entre leurs évolutions temporelles et des événements connus de la division. En effet, quelques secondes avant le passage en anaphase, la valeur du paramètre de frottement visqueux s'effondre pour atteindre une valeur proche de 0 à la transition ; il reste faible lors des 30 premières secondes de l'anaphase, ce qui correspondrait à un découplage entre les deux pôles du fuseau, lorsque les chromatides soeurs se séparent. Ce décalage de 10 secondes entre le passage en anaphase et le décrochage de G est certainement dû à la taille de la fenêtre qui est centrée sur le point temporel dans les graphiques. Il est par ailleurs intéressant de noter que la valeur du frottement visqueux G commence à augmenter à partir de 30 secondes après le passage en anaphase, ce qui coïnciderait à la mise en place du fuseau central qui couplerait mécaniquement les deux centrosomes entre eux [Maton et al., 2015]. Quant au terme inertiel, sa valeur commence à décroître plus lentement et plus tôt que G , aux alentours de 50 secondes avant le passage en anaphase pour atteindre un minimum juste

6.1. CARACTÉRISTIQUES MÉCANIQUES DU FUSEAU MITOTIQUE AU COURS DE LA MITOSE

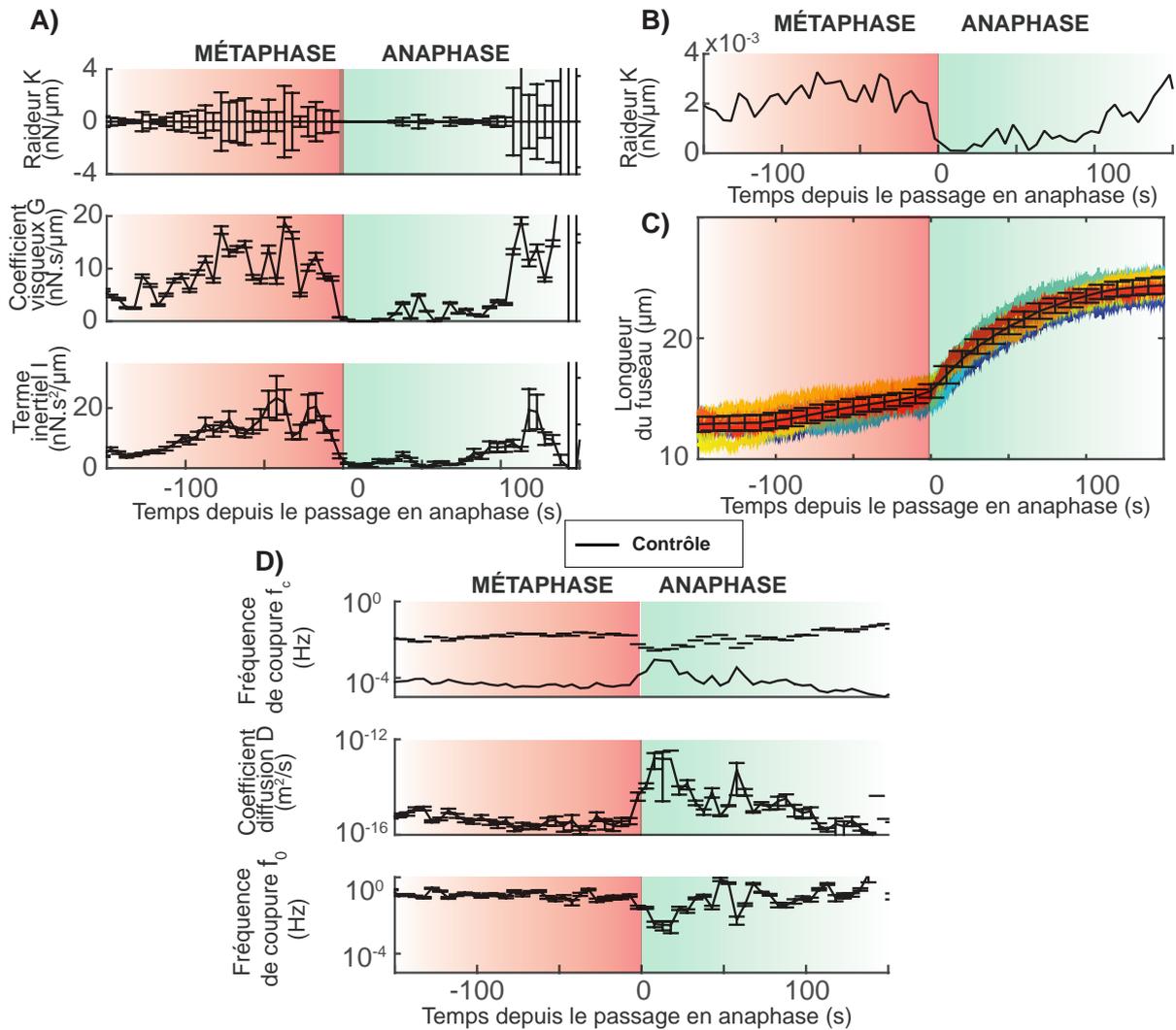


Figure III-16 – Analyse de $N=16$ embryons non-traités à $T=18^\circ\text{C}$ (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l'anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l'anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l'analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l'inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d'erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupure f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l'inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d'erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

après le passage en anaphase. Les valeurs de I restent faibles pendant 20 secondes après la transition puis augmentent jusqu'à atteindre en fin d'anaphase des valeurs similaires à celles mesurées en début de métaphase.

La contribution d'un mécanisme de maintien de la longueur du fuseau est faible ou nulle Le paramètre de raideur du ressort est quand à lui mal déterminé mais borné par les barres d'erreurs qui indiquent que ce paramètre est faible. Le ressort s'oppose à l'élongation du fuseau et en cela représente un mécanisme de maintien de sa longueur. Toutefois, prenant en compte la borne supérieure de l'erreur standard sur K , la valeur reste faible, suggérant potentiellement un faible rôle pour le ressort. Ce point sera développé dans la section suivante.

Représentation alternative des analyse S3, $f_c D f_0$ L'analyse S3 permet de retranscrire les mêmes résultats sous une autre représentation. Celle-ci comporte les deux fréquences de coupures f_c et f_0 correspondant au ratio du ressort sur la viscosité et au ratio de la viscosité sur l'inertie, ainsi que coefficient de diffusion D qui nous renseignent sur l'amplitude du bruit généré par les moteurs entre autre (Fig. III-16-D). Cette représentation possède l'avantage que les fréquences ne sont pas dépendantes de la puissance du bruit (cf section 4.1.3). Cependant, les grandes barres d'erreurs sur f_c et sur D , qui résultent de la mauvaise détermination de K (cf section 4.3.1), peuvent rendre difficiles l'interprétation dans cette représentation. Dans les expériences qui nous intéressent ici les valeurs de ces paramètres sont stables tout au long de la métaphase puis augmentent lors des 30 premières secondes après le passage en anaphase. Concernant la fréquence f_0 , sa valeur chute fortement lors du passage en anaphase et augmente doucement en fin d'anaphase. Ces évolutions restent cohérentes avec notre interprétation en représentation KGI . Cette représentation va nous permettre principalement de comprendre l'influence du bruit stochastique dû à l'activité des moteurs moléculaires sur les paramètres K , G et I . ainsi cela nous permettra et de confirmer si un changement de comportement mécanique du fuseau a lieu.

Ces premiers résultats sur le fuseau des embryons non traités illustrent l'utilisation de cette méthode S3 avec laquelle nous accédons aux modulations de la mécanique du fuseau mitotique durant la métaphase et l'anaphase. Elle permet de mettre en évidence une chute des paramètres à la transition évoquant un découplage des deux pôles lors du passage en anaphase.

6.2 La longueur du fuseau en métaphase principalement contrôlée par le frottement visqueux

Shimamoto et ses co-auteurs ont montré que le fuseau de xénope adoptait un comportement type amortisseur [Shimamoto et al., 2011]. Nous souhaitions savoir si cela est le cas chez *C. elegans*. Les valeurs des modules des paramètres mécaniques ne permettent pas une lecture directe de l'élément mécanique qui domine le comportement du fuseau mitotique. Nous avons donc cherché à estimer les forces développées par chaque élément afin de les comparer pour en déduire l'influence de l'élément sur le fuseau. Pour ce faire, nous avons estimé les forces développées par chacun des éléments. Nous avons calculé le taux d'élongation du fuseau (\dot{l}) et l'accélération de ce taux (\ddot{l}) moyen pour chaque pas de temps identique à ceux des fenêtres glissantes de l'analyse S3. Pour le ressort, nous avons utilisé la longueur du fuseau moyenné entre -100 et -85 comme longueur du ressort au repos. Notre estimation pour la force du ressort est sans doute surévaluée car nous négligeons les réarrangements du fuseau qui contribuent à relaxer la tension et donc de diminuer la force qu'il développe.

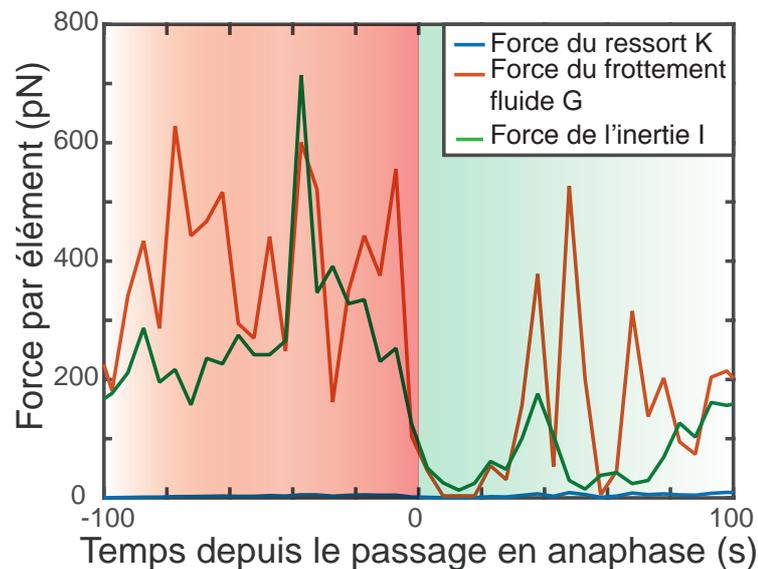


Figure III-17 – Estimation des forces développées par chaque élément avec comme temps de référence le début de l'anaphase. Les zones rouge et verte représentent respectivement la métaphase et l'anaphase.

Ces estimations de forces suggèrent que le frottement visqueux et le terme inertiel dominant la mécanique du fuseau mitotique des embryons non traités aussi bien en métaphase qu'en anaphase (Fig. III-17). Cette observation est cohérente avec l'étude de Shi-

mamoto et al. [Shimamoto et al., 2011]. Nous retrouvons ce résultat dans des conditions physiologiques. Cela suggère que le fuseau se comporte comme un fluide visco-inertiel. L'aspect visqueux du fuseau mitotique semble indiquer que celui-ci est hors équilibre dans un état métastable en lente évolution durant toute la division, favorisant ainsi son adaptabilité. Cette première expérience sur les embryons non traités illustre l'utilité de la méthode S3. Elle a permis d'observer un comportement mécanique original du fuseau lors de la division. Pour comprendre plus avant le fonctionnement du fuseau mitotique en lien avec ses acteurs microscopiques, nous allons dans la prochaine section explorer comment le fuseau se comporte face à des perturbations génétiques ciblées.

6.3 Vers une étude fonctionnelle du fuseau mitotique

L'utilisation de la génétique moléculaire associée à notre méthode S3 apparaissait comme la bonne approche pour étudier l'influence des protéines du fuseau sur le comportement mécanique du fuseau mitotique. Afin de tester notre analyse S3 nous avons revisité des phénotypes connus et pour lesquelles une explication à l'échelle microscopique avait été proposée. Nous verrons ces phénotypes sous un nouvel angle pour en enrichir la compréhension. Nous avons séparé les protéines à cibler en 4 groupes, reliés aux sous-structures du fuseau générant des forces (cf. section 1.3.2). Le premier groupe contient les protéines impliquées dans la génération de forces au niveau des microtubules kinétochoriens ; le second groupe comprend les protéines présentes au niveau des microtubules interdigités ; le troisième celles impliquées dans la génération de forces depuis la périphérie de la cellule; et le quatrième se focalise sur les protéines participant à la mise en place du fuseau central après le passage en anaphase.

6.3.1 Forces trouvant leur origine aux kinétochores

En premier lieu, nous nous sommes intéressés aux forces trouvant leur origine aux kinétochores, c'est-à-dire si elles influencent ou non la mécanique global du fuseau. La protéine, que nous avons ciblée par ARN interférant (ARNi), était CLS-2. Le gène *cls-2* code pour l'une des trois protéines orthologues aux CLASPs humaines. En mitose, CLS-2 joue notamment un rôle au niveau de la dynamique des microtubules kinétochoriens et sa déplétion cause un mauvais alignement des chromosomes (Fig. III-18)[Cheeseman et al., 2005; Espiritu et al., 2012]. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (cf. section 5.3.2), la suppression de CLS-2 dans l'embryon de *C. elegans* entraîne la rupture du fuseau mitotique proche de la transition métaphase/anaphase [Nahaboo et al., 2015].

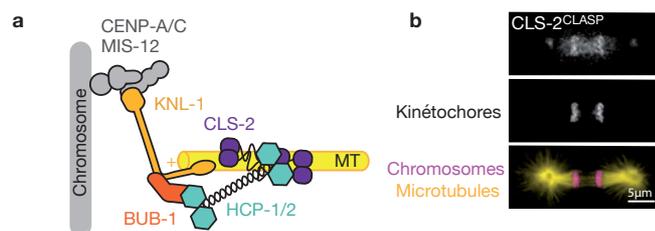


Figure III-18 – a Composition de l’ancrage kinétochorien de la branche BUB-1, b localisation de CLS-2 dans l’embryon de *C. elegans*. [Maton et al., 2015]

Nous avons donc réalisé une expérience de déplétion partielle de CLS-2 par interférence d’ARN (nourrissage) sur une durée de 24h à 18°C sur les embryons de *C. elegans*, dont les pôles du fuseau sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Cette première expérience de déplétion a été complétée par une expérience de suppression plus forte de CLS-2 par interférence d’ARN (nourrissage) sur une durée de 48h à 23°C.

Afin de nous assurer de la pénétrance de la déplétion par ARNi, nous avons utilisé le phénotype connu : une augmentation de la vitesse d’élongation du fuseau mitotique au passage en anaphase indiquant une rupture du fuseau. Nous observons que la pente d’élongation du fuseau mitotique à la transition métaphase – anaphase est plus élevée pour les embryons traités que pour les embryons non traités (Fig.III-19-C et III-20-C). Notons par ailleurs, que ce phénotype est plus prononcé pour les embryons avec une déplétion plus forte (ARNi sur une durée de 48h) comparée à la déplétion via ARNi sur une durée de 24h, comme attendu. Enfin, comme le montre Espiritu et ses co-auteurs, nous observons que les longueurs initiales et finales du fuseau ne sont pas affectées par les déplétions [Espiritu et al., 2012].

Par l’analyse S3, nous observons des modifications des évolutions temporelles des trois paramètres K , G et I en comparaison avec le cas des embryons non traités (Fig. III-19-A). Nous observons que le frottement fluide est réduit dès le milieu de la métaphase comme en anaphase après les 30 secondes de découplage. En comparaison des contrôles le terme inertiel I tarde à remonter en anaphase après les 30 secondes de découplage. La raideur du ressort suit probablement une variation similaire, néanmoins les barres d’erreurs préviennent toute certitude. Sur les courbes de la représentation $f_c D f_0$ (Fig. III-19-D), les trois coefficients suivent des évolutions parallèles suggérant que le frottement fluide est responsable de ces variations. Ces observations en métaphase sont cohérentes avec la stabilisation des microtubules (diminution du taux de catastrophe) cela pourrait être due à un défaut d’attachement des microtubules aux kinétochores [Cheeseman et al., 2005]. En effet, une diminution conjointe du ressort K et du frottement fluide G pourrait

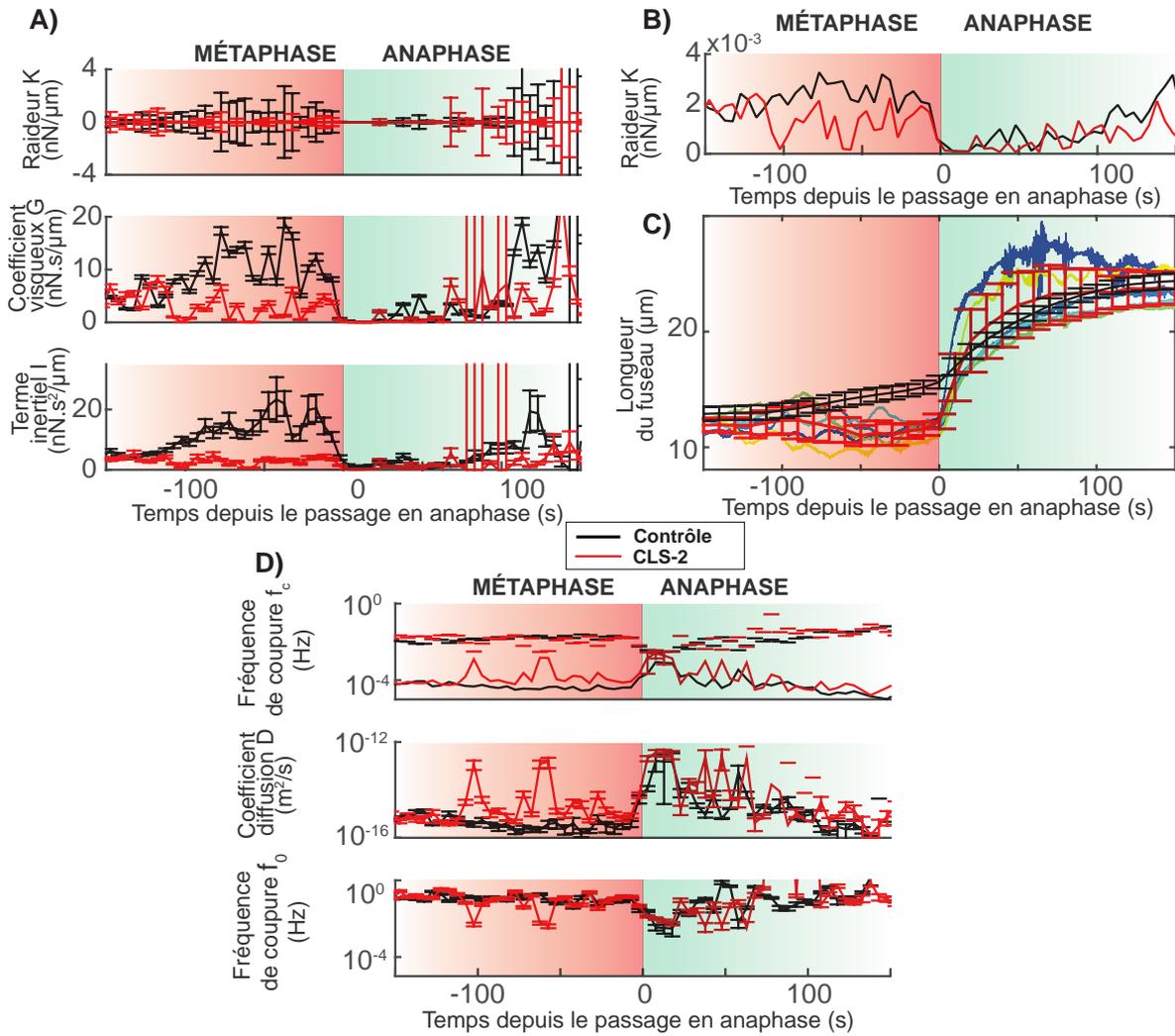


Figure III-19 – Expérience de déplétion de CLS-2 (ARNi 24h, 18°C, N=6) (courbes rouges). Les contrôles sont des N=16 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l’anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l’anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupe f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

6.3. VERS UNE ÉTUDE FONCTIONNELLE DU FUSEAU MITOTIQUE

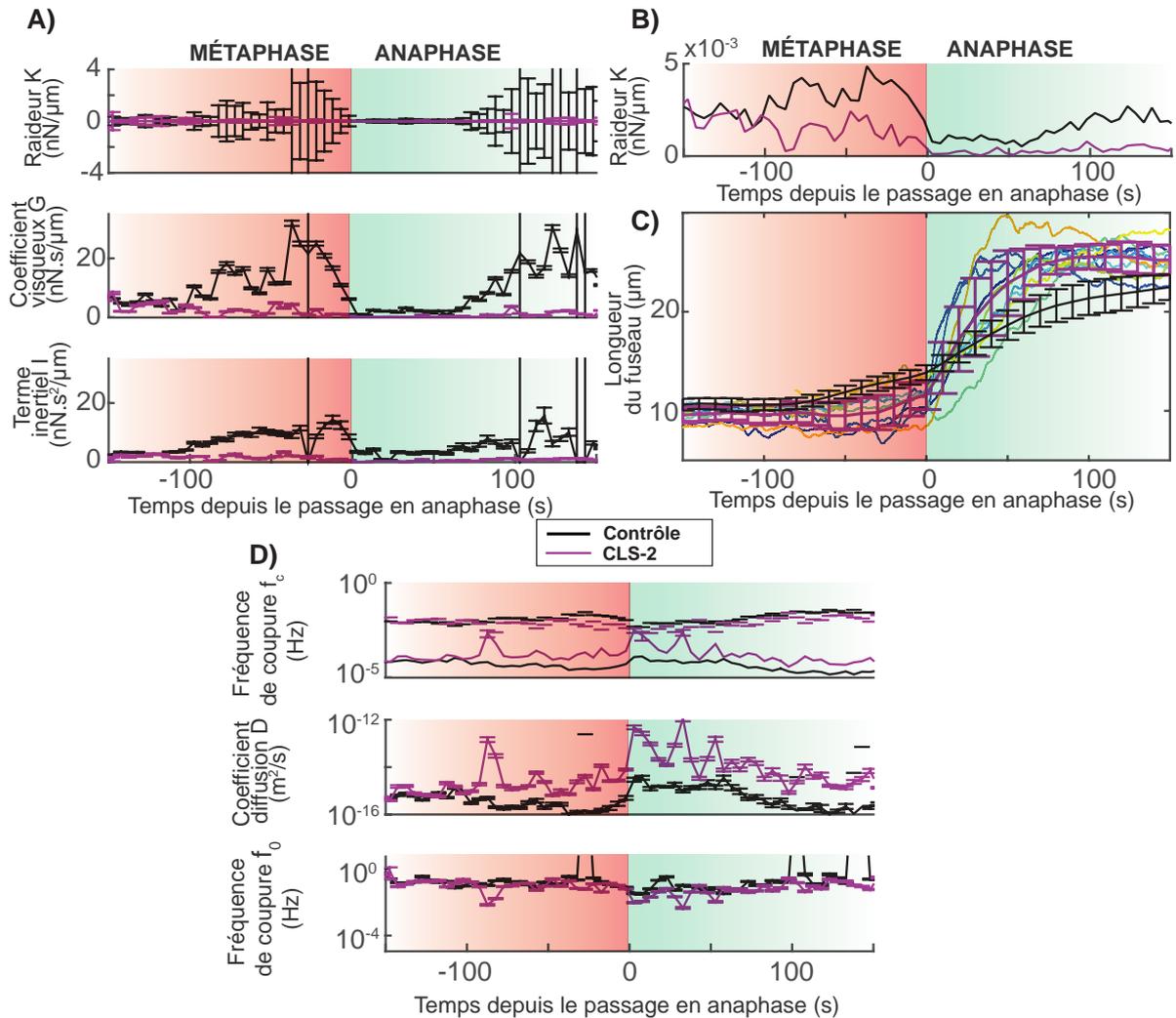


Figure III-20 – Expérience de déplétion de CLS-2 (ARNi 48h, 23°C, N=8) (courbes violettes). Les contrôles sont des N=23 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l’anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l’anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupe f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

s'expliquer par une altération du réseau de microtubules par analogie avec ce qui est observé au cortex [Pecreaux et al., 2016; Howard, 2006]. Après le passage en anaphase le retard de rétablissement de la connexion mécanique suggère un défaut d'établissement du fuseau central. Récemment Maton et co-auteurs ont observé un tel phénotype [Maton et al., 2015].

Nous avons voulu confirmer les observations par une déplétion plus forte, sur 48h à 23°C. Nous retrouvons dans ces conditions les mêmes effets en métaphase (Fig. III-20). Après le passage en anaphase, les trois paramètres restent très bas suggérant que les pôles restent découplés et donc un défaut structural majeur ou une absence de fuseau central.

Ces premières expériences sont encourageantes. Nous arrivons ici à retrouver des phénotypes connus sur le fuseau mitotique que nous observons sous un autre angle de vue.

6.3.2 Forces trouvant leur origine au niveau de la zone interdigitée

Les forces en jeu dans la zone interdigitée sont produites par les moteurs moléculaires (kinésines) qui s'attachent au niveau des microtubules interpolaires ainsi que par la dépolymérisation des microtubules. La zone interdigitée a longtemps été vue comme le lieu d'équilibre des forces entre les moteurs capables d'allonger le fuseau et ceux le raccourcissant. Nous souhaitons maintenant observer son influence sur le comportement mécanique du fuseau mitotique.

6.3.2.1 Déplétion de BMK-1, l'unique kinésine *V* de *C. elegans*

Le moteur moléculaire de la zone interdigitée que nous avons étudié est BMK-1 (Fig. III-21). C'est le seul moteur moléculaire de la famille des kinésines *V* chez le nématode *C. elegans*. Ce moteur, qui se déplace vers l'extrémité (+) des microtubules et peut allonger le fuseau. Il a toutefois été montré que durant le début de l'anaphase il agissait comme un frein à l'élongation du fuseau limitant, ainsi la vitesse d'élongation [Saunders et al., 2007].

Nous avons procédé à sa déplétion partielle par interférence d'ARN (nourrissage) durant 48h à 23°C sur une lignée où les pôles du fuseau sont marqués par la GFP:: γ -tubuline.

Pour valider notre expérience de déplétion, nous avons d'abord étudié l'évolution des longueurs du fuseau au cours de la division (Fig. III-22-C). La suppression partielle de BMK-1 entraîne une très légère accélération de l'élongation du fuseau lors du passage en anaphase. Sur notre expérience nous remarquons que cette augmentation de la vitesse d'élongation est très faible peut être pas significative, cela peut être dû à une mauvaise

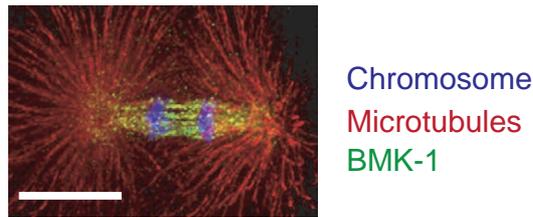


Figure III-21 – Localisation de BMK-1 dans l’embryon de *C. elegans*. La barre d’échelle représente 10 μm . [Saunders et al., 2007]

pénétrance du ARNi. Nous avons cependant cherché à voir si la méthode S3 détectait des différences avec les paramètres de fuseaux d’embryons non-traités.

Lors de la déplétion partielle de BMK-1 (Fig, III-22-A), nous remarquons une décroissance des paramètres K , G et I en fin de métaphase, particulièrement marquée sur I se poursuivant durant le début de l’anaphase. Ce dernier effet se relie à l’effet de frein que décrit Saunders et co-auteurs [Saunders et al., 2007] ; en effet l’inertie nous renseigne sur la dynamique d’attachement et détachement des moteurs, un nombre réduit de moteur augmente la force par BMK-1 et donc le taux de détachement. Cela se traduit par une décroissance de l’inertie. Les courbes dans la seconde représentation (Fig, III-22-D) suggèrent, comme la première représentation un effet, certe plus modeste, sur le frottement fluide. Celui-ci pourrait s’expliquer par le fait que l’attachement dynamique et le détachement de BMK-1 occasionnent un frottement fluide car le réarrangement du réseau de microtubules est d’autant plus pénalisant que l’élongation est rapide à l’instar des microtubules impliqués dans le centrage du fuseau [Howard, 2006].

Il serait intéressant de reproduire l’expérience avec un mutant nul pour confirmer les observations. Le crible d’effets synthétiques avec BMK-1 permettrait de pointer des candidats pour cibler une seconde protéine dont la déplétion couplée à celle de BMK-1 aurait un effet plus important [Maia et al., 2015]. Cela permettrait d’approfondir la compréhension de l’influence de la zone interdigitée sur le comportement mécanique du fuseau mitotique.

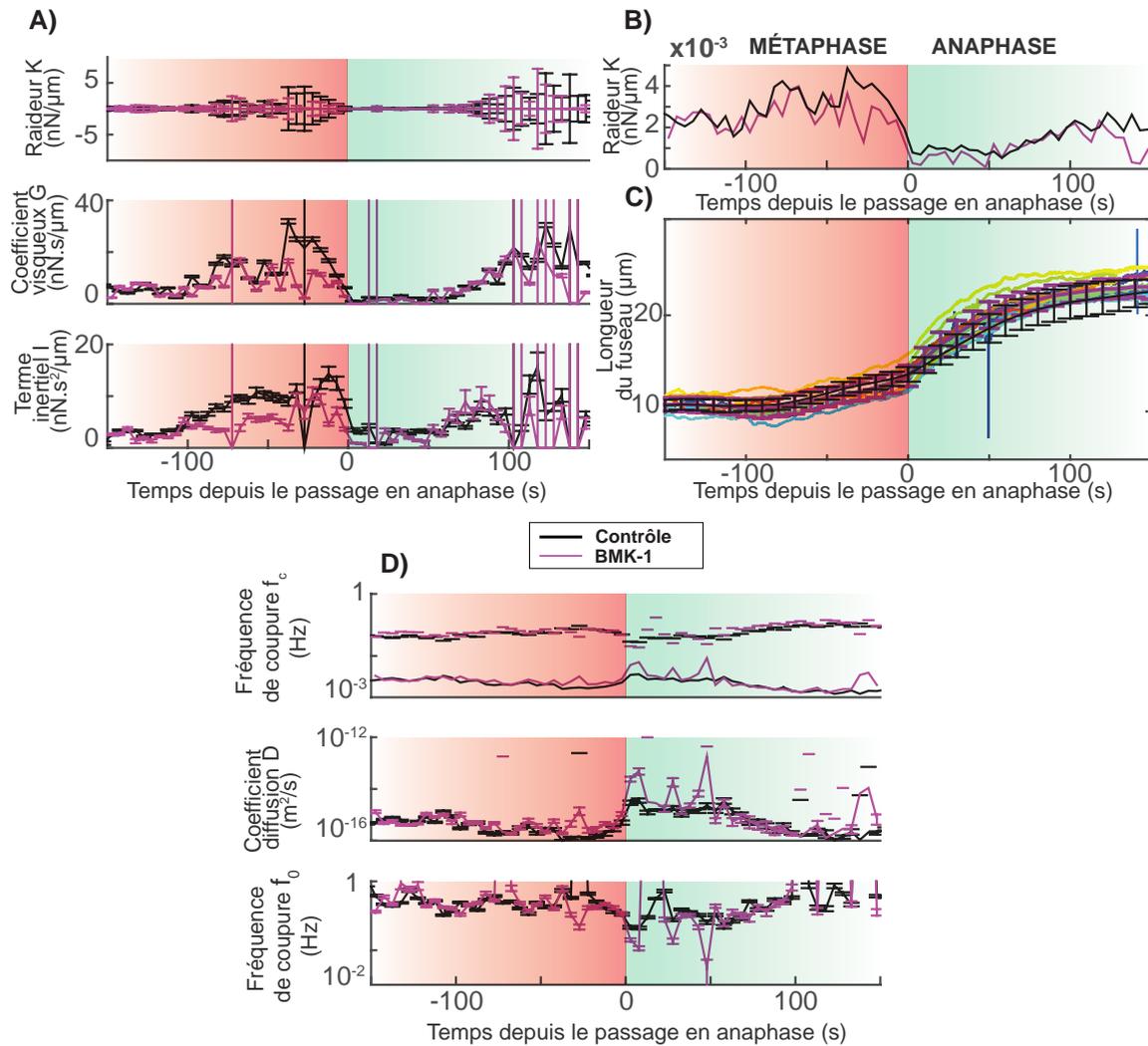


Figure III-22 – Expérience de déplétion de BMK-1 (ARNi 48h, 23°C, N=12) (courbes violettes). Les contrôles sont des N=23 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l’anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l’anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupure f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

6.3.3 Forces trouvant leur origine au niveau du cortex

Chez l'embryon unicellulaire du nématode *C. elegans*, le fuseau mitotique est mis sous tension durant la division cellulaire par des forces provenant de la périphérie de la cellule impliquant les microtubules astraux et le complexe trimérique composé de Dynéine, GPR-1/2 et LIN-5, ancré au cortex par des $G\alpha$ [Nguyen-Ngoc et al., 2007] (Fig. III-23). Le déplacement des moteurs dynéines vers l'extrémité (-) des microtubules conduit à la production de forces de traction appliquées sur les pôles du fuseau et qui participent à son élongation [Pecreaux et al., 2006]. Les protéines GPR-1/2 présentent une répartition asymétrique au niveau du cortex ce qui conduit à une asymétrie des moteurs actifs et donc une asymétrie des forces de traction. Cette asymétrie permet le déplacement du fuseau vers le côté postérieur de l'embryon [Hyman, 1989].

Nous souhaitons voir l'impact de ces forces, dites externes, sur la mécanique du fuseau, en s'interrogeant sur une possible adaptation du fuseau à son environnement.

6.3.3.1 Déplétion d'une protéine membre du complexe trimérique générateur des forces corticales

Nous souhaitons savoir si une modification du nombre des générateurs de forces actifs au cortex, pouvait modifier la mécanique du fuseau mitotique. Pour cette expérience nous avons supprimé partiellement la protéine GPR-1/2 par la méthode d'interférence d'ARN (nourrissage) sur une durée de 24h à 18°C sur des embryons dont les pôles du fuseau sont marqués par la GFP:: γ -tubuline.

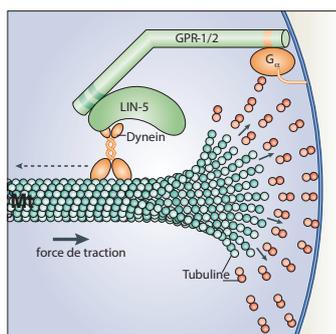


Figure III-23 – Complexe trimérique générateur des forces corticales. [Gonczy, 2008]

Le positionnement du centrosome postérieur lors de la déplétion partielle de GPR-1/2 nous a permis de valider que notre déplétion avait été efficace. Nous observons, dans le cas où nous avons supprimé partiellement GPR-1/2, que les oscillations présentes dans les embryons non-traités sont réduites chez les embryons traités ce qui est cohérent avec les phénotypes attendus pour cette déplétion [Pecreaux et al., 2006]. Nous avons ensuite appliqué l'analyse S3 pour étudier les fluctuations de ces longueurs.

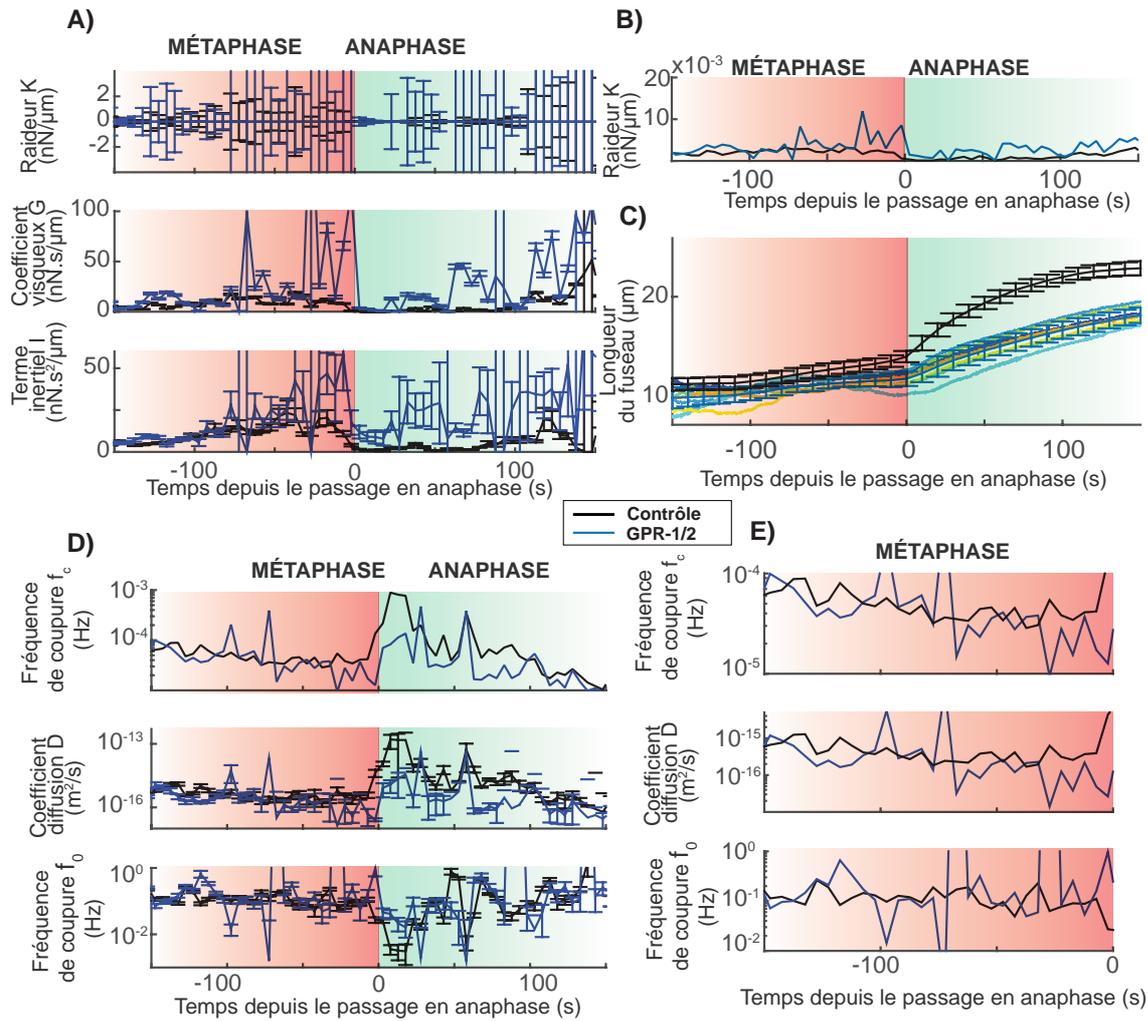


Figure III-24 – Expérience de déplétion de GPR-1/2 (ARNi 24h, 18°C, N=8) (courbes bleues). Les contrôles sont des N=16 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l’anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l’anaphase. **(A)** Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . **(B)** Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. **(C)** Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. **(D)** Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupe f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté. **(E)** Zoom sur les trois paramètres f_c , D et f_0 en métaphase.

Les résultats de l'analyse S3, suggèrent une forte perturbation de la mécanique du fuseau (Fig. III-24-A). Nous observons que les trois paramètres K , G et I augmentent fortement principalement en anaphase, suggérant un effet sur le bruit. La seconde représentation indique que la déplétion de GPR-1/2 à principalement une influence sur le coefficient de diffusion et non sur les fréquences de coupure (Fig. III-24-D & E). Cette observation appuie l'idée que cette déplétion modifie fortement le bruit appliqué au fuseau et non sa mécanique. Un autre aspect frappant de cette déplétion réside dans l'absence de découplage en anaphase précoce. Une interprétation possible serait que la force au cortex est insuffisante pour décrocher les moteurs et agents de réticulations et provoquer le découplage.

6.3.3.2 Diminution de la rigidité du cortex.

Nous nous sommes alors interrogés sur l'influence du cortex sur la mécanique du fuseau : est-ce que dans notre mesure du couplage entre les deux pôles le cortex jouait un rôle ? En d'autres termes, le système microtubules-cortex ferait-il partie d'un «fuseau effectif» sondé par l'analyse S3. Pour cela nous avons utilisé les expériences diminuant la rigidité du cortex par la déplétion de NMY-2 qu'ont réalisé Stéfanie Redemann et co-auteurs [Redemann et al., 2010]. Durant ces expériences, l'affaiblissement du cortex entraîne la création d'un tube de membrane lorsqu'une dynéine tire sur un microtubule astral. Ces expériences ont montré que durant l'anaphase, lorsque les forces de traction se renforcent des tubes apparaissent massivement là où les microtubules astraux tirent sur le cortex, révélant la position des générateurs de forces. Ces derniers sont alors moins efficaces pour l'élongation du fuseau.

L'expérience est réalisée par ARNi durant 20h à 18°C sur des embryons dont les pôles du fuseau sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Nous observons que durant *nmy-2* (ARNi) le passage en anaphase est marqué par une chute du paramètre de viscosité G qui reste néanmoins au-dessus du cas contrôle. Le paramètre inertiel semble être stable durant la période étudiée contrairement au cas contrôle. Sur la seconde représentation, nous remarquons que le coefficient de diffusion est le plus affecté en anaphase (Fig. III-25-D). Cela suggère donc une diminution de la source de bruit en anaphase. Ce phénotype est proche de celui de *gpr-1/2* (ARNi) pour l'anaphase. Cependant, nous remarquons un effet inverse de la déplétion de NMY-2 sur le paramètre de l'inertie et une modification de f_0 par rapport à l'effet de la déplétion de la GPR-1/2 en métaphase tardive (Fig. III-25-E). Ces phénotypes différents sont cohérents avec ce qui est observé au niveau du positionnement du fuseau mitotique où durant la métaphase, la déplétion de GPR-1/2 stabilise le positionnement alors que la déplétion de NMY-2 le rend moins précis [Pecreaux

et al., 2016]. Néanmoins nous ne sommes pas capable pour le moment d'expliquer l'origine de la diminution du terme inertiel dans le cas *nmy-2* (*ARNi*).

La modification du bruit par la déplétion de GPR-1/2 était attendue, ce qui fait de cette expérience une observation de référence lors de l'analyse pour comprendre l'influence de la source de bruit sur les paramètres. Ceci dit, il est intéressant de noter que les propriétés mécaniques du fuseau, caractérisées ici par f_c et f_0 ne sont pas modifiées en dehors de la fin de la métaphase. Cela suggère une potentielle homéostasie du fuseau lui permettant de s'adapter aux perturbations, bien que le découplage disparaisse dans ces conditions.

6.3. VERS UNE ÉTUDE FONCTIONNELLE DU FUSEAU MITOTIQUE

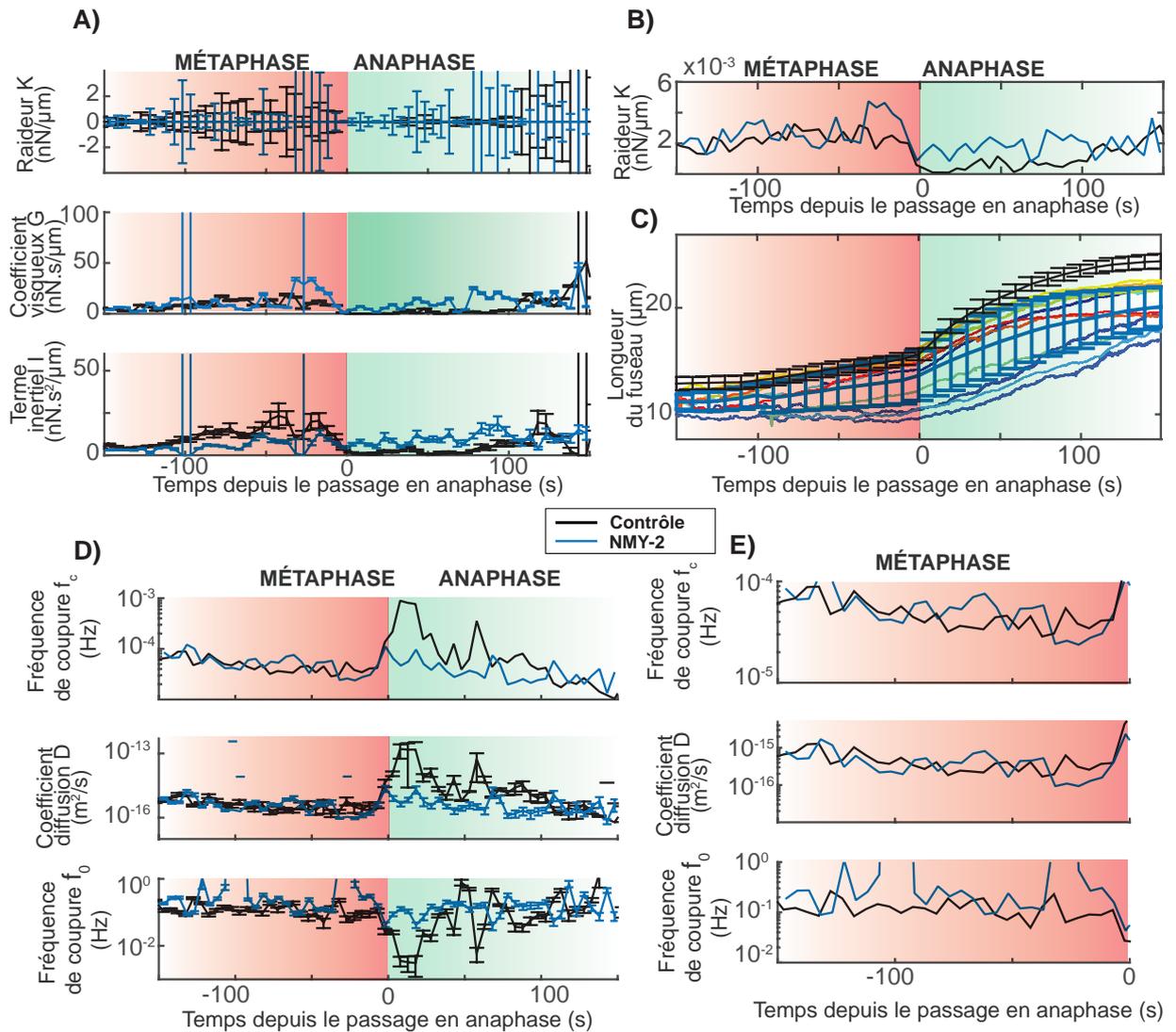


Figure III-25 – Expérience de déplétion de NMY-2 (ARNi 20h, 18°C, N=10) (courbes bleues). Les contrôles sont des N=16 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l'anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l'anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenu par l'analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l'inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d'erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupe f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l'inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d'erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté. (E) Zoom sur les trois paramètres f_c , D et f_0 en métaphase.

6.3.4 Forces trouvant leur origine au niveau du fuseau central

Une dernière structure ayant de l'importance est le fuseau central. Il pourrait participer à la séparation des chromatides soeurs en anaphase [Nahaboo et al., 2015; Verbrugghe and White, 2004]. Nous avons alors ciblé SPD-1 qui est une protéine de réticulation des microtubules (Fig. III-26). Sa déplétion partielle conduit à une élongation rapide du fuseau sous l'effet des forces corticales [Maton et al., 2015]. Nous avons donc perturbé cette structure pour observer son rôle dans la mécanique du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire.

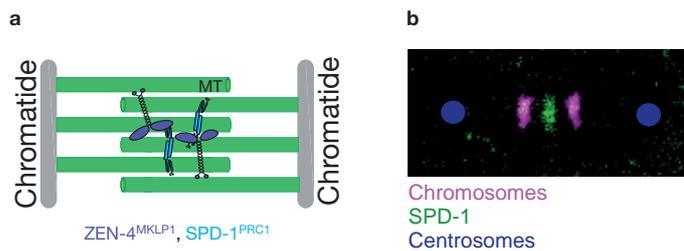


Figure III-26 – **a** Formation du fuseau central en anaphase, **b** Localisation de SPD-1 dans l'embryon de *C. elegans*. [Maton et al., 2015]

Lors de la déplétion de SPD-1 par interférence d'ARN (nourrissage) sur une durée de 48h à 23°C sur une lignée avec marquage des centrosomes (GFP:: γ -tubuline) nous n'avons pas observé de phénotype sur la longueur avant l'anaphase (Fig. III-27-C), comme attendu d'après les données bibliographiques nous observons que les pôles du fuseau se séparent plus rapidement au passage en anaphase lors de la déplétion, ce qui a validé notre déplétion partielle de SPD-1. Après le passage en anaphase, les valeurs du frottement visqueux et du terme inertiel chutent plus fortement que ceux des contrôles et restent faibles plus longtemps puis remontent en fin d'anaphase, ce qui suggère que le fuseau central est affecté. Ce phénotype en anaphase, plus inattendu du point de vue de la longueur seul suggère que SPD-1 participe ainsi à préserver l'intégrité du fuseau, comme son homologue *ase1p* chez la levure *S. pombe* [Courtheoux et al., 2009].

Cette expérience montre ici l'intérêt de la méthode S3 car elle permet en effet d'observer des phénotypes connus sous un autre angle pour en retirer de nouvelles données et donc de nouvelles idées d'interprétations. Il reste cependant difficile à interpréter en l'état et il nécessiterait des expériences complémentaires pour pouvoir aller plus loin dans l'interprétation.

6.3. VERS UNE ÉTUDE FONCTIONNELLE DU FUSEAU MITOTIQUE

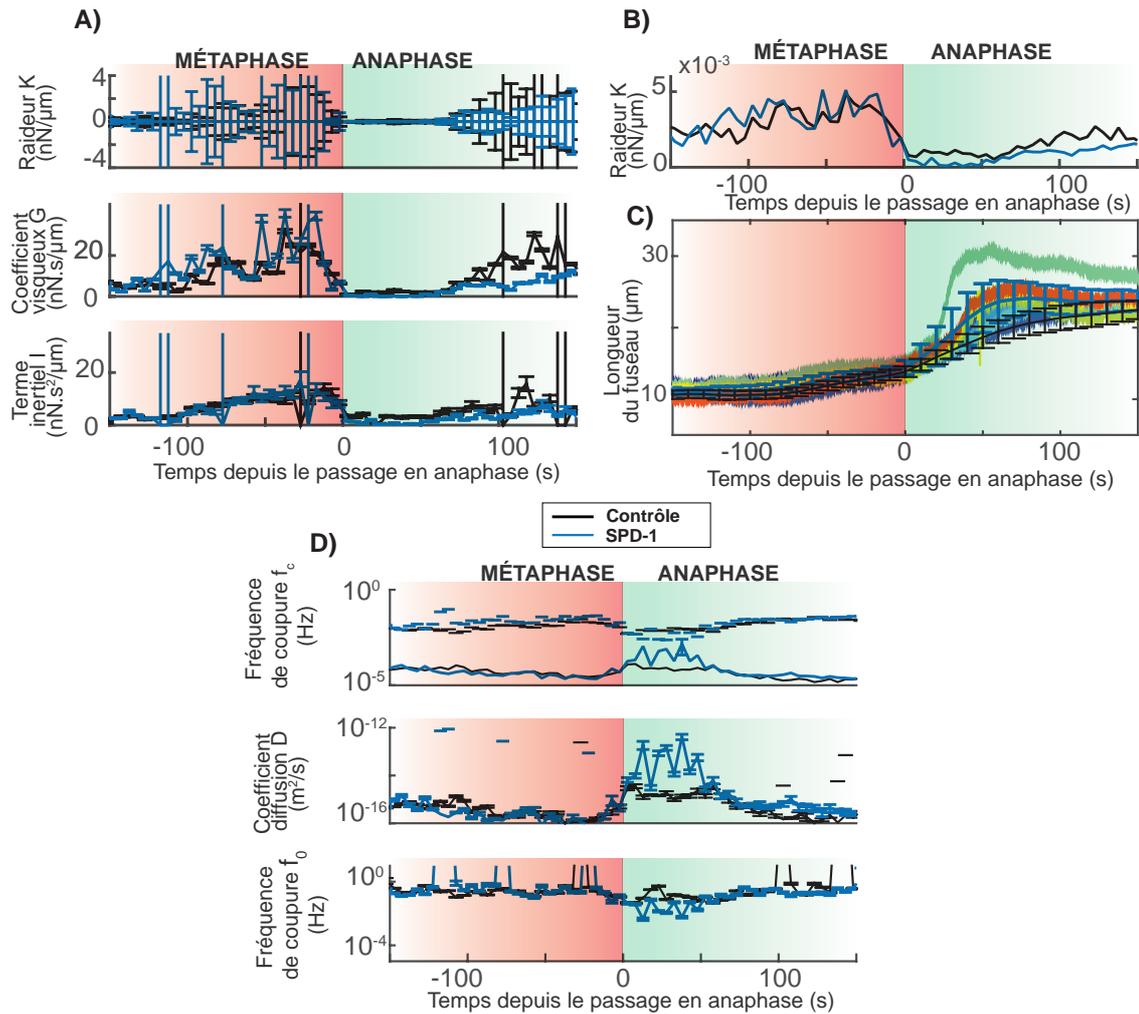


Figure III-27 – Expérience de déplétion de SPD-1 (ARNi 48h, 23°C, N=9) (courbes bleues). Les contrôles sont des N=23 embryons non traités (courbes noires). Les centrosomes des embryons sont marqués par la GFP:: γ -tubuline. Les embryons sont alignés temporellement sur le début de l'anaphase. La zone sur fond rouge correspond à la métaphase et celle sur fond vert à l'anaphase. (A) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l'analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l'inertie I . (B) Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d'erreurs pour une meilleure visualisation. (C) Évolutions temporelles des longueurs du fuseau, les courbes de couleurs représentent les différents embryons des expériences de déplétion. (D) Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau : en haut et en bas les fréquences de coupe f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l'inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d'erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

6.4 Généralisation de la méthode S3 : application au fuseau mitotique de la levure *S. pombe*, expériences préliminaires

L'équipe d'accueil étudie la mécanique du fuseau mitotique chez *C. elegans*, entre autres pour comprendre les forces mécaniques en jeu dans les mécanismes de correction des erreurs d'attachement des chromosomes. Dans cette perspective, l'équipe CeDRE collabore avec le laboratoire de Sylvie Tournier et Yannick Gachet (CBI¹ de Toulouse), expert dans la correction des erreurs d'attachements des chromosomes. Cette équipe travaille sur l'organisme modèle *S. pombe*, qui de par sa simplicité, permet de voir des événements individuels quand *C. elegans* offre plutôt la vision des aspects collectifs. La méthode S3 sera au coeur de cette étude comme outil pour disséquer les mécanismes de correction.

Avant de pouvoir faire cette étude des corrections des erreurs d'attachement des chromosomes en parallèle chez ces deux organismes, il nous fallait prouver que la méthode S3 développée durant cette thèse pouvait être exportée chez un organisme différent du nématode *C. elegans*.

Imagerie Avant de pratiquer l'analyse S3 chez *S. pombe*, nous avons imagé les pôles du fuseau mitotique en les marquant par une protéine fluorescente. Cette étape d'imagerie biologique a été réalisée dans le laboratoire de Toulouse sur des cellules de *S. pombe*, dont les pôles sont marqués par *cdc11*-GFP, elles ont été filmées à (très) faible illumination grâce à la sensibilité de la caméra. Cela a aussi permis l'imagerie rapide (25Hz) qui est une condition essentielle à l'approche S3.

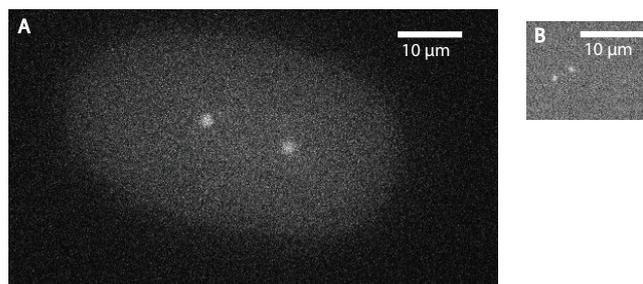


Figure III-28 – Comparaison d'une cellule de *S. pombe* et d'un embryon unicellulaire *C. elegans* en métaphase où les pôles du fuseau sont marqués **A)** par la GFP:: γ -tubuline, **B)** par la *cdc11*-GFP. (l'échelle est la même pour les deux images).

¹Centre de Biologie Intégrative

Validation sur des cellules fixées Une fois l'imagerie faite à Toulouse, nous avons cherché à suivre les pôles avec une résolution spatiale nous permettant de mesurer les fluctuations de la longueur du fuseau. Le fuseau mitotique de la levure est plus petit que celui du nématode (7 à 15 μm vs. 15 à 25 μm) et ses pôles sont environ deux fois moins larges (Fig. III-28), l'étape de tracking a donc été délicate. Ainsi avant de poursuivre l'étude de la mécanique du fuseau de *S. pombe* via une analyse temps-fréquence des fluctuations de longueur, nous avons validé que les fluctuations étaient d'origine biologique en comparant le spectre de fluctuations à celui obtenu sur des cellules fixées (cf. section 5.1.1). Après avoir suivi les pôles du fuseau sur des films N=7 cellules fixées et N=2 cellules vivantes (analyse préliminaire) de *S. pombe* présentant le même marquage des pôles (*cdc-11::GFP*), nous avons calculé les spectres de fluctuations sur ces deux jeux de données dans des conditions identiques avec notamment une taille de fenêtre de Hann de 2048 points (62 s) (Figure III-29). Dans la gamme de fréquences d'intérêt, correspondant *a priori* à des fluctuations d'origine biologique et située entre 0.02 Hz et 0.35 Hz, nous avons observé que le spectre des cellules vivantes se trouve deux décades au-dessus de celui des cellules fixées. Ceci valide l'origine biologique des fluctuations mesurées chez *S. pombe*. Par ailleurs, le fait que les plateaux finaux des deux spectres soient à la même hauteur signifie que le bruit de détection est de même amplitude dans les deux conditions, ce qui était attendu.

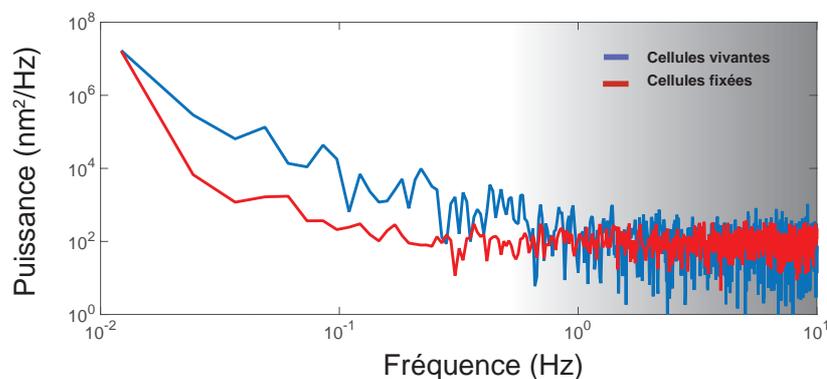


Figure III-29 – Comparaison des densités spectrales de puissance pour N=7 cellules fixées (courbe rouge) et N=2 cellules vivantes (courbe bleue) de *S.pombe* dont les pôles du fuseau sont marqués par la *cdc11-GFP*. Les spectres correspondent aux transformées de Fourier discrètes des trajectoires convoluées avec la transformée de Fourier de la fenêtre de Hann de 2048 points soit 62 s. La zone grisée correspond aux grandes fréquences dominées par le bruit de détection (voir section 4.1.1).

Résultat préliminaire sur des cellules vivantes Après avoir démontré la pertinence biologique des fluctuations, nous avons souhaité vérifier que nous pouvions mesurer une modulation temporelle des paramètres mécaniques du fuseau. Nous avons donc pratiqué l'analyse S3 sur les $N=2$ cellules vivantes avec une taille de fenêtre de Hann de 512 points (15 s) en utilisant les fluctuations de longueur entre -20 et + 60 secondes depuis le début de l'anaphase B. Nous remarquons sur la figure III-30 que nous sommes capables d'observer des modulations des paramètres mécaniques, notamment pour le coefficient visqueux G et la raideur K , avec une chute de la valeur de ces deux paramètres environ 10 s avant la transition entre anaphase A / anaphase B, qui remontent tout deux légèrement à la transition, puis plus fortement à + 15 s de la transition. Il semble, comme pour *C. elegans*, qu'il y ait découplage des pôles du fuseau au passage en anaphase B au vu des évolutions de la viscosité et de l'inertie. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres pourraient indiquer que comme pour le nématode la viscosité domine la mécanique du fuseau. Nous pouvons aussi noter que les ordres de grandeur des valeurs des paramètres mécaniques K , G et I chez *S. pombe* sont environ 10 fois plus élevés que ceux obtenus pour *C. elegans*, alors que les fréquences de coupure f_c et f_0 sont dans les mêmes ordres de grandeur que chez *C. elegans*, ce qui suggère une variation du niveau de bruit entre les deux organismes. Ceci ne paraît pas surprenant étant donné que le fuseau des cellules de *S. pombe* compte moins d'acteurs que celui de l'embryon de *C. elegans* et que le fuseau de la levure est bien plus petit, ce qui pourrait réduire l'amplitude du bruit stochastique. Ici, pour faire le calcul nous avons utilisé la modélisation de la puissance du bruit stochastique faite pour le nématode.

Ces premiers résultats obtenus sur la mécanique du fuseau mitotique de *S. pombe* sont prometteurs, mais appellent à être reproduits sur un nombre plus important de cellules. La période temporelle réduite à seulement 80 s autour de la transition anaphase A / anaphase B pourrait être opportunément étendue afin d'observer le passage en anaphase A, qui est ici difficile à prendre en compte. Ils prouvent néanmoins l'applicabilité de la méthode S3 chez la levure afin d'étudier la mécanique de son fuseau mitotique.

6.4. GÉNÉRALISATION DE LA MÉTHODE S3 : APPLICATION AU FUSEAU MITOTIQUE DE LA LEVURE *S. POMBE*, EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

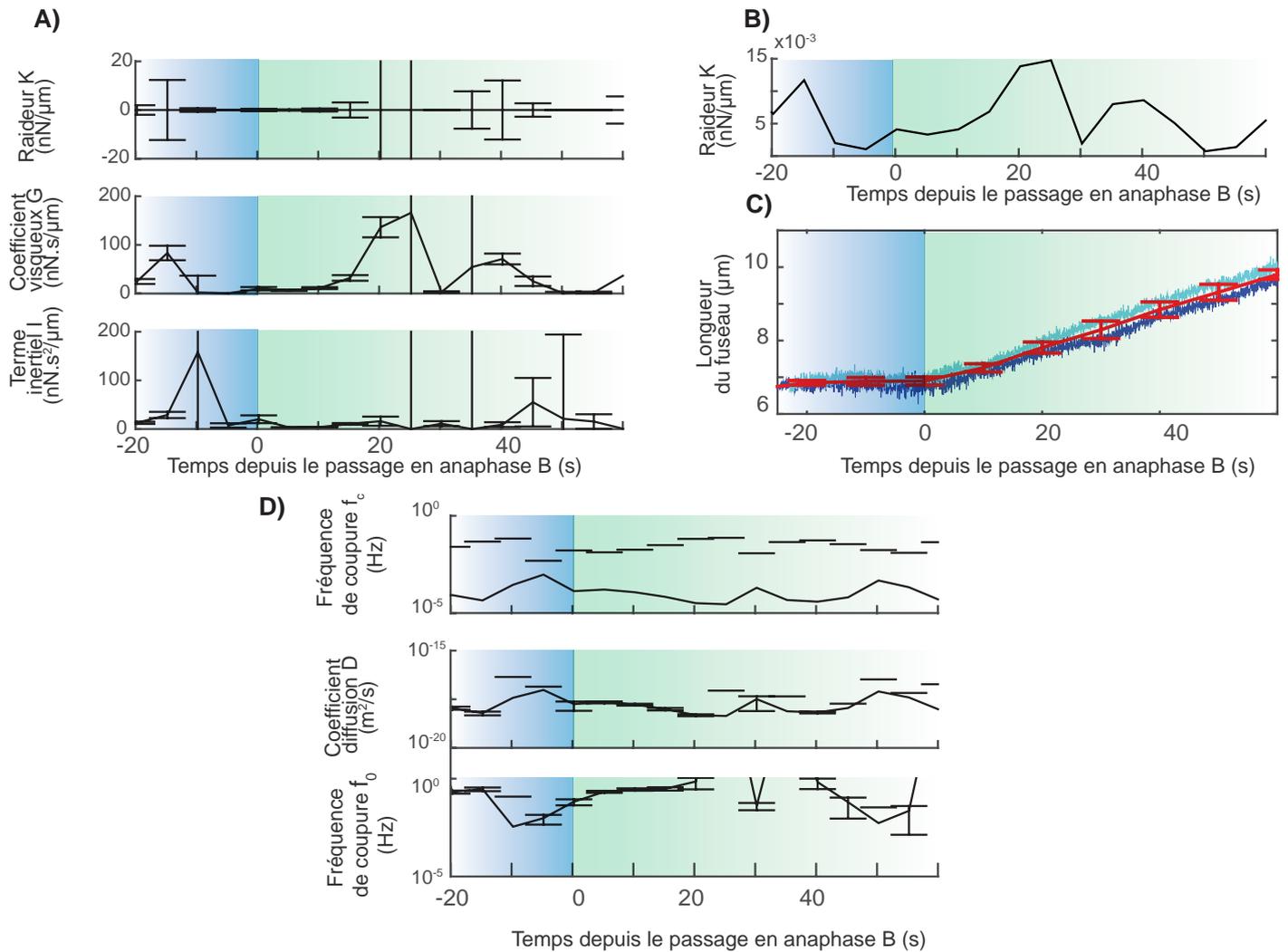


Figure III-30 – Analyse S3 avec une fenêtre de Hann de 512 points (15 s) de $N=2$ cellules de *S. pombe* non-traitées dont les pôles du fuseau sont marqués par *cdc11-GFP*. La zone sur fond bleu correspond à l’anaphase A et celle sur fond vert à l’anaphase B. **(A)** Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau obtenues par l’analyse S3 (modèle de Kelvin-Voigt avec inertie) dans la représentation KGI : en haut la raideur du ressort K , au milieu le module du frottement fluide G et en bas l’inertie I . **(B)** Évolutions temporelles de la raideur du ressort sans barre d’erreurs pour une meilleure visualisation. **(C)** Évolution temporelle des longueurs du fuseau, les courbes de couleur représentent les différentes cellules. **(D)** Évolutions temporelles des paramètres mécaniques du fuseau dans la représentation $f_c D f_0$: en haut et en bas les fréquences de coupure f_c rapportant le ratio de la raideur sur le frottement fluide et f_0 rapportant le ratio du frottement fluide sur l’inertie, au milieu le coefficient de diffusion D en échelle logarithmique. Les barres d’erreurs sont représentées par leurs extrémités par souci de clarté.

6.5 Conclusion

Ces premières mesures de la mécanique du fuseau mitotique *in vivo* dans des conditions physiologiques nous ont permis de montrer que sa mécanique, qui est dominée par le frottement visqueux, est modulée temporellement. La possibilité de suivre temporellement le comportement mécanique du fuseau tout au long de la division a permis de mettre en évidence un découplage des deux pôles lors du passage en anaphase. Ce découplage des deux pôles du fuseau peut être vu comme une rupture du fuseau mitotique durant 30 secondes après le passage en anaphase.

L'utilisation de la génétique moléculaire associée à notre méthode S3 a permis de souligner une influence différente des forces (internes et externes au fuseau) dans la mécanique du fuseau et les moments de la mitose où elles agissent. D'une part, nous avons pu retrouver des événements connus affectants le fuseau par la caractérisation de sa signature mécanique. Cela valide l'applicabilité de notre analyse en biologie pour étudier le fonctionnement du fuseau, non seulement chez le nématode *C. elegans* mais aussi chez la levure *S. pombe*. D'autre part, un certain nombre d'observations sont en l'état difficilement interprétables, mais promettent des découvertes grâce au nouvel angle de vue sur le fuseau mitotique permis par la méthode S3. Ainsi en est-il de l'impact des forces corticales qui agissent sur la mécanique du fuseau.

Partie IV

Discussion/Perspectives



Chapitre 7

Discussion

7.1 L'analyse des fluctuations de longueur une approche adaptée à l'étude du fuseau mitotique

Les nombreuses études biochimiques du fuseau mitotique ont permis d'identifier les principaux acteurs en jeu mais ont donné une vision assez statique du fuseau. L'aspect mécanique du fuseau a alors été considéré comme la résultante de la biochimie.

Depuis le milieu des années 80s Mitchison et ses collaborateurs ont montré que les microtubules étaient très dynamiques, ce qui a amorcé un changement de la vision du fuseau mettant en exergue son aspect dynamique et de système complexe [Mitchison and Kirschner, 1984; Kirschner and Mitchison, 1986a; Kirschner and Mitchison, 1986b]. Cette nouvelle vision a ouvert le champ à l'analyse du fuseau par des approches de (bio)physiques et de modélisation, pour identifier les interactions mécaniques qui complètent les voies de signalisation biochimiques déjà connues. Le rôle de la mécanique du fuseau est illustré par exemple par la détection du bon attachement des chromosomes par les microtubules kinétochoriens. En effet, ce processus, le SAC, se réalise par un test de tension entre les deux pôles du fuseau et, lorsqu'il est satisfait, déclenche une cascade de réactions, qui finira par dégrader le lien entre les chromatides soeurs et va permettre leurs ségrégations [McIntosh, 1991]. Un autre exemple du rôle de la mécanique est la correction des erreurs d'attachement des chromosomes, qui met en jeu des forces mécaniques durant l'anaphase [Courtheoux et al., 2009].

La mécanique du fuseau semble essentielle à son fonctionnement et à la réalisation de ses rôles majeurs. Ainsi, la mécanique du fuseau a été abordée notamment par des approches *in vitro* et *in silico*, qui ont grandement fait avancer les connaissances sur ce

domaine. Cependant, une compréhension globale du comportement mécanique du fuseau en lien avec les acteurs microscopiques nous échappe toujours car les données disponibles ne suffisent pas à contraindre suffisamment les modèles [Wollman et al., 2008].

Dans ce travail de thèse nous avons visé une modélisation unique du comportement mécanique du fuseau. Nous avons établi notre cahier des charges sur la mise au point de notre méthode :

- Nous souhaitons laisser le fuseau dans son contexte physiologique, nécessitant l'utilisation d'une méthode non invasive et *in vivo*.
- La structure du fuseau change au cours de la division, passant d'un fuseau composé de microtubules interdigités et kinétochoriens reliés aux chromatides soeurs en métaphase à une structure nommée fuseau central en anaphase qui participe à la ségrégation des chromatides soeurs. Ainsi, notre méthode devait être résolue temporellement.
- Pour faciliter l'interprétation, nous souhaitons récapituler les résultats dans un modèle physique.

7.1.1 Analyse des fluctuations de la longueur pour étudier la mécanique du fuseau

L'analyse des fluctuations de la longueur du fuseau mitotique nous a permis de retirer des informations d'ordre structural, notamment lors du passage en anaphase où nous observons un découplage des deux pôles du fuseau. Les fluctuations mesurées reflètent le couplage entre les deux pôles du fuseau par les microtubules du fuseau et les moteurs les liants dans le fuseau mitotique à l'exclusion des microtubules astraux, qui auraient pu relier les deux pôles par le cortex. Nous obtenons ces résultats tout en préservant le fuseau dans son contexte physiologique et en ayant une dépendance en temps, à l'inverse des méthodes d'imagerie super-résolue ou de microscopie électronique.

7.1.2 Suivi temporel de la mécanique du fuseau et modélisation des fluctuations par un modèle Kelvin-Voigt avec inertie

Une nouveauté de la méthode est l'utilisation d'une fenêtre glissante couplée à la transformée de Fourier discrète aux temps courts pour analyser le signal et introduire une dépendance au temps afin de satisfaire le point 2 de notre cahier des charges. Nous avons

choisi une fenêtre de Hann, adaptée à notre outil physique d'analyse, de 512 points soit 15 s. Le choix de la taille de la fenêtre a été motivé par deux points. Premièrement, au vu de l'aspect dynamique du fuseau mitotique, notre hypothèse de quasi-stationnarité n'était valable que pour des temps courts inférieurs à 30 secondes ; deuxièmement, la fenêtre d'analyse devait être d'une taille suffisamment grande pour explorer les petites fréquences et conclure sur un mécanisme de maintien de la longueur du fuseau. La fenêtre de 512 points nous a alors paru être le bon compromis pour une bonne détermination des paramètres mécaniques du modèle et satisfaire l'hypothèse de quasi-stationnarité du signal dans cet intervalle. Elle nous permet également d'avoir une bonne résolution temporelle de la mécanique. Cependant, ce choix signifiait que les événements, qui durent moins de 15 secondes, seraient moyennés dans le signal analysé et seraient donc impossibles à observer par notre méthode. Ce moyennage est nécessaire pour appliquer un modèle classique via une approche de modélisation gros grain (cf section 2.2.3).

L'avantage de la transformée de Fourier aux temps courts est de pouvoir ajuster un modèle et donc de satisfaire le point 3 du cahier des charges. Le modèle de Kelvin-Voigt avec inertie utilisé est classique, c'est le pendant des modèles dit "tug-of-war" (tir à la corde) nombreux en biologie, par exemple lors de l'analyse du transport intra cellulaire le long des microtubules [Pecreaux et al., 2006; Rezaul et al., 2016; Muller et al., 2008]. Il est alors facilement interprétable pour les non-spécialistes de la modélisation.

7.1.3 La méthode S3, un outil d'analyse mécanistique intra cellulaire généraliste

Nous avons développé notre méthode S3, "*spindle spectral signature*" dans l'optique de briser certaines barrières existantes dans le domaine. Cet outil nous a permis d'obtenir l'évolution temporelle des paramètres mécaniques du début de la métaphase jusqu'à la fin de l'anaphase avec une résolution temporelle de 15 secondes. Nos résultats sont obtenus dans des conditions physiologiques, grâce à l'utilisation de la microscopie optique, avec un contrôle de la puissance du laser d'excitation. Ainsi, notre outil a permis de récapituler en un modèle unique l'évolution du fuseau mitotique du début de la métaphase à la fin de l'anaphase, facilitant ainsi la compréhension du fonctionnement du fuseau tout au long de la division.

L'utilisation de la méthode S3 peut être plus générale que la simple application au fuseau du nématode *C. elegans*. En effet, l'automatisation de la génération de toutes les fonctions de calcul permet de changer de modèle simplement. Dans le cadre de la

collaboration avec l'équipe de Sylvie Tournier et Yannick Gachet, nous sommes amenés à étudier la mécanique du fuseau chez la levure *S. pombe*. Nous avons ainsi démontré que notre outil S3 peut être appliqué à d'autres organismes, ici *S. pombe*. Nous pouvons aller encore plus loin en changeant complètement d'objet d'étude: par exemple, la méthode serait alors capable de s'appliquer à d'autres champs de la mécanique subcellulaire. La seule limite est ici de pouvoir imaginer dans les bonnes conditions, pour avoir une résolution temporelle appropriée à la dynamique du système étudié et une résolution spatiale cohérente avec la taille des fluctuations attendues.

7.2 Dissection de la mécanique du fuseau mitotique par la méthode S3

7.2.1 La méthode S3 suggère un fuseau dominé par la viscosité et hors équilibre

L'estimation des forces développées par chacun des éléments mécaniques suggère que le comportement mécanique du fuseau mitotique est dominé par le frottement visqueux en cohérence avec les travaux *in vitro* sur des extraits de xénopes [Shimamoto et al., 2011]. À l'inverse de certaines études du fuseau, nous ne retrouvons pas de raideur de ressort significative, ce qui suggère l'absence d'un mécanisme de maintien de la longueur du fuseau mitotique au cours de la division [Ward et al., 2014; Takagi et al., 2013]. Cette différence peut s'expliquer par les différents organismes étudiés. Il serait ainsi intéressant de poursuivre l'étude du fuseau mitotique chez *S. pombe* en mesurant l'évolution de sa mécanique du début de la métaphase à la fin de l'anaphase B. L'aspect très visqueux, sans mécanisme de maintien de la longueur, corrèle bien avec la constante élongation du fuseau observée expérimentalement en métaphase. De plus, cette lente dérive en métaphase apparaît en contradiction avec la vision répandue du fuseau à l'équilibre entre les forces, qui l'allongent, et celles, qui le raccourcissent. Cela pourrait indiquer un fuseau, qui serait dans un état hors équilibre, c'est-à-dire que les forces en jeu ne s'équilibrent pas, comme déjà suggéré auparavant [Brugues and Needleman, 2014]. Un fuseau mitotique hors équilibre lors de la division cellulaire semble pertinent car cet état permettrait une meilleure adaptabilité aux perturbations [Prost et al., 2015]. En effet, lorsqu'il est à l'équilibre, le fuseau, pour répondre à une perturbation, devrait sortir de cet état d'équilibre, comme pour déplacer une réaction chimique à l'équilibre face à une énergie d'activation. Par ailleurs, l'état hors équilibre du fuseau serait cohérent avec la rapidité des réarrangements du fuseau au cours de la mitose et sa capacité à réagir vite aux perturbations internes à la division, par exemple les erreurs d'attachement des chromosomes.

7.2.2 Déconnexion des deux pôles du fuseau en anaphase précoce

Nous avons observé que les paramètres mécaniques, raideur du ressort, frottement visqueux et terme inertiel, chutent fortement lors du passage en anaphase, ce que nous avons interprété comme une découplage (partiel) des pôles du fuseau. Ils croissent ensuite lentement en anaphase, suite probablement à la mise en place du fuseau central. Nos résultats montrent que, comme attendu, la séparation des chromatides soeurs a un fort impact sur la mécanique du fuseau et son intégrité. De plus, ces observations semblent indiquer que l'élongation du fuseau mitotique en début d'anaphase se base sur les forces corticales jusqu'à la mise en place du fuseau central et la réapparition du couplage. Toutefois, il est à noter qu'en l'absence de GPR-1/2, le fuseau subit une élongation de moitié. Ainsi, un second mécanisme d'élongation est sans doute présent en accord avec l'étude de Nahaboo et co-auteurs, mais secondaire en tout début d'anaphase [Nahaboo et al., 2015].

7.2.3 L'inertie du fuseau et la dynamique des acteurs

L'interprétation du terme inertiel peut apparaître plus délicate à faire. L'inertie, ici, ne représente pas la masse du fuseau, mais résulte de la dynamique des moteurs, comme suggérés précédemment [Pecreaux et al., 2006]. Cela semble être validé par la dépendance que nous notons de l'inertie à la température lors de la comparaison des résultats pour les embryons contrôlés à 23°C et 18°C. En termes d'adaptabilité, l'inertie est également un paramètre majeur : en effet un système très inertiel s'adapte moins bien. La baisse d'inertie observée en fin de métaphase et début d'anaphase est donc cohérente avec cette idée, car c'est l'instant où le fuseau a le plus besoin «d'évoluer» en vue de la correction des erreurs d'attachement.

7.3 L'analyse S3 pour déchiffrer le rôle mécanique des acteurs moléculaires du fuseau

La réalisation de déplétions génétiques en complément de notre outil S3 nous a permis de commencer à mesurer l'impact des différentes structures présentes au sein du fuseau. Il est intéressant de souligner l'adéquation entre nos mesures et des phénotypes connus. Cela valide la capacité de la méthode à sonder dynamiquement la mécanique du fuseau et peut nous aider à analyser la structure du fuseau et son fonctionnement.

Au-delà de confirmer des phénotypes connus, notre outil a été développé aussi dans une optique exploratoire pour suggérer de nouvelles interprétations par l'observation de

phénotypes sous un nouvel angle de vue. Par exemple, dans le cas de la déplétion de CLS-2, nous n’observons pas de couplage une fois la transition métaphase/anaphase dépassée. Cette absence de couplage entre les deux pôles du fuseau indique que le fuseau central n’est pas parvenu à se mettre en place. Cette observation est en accord avec le nouveau rôle découvert à CLS-2 dans l’initiation de l’établissement du fuseau central [Maton et al., 2015].

Plus intéressants, nous remarquons une baisse du terme inertiel lors de la déplétion de BMK-1. Cette baisse semble indiquer que BMK-1 agit comme un frein inertiel sur la mécanique du fuseau mitotique. Cela suggérerait que ce frein est causé par la dynamique des moteurs.

Enfin, lors des expériences de perturbation des forces provenant de la périphérie nous avons fortement diminué une source de bruit sur le fuseau. L’analyse de f_c et f_0 , indique un maintien des propriétés mécaniques du fuseau en général, malgré le raccourcissement. Cela suggère une sorte d’homéostasie mécanique du fuseau, c’est-à-dire une régulation de la mécanique du fuseau autour des propriétés optimales de fonctionnement. Toutefois, nous n’observons plus de découplage des pôles du fuseau lors du passage en anaphase avec des fuseaux plus courts au final. Les forces à la périphérie pourraient être trop faibles pour induire la rupture du fuseau au passage en anaphase et l’élongation totale du fuseau. Dans ces expériences, l’outil S3 permet de mettre en évidence la formidable adaptabilité du fuseau mitotique lors de la division. Cette adaptabilité pourrait être reliée à une robustesse de la division cellulaire dans le sens où le fuseau serait capable de séparer les chromatides soeurs alors qu’il se trouve dans des configurations ou des environnements divers : par exemple, un nombre variable de chromosomes, la variation de la taille des cellules¹, ou de celle des centromères. Cette robustesse peut être accentuée par une forme d’homéostasie mécanique du fuseau mitotique comme suggéré ci-dessus. En effet, le maintien des propriétés mécaniques du fuseau malgré les perturbations renforce sa robustesse à accomplir son rôle.

7.4 Modèle hypothétique : réaction en chaîne et rupture du fuseau au passage en anaphase

À partir de ces premières observations, nous proposons un modèle hypothétique de fonctionnement du fuseau chez le nématode *C. elegans*. En métaphase, les forces de traction provenant de la périphérie sont faibles, car le fuseau est au centre de la cellule et donc

¹Lors du développement, la taille de l’embryon est constante mais celle des cellules décroît au fur et à mesure des divisions.

peu de microtubules astraux sont en interaction avec les générateurs de force du cortex [Riche et al., 2013; Bouvrais et al., prep]. Au sein du fuseau, les structures capables de résister à ces forces de traction sont les chromatides soeurs liées par la cohésine et les microtubules de la zone interdigitée reliés entre eux par les moteurs moléculaires et les agents de réticulation. Le fuseau s'allonge continuellement mais assez lentement pour que les moteurs puissent se réarranger limitant les forces par moteur et le détachement induit par la force. Lors du passage en anaphase, les séparases vont cliver les complexes cohésines et libérer les chromatides soeurs. Ainsi, dans la zone interdigitée il ne reste plus que les moteurs moléculaires et les agents de réticulation capables de s'opposer à l'élongation. La force portée par chaque moteur ou agent augmente et l'équilibre dynamique entre attachement et détachement est déplacé pour favoriser le détachement ; cela va propager une rupture (comme des défauts dans la rupture des matériaux) car les détachements provoquent une réaction en chaîne comme chaque détachement accroît la charge sur les moteurs restant attachés et amplifie le phénomène. Le fuseau va alors s'allonger rapidement et les pôles vont apparaître découplés en analyse S3. Cela pourrait s'apparenter à une signalisation mécanique, qui permettrait l'élongation du fuseau dès la séparation des chromatides soeurs.

Ces expériences et ces résultats préliminaires en vue de comprendre le fonctionnement du fuseau illustrent parfaitement l'intérêt de notre méthode. Elle permet en effet d'observer le fuseau mitotique sous un nouvel angle et permet d'obtenir de nouvelles données nécessaires à une meilleure compréhension du comportement du fuseau. La méthode S3 permet de réanalyser des phénotypes connus pour enrichir la compréhension, tant sur le plan du fonctionnement du fuseau que pour analyser les rôles et influences des acteurs microscopiques. Cet outil permet d'adopter la vision d'un fuseau mitotique dynamique et hors équilibre comme cela a déjà été suggéré pour d'autres systèmes [Needleman and Bruges, 2014; Prost et al., 2015], ces caractéristiques étant importantes pour assurer une adaptabilité du fuseau face aux perturbations et donc améliorer la robustesse de la division.

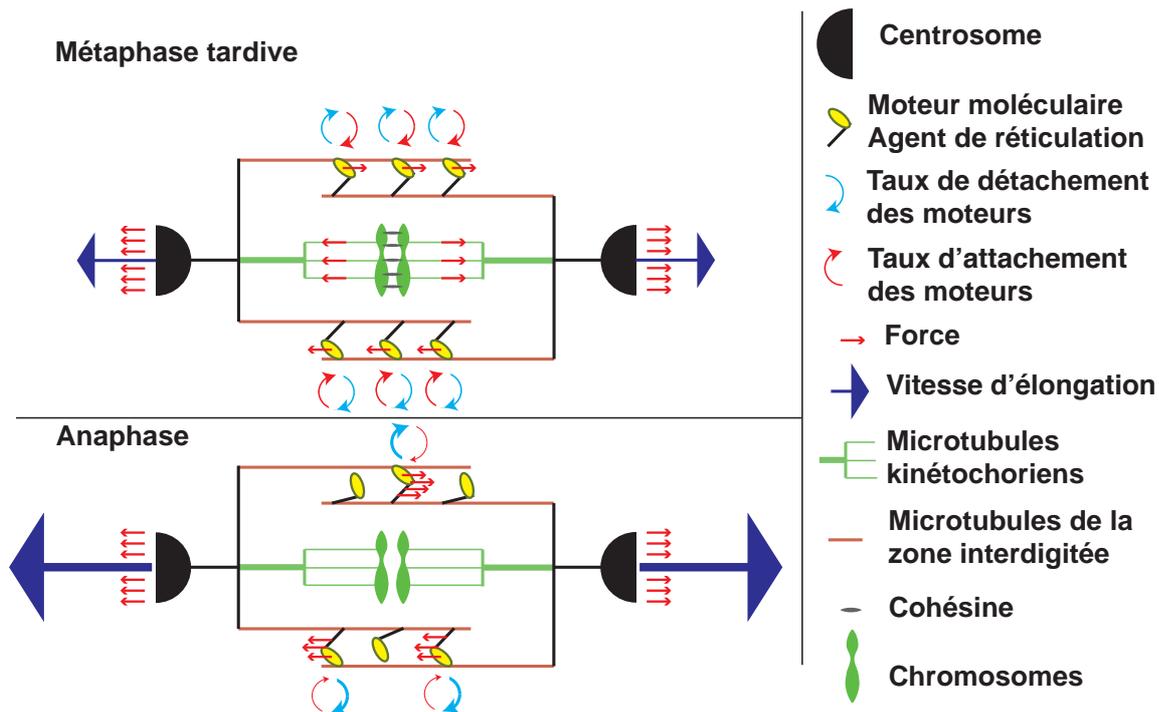


Figure IV-1 – Schéma récapitulant la cascade de réactions suite au passage en anaphase. Nous illustrons ici en particulier la cascade de réaction suite au passage en anaphase. En fin de métaphase, les forces de traction exercées sur les pôles se répartissent sur les moteurs au niveau de la zone interdigitée et sur le lien entre les chromatides soeurs. En anaphase, ce lien disparaît et libère les chromatides : les forces de traction sont alors réparties seulement sur les moteurs de la zone interdigitée, ce qui déplace l'équilibre dynamique attachement/détachement en faveur du détachement. Ainsi, en anaphase précoce, les pôles paraissent découplés et le fuseau s'allonge.

Chapitre 8

Perspectives

L'étude des forces mécaniques du fuseau mitotique du nématode *C. elegans*, réalisable grâce à l'outil développé pendant ma thèse, associée à des déplétions de protéines clés, sera poursuivie pour confirmer mes premiers résultats et tester d'autres pistes avec d'autres protéines impliquées dans la génération de forces. La méthode S3 apportera un nouvel éclairage sur la compréhension du fonctionnement du fuseau d'un point de vue fondamental. Cela permettra de valider et d'affiner le modèle présenté ci-dessus.

La méthode S3 peut aussi être utilisée dans une optique plus appliquée, par exemple pour étudier un des rôles majeurs du fuseau mitotique qui est la détection et la correction des erreurs d'attachement des chromosomes. En collaboration avec le laboratoire de Sylvie Tournier et Yannick Gachet à Toulouse, l'équipe d'accueil s'est récemment tournée vers cette problématique. Xavier Pinson, post-doctorant de l'équipe, a développé un test de mérotélie en utilisant un mutant thermosensible permettant de créer des erreurs d'attachement de type mérotélie et observer comment l'embryon les corrige lors de l'anaphase. Ce test associé à la méthode S3 et à des suppressions de gènes ciblés permettra d'observer tout au long du processus de détection et de correction des erreurs d'attachement le comportement mécanique du fuseau et permettra ainsi de mieux comprendre le rôle de la mécanique dans ce processus. Cette étude tire partie de la possibilité d'utilisation large de notre outil. Nous avons d'ailleurs commencé à utiliser la méthode S3 sur la levure à fission *S. pombe*. Cette collaboration sera essentielle dans l'identification des mécanismes de correction des erreurs d'attachement, le fuseau de *S. pombe* étant adapté pour une approche d'étude des événements individuels alors que le fuseau du nématode *C. elegans* est plus adapté à l'observation des comportements collectifs.

L'outil peut également être utilisé au-delà de la mitose pour analyser la mécanique de structures intra-cellulaires, par exemple pour modéliser le comportement mécanique

des réseaux d'actine au sein des cellules. En effet, l'outil a été développé pour qu'il soit utilisable chez d'autres organismes et/ou pour l'étude de la mécanique d'une structure différente que le fuseau. Le prérequis à cette méthode S3 est la capacité d'imager la structure étudiée à une fréquence d'acquisition suffisamment grande (dépendante de sa dynamique) et de suivre cette structure avec une bonne résolution spatiale, pour pouvoir mesurer les fluctuations qui contiennent l'information biologique sur lesquelles l'outil se base. L'automatisation de la génération des fonctions de calcul permet de changer de modèle mécanique facilement pour l'adapter à l'étude faite.

Ainsi, ce type d'approches non perturbatives, capturant la dynamique et résolues en temps, permet d'apporter de nouvelles données pour une meilleure compréhension du fonctionnement du fuseau mitotique. La dynamique est au cœur de l'analyse car elle permet d'observer des phénotypes plus précis, qui sont alors plus discriminants pour les interprétations que nous pouvons en faire. Pour l'analyse du fuseau mitotique, la dépendance temporelle de l'analyse est nécessaire pour mieux comprendre l'évolution au cours de la division. L'aspect non perturbateur est essentiel dans l'idée de faire des expériences *in vivo* pour être au plus près des conditions physiologiques de l'objet, que nous analysons, notamment dans l'idée d'étudier la robustesse du fuseau: l'approche classique consistant à perturber physiquement le fuseau et à observer la réaction paraissait inappropriée. À ce titre, la méthode S3 constitue une opportunité.

Annexes

A.1 Matériels et méthodes

A.1.1 Culture de *C. elegans*

Les embryons du nématode *C. elegans* sont cultivés comme indiqué dans [Brenner, 1974]. TH27 (GFP::TBG-1 aussi écrit GFP:: γ -tubuline) et TH231 (SPD-2::GFP) sont maintenus à 16°C ou à 25°C. Le transgène qui encode la GFP::TBG-1 est sous le contrôle du promoteur *pie-1*, le transgène qui encode la SPD2::GFP est sous son promoteur endogène. Les vers ont été nourris par des bactéries OP50 sur boîtes d'Agar.

A.1.2 Gènes rendus silencieux par interférence d'ARN

Les expériences de ARNi par nourrissage ont été réalisées comme décrit dans [Timmons and Fire, 1998]. Les clones bactériens ont été récupérés de la biobanque Ahringer Source BioScience. Les expériences de ARNi ont été menées à 18°C et 23°C durant 24 h ou 48 h après transfert des vers en fonction du niveau de déplétion que nous souhaitions.

A.1.3 Vidéo microscopie et analyse d'images pour le suivi des trajectoires des centrosomes

Les embryons ont été disséqués dans un tampon M9 et montés sur un coussin contenant 2% P/v d'agarose, 0.6 % P/v de NaCl et 4 % P/v de sucrose. Les embryons ont été imagés sur un microscope Zeiss Axioimager M1. Le microscope a été modifié pour réaliser des films longs par l'ajout d'un filtre «chaud» à la sortie de la lampe à mercure et en utilisant un filtre d'excitation de 12 nm de bande passante centré sur 485 nm (AHF analysentechnik, Tubingen, Allemagne). Ces filtres aident à prévenir la phototoxicité et réduisent le photoblanchiment. Les images ont été enregistrées en utilisant une caméra EMCCD de 512×512 pixels (iXon3 Andor Technologies, Belfast, Royaume Unis), fonctionnant sous le logiciel Solis. Le suivi des trajectoires des centrosomes a été réalisé par un programme développé par Jacques Pécreaux [Pecreux et al., 2006] sous Matlab (The MathWorks).

A.1.4 Embryons fixés

Les embryons furent fixés dans un bain de méthanol à -20°C pendant 20 minutes après avoir rompu la coque par bain soudain dans de l'azote liquide durant quelques secondes. Les embryons sont ensuite réhydratés en passant dans un bain de solution saline PBS (Phosphate Buffer Saline) pendant 10 min, avant d'être montés entre lame et lamelle avec une goutte du milieu de montage M9.

A.1.5 Calcul scientifique

Les calculs sont réalisés sous *Matlab* (The MathWorks) ; le calcul parallèle fut réalisé via l'utilisation de la toolbox *parallel computing toolbox gpu* et les calculs furent réalisés sur des cartes graphiques Nvidia Geforce Titan Black.

A.2 Textes intégraux de deux articles importants pour la mise en place de l'outil S3

Spindle Oscillations during Asymmetric Cell Division Require a Threshold Number of Active Cortical Force Generators

Jacques Pecreaux,^{1,5} Jens-Christian Röper,^{1,2,5}
Karsten Kruse,^{3,4} Frank Jülicher,³ Anthony A. Hyman,¹
Stephan W. Grill,^{1,3,*} and Jonathon Howard^{1,*}

¹Max-Planck Institute for Molecular Cell Biology
and Genetics

Pfotenhauerstrasse 108
01307 Dresden

Germany

²Freie Universität Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Takustrasse 3

14195 Berlin

Germany

³Max-Planck Institute for the Physics of Complex
Systems

Nötnitzerstrasse 38

01187 Dresden

Germany

Summary

Background: Asymmetric division of the *C. elegans* zygote is due to the posterior-directed movement of the mitotic spindle during metaphase and anaphase. During this movement along the anterior-posterior axis, the spindle oscillates transversely. These motions are thought to be driven by a force-generating complex—possibly containing the motor protein cytoplasmic dynein—that is located at the cell cortex and pulls on microtubules growing out from the spindle poles. A theoretical analysis indicates that the oscillations might arise from mechanical coordination of the force-generating motors, and this coordination is mediated by the load dependence of the motors' detachment from the microtubules. The model predicts that the motor activity must exceed a threshold for oscillations to occur.

Results: We have tested the existence of a threshold by using RNA interference to gradually reduce the levels of dynein light intermediate chain as well as GPR-1 and GPR-2 that are involved in the G protein-mediated regulation of the force generators. We found an abrupt cessation of oscillations as expected if the motor activity dropped below a threshold. Furthermore, we can account for the complex choreography of the mitotic spindle—the precise temporal coordination of the build-up and die-down of the transverse oscillations with the posterior displacement—by a gradual increase in the processivity of a single type of motor machinery during metaphase and anaphase.

Conclusions: The agreement between our results and modeling suggests that the force generators themselves have the intrinsic capability of generating oscillations when opposing forces exceed a threshold.

Introduction

Asymmetric cell divisions are common during embryogenesis and neurogenesis, where they contribute to the generation of cell-fate diversity [1, 2]. During such divisions, the mitotic spindle is off-center at the end of anaphase; when the cleavage furrow bisects the spindle [3], it therefore generates two daughter cells of unequal size. An example is the division of the one-cell embryo of the nematode *C. elegans*. At the beginning of metaphase, the mitotic spindle is positioned in the center of the cell, aligned along the anterior-posterior (AP) axis, which coincides with the long axis of the cell. During metaphase and anaphase, the spindle elongates and its center moves toward the posterior cortex, resulting in an off-center spindle. The asymmetry is determined by the cell's polarity, which is established after fertilization [4] through the activity of the *par* genes [5, 6]. The PAR proteins and associated components localize to the anterior or posterior half of the cell cortex [7] and lead to the preferential localization of the G protein regulators GPR-1 and GPR-2 to the posterior cortex [8–10]. The association of GPR-1 and GPR-2 with G α [8, 11, 12] is thought to activate force generators located at the cortex. The force generators pull on the astral microtubules emanating from the spindle poles, with a larger force acting on the posterior pole than on the anterior one [13]. The forces increase during metaphase and anaphase [14], and their increasing imbalance displaces the spindle into the posterior half of the embryo.

During its movement into the posterior half of the embryo, the mitotic spindle of the *C. elegans* zygote begins to oscillate transversely as the two spindle poles move perpendicular to the AP axis in a sinusoidal manner ([15, 16], Figure 1). The displacement of the posterior pole is larger than that of the anterior pole, and the oscillations of the two poles are out of phase (Figure 1C); the spindle therefore appears to rotate, or rock, about a point closer to the anterior pole. The amplitude of the oscillations steadily builds up, reaches a peak when the spindle reaches its most-posterior position, and then dies down. The function of the oscillations is unknown, although oscillations are often associated with asymmetric cell divisions [17, 18].

Several observations suggest that the oscillations are driven by the same regulatory or motor mechanisms that drive the posterior displacement. First, interfering with the G protein signaling pathway that controls posterior spindle displacement leads to loss of oscillations [8–12]. Second, because the poles continue to oscillate transversely even after the spindle has been bisected with a laser [13], the oscillations, like the posterior displacement itself [14], are generated by forces originating

*Correspondence: grill@mpi-cbg.de (S.W.G.), howard@mpi-cbg.de (J.H.)

⁴Present address: Theoretische Physik, Universität des Saarlandes, 66041 Saarbrücken, Germany.

⁵These authors contributed equally to this work and are listed alphabetically.

from outside of the spindle (i.e., at the cortex). And third, analysis of the radial movement of fragments after disintegration of the spindle poles with a laser indicates that force generators with similar mechanical properties are broadly distributed on the cortex [19]. Such broadly distributed force generators could then mediate both longitudinal displacement and transverse oscillations, although it is puzzling how one type of force generator could drive such very different motions. If the same force generators are indeed responsible for both the posterior displacement and the oscillations, then study of the latter may shed light on the former.

The motor protein cytoplasmic dynein is a good candidate for being a component of the cortical force-generator complex. First, dynein is located at the cortex [20]. Second, oscillations are absent in temperature-sensitive dynein mutants, even at the permissive temperature [21]. Third, dynein has the right polarity to pull on astral microtubules (it is a minus-end-directed motor). And fourth, dynein, in conjunction with its receptor, the dynactin complex, has been implicated in spindle movements in the two-cell embryo [20, 22], in budding yeast [23] and in epithelial cells [24]; in centrosome shape changes in the one-cell *C. elegans* embryo [25]; and in centrosome movements in interphase cells [26–28]. However, the precise role of dynein in spindle movements is still unresolved. This is partly due to the fact that dynein and dynactin are required for spindle formation [20, 22, 29], making molecular dissection of the subsequent movement of the spindle difficult [21]. In addition, because free energy for microtubule depolymerization is already available from the GTPase activity of tubulin [30, 31], a motor protein such as dynein is not necessary for force generation; dynein could therefore mainly play an adaptor or regulatory role, dynamically linking depolymerizing microtubules to the cell cortex. The spatial relationship between the force-generator complex and the microtubules is also unclear. An attractive model is that the complex binds to the end of a microtubule after it reaches the cortex, triggers depolymerization, and continues to hold on to the shrinking end (the complex would be a depolymerase), but alternatively it could bind to the side of the microtubule and walk along it, causing the microtubule to bend at the cortex. Finally, the components of the complex, perhaps dynein itself, could even reach the cortex via the plus ends of the growing microtubules [32], so they could be dynamically associated with the cortex.

In this paper, we have addressed the question of how the force generators, irrespective of their precise molecular composition and operation, could give rise to oscillations. Does one need oscillation of a regulatory molecule to alternately switch on the force generators on one side of the embryo and off on the other? Or can force generators produce oscillations on their own? If the oscillations are intrinsic to the force generators, what properties are needed to coordinate them? These questions have recently been investigated theoretically by Grill et al., who showed that a molecular tug-of-war between cortical force generators pulling from opposite sides of the AP axis can lead to oscillations [33]; and see Box 1). The key idea behind the model is that the rate of detachment of the force generators from microtubules is load dependent. Such load-dependent unbinding has

recently been established by single-molecule experiments on the motor protein kinesin [34] and other biomolecules [35]. The role of load dependence is most easily discussed in the case where motor proteins are the force generators, although the principle is the same whenever there is load-dependent detachment from a depolymerizing microtubule. The load dependence causes the motors to change their behavior in response to the forces that other motors are generating, thereby coordinating the force generators on different sides of the embryo. In Box 1, we present a simplified version of the model discussed by Grill et al. and show how load-dependent antagonistic force generators can give rise to a weakly nonlinear oscillator [36] that produces sinusoidal oscillations similar to those seen in the zygote.

The central prediction of the mechanical model is that oscillations only occur when the total activity of the motors exceeds a threshold value, at which point small spontaneous fluctuations become amplified into large sinusoidal oscillations. We have directly tested the existence of such a threshold by using RNA interference to gradually reduce the levels of dynein light intermediate chain as well as GPR-1 and GPR-2, which are involved in the G protein-mediated regulation of the force generators. We found an abrupt cessation of oscillations as expected if the number of active force generators dropped below a threshold. We then asked how the activity of the force generators is regulated. We found that the complex choreography of the mitotic spindle—the precise temporal coordination of the buildup and die-down of the transverse oscillations with the posterior displacement—could be completely accounted for by a gradual increase in the processivity of the force generators during metaphase and anaphase.

Results

Oscillations in Unperturbed Embryos

The mitotic spindle of the one-cell *C. elegans* embryo oscillates transversally as it elongates and moves toward the posterior side of the cell (Figure 1, Movie S1 in the Supplemental Data available online; oscillations observed in 24/24 embryos at 23°C). The oscillations were quantified by fluorescently labeling the anterior and posterior poles with GFP- γ -tubulin (Figure 1A) and tracking their positions over time (Figure 1B). The oscillations built up and died down over 2 to 3 min (Figure 1C). The rising phase could be fit with a single exponential that increased e -fold per 45 ± 19 s (mean \pm standard deviation [SD], $n = 24$ embryos, 23°C). The oscillation reached a maximum amplitude of 3.14 ± 0.84 μm (from the AP axis) for the posterior pole and 1.92 ± 0.68 μm for the anterior pole ($n = 22$). In all embryos, the maximum posterior amplitude was greater than the anterior one. The oscillations then decayed exponentially with a time constant of 21 ± 4 s ($n = 22$). The onset of the oscillation lagged the onset of spindle displacement by about 1 min, and the oscillation began to die down at about the time that the spindle reached its maximum posterior displacement (Figure 1D). The final displacement of the center of the spindle was 5.0 ± 0.7 μm ($n = 22$), measured from the center of the embryo toward the posterior (the average initial position was 0.6 ± 1.1 μm from the center).

Box 1. The Antagonistic-Motors Model

The model described here is a simplification of that developed in Grill et al. [B1]. We first describe qualitatively how load-dependent motors give rise to oscillations and then present the equations. The derivation of the equations together with a justification of the choice of parameter values is given in the Supplemental Data. The parameters used in the simulation are listed in the legend to Figure 5.

Consider cortical motors pulling on astral microtubules emanating from the posterior pole (Box 1, Figure 1A).

- (1) Suppose that the pole is undergoing transverse oscillations (up and down in Box 1, Figure 1) and that the pole is at the most downward part of its cycle and just beginning to move upward toward the AP axis. At this point in the motion, the speed is zero and we assume that there is a centering process that pulls the pole toward the AP axis. We call this the “centering spring”, and we infer its existence from the observation that the spindle is precisely centered on the AP axis prior to spindle oscillations. The molecular basis for this centering spring could be the pushing or pulling of microtubules [B2] that contact the cortex at sites that may be distinct from the cortical force generators. At this time, there are more active motors at the lower cortex than at the upper cortex, and the difference in cortical forces is balanced by the force in the centering spring.
- (2) As the upward speed increases, the load on the upper motors decreases. As a result of the load-dependent detachment, the number of attached upper motors increases. If the load dependence is strong enough, the increase in number of attached motors will be large enough to increase the total force generated by all the upper motors even though the force per motor has decreased. This is positive feedback! An analogous process occurs at the lower cortex: The load per motor increases, the number of attached motors decreases, and more motors detach. Such catastrophic detachment also constitutes positive feedback. The net result is an increasing upward force that augments the force from the centering spring.
- (3) As the pole moves across the AP axis, the centering spring will oppose the pole’s further movement toward the upper cortex. However, the upper motors do not respond immediately to this opposing force: They are processive and they only detach after a delay. This delay gives rise to the equivalent of inertia in the system. (Note, however, that all true inertial forces can be neglected and that inertia-like properties result solely from the attachment and

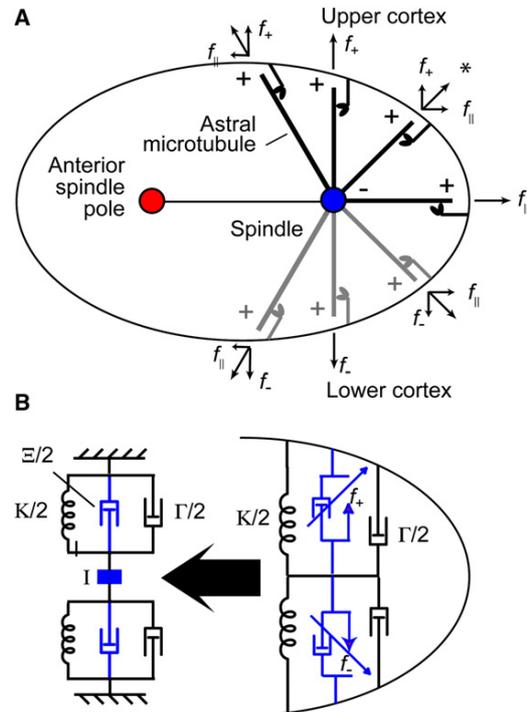


Figure 1. Model of Mechanical Oscillations Driven by a Symmetric Distribution of Cortical Force Generators

(A) Subset of astral microtubules emanating from the posterior spindle pole interacts with motor proteins attached to the cell cortex. Not shown are other posterior microtubules (growing, shrinking, or interacting at other sites on the cortex), anterior astral microtubules, and the spindle microtubules. The motors are part of a force-generating complex that pulls on the microtubules, creating tension that pulls the spindle pole toward the cortex as the microtubules depolymerize. The forces have components parallel to and perpendicular to the anterior-posterior axis. The plus and minus ends of the microtubules are indicated. (B) Mechanical model of the transverse forces (right). It is assumed that there is a process that centers the spindle (to account for the centering at early metaphase); this is represented by the spring. Viscous damping and rearrangements of the cytoskeleton give rise to a positive-damping element, represented by the black dashpot. The motors are represented by a force source (blue) together with a speed-limiting dashpot (blue). The diagonal arrow represents the load dependence of the motors’ attached probabilities: the higher the load force, the lower the probability. In the linear circuit (left), the negative-damping and inertial elements (in blue) correspond to the terms in Equations B2 and B3.

detachment kinetics of motors.) As a consequence, the spindle overshoots the AP axis before finally stopping at the most upward part of the cycle.

- (4) The cycle then continues in the other direction. If there were no positive feedback, the oscillations would slowly die out as a result

Continued on following page

of the damping from the viscosity of the ooplasm [B3] (which might be augmented by the dynamics of the cytoskeleton [B2]). With positive feedback, the swings on either side of the AP axis get larger and larger. This means that any small fluctuation of the position of the pole from the AP axis, as a result of either thermal forces or the finite number of motors, will trigger a sinusoidal oscillation.

To get oscillations that build up in this way, the net damping must be negative (to create positive feedback), but the negative-damping coefficient has to be small in magnitude; otherwise, the pole would move away explosively from the AP axis. The amplitude of oscillation will increase unless either the active components (i.e., the motors) are turned off or the negative damping is opposed by a nonlinear damping term that can cancel the negative damping as the oscillation amplitude increases. Such a nonlinear damping term sets the amplitude of the oscillations in the steady state. A combination of small damping coefficient and a nonlinearity gives rise to a weakly nonlinear oscillator [B4] and results in spontaneous sinusoidal oscillations. This type of oscillator differs from a strongly nonlinear relaxation oscillator, which results in asymmetric sawtooth-shaped oscillations; the model of Joglekar and Hunt for mitotic chromosomes movements [B5], which shares some features such as load-dependent detachment with the present model, is an example of this latter type of oscillator.

The equation of the nonlinear oscillator associated with our model is

$$I\ddot{y} + (\Gamma - \Xi)\dot{y} + \beta y^3 + Ky = 0. \quad (\text{B1})$$

If the damping coefficient is small [$(\Gamma - \Xi)^2 \ll 4IK$], then the equation produces sinusoidal oscillations and the oscillator is termed weakly nonlinear. Note that at threshold $\Gamma = \Xi$, so this condition is automatically satisfied and we expect the oscillations to start out being sinusoidal. K is the stiffness of the centering spring: It produces a restoring force proportional to the position, y , of the pole away from the AP axis. In our model (and see [B1]), K is assumed to be a constant in time and equal on both sides of the embryo. An earlier model [B6] considered the possibility that K differed between anterior and posterior sides, but this was not readily consistent with the spindle-cutting experiments. βy^3 is the nonlinear-damping term: It becomes large when the velocity of the spindle, \dot{y} , becomes large. The value of β is a complicated function of the molecular parameters—because its value is poorly constrained, we set β equal to zero in the simulations so that the amplitude of the oscillations is set by the time during which the net damping is negative (i.e., the steady state is not reached). In the cell, we expect that β is likely to be important for setting the maximum amplitude of oscillation, and

this will be the subject of later work. Γ is the positive-damping coefficient contributed by the viscosity of the cytoplasm. Ξ is the negative-damping coefficient given by

$$\Xi = 2N \left\{ \frac{\bar{f}}{\bar{f}_c} \bar{\rho} \left[(1 - \bar{\rho}) - \frac{f_c}{\bar{f}} \right] \right\} f'. \quad (\text{B2})$$

If it is positive, it gives rise to a force in the same direction as the velocity; it therefore gives rise to “negative damping.” I is an inertial term given by

$$I = 2N \left\{ \frac{\bar{f}}{\bar{f}_c} \bar{\rho} (1 - \bar{\rho}) \right\} f' \bar{\tau}. \quad (\text{B3})$$

I has units of mass and corresponds to a chemo-mechanical “inertia” because it is associated with a force that is proportional to acceleration (\ddot{y}). Note that as expected for an inertial term, $I \approx \Xi \bar{\tau}$, where $\bar{\tau} = (k_{\text{on}} + \bar{k}_{\text{off}})^{-1}$ is the lag due to the attachment and detachment rates. The numerical value of I is on the order of 100 μg (Figure 5D), nearly three orders of magnitude greater than the actual mass of a one-cell *C. elegans* embryo! This comparison underscores the fact that the present oscillations do not arise from the mass of the cellular structures, as expected because the static and dynamic Reynolds numbers are much smaller than one ([B7], p. 290).

The parameters are as follows. N is the number of motors on each side of the AP axis. \bar{f} is the single-motor force, the load force that is necessary to stall the motor (larger forces are assumed to make the motor go backward [B8]). $\bar{\rho} = k_{\text{on}} / (k_{\text{on}} + \bar{k}_{\text{off}})^{-1}$ is the single-motor activity defined in terms of the attachment and detachment rates as the average fraction of time that the motor spends attached to a microtubule and pulling. Note that the attached probability, ρ , oscillates about its mean value $\bar{\rho}$. The detachment rate is assumed to depend on load (f) according to $k_{\text{off}}(f) \propto \exp(f/f_c)$, and $\bar{k}_{\text{off}} = k_{\text{off}}(\bar{f})$ is the off rate at the stall force (about which the motors are assumed to operate).

If the negative damping (Ξ) exceeds a threshold set by the passive damping (Γ) (i.e., $\Xi > \Gamma$), then the total damping becomes negative. In this case, there is positive feedback and the system described by Equation B1 becomes unstable and begins to oscillate. Close to the instability, the angular oscillation frequency measured in radians/s is

$$\omega_0 \approx \sqrt{K/I}. \quad (\text{B4})$$

If the negative damping falls below the passive damping, then the system is stable and the oscillations die out exponentially.

The oscillation frequency depends inversely on the square root of the inertial coefficient (Equation B4). For fixed k_{on} , I is maximal when $\bar{\rho} = 2/3$ (noting that $\bar{\tau} = \bar{\rho}/k_{\text{on}}$), whereas for fixed \bar{k}_{off} , it has a maximum when $\bar{\rho} = 1/3$ (noting that $\bar{\tau} = (1 - \bar{\rho})/\bar{k}_{\text{off}}$). This is

Continued on following page

shown in Figure 5D by the solid and dashed lines, respectively. Because the negative-damping term is near its maximum during the oscillations and $\bar{p} \approx 0.5$ (see Figure 5C), the inertial term is increasing if k_{on} is fixed and decreasing if k_{off} is fixed: A decreasing oscillation frequency therefore corresponds to a decreasing \bar{k}_{off} .

Box References

- B1. Grill, S.W., Kruse, K., and Julicher, F. (2005). Theory of mitotic spindle oscillations. *Phys. Rev. Lett.* 94, 108104.
- B2. Howard, J. (2006). Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules. *Phys. Biol.* 3, 54–66.
- B3. Alexander, S.P., and Rieder, C.L. (1991). Chromosome motion during attachment to the vertebrate spindle: initial

saltatory-like behavior of chromosomes and quantitative analysis of force production by nascent kinetochore fibers. *J. Cell Biol.* 113, 805–815.

- B4. Strogatz, S.H. (1994). *Nonlinear Dynamics and Chaos* (Reading, Massachusetts: Perseus Books).
- B5. Joglekar, A.P., and Hunt, A.J. (2002). A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophys. J.* 83, 42–58.
- B6. Grill, S.W., Gonczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409, 630–633.
- B7. Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton* (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates).
- B8. Carter, N.J., and Cross, R.A. (2005). Mechanics of the kinesin step. *Nature* 435, 308–312.

The mean frequency of the posterior oscillation was 51.4 ± 8.0 mHz ($n = 24$ embryos, 23°C), corresponding to a period of 19.6 ± 3.0 s. The oscillation frequency increased with temperature: The slope was $+6.3\% \pm 0.3\%$ per $^\circ\text{C}$ (mean \pm standard error of the mean [SEM]) between 15°C and 26°C . This is similar to the dependence of the amplitude on temperature ($+4.6\% \pm 1.2\%$ increase per $^\circ\text{C}$).

The sinusoidal waveform suggests that the transverse oscillations arise from a so-called weakly nonlinear oscillator in which the absolute value of the damping coefficient is small compared to the inertial and elastic coefficients [36]. This contrasts with a relaxation oscillator that is strongly nonlinear and has a nonsinusoidal, asymmetric waveform [36] unlike that observed in Figure 1C. Our antagonistic-motors model (Equation B1) is an example of a weakly nonlinear oscillator: At small spindle amplitudes, the individual motors are in what we have termed their force-limited regime [19], meaning that they are operating at low speed and near their maximum force. The transition of a weakly nonlinear oscillator from a nonoscillating to an oscillating mode occurs when the damping coefficient changes sign from positive to negative. In our model, this occurs when the “negative damping” associated with the load dependence of the force generators (Equation B2) exceeds a threshold determined by the positive, viscous damping from the ooplasm. (Negative damping is the opposite of the usual positive damping: As the speed increases, there is an augmenting rather than opposing force.) The threshold can be crossed by changing the number of motors or their activity. By contrast, alternate scenarios such as those in which the activity of the regulatory pathway oscillates do not involve a threshold; reducing the number of motors or their activity would simply reduce the amplitude of the oscillations.

Depletion of Dynein Light Intermediate Chain

In order to obtain evidence for a threshold of motor activity required for oscillations, as predicted by the model, we transferred worms to feeding plates containing bacteria expressing dsRNA directed against *dli-1*, which encodes the essential light intermediate chain of cytoplasmic dynein [29]. With increasing time after transfer,

the amount of dynein light intermediate chain decreased as assayed by immunoblotting (see Supplemental Data). At comparatively short times after transfer, 13–16 hr when protein levels were about 50%, the oscillations were either absent or greatly attenuated (Figure 2B; Movie S3; amplitude $< 0.25 \mu\text{m}$, $n = 16/16$).

These results are consistent with a recent study [21] showing that oscillations are absent in five of six temperature-sensitive dynein mutants at the permissive temperature, where the total dynein activity is expected to be only partially decreased and other dynein-dependent processes such as spindle centering and posterior displacement were nearly normal. Thus our results as well as complementary results from another laboratory show that partial inactivation or loss of cytoplasmic-dynein function abolishes oscillations, as expected if dynein is an essential component of a force-generating complex whose activity must exceed a threshold for oscillations to occur. At longer times after transfer, the spindles failed to orient properly, a failure that has been found when dynein heavy chain [20] or the dynactin complex [20, 22] is more fully inactivated (Figure 2C, Movie S4).

Depletion of G Protein Regulators Provides Strong Evidence for a Threshold

Because dynein is required for essential processes that precede the oscillations, such as spindle orientation along the AP axis (see above), it is not an ideal protein to deplete in order to investigate the oscillation threshold in detail. We therefore sought additional evidence for a threshold total motor activity by injecting young adult worms with dsRNAs directed against the *gpr-1* and *gpr-2* genes, which encode proteins that regulate the cortical force generators. We confirmed via immunoblotting with anti-GPR antibodies that the levels of the corresponding proteins decreased in a graded manner over 40 hr after injection (Figure 3A, and see Supplemental Data). As the protein levels decreased over time after injection, the severity of the phenotypes increased (Figures 2D–2F, Movies S5–S7). In contrast to the gradual decrease in protein levels, there was a rapid decrease in oscillation amplitude and subsequently a complete loss of oscillation following partial knockdown of *gpr-1/2*.

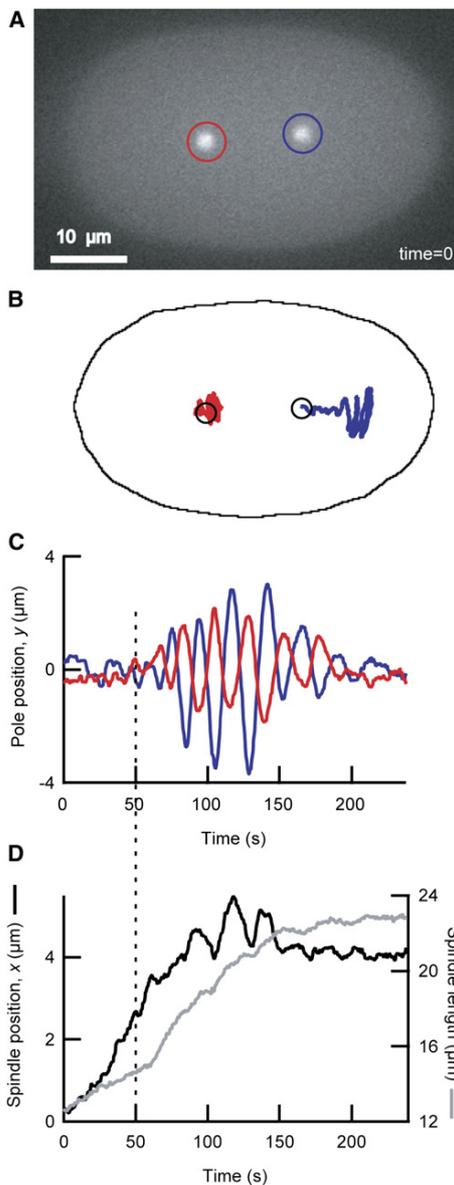


Figure 1. Transverse Oscillations and Posterior Displacement of the Mitotic Spindle in an Unperturbed Embryo

(A) Fluorescence image of the one-cell *C. elegans* embryo showing GFP-tagged γ -tubulin localizing preferentially to the centrosomes (spindle poles). The anterior spindle pole (left) is circled in red, the posterior (right) in blue.

(B) The trajectories of the two poles during metaphase and anaphase measured every 0.5 s. The circles denote the initial positions.

(C) The distances of the spindle poles from the anterior-posterior axis shows the buildup and die-down of the oscillations. The approximate onset of oscillations is indicated by the dashed line.

(D) The position of the spindle (defined as the midpoint of the poles) along the AP axis (black). Zero is the center of the embryo. The slight oscillations are due to the arcing motion of the spindle apparent in the posterior trace in (B). The spindle length is shown in gray. All panels are from the same cell.

The maximum amplitude of oscillations of the posterior pole decreased from $\sim 3 \mu\text{m}$ to near zero after only 10 hr (Figure 3B), a time at which the GPR-1/2 protein levels

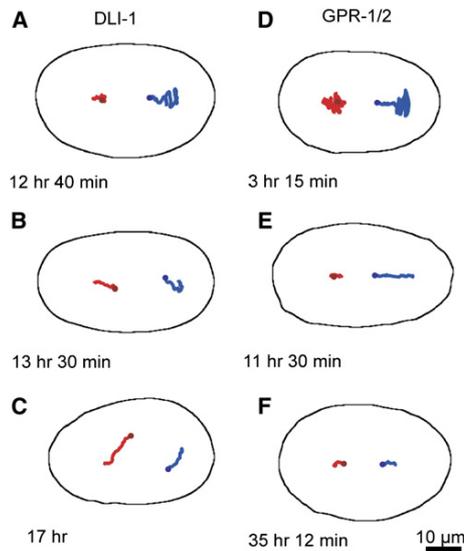


Figure 2. Phenotypes of Progressive Depletion of DLI-1 and GPR-1/2

Examples of the trajectories of the anterior (red) and posterior (blue) spindle poles are superimposed on the contour of the embryo. The circles represent the starting positions. Each panel shows a different embryo.

(A–C) Depletion of dynein light intermediate chain in worms fed bacteria expressing inactivating RNA directed against *dli-1*. (A) An embryo 12 hr 40 min after transfer onto the feeding plates in which the oscillation is normal. (B) A different embryo 13 hr 30 min after transfer in which the oscillation was not present. (C) At 17 hr after transfer, the spindle was not aligned properly on the AP axis.

(D–F) Depletion of GPR-1/2 after injection of dsRNA directed against *gpr-1/2*. (D) At short times after injection, the phenotype is almost normal. (E) At 11 hr 30 min, the oscillations are completely absent, although posterior displacement still occurs. (F) At 35 hr 12 min, there are no oscillations or posterior displacement, although spindles still elongate to 85% of their normal length. Interestingly, all the reduction of spindle elongation occurred over the first 13 hr, suggesting that spindle oscillations may be required to elongate the spindle to its full extent.

had decreased to only 47% (Figure 3A). This strongly supports the existence of a threshold.

Control experiments indicated that at times after injection when the oscillations were lost, there was still sufficient GPR-1/2 protein remaining in the embryo to at least partially activate the force generators. The activity of the force generators was monitored in two ways. First, the force generators generate tension in the spindle. This tension was assessed by cutting the spindle with a UV laser and measuring the initial velocity of the posterior pole toward the posterior side of the cortex [13]. The velocity decreased gradually toward zero as the time after injection increased to 40 hr (Figures 3C). At 9 hr after injection, when the oscillation had all but disappeared (Figure 3B), the initial speed of movement of the posterior pole had decreased only to $60\% \pm 3\%$ of uninjected controls (SEM, $n = 17$ embryos assayed between 7 and 11 hr). This shows that the force generators were active, but not at a sufficiently high level to give oscillations, as expected if there is a threshold. The activity of the force generators was monitored in a second way by measuring the total posterior displacement

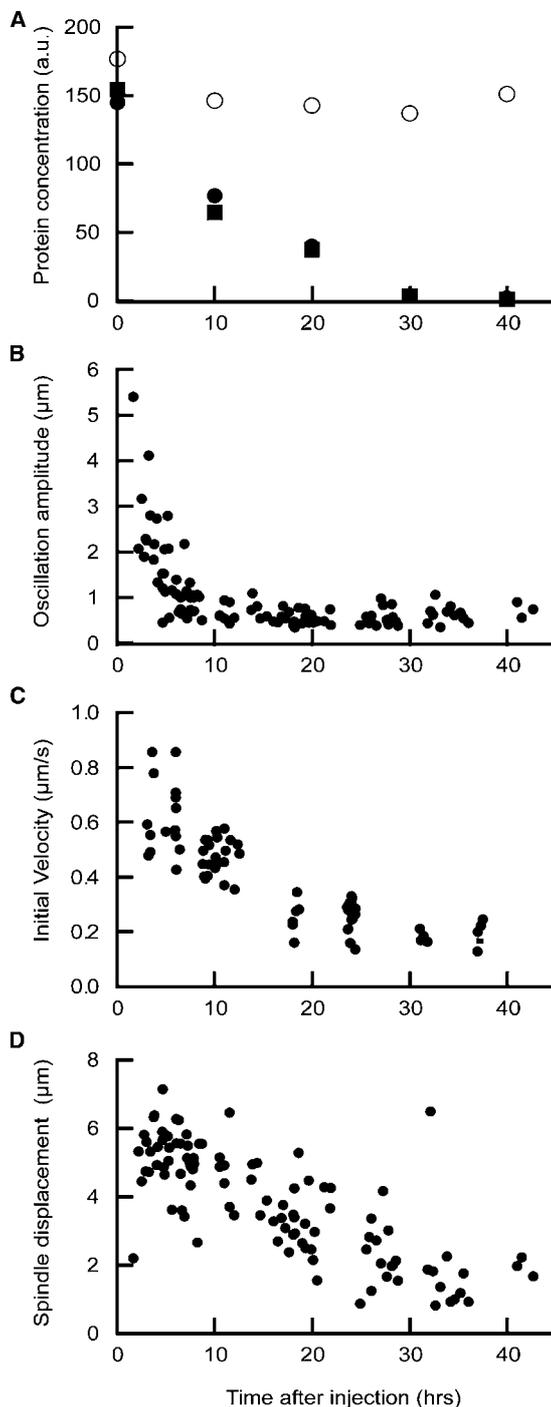


Figure 3. Effect of gradual depletion of GPR-1/2 on spindle movements

(A) As the time between the injection of dsRNA directed against the *gpr-1* and *gpr-2* genes into the mother is increased, the amount of GPR-1/2 protein, assayed by immunoblotting, gradually decreases (● and ■ are two different experiments). The control protein, tubulin (○), doesn't decrease.

(B) The oscillation amplitude decreases sharply after a few hours, falling to near zero at 8 hr after injection. This is consistent with there being a threshold force, as predicted by the model. Each point in panels (B)–(D) indicates a different embryo.

of the spindle pole during metaphase and anaphase in unirradiated embryos. The displacement, which is thought to be driven by the unbalanced tension generated by the cortical force generators [13], decreased gradually toward zero as the time after injection increased to 40 hr (Figures 3D). At 9 hr after injection, the posterior spindle displacement (Figure 3D) had decreased only to $74\% \pm 5\%$ of uninjected controls (SEM, $n = 16$ embryos assayed between 7 and 11 hr). Again, this supports the existence of a threshold: Decreasing the activity of the force generators by only one third is sufficient to completely abolish the oscillations.

The Buildup and Die-down of the Oscillations Are Accounted for by a Monotonic Increase in Motor Activity

Having established that a threshold exists, we then asked whether the threshold could also account for the onset and termination of the oscillations. If so, what motor properties might change during metaphase and anaphase to bring the spindle into oscillation and then to bring it out again? According to the model, the oscillations occur because load-dependent motors acting in groups generate negative damping (which produces positive feedback). The negative damping can be increased by increasing the number of motors (N), the activity of the individual motors (defined as the average probability over an oscillation cycle of the motor being attached to the microtubule and generating force, denoted \bar{p}), the single-motor force (\bar{f}), or other parameters that are associated with the force-dependence of the motors (see Equation B2).

Remarkably, all the qualitative features of the oscillations—the onset, its lag with respect to the spindle displacement (Figures 1C and 1D), and the termination—can all be accounted for by a monotonic increase in the single-motor activity (\bar{p}) during metaphase and anaphase. As \bar{p} begins to increase, the spindle begins to move toward the posterior because the total force (and therefore the force imbalance between posterior and anterior sides) is proportional to the single-motor activity. But the oscillations do not begin until the threshold is crossed (when the negative-damping coefficient [Ξ] exceeds the positive-damping coefficient [Γ] in Equation B1). The time required to reach this threshold determines the lag between spindle displacement and oscillation. As the single-motor activity increases further, the negative-damping coefficient actually decreases again (Equation B2) because positive feedback relies on the ability of individual motors to switch between active (attached) and inactive (detached) states. Therefore, as the mean attached probability increases toward unity, switching ceases because the motors are always attached; the negative-damping term then decreases until the net-damping coefficient becomes positive again and the oscillations die down. Thus the oscillations die down even though the mean total force remains high, keeping the spindle in its posterior position. In this way, a monotonic change in a single parameter (\bar{p}) can account for

(C) The velocity of the posterior spindle pole, measured just after severing with a UV laser, decreased progressively with time after injection.

(D) Total spindle displacement decreased with time after injection.

the complex choreography of the mitotic spindle during metaphase and anaphase.

The only parameter in our model whose variation can account simultaneously for the buildup and die-down of the oscillations and the steady increase in spindle displacement is the single-motor activity (\bar{p}). The negative-damping coefficient depends monotonically on all the other parameters such as the number of motors (N) and the single-motor force (\bar{f}), so if these parameters increase steadily during metaphase and anaphase (to account for the steady increase in spindle displacement), then there would be no die-down of the oscillations. If N or \bar{f} first increased (to bring the system into oscillation) and then decreased (to bring it out of oscillation), then the net force (which is proportional to N and \bar{f}) would decrease, leading to a reversal of the posterior displacement, which is not seen (Figure 1D). A decrease and then increase in the positive-damping coefficient (I) could trigger the buildup and die-down of oscillations but cannot account for the posterior displacement. Similarly, decreasing the centering spring constant (K) could lead to posterior displacement but will not affect oscillations. Thus even in the absence of more complex regulatory mechanisms during the cell cycle, a steady increase in \bar{p} accounts simply for the complex choreography of the spindle during metaphase and anaphase.

The Oscillation Frequency Decreases over the Duration of the Oscillations

We next asked how the single-motor activity, \bar{p} , might be regulated during metaphase and anaphase. The attached probability can be increased either by increasing the rate at which the motors attach to the microtubules (increasing the number of pulling motors) or decreasing the rate at which they detach (increasing the time that they pull). In the case of the cortical force generators, an increased attachment rate could correspond to an increase in the rate at which the microtubule binding complex attaches to an incoming microtubule and switches it into a shrinking mode. A decreased detachment rate could correspond to an increase in the time that the complex remains attached to a shrinking microtubule.

The two possibilities can be distinguished. An increase in the attachment rate (k_{on}) over time is predicted to lead to an increasing oscillation frequency, whereas a decrease in the detachment rate (k_{off}) over time is predicted to lead to a decreasing oscillation frequency. This can be understood by a simple argument because the oscillation frequency reflects the kinetics of association and dissociation of the motors to and from the microtubules: The kinetics become faster when k_{on} increases but slower when k_{off} decreases. A more rigorous argument is given in Box 1. To test these predictions, we carefully measured the frequency of the oscillations. The instantaneous frequency was estimated at four times during each period of oscillation (see Figure 4 legend). We found that the frequency of the oscillations decreased over the duration of the oscillations. The frequency decrease was apparent in most embryos, such as that shown in Figure 1. Figure 4 summarizes results from 22 embryos at 23°C: The frequency decreased at a rate of 0.179 ± 0.016 mHz/s (SEM; $p < 10^{-9}$ by Student's *t* test, $n = 22$), corresponding to a decrease in

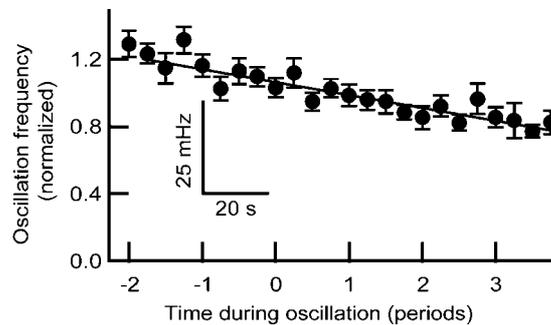


Figure 4. Decrease in Frequency during the Oscillations

The oscillation frequency decreased by about one-third over the duration of the oscillations. Four frequency measurements were made during each period of an oscillation by measuring the times in the cycle at which the position and velocity were at an extremum. The frequency was normalized to that at the peak amplitude and is plotted against time, measured in periods of oscillation, for 22 embryos. The slope is 0.0769 ± 0.0071 (mean \pm SEM, $p < 10^{-9}$). The scale bars represent the average oscillation frequency and time for the average oscillation.

frequency of $\sim 40\%$ over the ~ 120 s duration of the oscillations. Thus we suggest that the steady increase in motor activity during metaphase and anaphase is due to a steady decrease in the detachment rate (k_{off}).

Simulation of the Time Course of Spindle Movements

To summarize our findings, we believe that during metaphase and anaphase the motors become more and more processive as a result of a steadily decreasing off rate. As the processivity increases, the motors spend more time attached to microtubules and pulling (i.e., the mean attached probability or single-motor activity, \bar{p} , increases), and the net force increases, leading to posterior displacement. When the total motor activity exceeds a threshold, positive feedback due to load-dependent detachment causes the system to become unstable and any spontaneous fluctuations are amplified to produce a buildup of oscillations. However, as the activation of the motors increases further, the ability to switch between active and inactive states diminishes, the system becomes stable again, and the oscillations die down. The simulation in Figure 5 shows that the model accounts for all the qualitative and quantitative aspects of the oscillations: Their onset and decay, the mean frequency, and the decrease in frequency over time (Figure 5E). The expected decrease in the relative oscillation frequency over the duration of the oscillation is 0.064 per oscillation period (Figure 5E and Equation B4), in good agreement with the measured decrease of 0.078 ± 0.07 per oscillation period (Figure 4, legend). The simulation indicates that the oscillations reach their maximal amplitude when the mean attached probability is ~ 0.5 (horizontal dashed line in Figure 5). The threshold is ~ 0.25 . The same parameters correctly simulate the concurrent posterior displacement of the spindle (Figure 5F).

Discussion

We have shown that an antagonistic-motors model accounts well for the complex dynamics of spindle

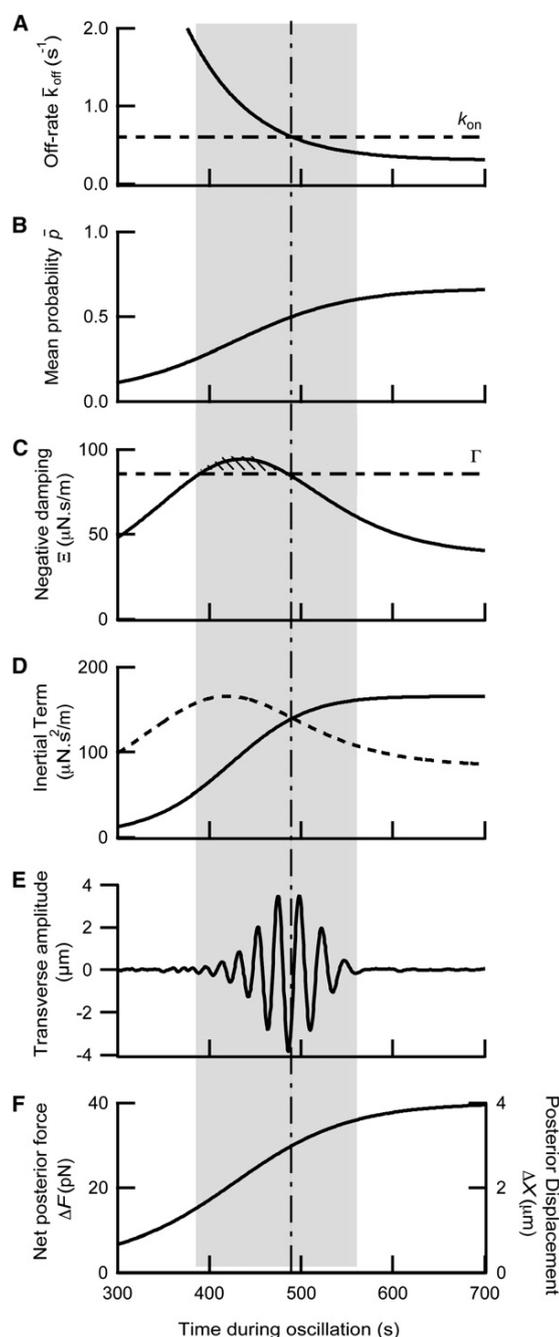


Figure 5. The Antagonistic-Motors Model Accounts for the Buildup and Die-down of the Oscillations

(A) The processivity of the motors is postulated to increase steadily during metaphase and anaphase (i.e., the off rate, k_{off} , decreases). (B) As a consequence of the varying off rate, the mean attached probability, \bar{p} , a measure of the activity of the motors, steadily increases. The probability is 0.5 when the off rate equals the on rate (k_{on}) indicated by the vertical dashed line in (A).

(C) As the probability increases, the coefficient of negative damping (Ξ) first increases and then decreases. When the coefficient of negative damping exceeds that of the positive damping (Γ), indicated by the horizontal dashed line, the system becomes unstable (shown as the hatched region), and spontaneous oscillations occur. When the coefficient of negative damping drops below the positive damping, the oscillations die out.

movements during metaphase and anaphase in unperturbed and genetically manipulated embryos.

Evidence for a Threshold Motor Activity Necessary for Transverse Oscillations

The model predicted that there is a threshold of motor activity above which the spindle oscillates and below which it does not. We have confirmed this prediction with two different observations. First, when the activity of the force generators was reduced in a graded manner by reduction in levels of the dynein light intermediate chain or the G protein regulators GPR-1 and GPR-2, the oscillations were abolished even when the protein levels were reduced by only one half. Furthermore, in the case of GPR-1 and GPR-2 inactivation, the abrupt decrease in the amplitude of the oscillations contrasted with the more gradual decrease in both the spindle tension and the posterior displacement, both of which likely reflect the activity of the same motors (see below). And second, we showed that the existence of a threshold can account for the lag between the onset of posterior displacement and the buildup of the oscillations in unperturbed embryos. In addition, we showed that the die-down of oscillations at the end of anaphase can be accounted for by crossing back across the threshold. In summary, graded increases and decreases in motor activity cause abrupt initiation and loss of transverse oscillations, consistent with the existence of a threshold.

Alternative Models for Oscillations

The key idea behind the antagonistic-motors model is that load dependence allows the motor complexes to communicate mechanically from one side of the embryo to the other in order to move the spindle in a coordinated fashion. An alternative is that the motors are activated by regulatory molecules whose activity oscillates through a reaction-diffusion mechanism of the sort that has been postulated to lead to spatio-temporal oscillations in the concentrations of the Min proteins in bacteria [37] and to calcium waves in oocytes and other cells (e.g., [38]). The main argument against such a reaction-diffusion mechanism is that reducing the number of motors is not expected to cause an abrupt cessation of oscillations as observed but rather to a gradual reduction in amplitude. Furthermore, the large size of the *C. elegans* embryo (minor axis is 30 μm) argues against such a reaction-diffusion mechanism. The diffusion coefficient (D) of MinD in protoplasm is 17 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (K.K., unpublished data) and of buffered calcium in frog ooplasm is 13 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [39]. With these diffusion coefficients, the estimated time associated with diffusion across the *C. elegans* embryo is ~ 30 s (time = distance²/2D), much longer than the time over which the phase of the oscillations changes by one radian (3 s). This makes a reaction-diffusion

(D) The instability occurs while the inertial coefficient (I) is increasing (solid curve). This leads to the observed decrease in the oscillation frequency over the course of the oscillations (Figure 4). The dashed curve shows the case if the on rate were decreasing.

(E) Simulation of the oscillation. The gray region denotes the time when oscillations are resolved above the noise.

(F) Because the probability increases monotonically, so too does the net posterior-directed force and the posterior displacement: $\Gamma = 85.8 \mu\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}$, $K = 10 \mu\text{N}/\text{m}$, $N = 28$, $f = 6 \text{ pN}$, $f_c = 1.5 \text{ pN}$, $f' = 3 \mu\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}$, $k_{on} = 0.6 \text{ s}^{-1}$.

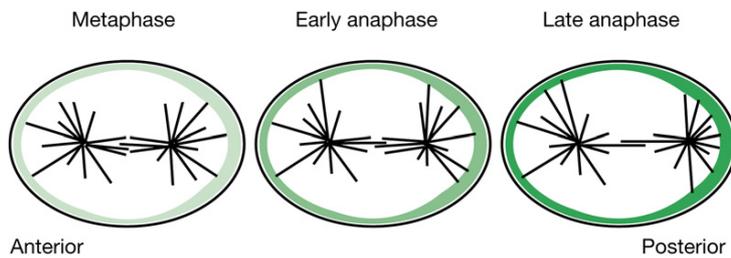


Figure 6. Model of the Time Course of Motor Activation

Prior to metaphase, the pool of motors that can be activated is established at the cortex via GPR-1/2. The size of the pool is indicated by the thickness of the green shaded areas: The pool is larger in the posterior half than in the anterior half but remains constant throughout metaphase and anaphase. Over time, the activity of the motors increases, indicated by the increasing opacity of the green shaded regions. The increasing motor activity accounts for the dynamics of both the oscillations and the posterior displacement.

mechanism unlikely, although a small unbuffered molecule such as IP3 [39] might diffuse fast enough. Likewise, the physical transfer of a chemical signal from one side of the embryo via microtubule dynamics (from cortex to pole on the end of a depolymerizing microtubule and then back to the other cortex on the end of a polymerizing microtubule) would also be too slow, given the microtubule growth and shrinkage rates in the embryo [32]. Because mechanical signaling is fast, it can more rapidly coordinate the activity of molecules over cellular dimensions than can chemical signaling, which relies on the movement of a substance from one side of the cell to the other.

Evidence that One Motor Drives Both Spindle Displacement and Oscillations

By showing that one type of motor can give rise, in a natural way, to very different types of motion—a monotonic displacement along one axis and an oscillation along the other—our findings add significant additional support (over that already mentioned in the Introduction) to the hypothesis that one type of motor underlies the posterior displacement and transverse oscillations. The alternative hypothesis is that different GPR-1/2-regulated motors drive spindle displacement and oscillation and that a threshold of GPR-1/2 activity is required to activate only the oscillation motors. Although we cannot completely rule this out, it does not make sense mechanically: A cortical motor located off the major or minor axis of the embryo will generate a pulling force that has components in both the longitudinal and transverse directions (e.g., starred [*] motor in Box 1, Figure 1), and because of the geometry it is not possible to regulate the two force components independently.

Our RNAi results from dynein light intermediate chain together with analysis of dynein-heavy-chain mutants [21] indicate that cytoplasmic dynein is essential for the transverse oscillations. Therefore, dynein is also expected to be essential for posterior displacement. However, decreasing dynein activity by shifting temperature-sensitive mutants to the restrictive temperature [21] had little effect on posterior displacement, suggesting that posterior displacement is dynein independent. There are two possible explanations for this apparent contradiction. One is that there was only a partial loss of total dynein activity, enough to abolish oscillations (because of the threshold) but not enough to abolish posterior displacement. The other is more subtle. Dynein is necessary for centering the spindle prior to metaphase (e.g., [20]) and could therefore also contribute to the centering

stiffness (see Box 1 and [40]); in this case, decreasing the total dynein activity would decrease both the force and the stiffness so that the posterior displacement, which is proportional to the ratio of the two, would be little changed, even if the decrease in dynein is enough to abolish the oscillations.

Relationship between the Current Work and Earlier Work

The current results are in good agreement with earlier results from our laboratory. In the earlier work, the spatial distribution of the force generators was examined at a single time (corresponding to the peak of oscillations) by using a laser to disintegrate the spindle poles [19]. It was found that the force generators were broadly distributed on the cortex. Analysis of the mean and variance of the speeds of the fragments suggested that all the cortical force generators have the same single-motor force (\bar{f}), and the variation in fragment speed in each half of the cortex was accounted for by spatial variation in the attached probability (p) but not motor number (N). The posterior cortex had more motors than the anterior one, accounting for the larger net posterior-directed force.

In the present work, we examined how the cortical forces changed over time. We found that the dynamics of the spindle movements were simply accounted for by a monotonic increase in mean motor activity (\bar{p}), whereas the motor number (N) and single-motor force (\bar{f}) remained constant. This mirrors the earlier results. Indeed, the present results are in quantitative agreement with the earlier ones. Our simulations indicated that the oscillations peak when the mean attached probability of the motors is 0.5 (Figure 5). This is similar to the average probability calculated from the earlier mean-variance analysis: In the posterior half of the cortex, p varied from about 0.25 to 0.75 on opposite sides of the AP axis, giving a mean attached probability (\bar{p}) of about 0.5 (Figures 3A and 3C in [19]).

A steady increase in mean motor activity during metaphase and anaphase implies that the total motor activity will increase, in agreement with other laser-ablation studies [14]. According to our analysis, both the number of motors and the single-motor force remain constant, and it is a steady increase in single-motor activity that leads to the increasing force. This is shown in Figure 6.

How Is the Processivity of the Motors Regulated?

In light of our suggestion that the processivity of the motors increases during metaphase and anaphase, it is

interesting that the dynactin complex has been reported to increase the processivity of cytoplasmic dynein [41]. This raises the possibility that the GPR-1/2-dependent activation of the force generators may occur through a dynactin-mediated increase in cytoplasmic-dynein processivity. The link may be LIN-5. LIN-5 associates with GPR-1/2 in vivo and in vitro and is required for both posterior displacement and transverse oscillations [12]. Furthermore, LIN-5 has been suggested, on the basis of functional similarities between GPR-1/2, the vertebrate protein LGN, and the *Drosophila* protein PINS, to be homologous to the vertebrate protein NUMA [42]. Bioinformatic analysis [43] confirms this link by showing that LIN-5 contains an N-terminal calponin-homology domain that is similar to that found in NUMA [44] and may mediate the interaction of the N Terminus of NUMA with the Arp1 subunit of dynactin [45]. Thus there is a potential molecular connection between GPR-1/2 and a motor protein, cytoplasmic dynein; it remains unclear, however, what signal would globally increase motor activity during metaphase and anaphase as indicated in Figure 6.

Role of the Oscillations

We propose that spindle oscillation occurs in the one-cell *C. elegans* embryo because the polarity cues are spatially coarse. The regulation of motor activity is at the level of the anterior and posterior halves of the embryo rather being spatially restricted to the very ends of the embryo. Consequently, force generators on each side of the anterior-posterior axis undergo a tug-of-war. Because it is advantageous for the cell to generate as high as possible force during metaphase and anaphase—higher forces allow the cell to displace the spindle more reliably against external perturbations, and they allow the cell to more rapidly displace the spindle and thus to proceed through mitosis more quickly—the force may exceed the threshold above which spontaneous oscillation is inevitable. Although oscillations are not necessary for asymmetric spindle positioning (the temperature-sensitive dynein mutants are viable at the permissive temperature [21]), they have been a useful tool to probe the internal workings of the mitotic-spindle positioning machinery.

Supplemental Data

Supplemental Data include Experimental Procedures, two figures, and seven movies and are available with this article online at: <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/16/21/2111/DC1/>.

Acknowledgments

The authors thank Mr. H. Bringmann for antibodies to DLI-1; Dr. S. van der Heuvel for antibodies to GPR-1/2; and Drs. C. Cowan, I. Riedel-Kruse, and A. Sanchez and Messrs. H. Bringmann and A. Mashagi for comments on an earlier version of this manuscript. We thank Dr. Bianca Habermann for bioinformatics analysis of LIN-5. J.P. was supported by the Human Frontier Science Program Organization, J.-C.R. by the Studienstiftung des Deutschen Volkes, and S.W.G. by the European Molecular Biology Organization and the Helen Hay Whitney Foundation. A.A.H. acknowledges support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft Schwerpunkt Zellpolarität, and J.H. was supported by the National Institutes of Health (AR40593). This work was supported by the Max Planck Society intersectoral program the Physics of Biological Systems.

Received: February 10, 2006
Revised: September 5, 2006
Accepted: September 7, 2006
Published: November 6, 2006

References

1. Horvitz, H.R., and Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: Two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68, 237–255.
2. Knoblich, J.A. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 11–20.
3. Rappaport, R. (1971). Cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 37, 169–213.
4. Goldstein, B., and Hird, S.N. (1996). Specification of the antero-posterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 122, 1467–1474.
5. Kempfues, K.J., and Strome, S. (1997). Fertilization and establishment of polarity in the embryo. In *The Nematode C. elegans*, II, D. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, and J. Priess, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press), pp. 335–359.
6. Schneider, S.Q., and Bowerman, B. (2003). Cell polarity and the cytoskeleton in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Annu. Rev. Genet.* 37, 221–249.
7. Cowan, C.R., and Hyman, A.A. (2004). Asymmetric cell division in *C. elegans*: Cortical polarity and spindle positioning. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 427–453.
8. Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300, 1957–1961.
9. Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol.* 13, 1029–1037.
10. Tsou, M.F., Hayashi, A., and Rose, L.S. (2003). LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Development* 130, 5717–5730.
11. Gotta, M., and Ahringer, J. (2001). Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* 3, 297–300.
12. Srinivasan, D.G., Fisk, R.M., Xu, H., and van den Heuvel, S. (2003). A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* 17, 1225–1239.
13. Grill, S.W., Gonczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409, 630–633.
14. Labbe, J.C., McCarthy, E.K., and Goldstein, B. (2004). The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *J. Cell Biol.* 167, 245–256.
15. Ziegler, H.E. (1896). Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge der Nematoden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie.* 60, 351–410.
16. Nigon, V., Guerrier, P., and Monin, H. (1960). L'architecture polaire de l'oeuf et les mouvements des constituants cellulaires au cours des premières étapes du développement chez quelques nématodes. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 94, 131–202.
17. Dan, K., and Inoue, S. (1987). Studies of unequal cell cleavage in molluscs II. Asymmetric nature of the two asters. *Int. J. Invert. Reprod. Develop.* 11, 335–354.
18. Haydar, T.F., Ang, E., Jr., and Rakic, P. (2003). Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2890–2895.
19. Grill, S.W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301, 518–521.
20. Gonczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* 147, 135–150.

21. Schmidt, D.J., Rose, D.J., Saxton, W.M., and Strome, S. (2005). Functional analysis of cytoplasmic dynein heavy chain in *Caenorhabditis elegans* with fast-acting temperature-sensitive mutations. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1200–1212.
22. Skop, A.R., and White, J.G. (1998). The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**, 1110–1116.
23. Hildebrandt, E.R., and Hoyt, M.A. (2000). Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 99–116.
24. Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275–280.
25. Severson, A.F., and Bowerman, B. (2003). Myosin and the PAR proteins polarize microfilament-dependent forces that shape and position mitotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **161**, 21–26.
26. Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* **106**, 489–498.
27. Dujardin, D.L., Barnhart, L.E., Stehman, S.A., Gomes, E.R., Gundersen, G.G., and Vallee, R.B. (2003). A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J. Cell Biol.* **163**, 1205–1211.
28. Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**, 451–463.
29. Yoder, J.H., and Han, M. (2001). Cytoplasmic dynein light intermediate chain is required for discrete aspects of mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2921–2933.
30. Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753–758.
31. Dogterom, M., Kerssemakers, J.W., Romet-Lemonne, G., and Janson, M.E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 67–74.
32. Srayko, M., Kaya, A., Stamford, J., and Hyman, A.A. (2005). Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* **9**, 223–236.
33. Grill, S.W., Kruse, K., and Julicher, F. (2005). Theory of mitotic spindle oscillations. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 108104.
34. Schnitzer, M.J., Visscher, K., and Block, S.M. (2000). Force production by single kinesin motors. *Nat. Cell Biol.* **2**, 718–723.
35. Evans, E. (2001). Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 105–128.
36. Strogatz, S.H. (1994). *Nonlinear Dynamics and Chaos* (Reading, Massachusetts: Perseus Books).
37. Howard, M., and Kruse, K. (2005). Cellular organization by self-organization: Mechanisms and models for Min protein dynamics. *J. Cell Biol.* **168**, 533–536.
38. Lechleiter, J., Girard, S., Peralta, E., and Clapham, D. (1991). Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* **252**, 123–126.
39. Allbritton, N.L., Meyer, T., and Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* **258**, 1812–1815.
40. Howard, J. (2006). Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules. *Phys. Biol.* **3**, 54–66.
41. King, S.J., and Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 20–24.
42. Du, Q., and Macara, I.G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* **119**, 503–516.
43. Bowman, S.K., Neumuller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The *Drosophila* NuMA homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev. Cell* **10**, 731–742.
44. Novatchkova, M., and Eisenhaber, F. (2002). A CH domain-containing N terminus in NuMA? *Protein Sci.* **11**, 2281–2284.
45. Clark, I.B., and Meyer, D.I. (1999). Overexpression of normal and mutant Arp1 α (centractin) differentially affects microtubule organization during mitosis and interphase. *J. Cell Sci.* **112**, 3507–3518.

Spindle Oscillations during Asymmetric Cell Division Require a Threshold Number of Active Cortical Force Generators

Jacques Pecreaux, Jens-Christian Röper,
Karsten Kruse, Frank Jülicher, Anthony A. Hyman,
Stephan W. Grill, and Jonathon Howard

Supplemental Experimental Procedures

Culture Conditions, RNA-Mediated Interference, Western Blots, and Spindle Severing

Nematode strains expressing γ -tubulin-GFP [S1] were grown at 16°C, and embryos were mounted and imaged at $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (unless otherwise stated) as described earlier [S2]. For RNAi of *gpr-1* and *gpr-2* (genes C38C10.4 and F22B7.13, which are >97% identical in sequence and thus indistinguishable by RNAi), young adults were injected with dsRNA derived from genomic DNA obtained by using the PCR primers 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGTCTGGCAGCAGACAGTTCAG-3' and 5'-TAATACGACTCACTATAGGAGCATGTGATTCCACACGTC-3' [S3]. Injected worms were kept at 24.5°C, and embryos were analyzed between 2 hr and 42 hr after injection. For RNAi of the dynein-light-intermediate-chain gene, *dli-1* (C39E9.14), young adult hermaphrodites were transferred onto feeding plates containing the bacterial strain for *dli-1* inactivation obtained from Geneservice [S4], as described elsewhere [S5, S6], and left at 24.5°C for different times before observation. Western blots were performed as described previously [S7], with 50 worms in each condition (control and 10, 20, 30, and 40 hr after injection or transfer). Severing of the central spindle at different times after injection was performed as described [S8], with a pulsed UV laser ($\lambda = 355$ nm, 400 ps, 20 $\mu\text{J}/\text{pulse}$, PowerChip, JDS Uniphase) [S9].

Automatic Spindle-Pole Tracking

The positions of both spindle poles were tracked at 2 frames/s with a precision of ~ 100 nm by using the following procedure. First, the image was low-pass-filtered at a spatial frequency of $1.125 \mu\text{m}^{-1}$. Second, a correlation was computed between the filtered image and a difference-of-Gaussians model image. Third, the centrosome position was computed by using a center-of-gravity algorithm applied to the result of the correlation. The maximum amplitude of an oscillation was defined as one half of the peak-to-peak variation in the spindle-position trace after it was passed through a band-pass filter with lower and upper cutoff frequencies of 10 and 100 mHz, respectively. The contour of the embryo was obtained from the cytoplasmic fluorescence, and the position the spindle within the cell was calculated as the mean position of the two spindle poles. Four frequency measurements were made during each period of an oscillation by measuring the times in the cycle at which the position and

velocity were at an extremum. Analysis was performed with MatLab (The MathWorks). Values are mean \pm SD unless otherwise stated.

Simulations

Equation S1 was solved numerically in MatLab. \bar{k}_{off} was varied with time as shown in Box 1, Figure 1A; this in turn makes the coefficients in Equation S1 vary with time (Equations S2 and S3). Because spontaneous oscillations build up from fluctuations, noise was added in each simulation step. The noise, $\eta(t)$, was added at each time step and was constructed in such a way that it corresponded to continuous time noise with the following properties: $\langle \eta(t) \rangle = 0$ and $\langle \eta(0)\eta(t) \rangle = 2kT\gamma\delta(t)$, where kT is the Boltzmann constant times absolute temperature, $\gamma = 39$ mN·s/m corresponds to a damping term arising from fluctuations of the motors [S10] and gives a noise amplitude somewhat smaller than the measured noise (compare Figure 1C with Figure 5E), and $\delta(t)$ is the Dirac delta function. The parameters used in the simulation are stated in the legend to Figure 5.

The Antagonistic-Motors Model

Because each spindle pole oscillates even after the spindle has been bisected with a UV laser [S8], we treat the oscillations of the two spindle poles separately (Box 1, Figure 1A). The cortical force generators are postulated to be protein complexes that contain one or more motor proteins. A motor protein binds near the plus end of an astral microtubule and moves processively toward the minus end, generating a force that pulls the spindle pole toward the cortex. The force has components parallel to and perpendicular to the AP axis as shown in Box 1, Figure 1A. In one picture, the force-generating complex is acting as a depolymerase in the sense that the net result is a decrease in length of the astral microtubules. Alternatively, the microtubule may not depolymerize and instead is bent along the cortex. The model is general enough to incorporate both pictures.

The motors obey a "force-velocity" curve whereby the speed, v , of a motor toward the minus end of the microtubule decreases as the load force, f , is increased. If the speed is low ($|v| \ll v_m$, where v_m is the maximum speed), in what has been termed the "force-limited" regime [S9], we can write $f \approx \bar{f} - f'v$, where \bar{f} is the "stall" or "reversal force" above which the motor reverses direction and f' is the slope of the force-velocity curve at the reversal force. The existence of a reversal force was recently demonstrated experimentally for kinesin [S11]. The numerical value of f' is on the order of f/v_m . The maximum speed is on the order of 2 $\mu\text{m}/\text{s}$, the highest speed of any of the

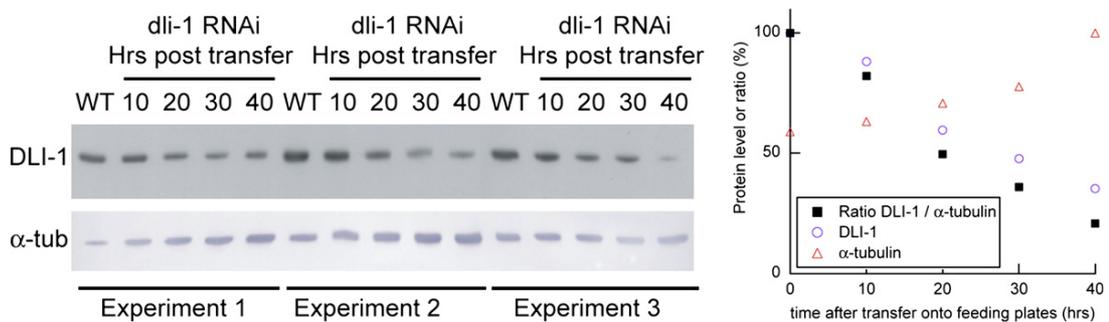


Figure S1. Western Blot and Quantification of DLI-1 Rundown

The left panel is a western blot for three experiments showing the dynein light intermediate chain (DLI-1) protein levels at the indicated times after transfer to the feeding plates. WT denotes uninjected control. Also shown are the α -tubulin protein levels, which serve as loading controls. The right panel shows the average protein levels for the three experiments normalized to the highest level: The DLI-1 levels decrease, as do their ratios relative to the tubulin control.

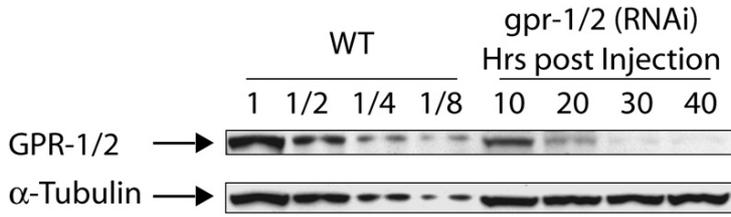


Figure S2. Western Blot of GPR-1/2 Run-down

Western blot showing the change in GPR-1/2 protein levels at the indicated times after the injection of dsRNA. WT denotes uninjected controls at the indicated dilution. Also shown are the α -tubulin protein levels, which serve as loading controls. These data are quantified in Figure 3A in the main text.

centrosomal fragments [S9], and is consistent with the speed of cytoplasmic dynein [S12]. We take $\bar{f} = 6$ pN, the stall force of kinesin and cytoplasmic dynein [S13]. We take $f' = 3 \mu\text{N} \cdot \text{s/m}$.

If we represent the position of the spindle by y and its velocity and higher time derivatives by \dot{y} and \ddot{y} , etc., then we can express the force generated by a motor on the upper cortex by

$$f_+ \approx \bar{f} - f' \dot{y} \quad (\text{S1})$$

In the following we derive a linear solution to the model; the full nonlinear solution is in [S14]. The linear equations are good approximations provided that the oscillations are small because the symmetry of the spindle about the AP axis ensures that the second-order terms ($\dot{y}^2, \ddot{y}^2, \dot{y}\ddot{y}$) cancel out.

The motor forces, which pull the spindle pole away from the AP axis, are opposed by a centering process. This process, whose existence is inferred from the observation that the spindle is centered prior to anaphase onset (i.e., before the cortical force generators are turned on), exerts a force on the spindle pole that increases with the displacement from the AP axis. Such a force-displacement relationship defines a spring, and we assume that it is Hookean with a spring constant K . The molecular substrate for this “centering spring” could be the pushing or pulling of microtubules that contact the cortex at sites distinct from the motors [S15, S16]. If buckling microtubules contribute to centering, then the value of K is $\sim 10 \mu\text{N/m}$ (Equation 3 in [S15], assuming that the number of microtubules contributing to centering, Np , is 100).

The movement of the spindle pole is expected to be opposed by drag forces that arise from viscosity of the ooplasm [S17] as well as the dynamic rearrangements of the microtubules themselves [S15]. We assume that the drag force is proportional to the velocity, with drag coefficient Γ . If the viscosity of the cytoplasm is 100–1000 times larger than that of an aqueous solution [S17], then the drag is on the order of $100 \mu\text{N} \cdot \text{s/m}$. If the damping is due to the dynamics of buckling microtubules, then Γ is again on this order of $100 \mu\text{N} \cdot \text{s/m}$ (Equation 10 in [S15], assuming that the time for microtubules to grow from the pole to the cortex, τ^+ , is 20 s [S18]).

The spindle pole together with its astral microtubules is equivalent to the mechanical circuit shown in Box 1, Figure 1B (right). The activity of the motors depends on the net forces that act on them as explained in the next paragraph.

The motors are processive, meaning that they take many steps before dissociating. This implies that a change in the probability that the motor is attached, p , lags behind a change in the load force according to $\dot{p}(t) = -k_{\text{off}}p + k_{\text{on}}(1-p)$, where k_{on} and k_{off} are the on and off rates for the motor binding to a microtubule. The off rate is assumed to increase exponentially with load as observed experimentally for kinesin [S19]: $k_{\text{off}}(f) = k_{\text{off}} \exp(f/f_c) \approx k_{\text{off}}(1 - f\dot{y}/f_c)$, where we have substituted the force-velocity relation and assumed that the speed is low. $k_{\text{off}} = k_{\text{off}}(\bar{f})$. We take $f_c = 1.5$ pN. This is somewhat smaller than the value of 4 pN for kinesin-microtubule detachment and the 4–5 pN for cadherin-cadherin detachment [S20]. The on rate of 0.6 s^{-1} is chosen to give the correct frequency of oscillation.

The equation of motion of the spindle pole is

$$\Gamma \dot{y} + Ky = F_+ + F_- \quad (\text{S2})$$

F_+ is the force generated by the motors on the upper side of the cortex, and F_- is the force generated by the motors on the lower side. The upper cortical force is given by

$$F_+ = Np_+ f_+ \quad (\text{S3})$$

[S9], where N is the number of motors, p_+ is the probability of an upper motor being attached, and f_+ is the single-motor force

generated by an upper motor. An analogous expression holds for the lower cortex. We can express the attached probability at the upper cortex as

$$\dot{p}_+ \equiv -\frac{1}{\bar{\tau}} \left[1 - \frac{f'}{f_c} (1 - \bar{p}) \dot{y} \right] p_+ + k_{\text{on}}, \quad (\text{S4})$$

where $\bar{\tau} = (k_{\text{on}} + k_{\text{off}})^{-1}$ is the delay in the response of the motors to changing forces and $\bar{p} = k_{\text{on}} / (k_{\text{on}} + k_{\text{off}})$ is the mean attached probability of the motors (which reflects their activity as defined in the text). If the delay is short (on the order of 1 s) compared to the period of spindle oscillation (~ 20 s), then the speed changes little over time ($\bar{\tau} |\dot{y}| \ll |\dot{y}|/\bar{\tau}$). In this case, the probability can be expressed to linear order as:

$$p_+ \approx \bar{p} + \frac{f'}{f_c} \bar{p} (1 - \bar{p}) \dot{y} - \bar{\tau} \frac{f'}{f_c} \bar{p} (1 - \bar{p}) \ddot{y}. \quad (\text{S5})$$

This can be checked by substituting S5 (and its derivative) back into Equation S4 and comparing the lowest-order terms. The attached probability lags the velocity by the time $\bar{\tau}$.

The symmetry of the spindle implies that $f_-(\dot{y}) = -f_+(-\dot{y})$ and $p_-(\dot{y}, \ddot{y}) = p_+(-\dot{y}, -\ddot{y})$. Substituting the force-velocity curve (Equation S1) and $F_- = Np_- f_-$ into S2, and using S5 and the symmetry relations, we obtain the following equation of motion:

$$I \ddot{y} + (\Gamma - \Xi) \dot{y} + Ky = 0. \quad (\text{S6})$$

This equation corresponds to the mechanical circuit shown in Box 1, Figure 1B (left). I and Ξ are given by

$$I = 2N \left\{ \frac{\bar{f}}{f_c} \bar{p} (1 - \bar{p}) \right\} f' \bar{\tau} \quad (\text{S7})$$

$$\Xi = 2N \left\{ \frac{\bar{f}}{f_c} \bar{p} \left[(1 - \bar{p}) - \frac{f_c}{\bar{f}} \right] \right\} f'.$$

I has units of mass and corresponds to a chemomechanical “inertia.” Ξ has units of damping, but if it is positive, it gives rise to a force in the same direction as the velocity; we therefore call it “negative damping” to distinguish it from positive damping, where the force opposes the velocity. For fixed k_{on} , I is maximum when $\bar{p} = 2/3$ (noting that $\bar{\tau} = \bar{p}/k_{\text{on}}$), whereas for fixed k_{off} it has a maximum when $\bar{p} = 1/3$ (noting that $\bar{\tau} = (1 - \bar{p})/k_{\text{off}}$) as shown in Figure S5D.

If the negative damping (Ξ) exceeds a threshold set by the passive damping (Γ) (i.e., $\Xi > \Gamma$), then the total damping is negative. In this case, there is positive feedback and the system described by Equation S1 becomes unstable and begins to oscillate. Close to the instability, the oscillation frequency is

$$\omega_0 \approx \sqrt{K/I} \text{ rad/s}. \quad (\text{S8})$$

If the negative damping falls below the passive damping, then the system is stable and the oscillations die out exponentially.

Supplemental References

- S1. Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 153, 1209–1226.
- S2. Gonczy, P., Schnabel, H., Kaletta, T., Amores, A.D., Hyman, T., and Schnabel, R. (1999). Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *J. Cell Biol.* 144, 927–946.
- S3. Gonczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S.J., Copley, R.R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin,

- E., et al. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408, 331–336.
- S4. Kamath, R.S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313–321.
- S5. Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325–330.
- S6. Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2. RESEARCH0002. Published online December 20, 2000. 10.1186/gb-2000-2-1-research0002.
- S7. Ozlu, N., Srayko, M., Kinoshita, K., Habermann, B., O'Toole, E.T., Muller-Reichert, T., Schmalz, N., Desai, A., and Hyman, A.A. (2005). An essential function of the *C. elegans* ortholog of TPX2 is to localize activated aurora A kinase to mitotic spindles. *Dev. Cell* 9, 237–248.
- S8. Grill, S.W., Gonczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409, 630–633.
- S9. Grill, S.W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301, 518–521.
- S10. Nadrowski, B., Martin, P., and Julicher, F. (2004). Active hair-bundle motility harnesses noise to operate near an optimum of mechanosensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12195–12200.
- S11. Carter, N.J., and Cross, R.A. (2005). Mechanics of the kinesin step. *Nature* 435, 308–312.
- S12. Paschal, B.M., Shpetner, H.S., and Vallee, R.B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* 105, 1273–1282.
- S13. Toba, S., Watanabe, T.M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y.Y., and Higuchi, H. (2006). Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5741–5745.
- S14. Grill, S.W., Kruse, K., and Julicher, F. (2005). Theory of mitotic spindle oscillations. *Phys. Rev. Lett.* 94, 108104.
- S15. Howard, J. (2006). Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules. *Phys. Biol.* 3, 54–66.
- S16. Dogterom, M., Kerssemakers, J.W., Romet-Lemonne, G., and Janson, M.E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 67–74.
- S17. Alexander, S.P., and Rieder, C.L. (1991). Chromosome motion during attachment to the vertebrate spindle: Initial saltatory-like behavior of chromosomes and quantitative analysis of force production by nascent kinetochore fibers. *J. Cell Biol.* 113, 805–815.
- S18. Srayko, M., Kaya, A., Stamford, J., and Hyman, A.A. (2005). Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* 9, 223–236.
- S19. Schnitzer, M.J., Visscher, K., and Block, S.M. (2000). Force production by single kinesin motors. *Nat. Cell Biol.* 2, 718–723.
- S20. Bayas, M.V., Leung, A., Evans, E., and Leckband, D. (2006). Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys. J.* 90, 1385–1395.

The mitotic spindle in the one-cell *C. elegans* embryo is positioned with high precision and stability

Jacques Pecreaux^{*,#,1,2}, Stefanie Redemann^{*,3}, Zahraa Alayan^{1,2}, Benjamin Mercat^{1,2}, Sylvain Pastezeur^{1,2}, Carlos Garzon-Coral⁴, Anthony A. Hyman⁴, Jonathon Howard^{5,#}

¹ IGDR, Unité Mixte de Recherche 6290, Centre National de la Recherche Scientifique, 2 avenue du Professeur. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

² IGDR, Institute of Genetics and Development of Rennes, University Rennes 1, F-35043 Rennes, France

³ Present address: Medizinisch Theoretisches Zentrum (MTZ), Technical University of Dresden, Fiedlerstrasse 42, D-01307 Dresden, Germany.

⁴ Shiram Center of Bioengineering and Chemical engineering, Stanford University, 433 Via Ortega, Stanford, CA 94305

⁵ Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics PfortenhauerStr. 108, 01307 Dresden, Germany

⁶ Department of Molecular Biophysics & Biochemistry, Yale University, 266 Whitney Avenue, New Haven, CT 06511

* These authors contributed equally.

Corresponding author: jacques.pecreaux@univ-rennes1.fr, jonathon.howard@yale.edu

Running title: The high stability of mitotic spindle centering

Abstract

Precise positioning of the mitotic spindle is important for specifying the plane of cell division, which in turn determines how the cytoplasmic contents of the mother cell are partitioned into the daughter cells, and how the daughters are positioned within the tissue. During metaphase in the early *C. elegans* embryo, the spindle is aligned and centered on the anterior-posterior axis by a microtubule-dependent machinery that exerts restoring forces when the spindle is displaced from the center. To investigate the accuracy and stability of centering, we tracked the position and orientation of the mitotic spindle during the first cell division with high temporal and spatial resolution. We found that the precision is remarkably high: the cell-to-cell variation in the transverse position of the center of the spindle during metaphase, as measured by the standard deviation, was only 1.5% of the length of the short axis of the cell. Spindle position is also very stable: the standard deviation of the fluctuations in transverse spindle position during metaphase was only 0.5% of the short axis of the cell. Assuming that stability is limited by fluctuations in the number of independent motor elements such as microtubules or dyneins underlying the centering machinery, we infer that the number is on the order of one thousand, consistent with the several thousand of astral microtubules in these cells. Astral microtubules grow out from the two spindle poles, make contact with the cell cortex, and then shrink back shortly thereafter. The high stability of centering can be accounted for quantitatively if, while making contact with the cortex, the astral microtubules buckle as they exert compressive, pushing forces. We thus propose that the large number of microtubules in the asters provides a highly precise mechanism for positioning the spindle during metaphase while assembly is completed prior to the onset of anaphase.

Introduction

During cell division, the correct positioning and orientation of the mitotic spindle are important for the developmental fate of the daughter cells. This is because the cleavage furrow usually bisects the spindle (1, 2) and thereby determines, in part, how the cytoplasmic contents are distributed to the two daughter cells (3-5). The plane of cell division also specifies the location of the daughter cells within the tissue (6). The initial establishment of spindle position and orientation in the early phases of mitosis are thought to be due to the microtubule-dependent motor protein dynein acting at the cell cortex (7) and/or in the cytoplasm (8-10). Once the spindle reaches the cell center, its position and orientation must be precisely maintained during metaphase (11, 12) until the spindle assembly checkpoint is passed and the cell enters anaphase, when chromosome segregation occurs.

In this work, we have asked: following the initial positioning of the spindle at the cell center early in mitosis, how accurately, precisely and stably is the position maintained during metaphase? By accuracy, we mean how close, on average, is the midpoint of the spindle to the center of the cell and how close on average is the orientation parallel to the anterior-posterior (A-P) axis. By precision, we mean how much variability is there from cell to cell? And by stability, we mean how well do individual cells maintain their spindle position and orientation during metaphase.

These are important questions because the reliability of biological processes ultimately depends on the number of molecules involved. The statistical fluctuations in the number of molecules often follows a Poisson distribution in which the variance is proportional to the mean (see e.g. (13)). If this holds true for the centering machinery, the standard deviation of the number will be proportional to the mean number of motors and the relative fluctuations will be inversely proportional to the square root of the number of constituent motors. This result holds independent of viscous properties of the cytoplasm, which will determine the timescale, but not the amplitude, of the fluctuations. If the motors are not independent of each other (i.e. they tend to operate in groups due to elastic or viscous coupling) or there are other sources of “noise” (such as Brownian motion) then the relative fluctuations will be larger. Thus, the number of constituent molecules places an upper limit on the precision and stability of a process. Physical and genetic perturbations indicate that the spindle is maintained at the cell center by a force-generating machinery that relies on the astral microtubules, which grow out from the spindle poles towards the cell cortex (14, 15). Thus, measurements of the accuracy and stability of spindle position may allow us to estimate the minimum number of microtubules and/or motors (e.g. dynein) that are involved in maintaining the spindle at the cell center.

We have used the one-cell embryo of the nematode *C. elegans* as a model system to study the precision of centering because the anatomy of the spindle is well characterized and its large size

facilitates the tracking of spindle position. Furthermore, there is a clearly defined period of about 2 minutes, roughly corresponding to metaphase, when the spindle is relatively quiescent and statistical measurements can be made.

Material and Methods

Culturing *C. elegans*

C. elegans embryos were cultured as described in (16). The TH65 (YFP::TBA-2, also denoted YFP:: α -tubulin) and TH66 (EBP2-2::GFP) worm strains used for the microtubule landing assay were maintained at 25 °C, TH27 (TBG-1::GFP, also denoted γ TUB::GFP), TH30 (γ TUB::GFP, histone H2B::GFP), TH290 (*gpr-1(ok2126)* back-crossed 9 times), TH291 (*gpr-2(ok1179)* back-crossed 10 times) were maintained at 16 °C. The transgenes encoding the GFP and YFP fusion proteins are under the control of the *pie-1* promoter. Transgenic worms were created by microparticle bombardment (BioRad), as described in (17).

Gene silencing by RNA interference

RNAi experiments were performed by feeding or injection as described in (18). The feeding clones for *zyg-9* were ordered from Gene Service: the target gene was subcloned into the RNAi feeding vector L4440 and transformed into HT115 (DE3) bacteria. Worms were grown for 4 hours at 25 °C on the plates. For injections, a region from the gene was amplified by PCR using N2 genomic DNA as a template. The PCR-sample was subsequently purified using the Qiagen PCR cleanup Kit. For T3 and T7 transcription, the Ambion kit was used and was purified using the RNeasy kit. Primers used to amplify regions from N2 genomic DNA for dsRNA production were

gpr-1/2: T7: TAATACGACTCACTATAGGTCAGCGGTTGTTTTATTGAAGAT
 T3: AATTAACCCTCACTAAAGGTGGACGAGCTGGAAAAATATAAA
lin-5: T7: TAATACGACTCACTATAGGCGAGCAAAGAAGTCTGGAGG
 T3: AATTAACCCTCACTAAAGGCGTTCCTCTCTTCGTCAAGG
nmy-2 T7: TAATACGACTCACTATAGGAATTGAATCTCGGTTGAAGGAA
 T3: AATTAACCCTCACTAAAGGACTGCATTTACGCATCTTATG
lov-1 T7: TAATACGACTCACTATAGGAACTCATAGGTGCCAATGCC
 T3: AATTAACCCTCACTAAAGGGCGATTTGCTCCTACCTTGA

The time post-injection when worms were assayed were 21-26 hrs (*gpr-1/2*), 40-42 hrs (*lin-5*), 18-24 hrs (*nmy-2*) and 41 hrs (*lov-1*). The knockdown of *gpr-1/2* and *nmy-2* were partial: *nmy-2* (RNAi) abolished oscillations but only delayed posterior displacement and *nmy-2* (RNAi) preserved embryo polarity.

Centrosome imaging, tracking and analysis

Embryos of the control TH27 strain, *gpr-1/2(RNAi)*, *zyg-9(RNAi)* and the fixed embryos were imaged using an AxioVision imager 2e upright microscope (Zeiss, Jena, Germany). All other embryos were imaged with an AxioImager M1. The microscopes were modified for long-term imaging by adding an extra heat filter in the mercury lamp light path, and by using a 12 nm bandpass excitation filter centered on 485 nm (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany). These filters helped to prevent phototoxicity and reduce bleaching. Images were collected using a 512x512 pixel back-illuminated emCCD camera (iXon+ on the AxioVision and an iXon 3 on the AxioImager) from Andor Technologies (Belfast, UK) running Solis software. We confirmed that photodamage was not serious by checking that the rate of subsequent divisions was normal (19). The acquisition frame rate was 31.23 frames/s for the iXon+ 32.95 frames/s for the iXon3, and with 4096 frames (corresponding to a total time of 131 s and 124.3 s respectively), the frequency ranges were 7.6 mHz to 15.6 Hz and 8.0 mHz to 16.5 Hz s respectively. The time interval used for measurements started 30 seconds after nuclear envelope breakdown. All analysis software was written in Matlab (The Mathworks). Statistical significance calculated with a two-tailed Welch t-test.

Data representation

The anterior and posterior centrosomes coordinates, (A_x, A_y) and (P_x, P_y) were computed as described in the text. We calculated the spindle coordinates (S_x, S_y, S_l, S_a) as:

$$\begin{cases} S_x = \frac{P_x + A_x}{2} \\ S_y = \frac{P_y + A_y}{2} \\ S_l = \sqrt{(P_x - A_x)^2 + (P_y - A_y)^2} \\ S_a = \text{atan2}(P_y, P_x) \end{cases} \quad 1$$

where atan2 is the four-quadrant inverse tangent (MatLab).

Cell-cycle timing

We used the fluorescent images to define the stages of the cell cycle. Taking advantage of the dim cytoplasmic labeling by the γ TUB::GFP, nuclear envelope breakdown (NEBD) was defined as the minimum of the fluorescence intensity of the nucleus (measured at the midpoint between centrosomes) (20). Anaphase onset was defined as the midpoint of the inflection in spindle elongation. The latter criterion was checked using a γ TUB::GFP histone H2B::GFP line, in which we compared our estimate with the chromatid separation timing. The difference between

the spindle elongation inflection and the onset of chromatid separation was 10 ± 5 s ($N = 4$, $p = 0.16$ compared to no difference).

Power spectra and curve fitting

From the time-series of the spindle's transverse position, we computed the one-sided power spectral density function, $\tilde{G}(f)$, where f is frequency, using MatLab's fast Fourier transform (21). We refer to this as the power spectrum. It has the property that

$$\int_0^{f_{\max}} \tilde{G}(f) df = \Delta f \sum_{i=0}^{2048} \tilde{G}_i = \sigma^2 \quad 2$$

where $f_{\max} \approx 16$ Hz is the maximum frequency, \tilde{G}_i is the value in the i th frequency increment, $\Delta f \approx 8$ mHz is the frequency increment and σ^2 is the variance of the time series.

We fit the data to a Lorentzian model and to second-order model. The Lorentzian model is defined by

$$H(f) = \frac{4\sigma^2\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2} = \frac{D/\pi^2}{f_c^2 + f^2} \quad 3$$

where τ is the time constant (or correlation time) and σ^2 is the total variance. Alternative parameters are a diffusion coefficient $D = \sigma^2 / \tau$ and a characteristic frequency $f_c = 1/2\pi\tau$. The second order model is defined by

$$H(f) = \frac{4\sigma^2\tau_2}{1 + (1 - 2\tau_1/\tau_2)(2\pi f\tau_2)^2 + \tau_1^2/\tau_2^2(2\pi f\tau_2)^4} \quad 4$$

where τ_1 and τ_2 are the shorter and longer time constants. This reduces to the Lorentzian when $\tau_1 \ll \tau_2$.

To estimate the parameter values we performed least-square fitting, minimizing:

$$\sum_{i=1}^{2048} \frac{(\langle \tilde{G}_i \rangle - \tilde{H}_i)^2}{\tilde{H}_i^2} \quad 5$$

where $\langle \tilde{G}_i \rangle$ is averaged power spectrum over the 8 embryos, \tilde{H}_i is the theoretical spectral density (the Lorentzian or the second-order model) and i indexes the different frequencies. We corrected the fit parameters for a small systematic bias (eq. 41 of (22)).

Stability of centration by microtubule pushing

Pushing forces generated by microtubules that grow out from the centrosome (the astral microtubules) and make contact with the cortex will lead to centration of the spindle. There are two lines of evidence that microtubules continue to grow after contact with the cortex (and

therefore generate pushing forces): (i) in vivo, EB1, a marker for microtubule growth, continues to bind to microtubule ends after they contact the cortex (23), and (ii) in vitro, microtubules fixed at one end buckle when the other end makes contact with a solid surface (24), indicating that growth continues and that compressive (pushing) forces are generated.

How pushing forces lead to centering has been model by (25). In the one dimensional model of a spindle, microtubules grow to the left and to the right with speed v_+ . After contacting the cortex, they continue to grow for a short time, τ_p , during which they generate pushing forces before shrinking with speed v_- . If the spindle moves a distance z away from the center to the right, then there will be a difference in the probability of microtubules pushing from the right compared to the left, $\Delta p(z) = p_r(z) - p_l(z)$, because the microtubules on the right side will spend less time growing out to the cortex ($\tau^+ = (R - z)/v_+$) and shrinking back ($\tau^- = (R - z)/v_-$) and a larger fraction of the time pushing at the cortex than those on the left. The probability is:

$p(z) = \tau_p / (\tau_p + \tau^+(z) + \tau^-(z))$, where we have dropped the left/right subscript. This leads to a centering force:

$$f(z) = \frac{M}{2} \Delta p(z) \bar{f} \quad 6$$

where M is the total number of microtubules and \bar{f} is the force exerted while pushing.

Differentiating with respect to z , we obtain

$$\frac{d\Delta p}{dz}(0) = 2 \frac{p_0(1-p_0)}{R} \quad 7$$

where the subscript 0 denotes the probability at the center. The centering stiffness is

$$K = \frac{df}{dz}(0) = Mp_0(1-p_0) \frac{\bar{f}}{R} \quad 8$$

Because motor pushing is a binomial process, the force variance is

$$\sigma_f^2 = Mp_0(1-p_0) \bar{f}^2 \quad 9$$

Therefore, the positional variance is

$$\sigma_z^2 = \frac{\sigma_f^2}{K^2} = \frac{R^2}{Mp_0(1-p_0)} \quad 10$$

For our case where $p_0 \ll 1$, the SD of the positional fluctuation divided by the cell radius (R) is inversely proportional to the square root of the number of pushing microtubules:

$$\frac{\sigma_z}{R} = \frac{1}{\sqrt{Mp_0}} \quad 11$$

Importantly, (i) the positional fluctuation depends on the square root of the number of pushing microtubules, Mp_0 , as claimed in the Introduction. And (ii) the positional fluctuations are independent of the pushing force, which can be understood through a dimensionality argument:

there is only one relevant force because the thermal fluctuations are expected to be very small (15) and therefore ignored.

Results

To measure the accuracy and stability of spindle position and orientation, we first defined a coordinate system for the one-cell *C. elegans* embryo. We labeled the centrosomes with γ TUB::GFP (Figure 1A, see Methods) and used a tracking algorithm based on (26) to locate the centroids of the anterior and posterior centrosomes (Figure 1A, red and blue traces respectively). To relate the positions of the centrosomes to the geometry of the cell, we used an active contour algorithm (27) to locate the cell periphery; the algorithm was applied to an optical plane that included the two centrosomes, and the cytoplasmic γ -tubulin fluorescence marked the interior of the cell. The cell center was defined as the centroid of the perimeter. We used the zeroth, first and second moments of cell area (i.e. within the perimeter) to determine an elliptical model of cell (28). The long axis of the ellipse (drawn through the cell center) defined the anterior-posterior axis, abbreviated AP, and was used as the x -axis of our coordinate system, with positive towards the posterior (Figure 1A, magenta). The short axis of the ellipse (also drawn through the cell center) defined the transverse axis and was used as the y -axis (Figure 1A, green). The lengths of the long and short axes of the cells were $51.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$ and $32.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ($N = 28$ embryos; errors are SD unless stated otherwise). Using this coordinate system, we measured the center of the spindle (defined by the mid-point of the line connecting the centrosomes), the orientation of the spindle and the length of the spindle (Figure 1B).

Accuracy and precision of centering

To determine the accuracy of centering, we tracked the positions of the centrosomes and computed the coordinates of the spindle for 8 minutes from before nuclear envelope breakdown (NEBD, time zero indicated by the left-hand vertical dashed line in Figure 1C-F) to the end of anaphase. After fertilization and the meeting of the male and female pronuclei in the posterior half of the embryo, the pronuclei-centrosome complex moves to the cell center. At NEBD, the anterior and posterior centrosomes lay close to the AP-axis (Figure 1C,D), the spindle center lay close to the cell center (Figure 1E) and the spindle was oriented approximately parallel to the AP-axis (Figure 1F, S_a). About 100 s after NEBD, the posterior centrosome began to move towards the posterior (Figure 1D, P_x), leading to a posterior displacement of the spindle center (Figure 1E, S_x). The spindle continued to lie on the AP-axis until anaphase onset when the spindle started rocking, which is best seen in the transverse position of the posterior centrosome (Figure 1D, S_y) and the spindle orientation (Figure 1F, S_a).

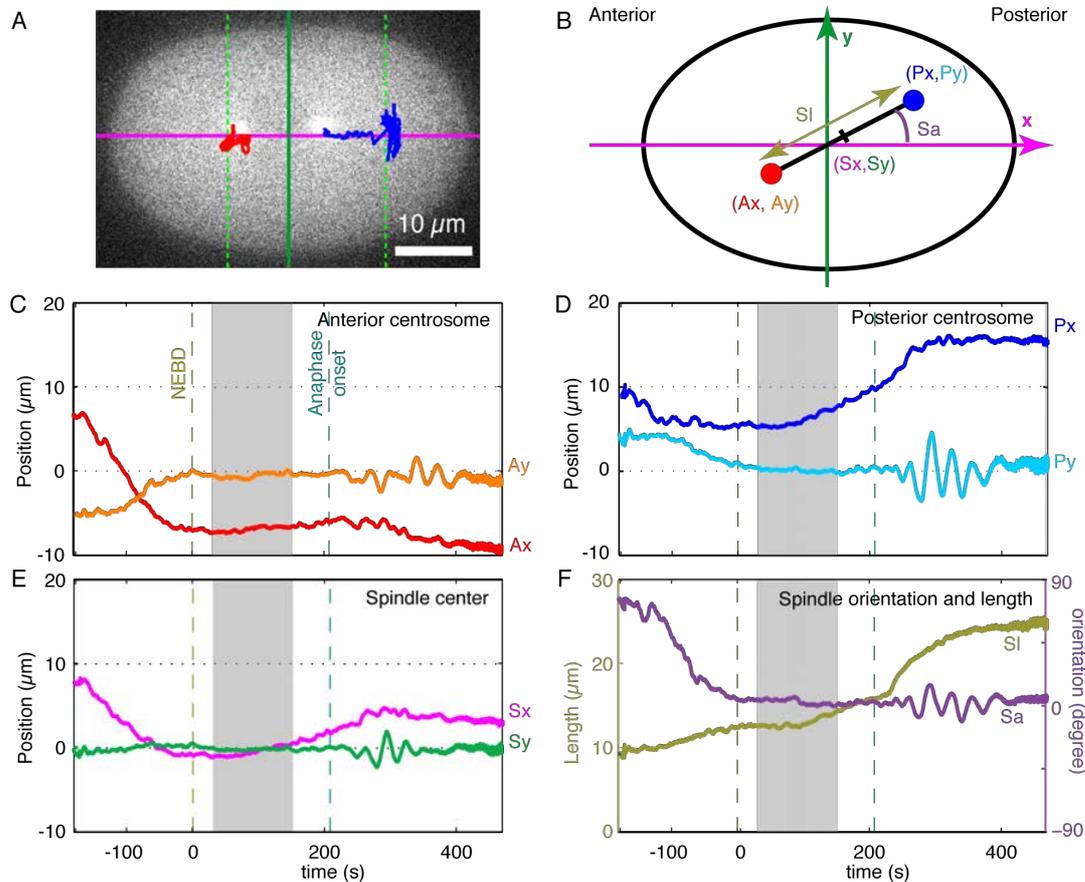


Figure 1: Definition of spindle coordinates and typical trajectories in control embryos

A Trajectories of the anterior (red) and posterior (blue) poles superimposed on a fluorescence micrograph of a one-cell *C. elegans* embryo labeled with GFP-gamma-tubulin. The horizontal magenta line is the AP-axis, and the vertical green line is the transverse axis. The intersection of the axes defines the cell center. Vertical green dashed lines mark the position of centrosomes on the AP-axis when anaphase ends. **B** Definition of the spindle coordinates and the color scheme used in the subsequent panels. **C** x - (orange) and y -coordinates (red) of the anterior centrosome of a typical cell. The dashed maroon line marks nuclear envelope break down (NEBD) and the dashed green line marks anaphase onset. The gray zone marks the maintenance phase, during which the transverse position and the orientation are stationary, and which is analyzed in detail. **D** x - (light blue) and y -coordinates (dark blue) of the posterior centrosome. **E** x - (magenta) and y -coordinates (green) of the spindle center. **F** Spindle length (khaki) and orientation (violet).

For detailed analysis, we chose the approximate 2-minute interval from 30 s to 160 s after NEBD, indicated by the gray shading in Figure 1C-F. During this interval, termed the maintenance phase (29, 30), the metaphase plate is established and maintained, the centrosomes remained stably centered on the AP axis, and there is little drift in the transverse direction. For 30 embryos, the mean and SD of the coordinates of the spindle center were $-1.32 \pm 0.99 \mu\text{m}$ along the AP axis (SE = $0.18 \mu\text{m}$). These data are displayed in Table 1. The mean displacement from

the center was 2.6% of the long axis of the cell in the anterior half of the embryo; this displacement, though small, as noted by others (12, 31), is significantly different from 0 (t -test, $p = 5 \times 10^{-8}$). The mean and standard deviation of the coordinates of the spindle center were $-0.05 \pm 0.47 \mu\text{m}$ ($N = 30$) along the transverse axis. A zero mean position along the transverse axis was expected because embryos were imaged in an arbitrarily oriented plane that included the AP-axis. The SD, however, contains information: the value is 1.5% of the short axis of the cell and indicates that centering has high precision (i.e. the variation from cell to cell is small). The mean and SD of the spindle angle relative to the AP axis was 1.8 ± 6.3 degrees ($N = 30$); the small SD again indicates high precision. Thus, the accuracy and precision of spindle centering in the one-cell *C. elegans* embryo are high.

Table 1: The accuracy and precision of centration. The mean for S_x gives the axial accuracy and the SDs give the axial (S_x), transverse (S_y) and angular (S_a) precision. Note that transverse and angular accuracy could not be determined due to symmetry (there is no marker to distinguish dorsal from ventral).

Condition	S_y (μm)	S_x (μm)	S_a (degrees)
Control ($N = 30$)	-0.05 ± 0.47	-1.32 ± 0.99	1.85 ± 6.29
Low-drift control ($N = 8$)	0.02 ± 0.27	-0.88 ± 1.08	1.58 ± 2.75
<i>gpr-1/2(RNAi)</i> ($N = 8$)	0.11 ± 0.58	1.08 ± 1.98	-7.05 ± 15.75
<i>zyg-9(RNAi)</i> ($N = 8$)	0.01 ± 0.36	-0.25 ± 1.27	-17.23 ± 29.84

The stability of spindle positioning

To assess the stability of the spindle centering machinery, we measured the variance of the fluctuations of spindle position and orientation in individual embryos. We band-pass filtered the time-traces between 0.1 Hz and 1.1 Hz using the robust local regression algorithm (rloess) (21) to remove mean, residual drift (see below), avoid any contribution from spindle oscillations (0.04 Hz, (26)) and remove high-frequency noise due to the tracking algorithm (see below). The standard deviations of these filtered traces were 35.8 ± 18.0 nm (mean in quadrature \pm SD, $N = 30$) along the AP-axis (S_x) and 22.8 ± 3.6 nm along the transverse axis (S_y) (Table 1, top line). These data are displayed in Table 2. The standard deviation of the filtered orientation (S_a) was 0.26 ± 0.07 degrees. For comparison, the filtered standard deviation of the transverse fluctuations for a methanol-fixed cell was 8.6 nm; the corresponding AP standard deviation was 9.6 nm. Thus, the filtered SDs, though larger than the measurement noise, are nevertheless small and indicate that the stability of positioning is very high.

Table 2: Stability of centering in the frequency range 0.1 to 1 Hz. The standard deviation (mean in quadrature \pm SD) of position along the AP axis (SD_x) and along the transverse axis (SD_y) and of angle (SD_a) in the frequency range 0.1 to 1 Hz. The homologous vertebrate protein is given in column 2.

Condition	Vertebrate protein	SD_y (nm)	SD_x (nm)	SD_a (degrees)
Control ($N = 30$)	-	22.8 ± 3.6	35.8 ± 18.0	0.26 ± 0.07
Low-drift control ($N=8$)	-	22.1 ± 2.9	30.4 ± 3.8	0.24 ± 0.04
<i>gpr-1/2(RNAi)</i> ($N = 8$)	LGN	18.4 ± 2.6	19.4 ± 3.5	0.20 ± 0.02
<i>zyg-9(RNAi)</i> ($N = 8$)	chTOG/XMAP215	39.8 ± 17.9	41.3 ± 10.4	0.45 ± 0.17
<i>gpr-1(ok2126)</i> ($N = 5$)	LGN	30.8 ± 4.0	33.8 ± 3.0	0.37 ± 0.05
<i>gpr-2(ok1179)</i> ($N = 5$)	LGN	25.3 ± 4.8	29.6 ± 2.8	0.27 ± 0.03
<i>lin-5(RNAi)</i> ($N = 6$)	NUMA	23.2 ± 8.3	23.8 ± 6.3	0.24 ± 0.06
<i>lov-1(RNAi)</i> ($N = 6$)	PKD1	25.2 ± 1.5	31.5 ± 3.0	0.25 ± 0.03
<i>nmy-2(RNAi)</i> ($N = 11$)	non-muscle myosin	45.8 ± 16.3	42.5 ± 8.8	0.64 ± 0.35

Spindle fluctuations

To evaluate the stability of centering over a broad frequency range, we performed Fourier analysis of the transverse position of the spindle center during the maintenance phase (e.g. Figure 1E, S_y). We focussed our attention on the transverse position because the axial position of the spindle is not stationary: it moves along the AP axis towards the posterior pole during metaphase (Figure 1E, S_x). We selected for detailed study a subset of eight of the thirty embryos that had low drift along the transverse axis. The reason for this selection was that we attribute the drift, which was typically less than $0.5 \mu\text{m}$ but none-the-less large compared to the standard deviation of the higher-frequency fluctuations, to an imbalance in the mean number of active force-generating elements above and below the AP axis; this imbalance leads to a steady displacement along the transverse axis. On the other hand, we attribute the fluctuations in transverse position to be due to the temporal fluctuations in the number of active force generating elements. It is this number that we are interested in estimating from the amplitude of the fluctuations. Thus, our stability analysis is focussed on the fluctuations, rather than the mean or the slow drift. These eight embryos had similar filtered SDs to the full set of thirty embryos (30.4 ± 3.8 nm, 22.1 ± 2.9 nm and 0.24 ± 0.04 for x , y and angle; mean \pm SD).

For each embryo, we computed the power spectrum as the one-sided power spectral density function of the time series of the spindle position along the transverse axis, S_y . The power spectrum is a measure of the variance of the transverse position within a small band of frequencies (normalized to a frequency interval of 1 Hz) over a range of frequencies determined by the sampling interval and the overall duration of the recording. In our case, the spindle position was measured in each of 4096 consecutive images acquired at a rate of 31 or 33 frames/s (depending on the model of the camera) over ≈ 128 s, corresponding to a range of frequencies

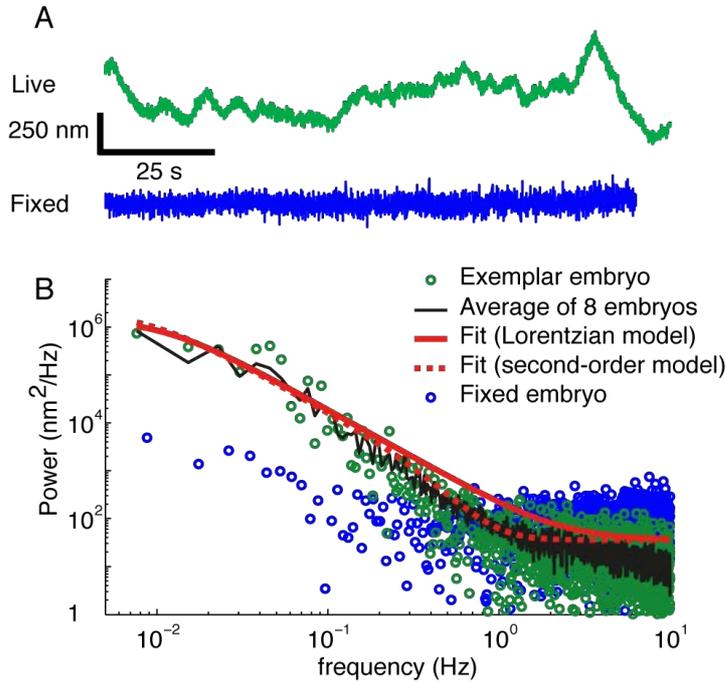


Figure 2: Power spectrum of the transverse spindle position in control embryos

A Time traces of live and fixed cells. The green, upper curve is the transverse position of the spindle center of the embryo in Figure 1 during the maintenance phase. The blue, lower curve is the spindle transverse position in a methanol-fixed embryo. Note that there is more high-frequency noise in the fixed cell due to the reduction in intensity of the GFP. However, the lower-frequency, biological noise is clearly less in the fixed cell. **B** Experimental and theoretical power spectra. The green circles are the one-sided power spectral density of the y -component of the spindle center computed during the maintenance phase. The black line is the average of power spectra from 8 embryos. The blue circles are the power spectrum of the fixed embryo. The solid red line is the least-squares fit to the Lorentzian model with $\sigma^2 = 24.0 \pm 6.0 \times 10^3 \text{ nm}^2$, $\tau = 14.5 \pm 3.8 \text{ s}$ and high-frequency asymptote $\sigma_0^2 = 36 \text{ nm}^2/\text{Hz}$. The dashed red line is the least-squares fit to the second-order model with $\sigma^2 = 27.1 \pm 8.4 \times 10^3 \text{ nm}^2$, $\tau = 18.1 \pm 5.7 \text{ s}$, $\tau_0 = 0.37 \pm 0.02 \text{ s}$ and $\sigma_0^2 = 36 \text{ nm}^2/\text{Hz}$.

from $\approx 8 \text{ mHz}$ to 16 Hz . The time trace of the transverse position of the spindle in Figure 1 is shown at an expanded scale in Figure 2A. The power spectra from the eight embryos had similar amplitudes over the whole frequency range and were averaged (Figure 2B, black line; green circles correspond to the cell in Figure 1). At high frequencies there is an asymptote of about $40 \text{ nm}^2/\text{Hz}$, the power then climbs with a maximum slope of about 2.5 on the log-log plot as the frequency decreases and then the slope decreases again at low frequency, consistent with a low-frequency asymptote of about $10^6 \text{ nm}^2/\text{Hz}$.

To prove that these fluctuations are real and not due to measurement noise from the tracking algorithm, we imaged a methanol-fixed embryo and computed the power spectrum of the transverse position of the spindle center (time trace in Figure 2A, spectrum in Figure 2B both shown in blue). At low frequencies, the power was one to two orders of magnitude less than that

of the living embryos, showing that the fluctuations are of biological origin. Above 1 Hz, the power measured in the fixed cell was somewhat higher than that in the live cell (also seen in the time trace) due to the reduction in GFP signal following fixation.

Modeling the dynamics of the fluctuations

To gain insight into the molecular origin of the fluctuations, we fit two different theoretical curves to the power spectra, a Lorentzian and a second-order model (26). The Lorentzian is the prediction of a model that assumes that the fluctuations are due to a random process with a correlation time, τ ; the correlation leads to low pass filtering of the power spectrum with a slope of -2 on a log-log axis at high frequencies. A physical interpretation of this model is that the centering mechanism acts like a spring, which moves the spindle back towards the center, combined with a viscous element, which slows down the movements (25). The correlation time is the drag coefficient of the viscous element (γ) divided by the spring constant (κ): $\tau = \gamma / \kappa$. The stiffness and drag coefficient were recently measured using magnetic tweezers (15). Fluctuations arise from stochastic variation in the number of force generators acting on the spindle. The second-order model has two characteristic times: the longer time constant likely corresponds to a damped spring, as in the Lorentzian model, and the shorter time constant might arise from an active motor-driven process or a relatively fast mechanical process such as microtubule buckling (see Discussion). For both models, we added a frequency-independent noise corresponding to the high-frequency asymptote.

The Lorentzian provided a good fit to the average power spectrum of the transverse position, except in the frequency range between 0.1 and 1 Hz, where the data fell below the theoretical curve (Figure 2A, B, solid black curves). The best-fit Lorentzian parameters were a time constant $\tau = 14.5 \pm 3.8$ s, an estimated total power (over all frequencies) of $24,000 \pm 5,900$ nm², and a high-frequency asymptote of 36 nm²/Hz (errors in the fits correspond to standard errors, the high-frequency asymptote was set equal to the average of the data over 1-3 Hz). Thus, our data are consistent with a centering machinery that acts as a damped spring, as was inferred by the application of external forces to the spindle (15). The square root of the estimated total power is 155 ± 19 nm (mean \pm SE). By comparison, the square root of the mean variance of the eight time traces, i.e. the average standard deviation of the time traces, was 131 ± 12 nm (mean \pm SE, $N = 8$). The similarity between the square root of the estimated power and the average standard deviation indicates that in these embryos the bandwidth of the measurement (from 0.08 to 16 Hz) was great enough to capture most of the variance.

The primary limitation of these measurements is the duration of the maintenance phase (130 seconds), which is less than ten times the time constant. As a result, the low frequency asymptote is not well constrained. Furthermore, if there is a persistent drift, as was observed in some embryos, then there will be no asymptote. In the eight embryos that we analyzed in detail and

which showed little drift, the 95% confidence range of the total estimated power is 12,300 - 43,000 nm², (doing the analysis on the logarithm of the parameter values and using $t = 2.37$ for 7 degrees of freedom); this range is approximately a factor of two on either side of the mean. Thus, the error in the estimated total power is large.

The second-order model provided a good fit to the average power spectrum over the whole frequency range (Figure 2A, B, dashed curve). The parameters were: $\tau_0 = 18.1 \pm 5.7$ s, $\tau_1 = 0.37 \pm 0.02$ s, an estimated total power (over all frequencies) of $27,200 \pm 8,300$ nm² and a high-frequency asymptote of 36 nm²/Hz as before.

The Fourier analysis confirms that the stability of centering is high. This confirmation is important because it allows to estimate the total fluctuations. We estimate that the standard deviation of the transverse fluctuations divided by the length of the minor axis of the cell is only 0.48% (155 nm/32.5 μ m). With 95% confidence, we estimate the SD/axis length is < 0.7%.

For the fluctuations along the AP axis, there was no strong evidence for a low-frequency asymptote. This indicates that the correlation time was longer than 20 s, and the total estimated power was larger than that of the transverse fluctuations, in agreement with the filtered standard deviations (see above).

Dependence of spindle fluctuations on cortically generated forces

As noted earlier, towards the end of metaphase the posterior centrosome begins to move towards the posterior (Figure 1D, P_x), leading to a posterior displacement of the spindle center (Figure 1E, S_x). This posterior displacement sets up an asymmetric cell division, giving rise to the anterior AB and the posterior P1 daughter cells. Posterior spindle displacement is driven by dynein motors attached to cortex that pull on the astral microtubules (32-35). While the motor activity of cortical dyneins is not required for the initial centration of the spindle (e.g. (26)), the cortical dyneins have been proposed to contribute to the maintenance phase (36, 37). We therefore tested whether cortical dyneins contribute to the stability of centering during the maintenance phase.

To test the role of the cortical dynein in spindle stabilization, we partially knocked down, using RNAi, the proteins GPR-1 and GPR-2, which are in a G-protein pathway that controls the motor activity of the cortical dyneins (32). To exclude nonspecific effects of RNAi, we knocked down *lov-1*, a gene that has no role in cell division and found no difference from control. Simultaneous RNAi against both GPR-1 and GPR-2, abolished spindle oscillations (Figure 3A, S_y) and delayed asymmetric spindle positioning (Figure 3A, S_x), confirming the partial decrease in activity (26, 32, 38-40). Interestingly, the stability of centering increased. The fluctuations in the frequency range 0.1 to 1 Hz decreased by 19 ± 5 % along the transverse axis ($p = 2 \times 10^{-4}$) and 46 ± 6 %

along the AP axis ($p = 7 \times 10^{-9}$) (Table 2). The power spectrum decreased relative to control at all frequencies (Figure 3C, black circles compared to the red line), with an integrated power of $11,500 \pm 3,600 \text{ nm}^2$, about 48 % of the wildtype power. This result shows that the high stability of centering does not require GPR-1/2 dependent pulling forces; indeed, the increase in stability following RNAi indicates that the pulling forces generated by the cortical dyneins have a destabilizing activity.

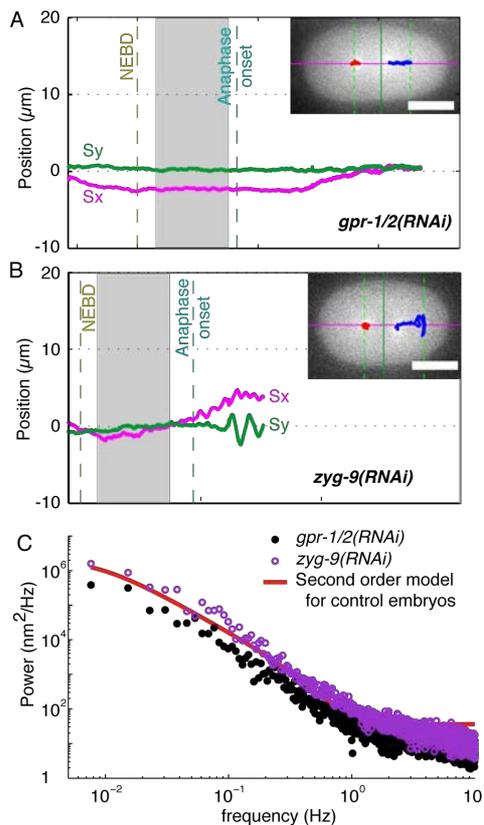


Figure 3: Spindle positioning in *gpr-1/2(RNAi)* and *zyg-9(RNAi)* embryos

A Time traces of spindle position in a *gpr-1/2(RNAi)* embryo along the AP-axis (magenta) and the transverse (green) axis showing the loss of transverse oscillations. **B** Time traces of spindle position in a *zyg-9(RNAi)* embryo along the AP-axis (magenta) and the transverse (green) axis. **C** Average power spectra of 8 *gpr-1/2(RNAi)* and 8 *zyg-9(RNAi)* embryos (black closed and purple open circles respectively). For comparison, the second-order model fit to the control embryos (From Figure 3) is shown in red. See also Supplementary Figure S1 for positioning in *lin-5(RNAi)* and *nmy-2(RNAi)* embryos.

The GPR-1 and GPR-2 proteins are functionally redundant as the mitotic spindles in the individual mutants undergo both posterior displacement and spindle oscillations (38). In order to study their individual roles in spindle stability, we crossed these mutants into the $\gamma\text{TUB}::\text{GFP}$ strain. The *gpr-1(ok2126)* mutant had normal posterior displacement and spindle oscillations, whereas the *gpr-2(ok1179)* mutant had normal posterior displacement but reduced spindle oscillations, indicating a weak phenotype. The transverse fluctuations in the frequency range 0.1 to 1 Hz increased by $35 \pm 9 \%$ ($p = 3 \times 10^{-4}$) in *gpr-1(ok2126)* and by $11 \pm 10 \%$ in *gpr-2(ok1179)*, while the AP fluctuations decreased by $6 \pm 9 \%$ in *gpr-1(ok2126)* and by $17 \pm 8 \%$ ($p = 0.05$) in *gpr-2(ok1179)* (Table 2). The power spectra were similar to controls (data not shown). Thus,

deleting the GPR proteins individually did not have a consistent effect on the fluctuations, increasing the transverse fluctuation but decreasing the axial fluctuations.

RNAi against the NUMA homolog LIN-5, which couples GPR-1/2 to dynein (41), also abolishes spindle oscillations and delays asymmetric spindle positioning (Supplementary Figure S1A). In addition, spindle orientation was delayed. The fluctuations of the transverse position of the spindle center increased by 2 ± 15 % along the transverse axis and decreased by 34 ± 9 % along the AP axis ($p = 0.001$) in the frequency range 0.1 to 1 Hz (Table 2). The power spectrum of the transverse fluctuations decreased slightly (Supplementary Figure S1A). This provides additional evidence that pulling forces are not necessary for the high stability of centering.

GPR-1/2 dependent pulling force generation at the cell periphery depends on the non-muscle myosin NMY-2 (42). We weakened the cortex by partial *nmy-2(RNAi)* and found that centering still occurred (Supplementary Figure S1B). This further argues against pulling forces being required for centering. However, unlike the GPR-1/2 knockdown, there was an increase in the fluctuations in the frequency range 0.1 to 1 Hz: the transverse fluctuations increased by 101 ± 22 % ($p = 5 \times 10^{-5}$) and the axial ones increased by 19 ± 13 % (Table 2). The increase in fluctuations in *nmy-2(RNAi)* shows that the cortex facilitates centering.

Dependence of spindle fluctuations on microtubule dynamics

The forces that maintain the spindle at the cell center depend on microtubules (15). To determine whether the stability of centering also depends on microtubules, we slowed down microtubule growth by a mild, though penetrant, knockdown of ZYG-9, the *C. elegans* member of the chTOG/XMAP 215/STU2 family of microtubule polymerases (43). *zyg-9(RNAi)* decreased the growth rate slightly, but significantly, from 0.73 ± 0.03 ($N = 52$ microtubules) to 0.65 ± 0.02 $\mu\text{m}/\text{s}$ ($N = 62$ microtubules, $p = 0.05$). There was also a small, but significant, decrease in the number of microtubules arriving at the cortex, 31% ($N = 4$ embryos, $p = 0.009$). Associated with this reduction in microtubule number and growth speed, the stability of spindle centering decreased: while the decrease is difficult to see in individual traces (e.g. Figure 3B), the average amplitude of the fluctuations in the frequency range 0.1 to 1 Hz increased, by 75 ± 28 % in the transverse axis ($p = 0.01$) and 15 ± 15 % ($p > 0.05$) in the AP axis, and the angular fluctuations increased 73 ± 70 % ($p > 0.05$) (Table 2). The power spectrum showed an increase over control at all frequencies (Figure 3C purple circles compared to the red line). Thus, slowing microtubule growth correlates with a decrease in stability of centering.

Discussion

Our main finding is that the centering of the mitotic spindle in the one-cell *C. elegans* embryo is highly precise and stable. The cell-to-cell variability (i.e. precision) in the position of the spindle

center transverse to the anterior-posterior axis, as measured by the standard-deviation, was 470 nm, corresponding to only 1.5% of the length of the short axis of the cell. The transverse fluctuations had an average standard deviation of 155 nm, corresponding to only 0.5% of the length of the short axis of the cell, indicating high stability. The precision and stability were less along the AP axis, but still very high. The high precision is similar to the 1% precision of the hunchback protein profile in the cycle-14 *Drosophila* embryo (44), one of the most precise developmental events studied (45). The high stability implies that the number of molecules involved in centering must be large. If molecules such as microtubules or motor proteins act independently and are of number n , then the relative fluctuation in the number is $1/\sqrt{n}$. Thus, for a precision and stability on the order of 1%, we require on the order of 10,000 centering molecules.

Comparison of results to centering models

We now discuss whether our findings are consistent with three centering models that have been discussed in the literature (Figure 4) (46, 47).

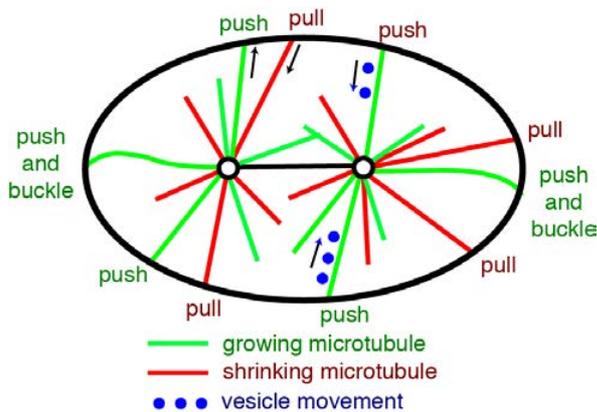


Figure 4: Models of centering

Diagram of a one-cell embryo showing microtubules growing from (green) and shrinking to (red) the centrosomes (circles). If a microtubule continues to grow when it contacts the cortex

(the inside of the ellipse) then it will push. If the centrosome is closer to one side, the microtubules on that side will spend less time growing and shrinking (because they do not have to go as far) and so will spend a larger fraction of time pushing: this leads to a centering force. If a microtubule shrinks while still in contact with the cortex, then it will pull. Pulling is often destabilizing, though under some circumstances it can lead to centering. If vesicles are carried by motors towards the centrosome, then the drag force on the vesicle will lead to a reactive force on the centrosome and spindle: if the spindle is displaced there will be a net force pulling the centrosome towards the center. Buckling microtubules are shown at the ends: the left one cannot slide on the cortex; the right one can slide.

(i) Cortical pulling. Astral microtubules grow out to the cell periphery where they interact with cortical-anchored motors that generate pulling forces (48, 49). This cortical force generator activity, of which cytoplasmic dynein is an essential component, can be greatly reduced by RNAi against *gpr-1/2* and other proteins that define a regulatory pathway (26, 32, 50). When these proteins are knocked down, the spindle still centers, showing that this pathway is not essential for the initial establishment of centering. Our results show that the cortical force generators are not necessary for the high stability of centering during the maintenance phase and indeed reducing force-generator activity leads to an increase in stability. These findings are consistent

with a recent study showing that knocking down GPR-1/2 increases the force associated with centering (15). Together, these results and ours suggest that the cortical force generators have an anti-centering activity. Such anti-centering activity is expected because the closer the centrosome to the cortex, the larger the net pulling force (25). Thus, cortical pulling does not stabilize centering.

(ii) Cytoplasmic pulling. Membrane-bound organelles move along the astral microtubules towards the centrosomes. The viscous forces acting on the organelles lead to a reactive force that moves the spindle towards the moving organelles (8, 9, 51). If the spindle is displaced from the cell center, the astral microtubules will be longer on one side than the other, and the reactive force will tend to move the spindle back to the center (9, 10, 30, 52). Thus, cytoplasmic pulling forces are centering.

The cytoplasmic pulling model accords with most our observations. The model relies on hydrodynamic forces generated by vesicle movement. Given that there are many thousands of microtubules per centrosome (see below) and that several vesicles can potentially move on each microtubule (9, 53), the number of moving vesicles may be large enough to attain the high observed stability. In addition, given that movement of the centrosome entails a re-equilibration of the distribution of microtubules, and that this is likely to take on the order of the times to grow to and shrink from the cortex (on the order of 20 s each way, see next paragraph), the correlation time of the fluctuations is also consistent with cytoplasmic pulling. The cytoplasmic pulling model is not readily consistent with the *nmy-2* RNAi because centering by this mechanism is not expected to be influenced by activity at the cortex. However, an indirect effect of the cortex on vesicle transport could affect centering. Thus, our data do not rule out the cortical pulling model.

(iii) Cortical pushing. There are two lines of evidence that microtubules continue to grow after contact with the cortex (and therefore generate pushing forces): (i) *in vivo*, EB1, a marker for microtubule growth, continues to bind to microtubule ends after they contact the cortex (23). (ii) *in vitro*, microtubules fixed at one end buckle when the other end makes contact with a solid surface (24), indicating that growth continues and that compressive (pushing) forces are generated. Astral microtubules will spend a larger fraction of their time pushing on the side closer to the cortex, because the microtubules spend less time growing to and shrinking from the cortex. This leads to a force imbalance that tends to return the spindle to the center of the cell (25). Thus cortical pushing forces lead to centering.

Microtubule pushing is consistent with several properties of centering. First, it accords with the small forces associated with spindle centering, ~ 16 pN per $1 \mu\text{m}$ displacement from the cell center (15). We note that the centering stiffness, $16 \text{ pN}/\mu\text{m}$, implies that the Brownian motion is only 16 nm (standard deviation over the full bandwidth of the fluctuations), which is about 10-fold smaller than the estimated fluctuation in wild-type cells of 155 nm. Second, pushing accords with the greater stability along the shorter transverse axis than along the longer AP axis (Table 1): the fluctuations are expected to be smaller in smaller cells because the growth

and shrinkage times of microtubules from centrosome to cortex are shorter (25). Third, the decrease in stability following *nmy-2* RNAi is consistent with a cortical mechanism such as pushing, though, as pointed out before, the effect of *nmy-2* knockdown may be indirect. Fourth, pushing is known to center and orient the mitotic spindle in other cells, such as fission yeast (54, 55). It has, however, been argued that in large metazoan cells, such as those in the *C. elegans* zygote, the microtubules are likely to buckle (two examples of buckling microtubules are depicted in Figure 4) and that the associated reduction in pushing force will make pushing an inefficient centering mechanism (46); we address this below. Thus, several observations support the pushing model.

One observation that is difficult to reconcile with the pushing model is that the high stability of centering appears to be at odds with the comparatively small number of pushing microtubules. Even though there are at least 2000 microtubules per spindle pole (56), the fraction that are in contact with the cortex at any one time is low because the interaction with the cortex is transient. If there are M microtubules on each side of the spindle and they are pushing (without buckling) for a fraction p_0 of the time, then the cortical pushing model predicts that the SD of the fluctuations divided by the cell diameter is $\approx 1/(2\sqrt{Mp_0})$ (assuming p_0 is small as is the case because the pushing times are much shorter than the growing and shrinking times, see Materials and Methods and (25)). We estimate from data obtained by imaging microtubule ends at the cortex *en face* ((15), Supplementary Figure 10B and using the surface area in Supplementary Figure 8E) that during metaphase, the total number of microtubule ends marked with EB1 interacting over the entire cortex at any one time, Mp_0 , is 236 (only scoring microtubules ends with interaction times >0.4 s). The interaction time distribution was exponential with a time constant of 0.7 s (the average of the scored times was 0.99 s). Correcting for missed interactions (i.e. those shorter than 0.4 s), we estimate the number of cortex-interacting microtubules to be 418. This number is similar to that inferred from (23) and our own independent measurements obtained by SR. Using this value, the cortical pushing model predicts that the standard deviation of the fluctuations divided by centrosome-cortex distance is 2.4%. This is not consistent with the measured value of 0.5% and the 95% confidence bound of 0.7% (and about 25% less in GPR1/2 RNAi cells). Thus, the number of pushing microtubules appears to be too small to account for the high stability.

However, if the microtubules buckle, as expected based on *in vitro* experiments (57, 58), then the stability is expected to increase (not decrease as had been assumed (45)). This is because of the length-dependence of buckling: the microtubules on the shorter side reach a larger force before they buckle, leading to stronger centering. In this case (25), the relative stability is increased approximately three-fold to $\approx 1/(6\sqrt{Mp_0}) \approx 0.8\%$. The key point here is that the relative stability is independent of the magnitude of the pushing force; this is because positional fluctuations due to thermal forces are very small, given the stiffness of the centering apparatus (15). For this reason, the diminution of pushing forces by buckling does not degrade stability, as had been thought. Thus, the measured stability is close to, though a little smaller, than the stability predicted by the cortical pushing model.

Microtubule buckling also accounts for the measured time constant of centering. The time constant arises from the re-equilibration of the microtubule array and depends on the time that it takes for the microtubule to grow out from the centrosome and shrink back from the cortex. In the case of buckling, the time constant is expected to be $\tau \approx \frac{1}{3}(\tau^+ + \tau^-) \approx 16$ s (25), where the growth and shrinkage times are respectively $\tau^+ = 20.5$ s and $\tau^- = 17.9$ s, assuming a distance of 15 μm from the nucleation site in the centrosome to the cortex and growth rate of 0.73 $\mu\text{m/s}$ (43) and a shrinkage rate of 0.84 $\mu\text{m/s}$ (23). The time constant is on the order of the time that it takes for a microtubule to grow from the centrosome to the cortex and shrink back again. The predicted time constant is consistent with the measured time constant of 14.5 ± 3.8 s for the Lorentzian model. In the absence of buckling, the time constant is expected to be more than ten times longer, which is inconsistent with the data (25). Thus, the pushing model accords with the data provided that the microtubules buckle. As an aside, the data in the last few paragraphs can be used to estimate the total number of astral microtubules in a cell. The fraction of the time microtubules were observed at the cortex was $0.99/(20.5 + 17.9 + 0.99) = 0.025$. Assuming that there are no catastrophes or rescues in the cytoplasm, we can estimate that the total number of astral microtubules is $\approx 9,000$ ($236/0.025$). This is about twice as high as a lower estimate of total microtubule number of 4000 based on light and electron microscopy (56).

Thus, buckling can account for the measured stability. It is important to point out, however, that buckling has only been observed during anaphase when the spindle oscillates (23, 43). In this case, the force that drives buckling may originate from the cortical dyneins that drive the oscillations (26). Buckling has not been observed during the quiescent maintenance phase, and thus stabilization by buckling remains hypothetical.

The kinetics of centering

Our results on the kinetics of spindle fluctuations are in general agreement with the magnetic tweezer experiments of (15). They found that response to force, the spindle displayed viscoelastic behavior with a spring constant of $\kappa = 16$ pN/ μm and a drag coefficient of $\gamma = 130$ pN·s/ μm . The time constant, $\gamma/\kappa \approx 8$ s, is within a factor of two of our correlation time of 15 ± 4 s. The uncertainty in the correlation time is large because the total maintenance phase is less than ten times longer than the correlation time; for this reason, the difference between the correlation time and the time constant measure in the force experiments is not significant.

A final discussion point is our finding that the Lorentzian model did not provide a good fit to the power spectra. A discrepancy was observed in the mid-frequency range between 0.1 and 1 Hz where the power decreased more rapidly with increasing frequency than predicted. The more rapid decrease implies that the autocorrelation function is not a single exponential. The good fit using a second-order model indicates that the autocorrelation is well fit with two exponentials. It is reasonable that the longer-time-constant exponential corresponds to the re-equilibration of the microtubule array due to growth and shrinkage, as is the case for the Lorentzian. We are unsure

what the second, shorter time constant corresponds to. One possibility is that it corresponds to the active process that drives oscillations: the active process is expected to have two time constants and to be present even before the oscillation threshold is reached (26). Other possible explanations for the second time constant include microtubule buckling, which happens on a fast time-scale (59), or delays associated with cortical catastrophe. Mixed pushing-pulling models have also been proposed (37, 60), and these may lead to second-order kinetics. Further work will be required to test these possibilities.

Conclusion

Using high-resolution tracking and Fourier analysis of spindle trajectories, we found that the accuracy, precision and stability of spindle positioning during metaphase of mitosis of the one-cell embryo of *C. elegans* is very high. The maintenance of spindle position during metaphase could not be accounted for by microtubule pulling by cortical motor because depletion of the cortical pulling force generators resulted in improved, not diminished, centering. Of other possible centering mechanisms, microtubule pushing against the cortex, taking advantage of buckling to create additional stabilizing feedback, accounts for the high stability of centering, though other models, such as cytoplasmic pulling cannot be ruled out by our data.

Author contributions

JP, SR, AAH and JH designed research; JP, SR, ZA, BM, SP and SG-C performed research; JP and JH analyzed data; JP and JH wrote the paper.

Acknowledgements

The authors thank Dr C. Kozlowski & Dr F. Nedelec for providing their landing assay algorithm, Drs C. Brangwynne, H. Bouvrais, L. Chesneau & Y. Le Cunff for comments on the manuscript and Drs H. Fantana, V. Bormuth, G. Greenan & E. Schäffer for stimulating discussions. J.P. was supported by the Human Frontier Science Program Organization. The PécrauxLab was funded by the CNRS/INSERM and “Ligue Nationale Contre le Cancer, LNCC” (ATIP/Avenir) and by the “Région Bretagne” (grant AniDyn). B.M. was supported by a LNCC PhD fellowship. JH was supported by the Max Planck Society and Yale University. We thank an anonymous reviewer of an earlier draft of this manuscript for detailed criticisms which led to a substantial improvement in the analysis of the data.

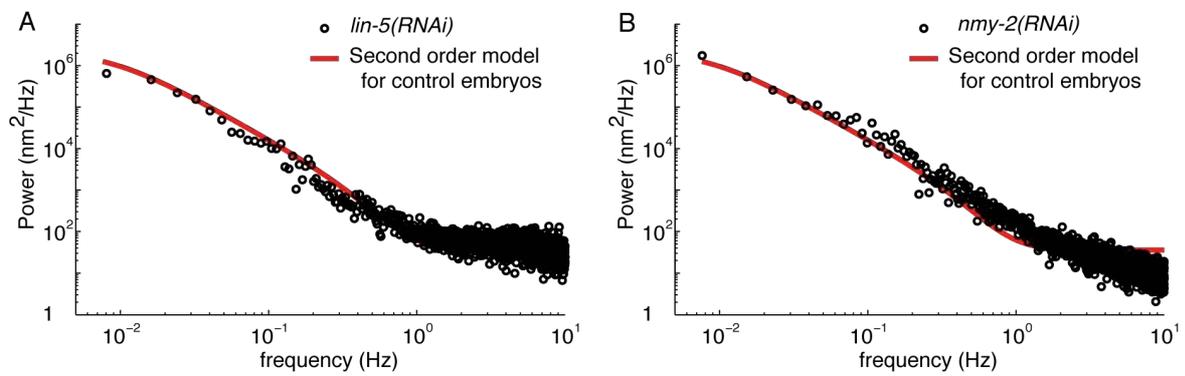


Figure S1, related to Figure 3: Spindle positioning in *lin-5(RNAi)* and *nmy-2(RNAi)* embryos

A Average power spectra of the transverse spindle position for six *lin-5(RNAi)* embryos (black open circles). For comparison, the second-order model fit to the control embryos (From Figure 2) is shown in red. **B** Average power spectra of the transverse spindle position for seven *nmy-2(RNAi)* embryos (black open circles). For comparison, the second-order model fit to the control embryos (From Figure 2) is shown in red.

References

1. Glotzer, M. 2004. Cleavage furrow positioning. *J Cell Biol* 164:347-351.
2. Galli, M., and S. van den Heuvel. 2008. Determination of the cleavage plane in early *C. elegans* embryos. *Annu Rev Genet* 42:389-411.
3. Imoto, Y., Y. Yoshida, F. Yagisawa, H. Kuroiwa, and T. Kuroiwa. 2011. The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *Journal of electron microscopy* 60 Suppl 1:S117-136.
4. Shorter, J., and G. Warren. 2002. Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:379-420.
5. Weisman, L. S. 2006. Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:243-252.
6. Gillies, T. E., and C. Cabernard. 2011. Cell division orientation in animals. *Curr Biol* 21:R599-609.
7. Morin, X., and Y. Bellaiche. 2011. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 21:102-119.
8. Hamaguchi, M. S., and Y. Hiramoto. 1986. Analysis of the role of astral rays in pronuclear migration in sand dollar eggs by the coldemid-UV method. *Development Growth & Differentiation* 28:143-156.
9. Kimura, K., and A. Kimura. 2011. Intracellular organelles mediate cytoplasmic pulling force for centrosome centration in the *Caenorhabditis elegans* early embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:137-142.
10. Tanimoto, H., A. Kimura, and N. Minc. 2016. Shape-motion relationships of centering microtubule asters. *J Cell Biol* 212:777-787.
11. Oegema, K., and A. A. Hyman. 2006. Cell division. *WormBook*:1-40.
12. McCarthy Campbell, E. K., A. D. Werts, and B. Goldstein. 2009. A cell cycle timer for asymmetric spindle positioning. *PLoS Biol* 7:e1000088.
13. Sigworth, F. J. 1980. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Physiol* 307:97-129.
14. Dumont, S., and T. J. Mitchison. 2009. Force and length in the mitotic spindle. *Curr Biol* 19:R749-761.
15. Garzon-Coral, C., H. A. Fantana, and J. Howard. 2016. A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis. *Science* 352:1124-1127.
16. Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
17. Praitis, V., E. Casey, D. Collar, and J. Austin. 2001. Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157:1217-1226.
18. Timmons, L., and A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854.
19. Riddle, D. L. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
20. Portier, N., A. Audhya, P. S. Maddox, R. A. Green, A. Dammermann, A. Desai, and K. Oegema. 2007. A microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown. *Dev Cell* 12:515-529.

21. Press, W. H. 2002. Numerical recipes in C++ : the art of scientific computing. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York.
22. Norrelykke, S. F., and H. Flyvbjerg. 2010. Power spectrum analysis with least-squares fitting: amplitude bias and its elimination, with application to optical tweezers and atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum* 81:075103.
23. Kozłowski, C., M. Srayko, and F. Nedelec. 2007. Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell* 129:499-510.
24. Dogterom, M., and B. Yurke. 1997. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278:856-860.
25. Howard, J. 2006. Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules. *Phys Biol* 3:54-66.
26. Pecreaux, J., J. C. Roper, K. Kruse, F. Julicher, A. A. Hyman, S. W. Grill, and J. Howard. 2006. Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators. *Curr. Biol.* 16:2111-2122.
27. Pecreaux, J., C. Zimmer, and J. C. Olivo-Marin. 2006. Biophysical active contours for cell tracking I: Tension and bending. In 2006 IEEE International Conference on Image Processing, *Icip 2006, Proceedings, October 8-11 2006, Atlanta, GA, USA.* 1949-1952.
28. Burger, W., and M. Burge. 2009. Principles of digital image processing : core algorithms. Springer, London.
29. Ahringer, J. 2003. Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 15:73-81.
30. Kimura, A., and S. Onami. 2007. Local cortical pulling-force repression switches centrosomal centration and posterior displacement in *C. elegans*. *J Cell Biol* 179:1347-1354.
31. Rose, L. S., and K. Kemphues. 1998. The *let-99* gene is required for proper spindle orientation during cleavage of the *C. elegans* embryo. *Development* 125:1337-1346.
32. Grill, S. W., J. Howard, E. Schaffer, E. H. Stelzer, and A. A. Hyman. 2003. The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301:518-521.
33. Labbe, J. C., E. K. McCarthy, and B. Goldstein. 2004. The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *J Cell Biol* 167:245-256.
34. Couwenbergs, C., J. C. Labbe, M. Goulding, T. Marty, B. Bowerman, and M. Gotta. 2007. Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *J Cell Biol* 179:15-22.
35. Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., and Gonczy, P. 2007. Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* 9 1294-1302.
36. Grill, S. W., and A. A. Hyman. 2005. Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev Cell* 8:461-465.
37. Laan, L., N. Pavin, J. Husson, G. Romet-Lemonne, M. van Duijn, M. P. Lopez, R. D. Vale, F. Julicher, S. L. Reck-Peterson, and M. Dogterom. 2012. Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell* 148:502-514.

38. Colombo, K., S. W. Grill, R. J. Kimple, F. S. Willard, D. P. Siderovski, and P. Gonczy. 2003. Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300:1957-1961.
39. Gotta, M., Y. Dong, Y. K. Peterson, S. M. Lanier, and J. Ahringer. 2003. Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr Biol* 13:1029-1037.
40. Srinivasan, D. G., R. M. Fisk, H. Xu, and S. van den Heuvel. 2003. A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev* 17:1225-1239.
41. Gonczy, P. 2008. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:355-366.
42. Redemann, S., J. Pecreaux, N. W. Goehring, K. Khairy, E. H. Stelzer, A. A. Hyman, and J. Howard. 2010. Membrane invaginations reveal cortical sites that pull on mitotic spindles in one-cell *C. elegans* embryos. *PLoS ONE* 5.
43. Srayko, M., A. Kaya, J. Stamford, and A. A. Hyman. 2005. Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell* 9:223-236.
44. Houchmandzadeh, B., E. Wieschaus, and S. Leibler. 2002. Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 415:798-802.
45. Tamari, Z., and N. Barkai. 2012. Improved readout precision of the Bicoid morphogen gradient by early decoding. *J Biol Phys* 38:317-329.
46. Dogterom, M., J. W. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne, and M. E. Janson. 2005. Force generation by dynamic microtubules. *Curr Opin Cell Biol* 17:67-74.
47. Wuhr, M., S. Dumont, A. C. Groen, D. J. Needleman, and T. J. Mitchison. 2009. How does a millimeter-sized cell find its center? *Cell Cycle* 8.
48. Hyman, A. A., and J. G. White. 1987. Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 105:2123-2135.
49. Grill, S. W., P. Gonczy, E. H. Stelzer, and A. A. Hyman. 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409:630-633.
50. Gotta, M., and J. Ahringer. 2001. Axis determination in *C. elegans*: initiating and transducing polarity. *Curr Opin Genet Dev* 11:367-373.
51. Wuhr, M., E. S. Tan, S. K. Parker, H. W. Detrich, and T. J. Mitchison. 2010. A model for cleavage plane determination in early amphibian and fish embryos. *Curr Biol* 20:2040-2045.
52. Kimura, A., and S. Onami. 2005. Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. *Dev Cell* 8:765-775.
53. Andrews, R., and J. Ahringer. 2007. Asymmetry of early endosome distribution in *C. elegans* embryos. *PLoS ONE* 2:e493.
54. Tolic-Norrelykke, I. M. 2008. Push-me-pull-you: how microtubules organize the cell interior. *Eur Biophys J* 37:1271-1278.
55. Minc, N., D. Burgess, and F. Chang. 2011. Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell* 144:414-426.

56. Muller-Reichert, T., G. Greenan, E. O'Toole, and M. Srayko. 2010. The elegans of spindle assembly. *Cell Mol Life Sci* 67:2195-2213.
57. Dogterom, M., and B. Yurke. 1998. Microtubule dynamics and the positioning of microtubule organizing centers. *Physical Review Letters* 81:485-488.
58. Janson, M. E., and M. Dogterom. 2004. A bending mode analysis for growing microtubules: Evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophysical Journal* 87:2723-2736.
59. Howard, J. 2001. *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.
60. Ma, R., L. Laan, M. Dogterom, N. Pavin, and F. Jülicher. 2014. General theory for the mechanics of confined microtubule asters. *New J Phys* 16:013018.

Références bibliographiques

- Addison, P. (2002). *The Illustrated Wavelet Transform Handbook: Introductory Theory and Applications in Science, Engineering, Medicine and Finance*. 56
- Akhmanova, A. and Hoogenraad, C. C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol*, 17(1):47–54. 23
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4):309–22. 24
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. U. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 8, 23
- Albertson, D. G. (1984). Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Dev Biol*, 101(1):61–72. 26
- Berg-Sorensen, K. and Flyvbjerg, H. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3):594–612. 71, 76
- Berg-Sorensen, K., Peterman, E. J. G., Weber, T., Schmidt, C. F., and Flyvbjerg, H. (2006). Power spectrum analysis for optical tweezers. ii: Laser wavelength dependence of parasitic filtering, and how to achieve high bandwidth. *Review of Scientific Instruments*, 77(6):063106–10. 37
- Betschinger, J. and Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in drosophila, c. elegans and vertebrates. *Curr Biol*, 14(16):R674–85. 11
- Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 14(1):25–34. 21
- Bouvrais, H., Chesnau, L., Riche, S., Argoul, F., Zouak, M., Arneodo, A., Delattre, M., and Pecreaux, J. (in prep). Space and time regulation of the spindle positioning in one-cell embryo of c. elegans. 145
- Braun, M., Drummond, D. R., Cross, R. A., and McAinsh, A. D. (2009). The kinesin-14 klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an atp-dependent sorting mechanism. *Nat Cell Biol*, 11(6):724–30. 25
- Brenner, S. (1974). The genetics of caenorhabditis elegans. *Genetics*, 77(1):71–94. 14, 149
- Brugues, J. and Needleman, D. (2014). Physical basis of spindle self-organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(52):18496–500. 32, 33, 142
- Brunet, F. (2010). *Contributions to Parametric Image Registration and 3D Surface Reconstruction*. Thesis. 80

- Buttkus, B. (2000). *Spectral Analysis and Filter Theory in Applied Geophysics: With 23 Tables*. Springer Berlin Heidelberg. 38
- Cassimeris, L., Gard, D., Tran, P. T., and Erickson, H. P. (2001). Xmap215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *J Cell Sci*, 114(Pt 16):3025–33. 70
- Castanon, I. and Gonzalez-Gaitan, M. (2011). Integrating levels of complexity: a trend in developmental biology. *Curr Opin Cell Biol*, 23(6):647–9. 13
- Chalfie, M. (1982). Microtubule structure in caenorhabditis elegans neurons. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 46 Pt 1:255–61. 22
- Cheeseman, I. M. and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):33–46. 10
- Cheeseman, I. M., MacLeod, I., Yates, J. R., r., Oegema, K., and Desai, A. (2005). The cenp-f-like proteins hcp-1 and hcp-2 target clasp to kinetochores to mediate chromosome segregation. *Curr Biol*, 15(8):771–7. 106, 108, 118, 119
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrossi, F., and Salmon, E. D. (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*, 153(3):517–27. 28
- Civelekoglu-Scholey, G. and Scholey, J. M. (2010). Mitotic force generators and chromosome segregation. *Cell Mol Life Sci*, 67(13):2231–50. 68
- Cole, D. G., Saxton, W. M., Sheehan, K. B., and Scholey, J. M. (1994). A slow homotetrameric kinesin-related motor protein purified from drosophila embryos. *J Biol Chem*, 269(37). 25
- Connolly, A. A., Sugioka, K., Chuang, C. H., Lowry, J. B., and Bowerman, B. (2015). Klp-7 acts through the ndc80 complex to limit pole number in c. elegans oocyte meiotic spindle assembly. *J Cell Bio*, 210(6):917–32. 25
- Consortium (1998). Genome sequence of the nematode c. elegans: A platform for investigating biology. *Science*, 282(5396):2012–2018. 14
- Cooley, J. W. and Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *Mathematics of computation*, 19(90):297–301 39
- Courthoux, T., Gay, G., Gachet, Y., and Tournier, S. (2009). Ase1/prc1-dependent spindle elongation corrects merotelically during anaphase in fission yeast. *J Cell Biol*, 187(3):399–412. 20, 26, 29, 130, 139
- Cowan, C. R. and Hyman, A. A. (2007). Acto-myosin reorganization and par polarity in c. elegans. *Development*, 134(6):1035–43. 16
- Daniels, B. R., Masi, B. C., and Wirtz, D. (2006). Probing single-cell micromechanics in vivo: the microrheology of c. elegans developing embryos. *Biophys J*, 90(12):4712–9. 54
- Daubree, A. (1879). *tudes synthtiques de gologie exprimentale*. Dunod. 41
- Decker, M., Jaensch, S., Pozniakovsky, A., Zinke, A., O’Connell, K. F., Zachariae, W., Myers, E., and Hyman, A. A. (2011). Limiting amounts of centrosome material set centrosome size in c. elegans embryos. *Curr Biol*, 21(15):1259–67. 68, 91
- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:83–117. 23

- Dumont, J. and Desai, A. (2012). Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends in Cell Biology*, 22(5):241–249. 106
- Dumont, J., Oegema, K., and Desai, A. (2010). A kinetochore-independent mechanism drives anaphase chromosome separation during acentrosomal meiosis. *Nat Cell Biol*, 12(9):894–901. 26
- Dumont, S. (2011). Chromosome segregation: spindle mechanics come to life. *Curr Biol*, 21(18):R688–90. 65
- Espiritu, E. B., Krueger, L. E., Ye, A., and Rose, L. S. (2012). Clasps function redundantly to regulate astral microtubules in the *c. elegans* embryo. *Dev Biol*, 368(2):242–54. 26, 106, 118, 119
- Fantana, H. A. (2011). *Mechanics of spindle centering in Caenorhabditis elegans*. thesis. 54
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, volume Leipzig. FCW Vogel. 7, 9
- Fourier, J. B. J. (1822). *Théorie analytique de la chaleur*. Chez Firmin Didot, père et fils. 39
- Francois, N. and Dietrich, F. (2007). Collective langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers. *New Journal of Physics*, 9(11):427. 30
- 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. *Dev Cell*, 17(2):257–67. 26
- Gabor, D. (1946). *Theory of communication*. Institution of Electrical Engineering. 39
- Gadde, S. and Heald, R. (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Current Biology*, 14(18):R797–R805. 28
- Garzon-Coral, C., Fantana, H. A., and Howard, J. (2016). A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis. *Science*, 352(6289):1124–1127. 32
- Gillies, T. E. and Cabernard, C. (2011). Cell division orientation in animals. *Curr Biol*, 21(15):R599–609. 11, 13
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120(4):923–34. 37, 66
- Goehring, N. W. and Grill, S. W. (2013). Cell polarity: mechanochemical patterning. *Trends Cell Biol*, 23(2):72–80. 16
- Gonczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5):355–66. 12, 125
- Gonczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A. A. (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of mtoc positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol*, 147(1):135–50. 26
- Grill, S. W., Gonczy, P., Stelzer, E. H., and Hyman, A. A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*, 409(6820):630–3. 16, 108
- Grill, S. W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E. H., and Hyman, A. A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science*, 301(5632):518–21. 16, 18, 27, 53

- Grossmann, A. and Morlet, J. (1984). Decomposition of hardy functions into square integrable wavelets of constant shape. *SIAM Journal on Mathematical Analysis*, 15(4):723–736. 40
- Hannak, E., Oegema, K., Kirkham, M., Gonczy, P., Habermann, B., and Hyman, A. A. (2002). The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *caenorhabditis elegans* is gamma-tubulin dependent. *J Cell Biol*, 157(4):591–602. 91
- Harris, F. J. (1978). On the use of windows for harmonic analysis with the discrete fourier transform. *Proceedings of the IEEE*, 66(1):51–83. 60
- Holy, T. E. and Leibler, S. (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5682–5. 27
- Horvitz, H. R. and Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two bs or not two bs, that is the question. *Cell*, 68(2):237–55. 11, 12
- Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Publishers. 53, 69
- Howard, J. (2006). Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules. *Phys Biol*, 3(1):54–66. 53, 69, 70, 122, 123
- Hyman, A. A. (1989). Centrosome movement in the early divisions of *caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *J Cell Biol*, 109(3):1185–93. 26, 125
- Itabashi, T., Takagi, J., Shimamoto, Y., Onoe, H., Kuwana, K., Shimoyama, I., Gaetz, J., Kapoor, T. M., and Ishiwata, S. (2009). Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle. *Nat Methods*, 6(2):167–72. 31, 51
- Kashina, A. S., Scholey, J. M., Leszyk, J. D., and Saxton, W. M. (1996). An essential bipolar mitotic motor. *Nature*, 384(6606):225. 25
- Kay, S. (1988). *Modern Spectral Estimation: Theory and Application/Book and Disk*. PTR Prentice Hall. 39
- Kemp, C. A., Kopish, K. R., Zipperlen, P., Ahringer, J., and O’Connell, K. F. (2004). Centrosome maturation and duplication in *c. elegans* require the coiled-coil protein *spd-2*. *Developmental Cell*, 6(4):511–523. 91
- Kemphues, K. J., Wolf, N., Wood, W. B., and Hirsh, D. (1986). Two loci required for cytoplasmic organization in early embryos of *caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 113(2):449–60. 26
- Kerssemakers, J. W. J., Laura Munteanu, E., Laan, L., Noetzel, T. L., Janson, M. E., and Dogterom, M. (2006). Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*, 442(7103):709–712. 53
- Khan, M. L., Gogonea, C. B., Siddiqui, Z. K., Ali, M. Y., Kikuno, R., Nishikawa, K., and Siddiqui, S. S. (1997). Molecular cloning and expression of the *caenorhabditis elegans* *klp-3*, an ortholog of c terminus motor kinesins *kar3* and *ncd*. *J Mol Biol*, 270(5):627–39. 25
- Khintchine, A. (1934). Korrelationstheorie der stationären stochastischen prozesse. *Mathematische Annalen*, 109(1):604–615. 58
- Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986a). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45(3):329–42. 16, 139
- Kirschner, M. W. and Mitchison, T. (1986b). Microtubule dynamics. *Nature*, 324(6098):621. 23, 27, 139

- Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132(4):583–97. 12
- Konig, K., Riemann, I., and Fritzsche, W. (2001). Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. *Opt Lett*, 26(11):819–21. 108
- Kozlowski, C., Srayko, M., and Nedelec, F. (2007). Cortical microtubule contacts position the spindle in *c. elegans* embryos. *Cell*, 129(3):499–510. 23, 52, 53
- Kubo, R., Toda, M., and Hashitsume, N. (2012). *Statistical physics II: nonequilibrium statistical mechanics*, volume 31 Springer Science Business Media. 43, 53, 58, 69
- Lanson, B. (1997). Decomposition of experimental x-ray diffraction patterns (profile fitting); a convenient way to study clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, 45(2):132–146. 62
- Leupold, U. (1957). [physiologic and genetic studies of adenine-dependant mutants of *schizosaccharomyces pombe*; a contribution to the problem of pseudoallele]. *Schweiz Z Pathol Bakteriolog*, 20(5):535–44. 18
- Loughlin, R., Riggs, B., and Heald, R. (2008). Snapshot: motor proteins in spindle assembly. *Cell*, 134(3):548–548 e1. 22
- Maia, A. F., Tanenbaum, M. E., Galli, M., Lelieveld, D., Egan, D. A., Gassmann, R., Sunkel, C. E., van den Heuvel, S., and Medema, R. H. (2015). Genome-wide rna screen for synthetic lethal interactions with the *c. elegans* kinesin-5 homolog *bnk-1*. *Sci Data*, 2:150020. 123
- Martin, P., Mehta, A. D., and Hudspeth, A. J. (2000). Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22):12026–12031. 36
- Maton, G., Edwards, F., Lacroix, B., Stefanutti, M., Laband, K., Lieury, T., Kim, T., Espeut, J., Canman, J. C., and Dumont, J. (2015). Kinetochore components are required for central spindle assembly. *Nat Cell Biol*, 17(5):697–705. 26, 114, 119, 122, 130, 144
- McIntosh, J. R. (1991). Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 56:613–9. 8, 139
- McIntosh, J. R. (2011). Mitosis futures: the past is prologue. *Mol Biol Cell*, 22(21):3933–5. 8
- Meraldi, P. and Nigg, E. A. (2002). The centrosome cycle. *FEBS Lett*, 521(1-3):9–13. 21
- Michalet, X. (2010). Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in isotropic medium. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 82(4 Pt 1):041914–041914. 55
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991):237–42. 21, 23, 139
- Morgan (2007). The cell cycle: Principles of control. *New Science Press*. 19
- Morrison, S. J. and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097):1068–74. 11
- Muller, M. J., Klumpp, S., and Lipowsky, R. (2008). Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(12):4609–14. 141
- Musacchio, A. and Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(10):731–41. 28

- Nadrowski, B., Martin, P., and Julicher, F. (2004). Active hair-bundle motility harnesses noise to operate near an optimum of mechanosensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(33):12195–200. 36, 69
- Nahaboo, W., Zouak, M., Askjaer, P., and Delattre, M. (2015). Chromatids segregate without centrosomes during *caenorhabditis elegans* mitosis in a ran- and clasp-dependent manner. *Mol Biol Cell*, 26(11):2020–9. 24, 106, 110, 118, 130, 143
- Needleman, D. and Brugues, J. (2014). Determining physical principles of subcellular organization. *Dev Cell*, 29(2):135–8. 145
- Needleman, D. J., Groen, A., Ohi, R., Maresca, T., Mirny, L., and Mitchison, T. (2010). Fast microtubule dynamics in meiotic spindles measured by single molecule imaging: evidence that the spindle environment does not stabilize microtubules. *Mol Biol Cell*, 21(2):323–33. 33
- Nelder, J. A. and Mead, R. (1965). A simplex method for function minimization. *The Computer Journal*, 7(4):308–313. 79
- Neumuller, R. A. and Knoblich, J. A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev*, 23(23):2675–99. 11
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., and Gonczy, P. (2007). Coupling of cortical dynein and g alpha proteins mediates spindle positioning in *caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*, 9(11):1294–302. 26, 125
- Nogales, E. (1999). A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*, 56(1-2):133–42. 22
- Norrelykke, S. F. and Flyvbjerg, H. (2010). Power spectrum analysis with least-squares fitting: amplitude bias and its elimination, with application to optical tweezers and atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum*, 81(7):075103. 65, 71, 74, 75, 76, 77
- Oegema, K. and Hyman, A. A. (2006). *Cell division*, volume 153. 14, 15, 16, 17, 91
- Olson, S. K., Greenan, G., Desai, A., Muller-Reichert, T., and Oegema, K. (2012). Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in *c. elegans*. *J Cell Biol*, 198(4):731–48. 109
- O’Toole, E. T., McDonald, K. L., Mantler, J., McIntosh, J. R., Hyman, A. A., and Muller-Reichert, T. (2003). Morphologically distinct microtubule ends in the mitotic centrosome of *caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 163(3):451–6. 16, 21, 69
- Park, D. H. and Rose, L. S. (2008). Dynamic localization of *lin-5* and *gpr-1/2* to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev Biol*, 315(1):42–54. 27
- 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*, 106(37):15708–15713. 30
- Pecreaux, J., Roper, J. C., Kruse, K., Julicher, 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. *Curr Biol*, 16(21):2111–22. 18, 27, 43, 52, 53, 67, 68, 125, 141, 143, 149
- Pecreaux, J. and Redemann, S., Alayan, Z., Mercat, B., Pastezeur, S., Garzon-Cora, I. C., A. Hyman, A., and Howard, J. (2016). The mitotic spindle in the one-cell *c. elegans* embryo is positioned with high precision and stability. 33, 35, 38, 53, 66, 68, 69, 122, 128

- Pelletier, L., Zl, N., Hannak, E., Cowan, C., Habermann, B., Ruer, M., Mller-Reichert, T., and Hyman, A. A. (2004). The *caenorhabditis elegans* centrosomal protein spd-2 is required for both pericentriolar material recruitment and centriole duplication. *Current Biology*, 14(10):863–873. 91
- Pesenti, M. E., Weir, J. R., and Musacchio, A. (2016). Progress in the structural and functional characterization of kinetochores. *Curr Opin Struct Biol*, 37:152–63. 28
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9):644–56. 9
- Portier, N., Audhya, A., Maddox, P. S., Green, R. A., Dammermann, A., Desai, A., and Oegema, K. (2007). A microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown. *Dev Cell*, 12(4):515–29. 16
- Powers, J., Rose, D. J., Saunders, A., Dunkelbarger, S., Strome, S., and Saxton, W. M. (2004). Loss of klp-19 polar ejection force causes misorientation and missegregation of holocentric chromosomes. *J Cell Biol*, 166(7):991–1001. 25
- Press, W. H. U. h. b. g. f. b. i. a. F. (2007). *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press. 59, 73
- Prost, J., Jülicher, F., and Joanny, J. F. (2015). Active gel physics. *Nature Physics*, 11(2):111–117. 33, 142, 145
- Rappaport, R. (1971). Cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol*, 31:169–213. 18
- Redemann, S., Baumgart, J., Lindow, N., Fuerthauer, S., Nazockdast, E., Kratz, A., Prohaska, S., Brugues, J., Shelley, M., and Mueller-Reichert, T. (2016). Kinetochores indirectly link chromosomes 2 and centrosomes in *c. elegans* mitosis. *bioRxiv*. 16, 20, 21
- Redemann, S., Pecreaux, J., Goehring, N. W., Khairy, K., Stelzer, E. H., Hyman, A. A., and Howard, J. (2010). Membrane invaginations reveal cortical sites that pull on mitotic spindles in one-cell *c. elegans* embryos. *PLoS One*, 5(8):e12301. 18, 127
- Rezaul, K., Gupta, D., Semenova, I., Ikeda, K., Kraikivski, P., Yu, J., Cowan, A., Zaliapin, I., and Rodionov, V. (2016). Engineered tug-of-war between kinesin and dynein controls direction of microtubule based transport in vivo. *Traffic*, 17(5):475–86. 141
- Riche, S., Zouak, M., Argoul, F., Arneodo, A., Pecreaux, J., and Delattre, M. (2013). Evolutionary comparisons reveal a positional switch for spindle pole oscillations in *caenorhabditis* embryos. *J Cell Biol*, 201(5):653–62. 27, 145
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., and Priess, J. R. (1997). *Introduction to C. elegans*. Cold Spring Harbor (NY), 2nd edition. 14, 15, 54
- Rodriguez-Garcia, R., Chesneau, L., Pinson, X., Roul, J., Tramier, M., and Pecreaux, J. (in prep). Dynamics of dynein intermediate chain (*dyci-1*) in the *c. elegans* zygote. 52
- Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). Two types of asymmetric divisions in the *drosophila* sensory organ precursor cell lineage. *Nat Cell Biol*, 3(1):58–67. 11
- Rosenbrock, H. (1963). Some general implicit processes for the numerical solution of differential equations. *The Computer Journal*, 5(4):329–330. 101

- Saunders, A. M., Powers, J., Strome, S., and Saxton, W. M. (2007). Kinesin-5 acts as a brake in anaphase spindle elongation. *Curr Biol*, 17(12):R453–4. 25, 122, 123
- Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M. V., Blanchoin, L., and They, M. (2015). Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater*, 14(11):1156–63. 37
- Schmid-Schönbein, G. W., Sung, K. L., Tözeren, H., Skalak, R., and Chien, S. (1981). Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophysical Journal*, 36(1):243–256. 93
- Schweisguth, F. (2004). Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol*, 14(3):R129–38. 12
- Selhuber-Unkel, C., Yde, P., Berg-Sorensen, K., and Oddershede, L. B. (2009). Variety in intracellular diffusion during the cell cycle. *Phys Biol*, 6(2):025015. 19
- Shampine, L. F. and Reichelt, M. W. (1997). The matlab ode suite. *SIAM journal on scientific computing*, 18(1):1–22. 101
- Shimamoto, Y., Maeda, Y., Ishiwata, S., Libchaber, A., and Kapoor, T. (2011). Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. *Cell*, 145(7):1062–1074. 31, 51, 113, 117, 118, 142
- Siddiqui, S. S. (2002). Metazoan motor models: kinesin superfamily in *c. elegans*. *Traffic*, 3(1):20–8. 25
- Srayko, M., Kaya, A., Stamford, J., and Hyman, A. A. (2005). Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early *c. elegans* embryo. *Dev Cell*, 9(2):223–36. 23, 25, 106
- Stear, J. H. and Roth, M. B. (2004). The *caenorhabditis elegans* kinetochore reorganizes at prometaphase and in response to checkpoint stimuli. *Mol Biol Cell*, 15(11):5187–96. 16
- Strome, S. and Wood, W. B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *c. elegans* embryos. *Cell*, 35(1):15–25. 16
- Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T. M., Shimamoto, Y., and Ishiwata, S. (2013). Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size. *Cell Rep*, 5(1):44–50. 31, 49, 51, 83, 92, 142
- Thompson, S. L., Bakhoun, S. F., and Compton, D. A. (2010). Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol*, 20(6):R285–95. 13, 28, 29
- Timmons, L. and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsrna. *Nature*, 395(6705):854. 149
- Tinevez, J.-Y., Dragavon, J., Baba-Aissa, L., Roux, P., Perret, E., Canivet, A., Galy, V., and Shorte, S. (2012). *Chapter fifteen - A Quantitative Method for Measuring Phototoxicity of a Live Cell Imaging Microscope*, volume Volume 506, pages 291–309. Academic Press. 54
- Verbrugghe, K. J. and White, J. G. (2004). Spd-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *c. elegans* embryos. *Curr Biol*, 14(19):1755–60. 24, 26, 108, 130
- Ward, J. J., Roque, H., Antony, C., and Nedelec, F. (2014). Mechanical design principles of a mitotic spindle. *Elife*, 4. 29, 142
- Wiener, N. (1930). Generalized harmonic analysis. *Acta Mathematica*, 55(1) 58
- Woelke, A. L., Murgueitio, M. S., and Preissner, R. (2010). Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology. *Clinical and Developmental Immunology*, 2010. 42

- Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J. M., and Mogilner, A. (2008). Reverse engineering of force integration during mitosis in the drosophila embryo. *Mol Syst Biol*, 4:195. 30, 33, 37, 52, 140
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritze, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874):871–80. 19

