



HAL
open science

Quels sont les signaux détectés par le point de contrôle du fuseau lors de la méiose dans l'ovocyte de souris ?

Antoine Vallot

► **To cite this version:**

Antoine Vallot. Quels sont les signaux détectés par le point de contrôle du fuseau lors de la méiose dans l'ovocyte de souris ?. Sciences agricoles. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066246 . tel-01692685

HAL Id: tel-01692685

<https://theses.hal.science/tel-01692685>

Submitted on 25 Jan 2018

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 de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire de Biologie du Développement Paris Seine UMR 7622 CNRS

Institut de Biologie Paris Seine (IBPS)

Equipe Mammalian Oocyte Meiosis MOM

Quels sont les signaux détectés par le point de contrôle du fuseau lors de la méiose dans l'ovocyte de souris ?

Par Antoine Vallot

Dirigée par Katja Wassmann et Eulalie Buffin

Présentée et soutenue publiquement le 8 septembre 2017

Devant un jury composé de :

Alexander McDougall	Directeur de recherche CNRS, Président du Jury
Simonetta Piatti	Directeur de recherche CNRS, Rapportrice
Julien Dumont	Directeur de Recherche CNRS, Rapporteur
Marie Emilie Terret	Chargée de recherche INSERM, Examinatrice
Roger Karess	Directeur de recherche CNRS, Examineur
Katja Wassmann	Directrice de recherche CNRS, Directrice de thèse
Eulalie Buffin	Maître de conférences UPMC, Co-Directrice de thèse



Résumé

Au cours de mon travail de doctorat, je me suis intéressé aux mécanismes qui contrôlent la séparation équitable du génome lors de la méiose. La méiose est la division des cellules germinales permettant la formation de gamètes haploïdes. Elle est constituée de deux divisions successives : Méiose I et Méiose II. En méiose I, les chromosomes homologues sont ségrégués, tandis que ce sont les chromatides sœurs qui sont ségrégués en méiose II. Le partage équitable des chromosomes en méiose I et en méiose II est essentiel pour former des gamètes avec le nombre correct de chromosomes afin d'obtenir une ploïdie normale de l'embryon après fécondation.

Il existe en méiose, comme en mitose, un contrôle de la ségrégation des chromosomes. Ce mécanisme, appelé point de contrôle du fuseau, surveille l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau : en cas d'attachement incorrect, l'anaphase est retardée ce qui permet d'éviter les aneuploïdies. En métaphase, l'attachement des chromosomes homologues aux deux pôles opposés du fuseau, génère une force de tension au niveau des kinétochores.

Mon travail de thèse a consisté à déterminer si cette tension exercée sur les chromosomes est un signal qui permet de satisfaire le point de contrôle du fuseau en méiose I dans l'ovocyte de souris. Lorsque la tension exercée sur les chromosomes homologues par les microtubules est diminuée par un traitement pharmacologique, la dégradation de la securine, qui marque l'entrée en anaphase, est retardée. Si le point de contrôle du fuseau est inhibé en absence de tension, l'anaphase n'est pas retardée. Ainsi, la tension est reconnue par le point de contrôle du fuseau.

De plus, nous avons étudié l'implication de la kinase Aurora B/C dans ce processus. Nous avons montré que cette kinase n'est pas requise pour la réponse du point de contrôle du fuseau aux chromosomes non attachés, mais qu'elle est essentielle à la réponse du point de contrôle du fuseau à la baisse de tension. Cette kinase est en effet essentielle à la correction des attachements sans tension, et permet à la cellule d'activer le point de contrôle du fuseau en déstabilisant ces attachements.

Dans un contexte où les erreurs de ségrégation en méiose sont très fréquentes chez la femme et augmentent drastiquement avec l'âge, nos travaux pourraient permettre d'identifier si ces mécanismes de contrôle sont diminués et moins efficaces avec l'âge chez la femme.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury, Alex McDougall, Simonetta Piatti, Julien Dumont, Marie Emilie Terret et Roger Karess pour me faire l'honneur d'avoir accepté sans hésitation d'évaluer mon travail de doctorat.

Je remercie Katja, pour m'avoir ouvert les portes de la recherche dans son laboratoire. J'ai toujours pu compter sur ton soutien même quand les manips ne marchaient pas, tu as su me mettre sur les bons rails. On écrit sa thèse une seule fois dans vie, et je suis très heureux d'avoir pu écrire une petite page de cette aventure scientifique dans un environnement très stimulant et qui laisse une grande liberté à chacun, même si l'ovocyte de souris est parfois tricky !

Je remercie Eulalie, la meilleure des maitres de conf' ! Merci de m'avoir déjà guidé dès le M1 (ça nous rajeunit pas...) et de m'avoir toujours fait confiance, de m'avoir aidé dans les manips et pour les longues séances de correction de ma thèse, je ne pouvais pas rêver mieux comme encadrante.

Merci aussi à Warif, de m'avoir supporté comme voisin de bureau, on était comme Sandra dirait des kinétochores frères d'un même homologue (ça commence déjà dans les remerciements !). On publiera un jour en Une de Picsou Magazine, c'est sûr !

Merci à Damien, pour son aide pendant les manips, les discussions aux souris (et pour m'avoir prêté son sucre pendant les moments de pénurie pendant la rédaction, très important !).

I'd like to thank all the members of the lab, Nora, and Elvira, for their kind help especially with the videomicroscope, and Yuliya and Leonor. Overall, they all contributed to make this lab a really pleasant place to work every day.

Je remercie aussi tous les doc-postdoc de l'institut, Margarita, Sara, Camille, Mafalda et tout le club des doc, mais aussi les labos voisins, Clément, Jorge (what else ?), Valéria, Aude et Bruno, toujours de bonne humeur.

Une petite pensée à tous les doctorant-e-s de Doc'Up, Clément, Charlotte, Félix, Aurélien, Marie, Romain, Claire, Pauline, Anthony et j'en passe (on est trop nombreux dans l'asso..). Votre dynamisme et votre passion sont une source d'inspiration sans borne pour moi. A Ludovica et Camille, pour les JED et pour les deux semaines de formation souris, j'espère que ça te sera utile finalement Ludovica.

Aux M1 BMC Ambre, Eléonore, Coralie, Caroline, Mathieu (Mr ma thèse en 180s !) et aux M2 ARN Margarita (encore !), Clémence, Nikiforos et Alex, j'attends de pied ferme votre soutenance !

Aux anciennes du labo, Sandra et Soraya, pour m'avoir montré « la voie », dommage que vous soyez parties si tôt du labo !

Je remercie Valentin, toujours partant pour un restau ! Et qui a supporté mon style particulier à la batterie pendant des années et Benjamin, qui a toujours eu le temps de refaire le monde autour d'un café, et qui se jette maintenant lui aussi dans une thèse. Les étudiants de L1 ont fait du parcours. Pleins

de souvenirs depuis un nombre immémorial d'année, merci de m'avoir toujours soutenu. A quand une soirée pizza devant l'intégrale de Die Hard ? (Ça date aussi... !)

Enfin, je voudrais remercier ma famille, et en particulier mon frère Guillaume et ma sœur Marie, de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) toutes ces années,

A Alizée, qui a toujours été à mes côtés, et qui a été très indulgente face à mes absences bien trop fréquentes. Si cette thèse a pu voir le jour, c'est grâce à ta bonne humeur, ta gentillesse et ton sourire, au quotidien, et je t'en suis infiniment reconnaissant. Je t'aime.

A mes parents, pour leur soutien sans faille, leur aide précieuse et pour avoir en toute circonstance cru en moi, je leur dédie ma thèse.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
APC/C	Anaphase Promoting Complex / Cyclosome
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bub	Budding Uninhibited by benomyl
BSA	Bovine Serum Albumine
CCAN	Constitutive Centromere Associated Network
CDC	Cell Division Cycle
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CENP	Centromeric Protein
CLIP-170	Cytoplasmic Linker Protein of 170kDa
CPC	Chromosomal Passenger Complex
CREST	Calcinosis – Raynaud’s phenomom – Esophageal dysfunction - Sclerodactyly - Telangiectasias
CSF	Cytostatic Factor
dbcAMP	dibutyryl cyclic AMP
DTT	DiThioThréitol
EB	End Binding
Emi	Early mitotic inhibitor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GDP	Guanosine Mono-Phosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
GV	Germinal Vesicle
GVBD	Germinal Vesicle BreakDown
INCENP	Inner Centromere Protein
Ip11	Increase in Ploidy 1
KMN	Kn1 – Mis12 – Ndc80
LH	Luteinizing Hormone
Mad	Mitotic arrest deficient
MAP	Microtubule Associated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCAK	Mitotic Centromere Associated Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
Mlh1	MutL Homolog 1
MPF	M phase Promoting Complex
Mps1	Monopolar spindle 1
MTOC	Microtubule Organizing Center
NEBD	Nuclear Enveloppe BreakDown
NuMa	Nuclear protein that associates with the Mitotic Apparatus
Pb	Paire de base
PBE	Polar Body Extrusion

PCM	Pericentriolar Material
PCR	Polymerase Chain Reaction
Phase G	Gap
Phase M	Mitose/Méiose
Phase S	Synthèse
PKA	Protéine Kinase A
Plk	Polo Like Kinase
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
RCC1	Regulator of Chromosome Condensation 1
Rec8	Recombination Protein 8
RZZ	Rod – Zw10 – Zwilch
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCF	Skp – Cullin – F-box
SCP3	Synaptonemal Complex Protein 3
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sgo	Shugoshin
STLC	S-Trityl-L-Cystéine
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZP3	Zona Pellucida 3

Sommaire

Remerciements	4
Liste des abréviations	6
Sommaire	8
Préambule	10
Est-ce que la tension est détectée dans l'ovocyte de souris en méiose I ?	10
Introduction	12
La logique du cycle cellulaire	13
1. Les principales étapes du cycle cellulaire	13
L'interphase	13
La mitose	14
2. Machinerie moléculaire du contrôle du cycle	15
Cyclines et kinases dépendantes des cyclines	15
Protéolyse médiée par les ubiquitines-ligases	16
Points de contrôles	17
3. La méiose, une division cellulaire spécialisée	18
La maturation de l'ovocyte chez les mammifères	20
1. Formation du stock d'ovocytes : l'ovogénèse	20
2. Arrêt en prophase I et reprise de la méiose	21
Mécanismes moléculaires de l'arrêt en prophase I	21
Reprise de la méiose	22
3. La méiose I	22
4. Méiose II	23
Les attachements kinétochore-microtubule et le fuseau	25
1. Les microtubules	25
Structure et dynamique des microtubules	25
Protéines associées aux microtubules (MAPs)	26
Agents pharmacologiques ciblant les microtubules	28
2. Assemblage du fuseau	28
Nucléation des microtubules du fuseau	29
Rôle organisateur des moteurs	29
Congressions des chromosomes	30
3. Le kinétochore	31
Spécification des centromères	31
Structure et Assemblage du kinétochore	32
4. Attachement des microtubules et tension aux kinétochores	33
5. Correction des erreurs d'attachement	35
Les différents types d'attachement en mitose et en méiose	35
Le complexe passager des chromosomes	36
Rôles d'Aurora B et C en méiose	37
Le point de contrôle du fuseau (SAC)	39
1. Transition métaphase-anaphase	39
2. Les protéines du SAC	40
3. Recrutement des protéines du SAC au kinétochore	41

4. Inhibition de l'APC/C ^{Cdc20}	43
5. Rôle controversé de Aurora B dans le SAC	44
6. Extinction du SAC	45
7. Le SAC en méiose	46
8. La tension satisfait-elle le SAC ?	48
Résultats	50
Article : Aurora B/C est requise pour la réponse du SAC à la baisse de tension aux bivalents, mais pas pour la réponse aux kinétochores non attachés	51
Discussion.....	86
Quel signal est détecté par le SAC dans l'ovocyte de souris ?.....	87
Bibliographie	96
Table des illustrations	121

PREAMBULE

Est-ce que la tension est détectée dans l'ovocyte de souris en méiose I ?

En méiose I, la ségrégation des chromosomes n'est pas aussi fidèle qu'en mitose, et des erreurs sont observées dans 1-2% des ovocytes de souris et plus de 20% des ovocytes humains^{1,2}. Une hypothèse attrayante est que la configuration des chromosomes en méiose I ne permet pas au SAC de reconnaître efficacement le manque de tension, ce qui expliquerait pourquoi le SAC en méiose paraît plus permissif qu'en mitose.

On sait que dans les ovocytes de souris, la présence de quelques univalents n'est pas détectée par le point de contrôle du fuseau. En effet des mutations dans des protéines essentielles pour la recombinaison comme Scyp3 ou Mlh1 empêche la formation de chiasma entre certains chromosomes homologues, et génère donc des chromosomes non appariés, qu'on appelle univalents. La présence de ces univalents n'arrêtent pas la méiose en métaphase même s'ils s'attachent de manière monopolaire au fuseau, sans génération de tension. Cependant, lorsque le nombre d'univalents est plus important, typiquement supérieur à trois univalents dans un ovocyte, il y a une activation du point de contrôle³⁻⁵.

Aussi, une étude montre que la perturbation du fuseau par un mutant de la protéine NuMa entraîne une baisse de la tension entre les bivalents mais n'activent pas le SAC⁶ malgré la présence de bivalents non alignés. Ces études suggèrent que la tension ne serait pas un paramètre reconnu par le SAC dans les ovocytes de souris, ce qui expliquerait en partie pourquoi la méiose dans les ovocytes de mammifères est sujette aux erreurs de ségrégation des chromosomes. Cependant, ces études n'expliquent pas pourquoi le SAC ne pourrait pas répondre aux défauts d'attachement, d'autant plus que le mécanisme de correction des erreurs existe chez la souris en méiose I.

En méiose, dans l'ovocyte de souris, l'étirement du kinétochore a été mesuré en méiose I et en méiose II, mais il semble que l'étirement est moindre pour les kinétochores en méiose I comparé à la méiose II⁷. Il n'est donc pas clair si le mécanisme responsable de la détection de la tension est fonctionnel en méiose I malgré la mono-orientation des kinétochore frères.

C'est pourquoi l'objectif de ma thèse a été de clarifier si le SAC est capable de répondre à la baisse de tension au niveau des kinétochores dans les ovocytes en méiose I.

INTRODUCTION

LA LOGIQUE DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire est défini comme l'ensemble des étapes ayant lieu entre deux divisions cellulaires successives⁸. C'est un processus fondamental et commun à toutes les cellules eucaryotes, composé de deux grands événements : la réplication des chromosomes d'une part et la division de la cellule d'autre part. La division cellulaire ou mitose, est l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle les chromosomes sont visibles et ségrègent équitablement au sein de deux cellules filles, tandis que les autres étapes du cycle constituent l'interphase. La mitose est le mode de division commun à toutes les cellules somatiques. Les cellules germinales, qui assurent la transmission de l'information génétique, sont formées par la méiose, qui après un seul cycle de réplication du génome, est constituée de deux ségrégations successives des chromosomes. Les gamètes ainsi formés n'héritent que d'une seule copie du génome et sont donc haploïdes. La fusion de deux gamètes à la fécondation formera un individu diploïde, permettant un brassage génétique à la génération suivante. Les erreurs de ségrégations des chromosomes lors de la mitose ou de la méiose conduisent à des aneuploïdies², c'est-à-dire un nombre incorrect de chromosomes. C'est pourquoi la ségrégation des chromosomes est un processus finement régulé.

1. Les principales étapes du cycle cellulaire

L'interphase

L'interphase comporte chez la plupart des cellules eucaryotes trois phases distinctes appelées G1, S, et G2. La première phase dite G1, (G pour Gap, "intervalle" en anglais) est une phase de croissance de la cellule, qui correspond à l'intervalle entre la division cellulaire précédente et la phase de synthèse de l'ADN. Pour reconstituer ses stocks de protéines, la cellule en G1 synthétise abondamment divers ARN nécessaires à la traduction⁹. C'est aussi et surtout une phase où l'intégration des différents paramètres environnementaux et cellulaires permet à la cellule de s'engager ou non de manière irréversible dans un nouveau cycle cellulaire. Cette décision résulte du franchissement du point "START" chez la levure ou point de restriction pour les cellules animale¹⁰.

En phase S, l'évènement central est la réplication de l'ADN (S pour "synthèse"). Cette synthèse commence au niveau des origines de réplication, dont l'accessibilité à la machinerie de réplication est finement régulée pour ne permettre qu'un seul tour de réplication¹¹. A l'issue de la phase S, chaque

chromosome dupliqué sera constitué de deux chromatides sœurs. Des structures en anneaux appelées cohésines permettant de lier ensemble deux chromatides sœurs sont mises en place lors cette phase¹². Les histones, protéines autour desquelles l'ADN s'enroule et se condense en formant un nucléosome, sont aussi synthétisés en phase S. Enfin, les centrosomes, structures autour desquelles s'organise le réseau de microtubules sont dupliqués en phase S¹³.

Lorsque la réplication de l'ADN est terminée, la cellule entre dans une nouvelle phase intermédiaire appelé G2, pendant laquelle la cellule vérifie l'intégrité de l'ADN génomique après réplication et prépare l'entrée en mitose.

La mitose

La mitose se déroule en cinq étapes (Figure 1) :

En **prophase**, la condensation des chromosomes a lieu et est médiée par les condensines¹⁴, et les histones. Le second évènement majeur de la prophase est la séparation des centres organisateurs des microtubules, les centrosomes. A la fin de la prophase, le noyau disparaît lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Cet évènement permet de rendre accessible les chromosomes à la machinerie de séparation des chromosomes que nous verrons par la suite, le fuseau mitotique. La rupture de l'enveloppe nucléaire marque généralement le début de l'entrée en mitose, même s'il n'a pas lieu au sein de toutes les espèces^{15,16}.

Au cours de la **prométaphase**, les microtubules s'assemblent pour former un fuseau bipolaire dont les deux pôles s'organisent autour de chaque centrosome, dupliqué en phase S¹⁷. Des attachements s'établissent entre les microtubules du fuseau et les chromosomes par l'intermédiaire de structures protéiques appelées kinétochores qui s'associent au niveau des centromères. L'attachement des chromosomes doit être bipolaire : les chromatides sœurs s'attachent à des microtubules venant de pôle opposé, de sorte que chaque chromosome est attaché aux deux pôles du fuseau. Au fur et à mesure que les chromosomes s'attachent au fuseau, ils migrent progressivement vers la ligne médiane qui partage le fuseau en deux (la plaque équatoriale) lors de la congression.

En **métaphase**, les chromosomes sont tous attachés au fuseau de manière bipolaire et alignés sur la plaque équatoriale ce qui génère des forces opposées qui tirent chaque chromatide sœur vers un

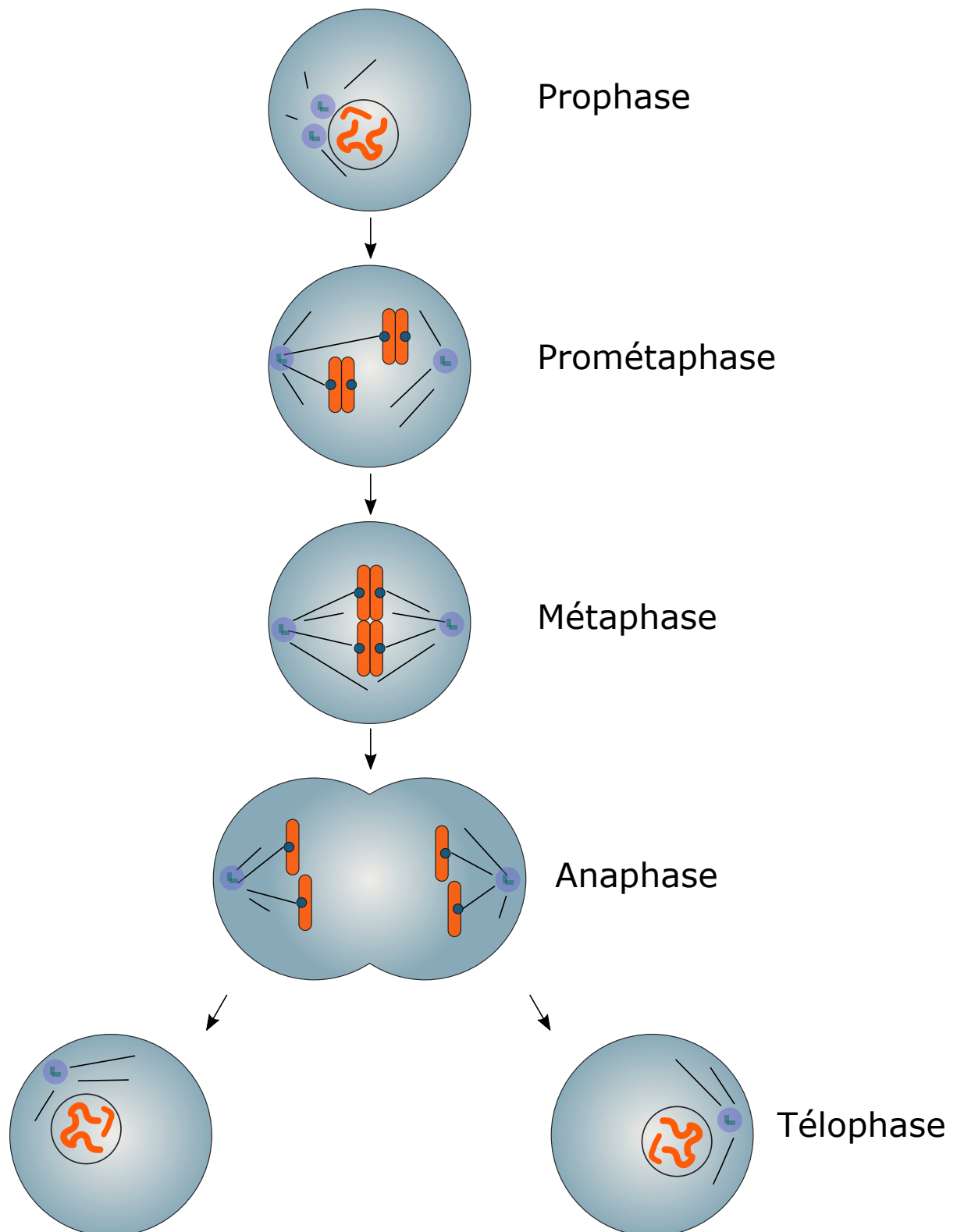


Figure 1 : Les principales étapes de la mitose.

La mitose est constituée de cinq étapes figurées ici. Seules deux paires de chromatides soeurs sont représentées par soucis de simplicité.

pôle du fuseau. Cette force, exercée par les microtubules du fuseau et transmise aux chromosomes via les

kinétochores, produit une tension entre les kinétochores des chromatides sœurs¹⁸. La présence de tension en métaphase est un paramètre clé dans le contrôle de la séparation des chromosomes, par des mécanismes explicités au chapitre III.

L'**anaphase** est l'étape décisive au cours de laquelle a lieu la séparation des chromatides sœurs. C'est le clivage des cohésines maintenant les chromatides sœurs unies qui permet leur séparation. Ce clivage dépend de l'activation d'une protéase appelée séparase. La séparation des chromosomes fait intervenir dans un premier temps, la migration des chromosomes vers les pôles du fuseau (Anaphase A) et dans un deuxième temps l'allongement du fuseau de division (Anaphase B).

En **télophase**, une fois les chromosomes séparés, le processus de sortie de mitose est enclenché. Les chromosomes se décondensent, l'enveloppe nucléaire se réassemble autour des chromosomes et le fuseau de mitose se désorganise. Finalement le cytoplasme se divise en deux lors de la cytotéiérèse pour former deux cellules filles génétiquement identiques.

2. Machinerie moléculaire du contrôle du cycle

Cyclines et kinases dépendantes des cyclines

Les étapes du cycle cellulaire se succèdent toujours dans le même ordre, de la phase G1 à la phase M. Cette séquence temporelle dépend de l'activité de dimères formés d'une protéine kinase appelée **CDK** (Cyclin Dependent Kinases) et d'une sous unité régulatrice, appelée **cycline**¹⁹. Si la concentration des CDK reste globalement constante au cours du cycle, les cyclines sont synthétisées puis dégradées à des moments précis du cycle cellulaire, et c'est donc leur présence qui gouverne la formation des différents complexes CDK-Cycline au cours des différentes phases (figure 2)

La première cycline étudiée, la cycline B, s'accumule au cours du cycle dès la fin de la phase G2 puis est détruite en mitose à la fin de la métaphase. Cette cycline s'associe avec la sous unité catalytique CDK1 chez les vertébrés, et est responsable de l'activité **MPF** (Maturation Promoting

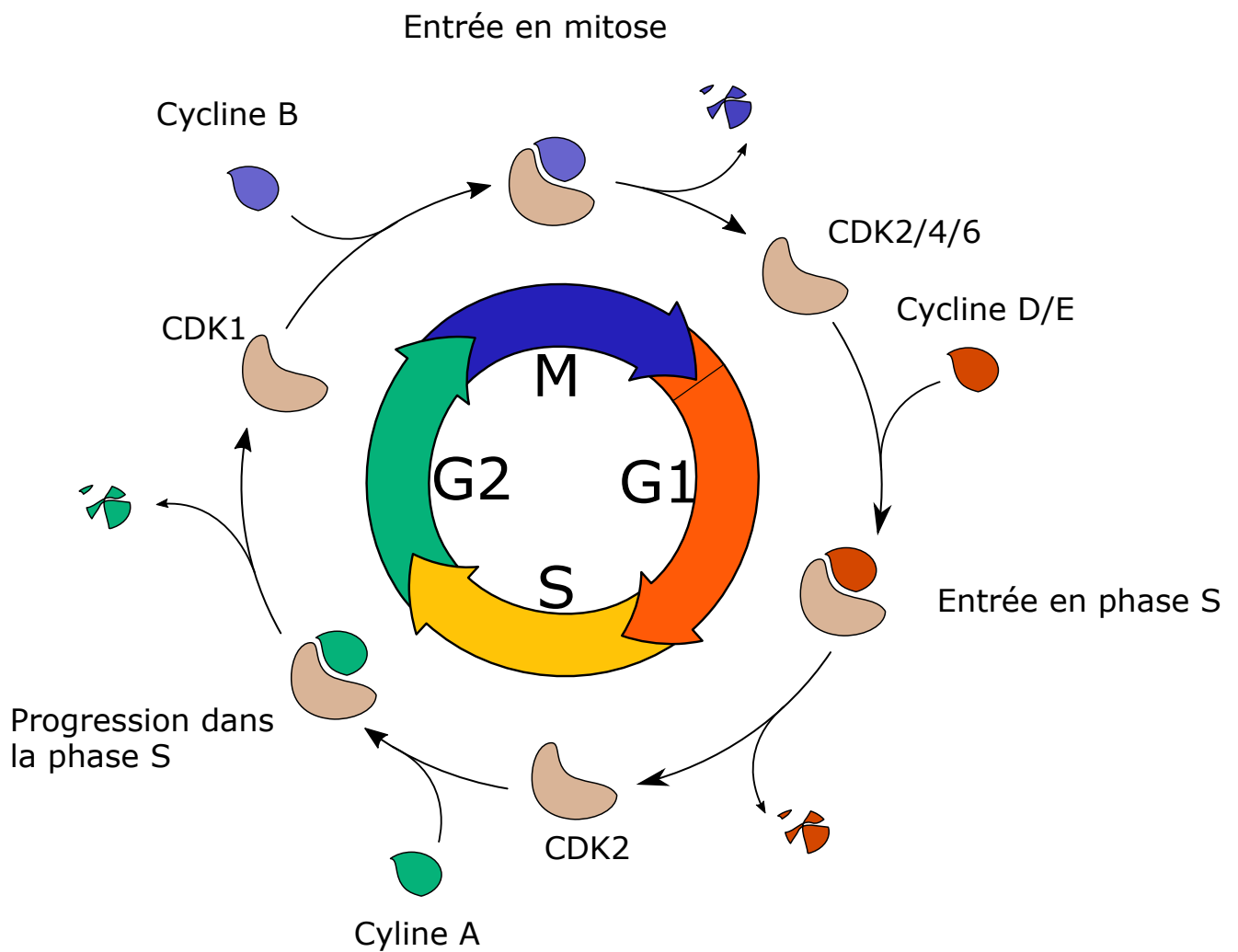


Figure 2 : Phases du cycle cellulaire et leur contrôle.

Au cours du cycle cellulaire, différentes CDK s'associent avec différentes cyclines, dont l'abondance dans la cellule varie au cours du cycle. La destruction ordonnée des cyclines permet de rendre chaque étape irréversible.

Factor)²⁰. Cette activité MPF est responsable de l'entrée des cellules en phase M, à la fois en mitose et en méiose.

Chez les métazoaires, Il existe ainsi au moins quatre types de cyclines qui jouent un rôle majeur dans la progression du cycle cellulaire. La cycline D, associée à CDK4 ou CDK6 permet la progression de la cellule en G1 à la faveur de signaux mitogènes²¹. La cycline E, associée à CDK2 est impliquée dans l'entrée en phase S²². La cycline A associée à la CDK2 permet la progression de la phase S²³. Enfin, la cycline B et la cycline A s'associent à la CDK1 pour former le MPF, qui permet l'entrée en phase M et la progression jusqu'en métaphase.

En plus de leur association avec les différentes cyclines, l'activité des CDK dépend de la phosphorylation et de la déphosphorylation de certains résidus, et de leur interaction avec des protéines inhibitrices²⁴.

Ce schéma général est valable pour les cellules animales. Il existe cependant des différences notables avec d'autres organismes, en particulier les levures, où une seule CDK (Cdc28 chez *S.cerevisiae*, cdc2 chez *S.pombe*) s'associe à différentes cyclines. Malgré ces différences, l'association cycline-CDK est constamment retrouvée au cœur des mécanismes de régulation du cycle cellulaire et ce chez l'ensemble des eucaryotes²⁵.

Protéolyse médiée par les ubiquitines-ligases

La succession des étapes du cycle cellulaire est rendue irréversible par la dégradation de protéines du cycle, et en particulier la dégradation des cyclines. Il existe deux familles d'ubiquitine-ligases qui jouent un rôle clé dans ce processus, avec d'une part l'**APC/C** (Anaphase Promoting Complex /Cyclosome) et d'autre part le **SCF** (Skp1, culling1, F-box)^{26,27}. L'APC comme le SCF sont des ubiquitines ligases de la famille E3, c'est-à-dire qu'elles ajoutent une chaîne d'ubiquitine à leurs cibles à partir d'une enzyme E2. L'ubiquitinylation des protéines cibles les adresse au protéasome, qui assure la protéolyse des protéines poly-ubiquitinylés²⁸.

L'APC/C est composé d'une douzaine de protéines et acquiert sa spécificité en se liant à des coactivateurs, qui sont la protéine Cdc20, ainsi que Cdh1²⁹. L'activation de l'APC/C par sa liaison avec Cdh1 ou Cdc20 est étroitement contrôlée dans le temps par la Cdk1³⁰⁻³². L'APC/C^{Cdc20} contrôle principalement la ségrégation des chromosomes en ciblant la cycline B ainsi que la sécurine pour la

dégradation par le protéasome³³. L'APC/C^{cdh1} est activé après l'anaphase et permet la sortie de la mitose en ciblant les protéines de la phase M pour la dégradation²⁶. Ce complexe est aussi important pour maintenir un faible niveau de protéines mitotiques après la mitose, ce qui permet la progression en G1. L'APC/C est maintenu inactif en phase S et G2 par la protéine Emi1, qui empêche la liaison des coactivateurs à l'APC/C²⁶.

Le SCF est un complexe qui régule l'entrée en phase S ainsi que l'entrée en mitose. Le SCF permet par exemple la dégradation des inhibiteurs des CDK de la phase S pour l'entrée en phase S et la dégradation de Emi1 pour l'activation de l'APC/C en fin de phase G2, et favorise donc l'entrée en mitose³⁴.

Points de contrôles

Une autre composante moléculaire de la régulation du cycle cellulaire fait intervenir des points de contrôle (figure 3). Un point de contrôle est un mécanisme qui fait intervenir un détecteur, qui surveille la survenue d'un problème, et une voie de transduction du signal qui permet l'activation d'un effecteur dont le rôle est d'arrêter la progression dans le cycle tant que le problème n'est pas corrigé^{35,36}. Si ces points de contrôle sont défaillants, le génome n'est pas fidèlement ségrégué et la survie des cellules filles est souvent compromise.

Le premier mécanisme de ce type à avoir été découvert est le point de contrôle aux dommages de l'ADN. Ce point de contrôle bloque la progression du cycle s'il détecte la présence de cassures dans l'ADN. De cette manière il empêche la réplication ou la division d'un ADN endommagé. En réponse à des cassures double brin de l'ADN en G1 par exemple, la protéine Chk2 est activée et permet de retarder l'activation de CDK2 associé aux cyclines A/E. L'entrée en phase S est donc retardée. En G2, la présence de cassures dans l'ADN induit l'activation de la protéine Chk1. Chk1 permet de retarder l'entrée en phase M en gardant inactive la kinase Cdk1. En effet, en phase S, Cdk1 arbore deux phosphorylations inhibitrices, et c'est leur retrait par la phosphatase Cdc25 qui permet l'entrée en phase M. Ainsi, Chk1 empêche l'entrée en mitose en ciblant la Cdc25 pour la dégradation³⁷.

Le deuxième point de contrôle du cycle est le point de contrôle du fuseau. Ce point de contrôle fait l'objet de ma thèse, c'est pourquoi nous y reviendrons plus en détail au chapitre 4. Brièvement, le rôle

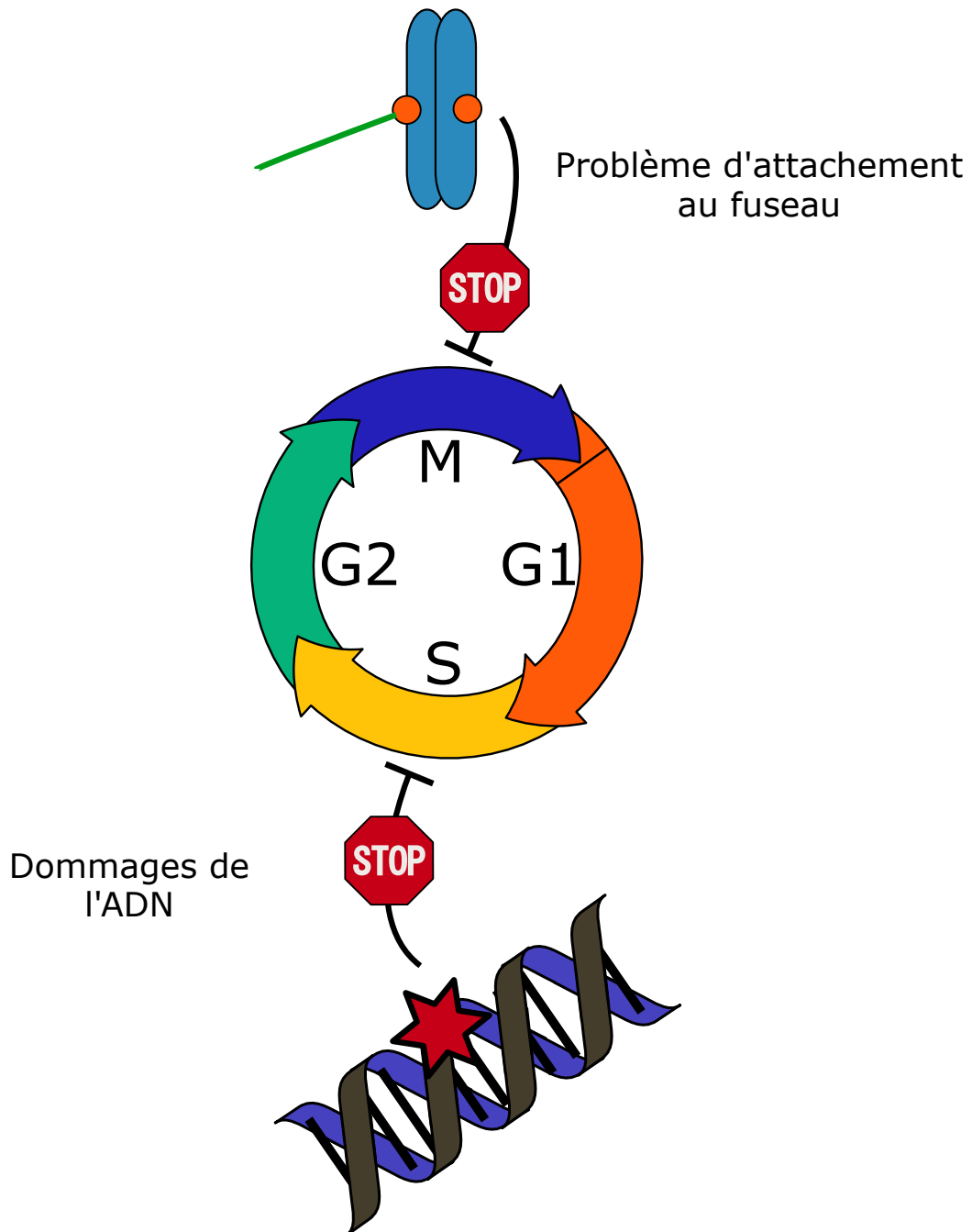


Figure 3 : Points de contrôle du cycle cellulaire

Deux points de contrôle du cycle cellulaire existent dans la cellule. Le premier point de contrôle surveille l'intégrité du génome et bloque la progression des cellules dans le cycle en réponse à des dommages de l'ADN. Le deuxième point de contrôle surveille l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau et retarde l'anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas attachés.

du point de contrôle est de réguler le partage équitable des chromosomes lors de la transition métaphase-anaphase. L'absence de point de contrôle du fuseau dans les cellules entraîne des erreurs de ségrégation des chromosomes et favorise les aneuploïdies.

3. La méiose, une division cellulaire spécialisée

La reproduction sexuée permet de produire un organisme génétiquement différent suite à la fusion de deux gamètes haploïdes provenant de deux individus. Il est donc nécessaire de diviser par deux le nombre de chromosomes (la ploïdie) de chaque gamète parental pour retrouver une ploïdie normale lors de la fécondation³⁸. La méiose est une division cellulaire spécialisée, spécifique des cellules germinales permettant de générer des gamètes haploïdes. Elle se caractérise par deux divisions qui se succèdent sans phase S intermédiaire. La méiose I : séparation des chromosomes homologues, et la méiose II : séparation des chromatides sœurs (figure 4)

Lors de la prophase de méiose, il se forme de nouvelles combinaisons génétiques par recombinaison entre les chromosomes homologues. On distingue cinq étapes majeures de la prophase I³⁹. Lors de la première étape, le leptotène, les chromosomes s'individualisent, et subissent des cassures double brin permettant aux chromosomes homologues de s'apparier. Au stade zygotène, une structure trilamellaire particulière, le complexe synaptonémal, s'associe aux chromosomes et permet la synapse, c'est à dire l'appariement étroit sur toute la longueur du chromosome entre deux homologues. Au stade pachytène, l'appariement est achevé et le complexe synaptonémal complètement assemblé. C'est à ce stade qu'a lieu les échanges chromosomiques (les crossings-over). Il faut souligner ici l'importance de ces crossings-over dans le cadre de la méiose I, puisqu'ils fournissent des sites de liaison physique appelés chiasmas, entre les chromosomes homologues⁴⁰. Au diplotène, les bivalents commencent à se séparer mais restent néanmoins liés au niveau des chiasmas. On distingue parfois une cinquième étape, la diacinèse, qui correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage du fuseau. A l'issue de la prophase I, les chromosomes homologues, constitués chacun de deux chromatides sœurs, sont appariés au niveau des chiasmas, ce qui est essentiel pour la bonne ségrégation des chromosomes lors de la méiose I⁴⁰.

En méiose I, ce sont les chromosomes homologues qui doivent être ségrégés dans deux cellules filles. Ainsi, chaque paire de chromatides sœurs doit être attachée à un seul pôle du fuseau lors de la métaphase. Cette particularité implique que les deux kinétochores frères d'une paire de chromatide

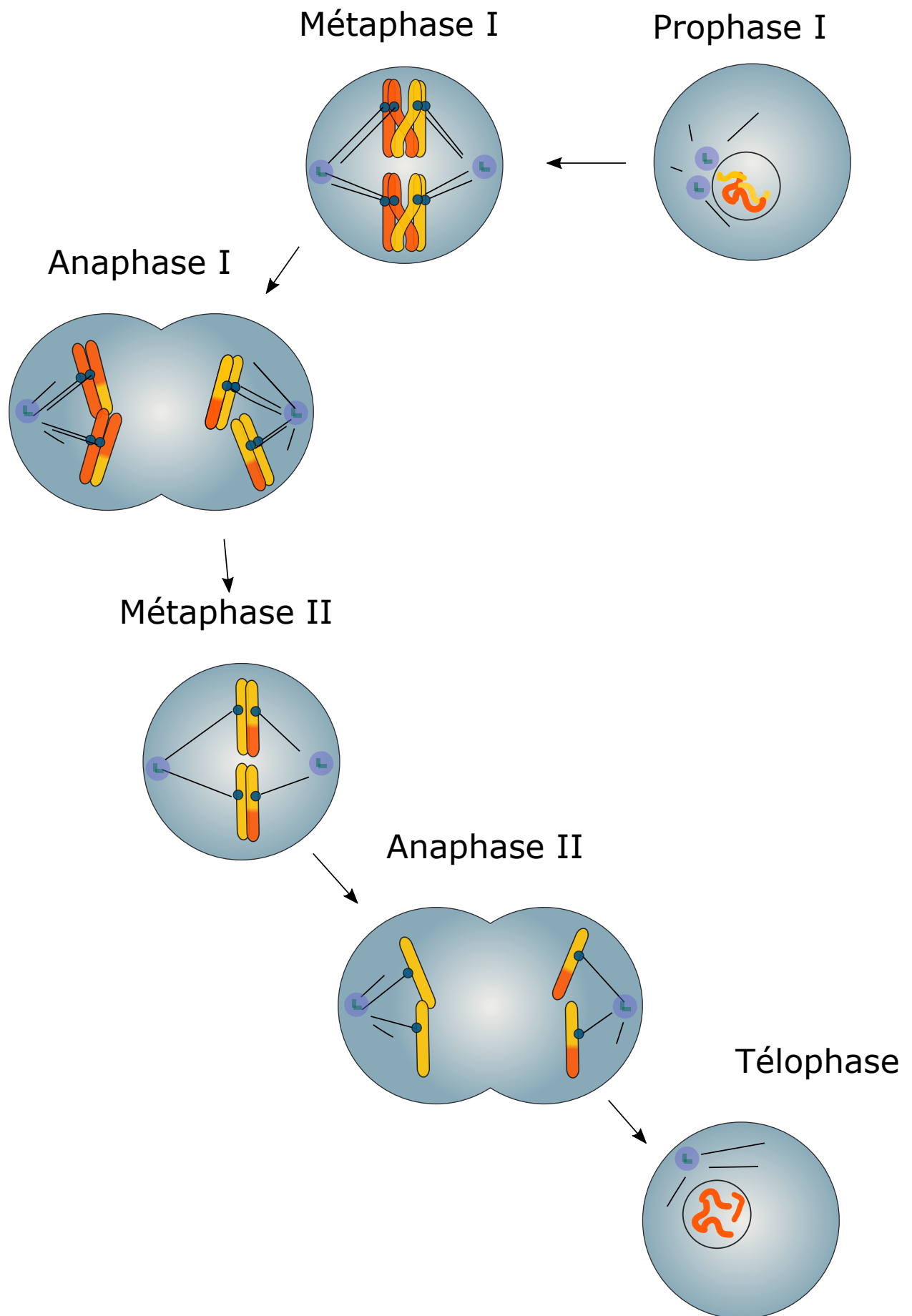


Figure 4 : Les principales étapes de la méiose.

La méiose est constituée de deux divisions successives sans phase S intermédiaire. Lors de la méiose I, les chromosomes homologues sont ségrégués, lors de la méiose II, ce sont les chromatides soeurs qui sont ségrégués.

sœurs soient co-orientés vers le même pôle. Chez la souris comme chez la levure, des protéines importantes pour la co-orientation des kinétochores frères ont été découvertes.⁴¹ Par exemple, la surexpression des protéines du complexe monopoline chez la levure entraîne la co-ségrégation des chromatides sœurs en mitose⁴². La protéine Meikin semble jouer un rôle semblable à celle des monopolines dans l'ovocyte de souris⁴³. Aussi, les complexes cohésines, qui lient ensemble les chromatides sœurs, sont essentiels à cette co-orientation⁴⁴. A l'issue de la méiose I, les chromosomes homologues ségrégent grâce à la résolution des chiasmas qui les lient ensemble. Chez la souris, la résolution des chiasmas est apportée par la séparase, qui clive les cohésines sur les bras des chromatides⁴⁵. En revanche, le clivage des cohésines ne doit pas survenir au niveau des centromères, puisque les chromatides sœurs doivent rester liées jusqu'en métaphase II pour ségréger en anaphase II. En méiose I, les cohésines centromériques sont donc protégées de la séparase par un mécanisme faisant intervenir les protéines Shugoshins et PP2A⁴⁶.

En méiose II, les chromatides sœurs doivent à présent s'attacher à deux pôles différents. Leurs kinétochores frères ne sont plus co-orientés et se comportent maintenant comme deux unités distinctes. Ce changement de configuration des kinétochores est essentiel pour la séparation des chromatides sœurs en méiose II, mais n'est pas très bien compris. L'événement essentiel pour la séparation des chromatides sœurs en méiose II est la déprotection de la cohésine centromérique⁴⁷. Cette déprotection passe par l'inhibition ou la délocalisation de PP2A aux centromères, et fait intervenir la protéine I2PP2A dans l'ovocyte de souris⁴⁶. A l'issue de la méiose II, les chromatides sœurs ségrégent dans deux cellules différentes qui sont donc haploïde. Une erreur de ségrégation en méiose I ou II aura pour conséquence un nombre incorrect de chromosomes et aboutit à la formation de gamètes aneuploïdes.

LA MATURATION DE L'OVOCYTE CHEZ LES MAMMIFERES

Chez les mammifères, la **gamétogénèse** est le processus qui permet de former les cellules germinales haploïdes à partir d'une cellule germinale primordiale diploïde ³⁸. La production d'un ovocyte mature est appelée **ovogénèse** et débute dès la vie fœtale chez les mammifères. Elle se caractérise par un blocage en prophase I de méiose au stade fœtal, la méiose reprend ensuite sous contrôle hormonal à la maturité sexuelle, et l'ovocyte se bloque à nouveau en métaphase II de méiose. C'est à ce stade que l'ovocyte est ovulé et qu'il peut être fécondé.

1. Formation du stock d'ovocytes : l'ovogénèse

Les cellules germinales primordiales se différencient très tôt lors du développement embryonnaire, au sein d'une région appelée épiblaste postérieur proximal⁴⁸. Ces cellules, d'abord peu nombreuses, vont migrer à travers l'embryon et s'établir au sein des crêtes génitales, les ébauches des gonades. Il s'ensuit une division mitotique importante, qui dure jusqu'au septième mois de grossesse chez la femme et qui permet la formation d'environ sept millions de cellules germinales femelles, les ovogonies⁴⁹.

Chez l'adulte, les ovocytes sont exclusivement localisés au niveau de structures appelées follicules ovariens. Un follicule ovarien s'organise autour d'un ovocyte recouvert de nombreuses couches de cellules folliculaires⁵⁰ (figure 5)

La formation des follicules débute par la prolifération des ovogonies, qui est d'ailleurs particulière puisque la cytokinèse est incomplète⁵¹. Ces groupes de cellules reliées entre elles via les ponts cytoplasmiques forment ce qu'on appelle des cystes. Parmi ces cellules, une seule se différencie en ovocyte, les autres devenant cellules nourricières. Ces cellules sont en effet essentielles sur le plan métabolique pour l'ovocyte en croissance, car celui-ci est incapable d'effectuer par lui-même de nombreuses réactions du métabolisme cellulaire, comme la synthèse de cholestérol ou l'utilisation du glucose par la glycolyse⁵². L'entrée en méiose débute chez la souris après deux semaines de vie embryonnaire au sein des follicules primordiaux. Il s'ensuit les différentes étapes de la prophase méiotique, puis les ovocytes immatures se bloquent au stage diplotène dans les 4 à 10 jours suivant l'entrée en méiose⁵³. Le blocage des ovocytes en prophase I durera jusqu'à la puberté, où certains ovocytes pourront reprendre la méiose sous contrôle hormonal.

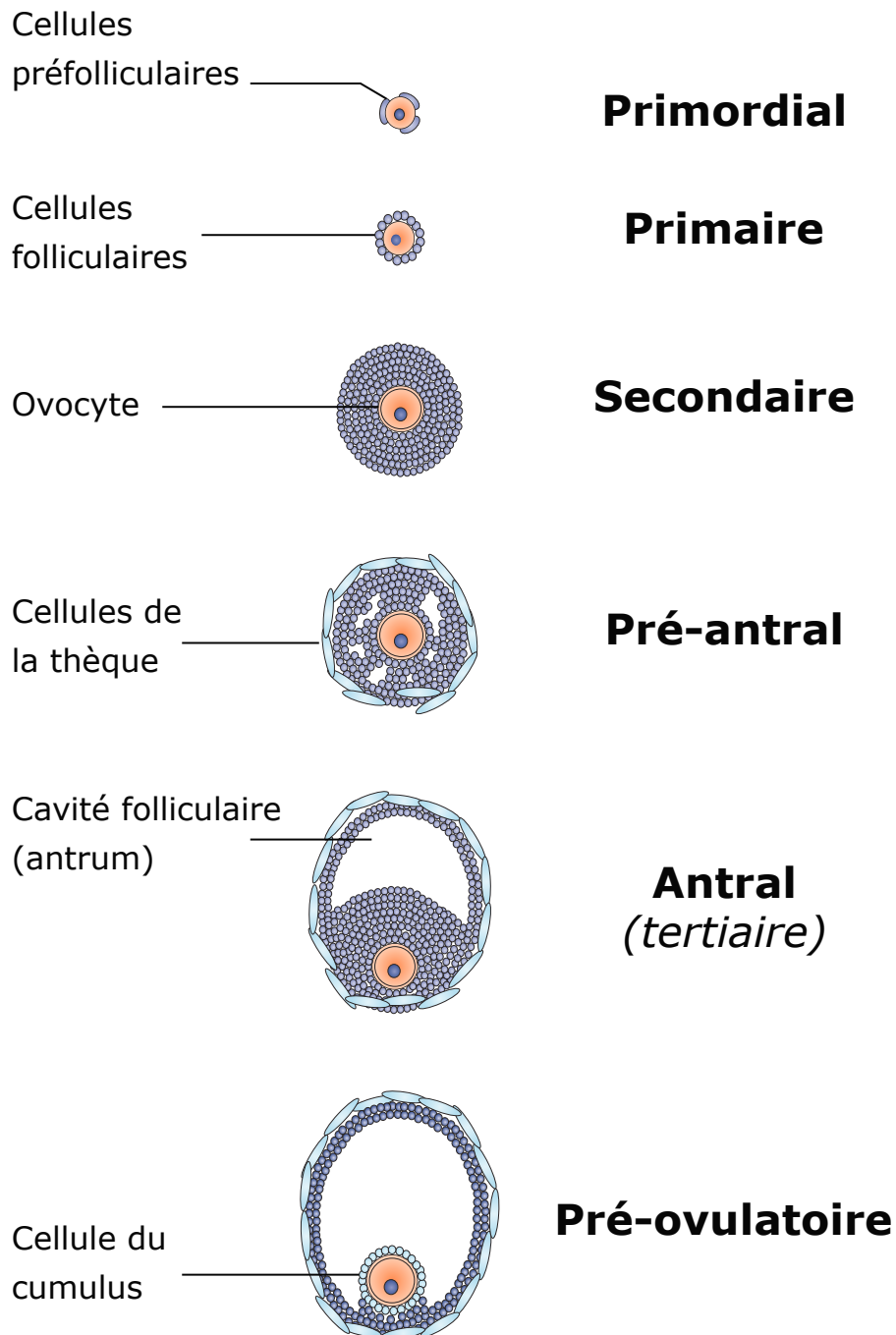


Figure 5 : Formation du follicule ovarien à partir des cellules germinales. On distingue six phases de croissance du follicule chez les mammifères, du follicule primordial au follicule pré-ovulatoire. A la puberté, certains follicules secondaires reprennent leur croissance jusqu'au stade de l'ovulation. (D'après Li et Albertini 2013)

L'ensemble des ovocytes contenus dans ces follicules primordiaux constitue le stock définitif des ovocytes⁵⁴. Malgré tout, il semble exister dans l'ovaire adulte des cellules qui retiennent la capacité de former des ovocytes à nouveau, même si ce sujet est encore très controversé⁵⁵⁻⁵⁸

Le contrôle hormonal de la croissance folliculaire repose sur la sécrétion par l'axe hypothalamo-hypophysaire de l'hormone FSH (Follicle Stimulating Hormone). Comme le follicule sécrète lui aussi de l'œstradiol, il arrive un moment où la concentration de cette hormone devient maximale et provoque en retour un pic de LH (Luteinizing Hormone). Ce pic de LH provoque la maturation de l'ovocyte et l'ovulation⁵⁹.

2. Arrêt en prophase I et reprise de la méiose

Au sein des follicules ovariens, les ovocytes demeurent bloqués au stade diplotène de la prophase. Ce blocage est lié à la régulation de l'activité du MPF^{20,60} d'une part via l'inhibition de la sous unité catalytique CDK et d'autre part via le maintien d'un faible niveau de cycline B1⁶⁰. A la maturité sexuelle, l'activation du MPF permet la reprise de la méiose.

Mécanismes moléculaires de l'arrêt en prophase I

L'arrêt en prophase I est lié à un niveau élevé d'AMP cyclique (**AMPc**). Dans l'ovocyte, l'AMPc est produit par l'adénylate cyclase à partir d'ATP, et subit en même temps une dégradation liée à une phosphodiesterase, la PDE3A⁶¹. Un équilibre s'instaure où la dégradation de l'AMPc est ralentie par l'inhibition de la PDE3A. Cette inhibition est maintenue par les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte, en exportant vers l'ovocyte du GMPc qui agit en tant qu'inhibiteur de la PDE3A⁶².

L'AMPc active la protéine kinase A (**PKA**) qui contrôle en retour l'activité de la kinase Wee1B et de la phosphatase Cdc25, les protéines régulatrices de CDK1⁶³. La kinase Wee1B est activée par PKA, et maintient les phosphorylations inhibitrices sur CDK1 au niveau de la thréonine 14 et de la tyrosine 15⁶⁴, tandis que la phosphatase Cdc25 est inhibée.

Expérimentalement, il est possible d'induire la reprise de la méiose en retirant les cellules folliculaires. Le niveau d'AMPc chute car la PDE3A n'est plus inhibée. Au contraire, les ovocytes peuvent être maintenus arrêtés en prophase en ajoutant dans le milieu un inhibiteur de PDE3A comme la milrinone, ou en activant la PKA par des analogues de l'AMPc, comme l'IBMX ou le dbcAMP⁶⁵.

Pour maintenir l'arrêt en prophase I, il est non seulement nécessaire de maintenir inactive Cdk1, mais aussi de garder un niveau bas de cycline B^{66,67}. Dans l'ovocyte de souris, le niveau de cycline B est environ 10 fois supérieur à celui de la kinase CDK1, ce qui suggère que la cycline B n'est pas le facteur limitant^{68,69}. En revanche, le maintien de l'arrêt en prophase I nécessite une dégradation constante de la cycline B. L'APC/C^{cdh1} permet de cibler la cycline B pour l'orienter vers la protéolyse par le protéasome. Son activité est essentielle au maintien de l'arrêt en prophase I⁶⁶.

Reprise de la méiose

La reprise de la méiose à la maturité sexuelle est induite par un pic de LH. Le pic de LH a pour effet la fermeture des jonctions communicantes entre les cellules folliculaires et l'ovocyte. Il n'y a plus d'arrivée de GMPc, et l'activité de la PDE3A augmente⁶². Par conséquent, le niveau d'AMPc baisse drastiquement et la PKA n'est plus activée. Ainsi, les phosphorylations inhibitrices sur CDK1 sont déphosphorylées par Cdc25. Aussi, le complexe APC/C^{cdh1} responsable de la dégradation continue de la cycline B1 en prophase est inhibé par la protéine Emi1⁷⁰, ce qui permet *in fine* d'augmenter l'activité MPF (figure 6).

La hausse de l'activité MPF a comme conséquence la phosphorylation d'un très grand nombre de protéines importantes pour la division cellulaire⁷¹. En premier lieu, les lamines du cytosquelette interne au noyau sont phosphorylées, ce qui provoque la rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD -Germinal Vesicle Breakdown)^{72,73}. La rupture de l'enveloppe nucléaire permet de rendre accessible au fuseau les chromosomes lors de la prométaphase.

3. La méiose I

Dans l'ovocyte des mammifères et en particulier de souris, la durée de la prométaphase et la métaphase est très importante – plusieurs heures – relativement aux cellules mitotiques⁷⁴. La raison de cette longue prométaphase est probablement l'étape de formation du fuseau. Comme nous le verrons, le fuseau se forme sans centrosomes dans l'ovocyte et c'est uniquement par le jeu de forces d'auto-organisation qu'un fuseau bipolaire se crée et permet finalement la congression puis l'attachement correct des chromosomes au fuseau en métaphase.

La ségrégation des chromosomes homologues en anaphase I requiert la destruction des cohésines sur les bras des chromosomes⁷⁵. Une fois les chromosomes homologues correctement attachés sur le fuseau, le

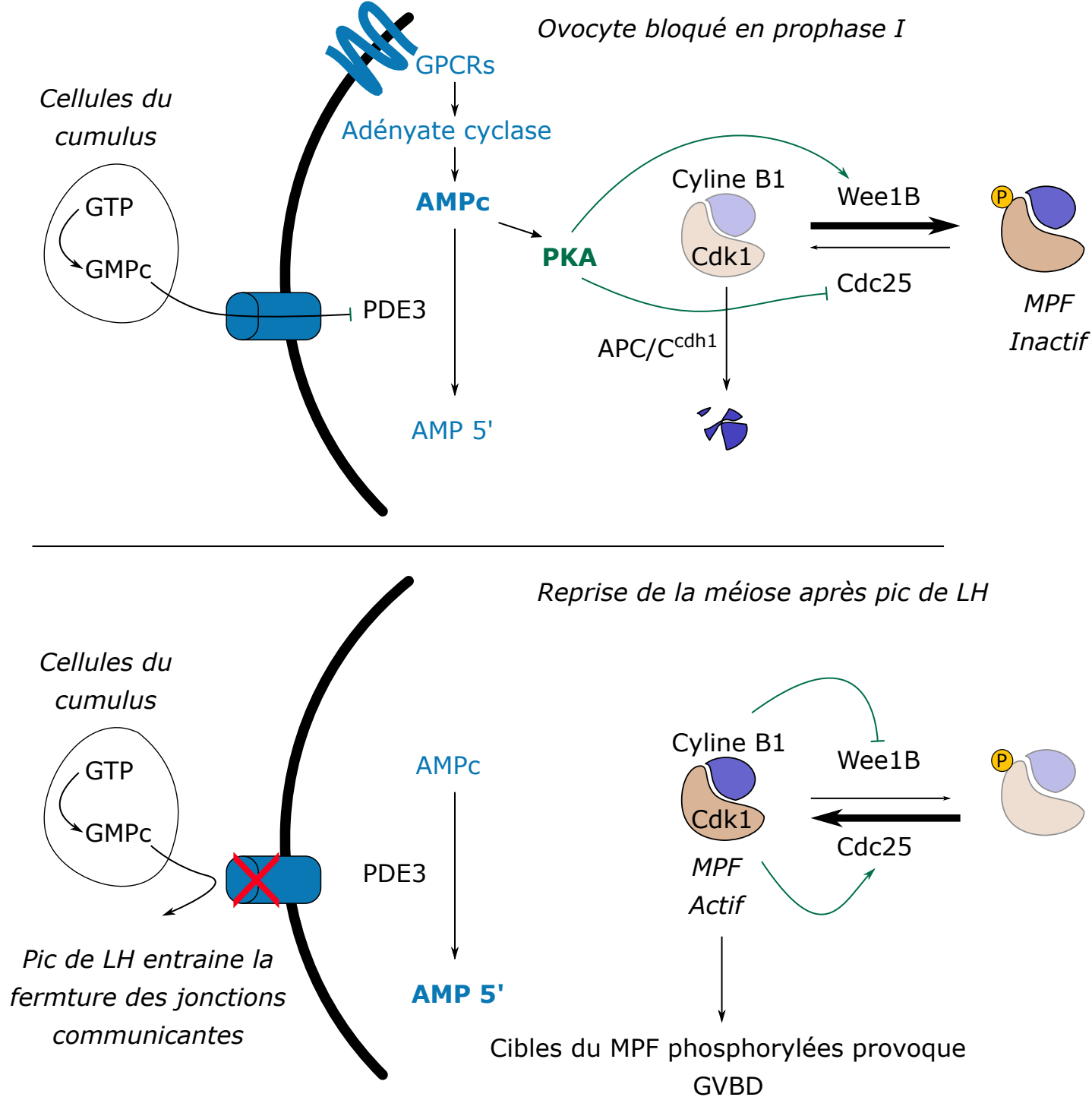


Figure 6 : Contrôle moléculaire de l'arrêt en prophase I et reprise de la méiose dans l'ovocyte

Le blocage en prophase I est principalement l'effet d'une faible activité MPF, maintenue par le haut niveau d'AMPC dans le cellule. A la reprise de la méiose I, le niveau d'AMPC chute et le MPF devient actif.

point de contrôle du fuseau est satisfait et qui permet l'activation de l'APC/C^{cdc20}. La première conséquence est la destruction de la sécurine, qui inhibe la séparation des chromosomes homologues en maintenant inactive la protéase qui clive les cohésines. La destruction de la sécurine active la séparase ce qui permet le clivage des cohésines sur les bras des chromosomes et la résolution des chiasmas lors de l'anaphase I : les chromosomes homologues ségrègent^{45,75,76}. La cycline B est aussi dégradée lors de la transition métaphase anaphase par l'APC/C^{cdc20}. La dégradation de la cycline B fait chuter l'activité MPF et initie la sortie de la méiose I. La synchronisation entre d'une part l'attachement correct des chromosomes homologues en métaphase I et la sortie de méiose I dépend du point de contrôle du fuseau, que nous verrons en détail au chapitre IV.

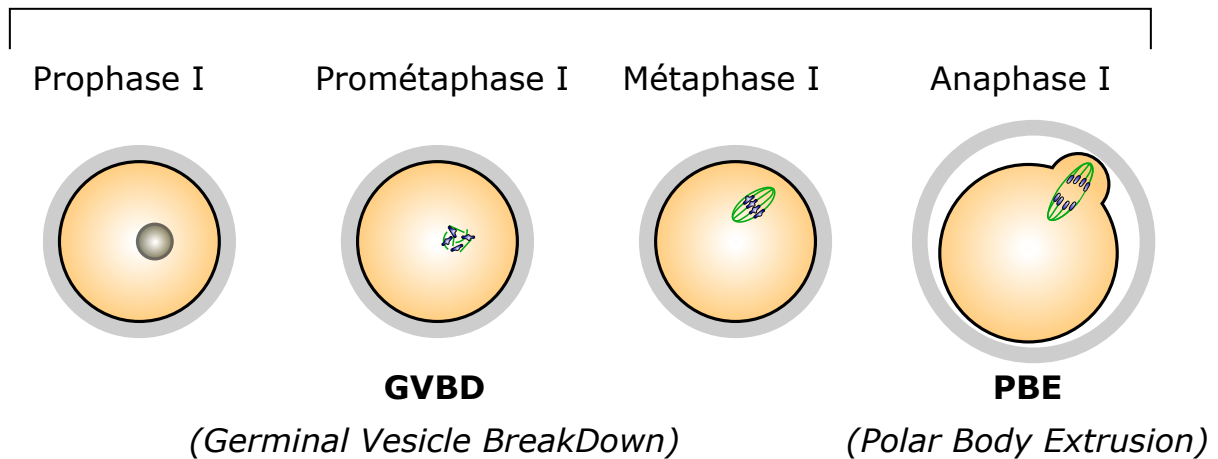
La fin de la méiose I est marquée par la division de l'ovocyte en deux cellules filles (figure 7). Cependant, cette division est remarquablement asymétrique dans le cas des ovocytes de mammifères, avec la formation d'une petite cellule appelée premier globule polaire, qui dégénère par la suite, et celle de l'ovocyte dit de deuxième ordre, qui conserve une taille très importante⁷⁷.

Le fuseau en prométaphase I est généralement au centre de l'ovocyte, mais par la suite, en métaphase, il y a migration du fuseau au cortex. Ce mouvement est dépendant de la myosine II, un moteur moléculaire, et du réseau d'actine qui se reconstitue dans l'ovocyte en prométaphase. La réorganisation du réseau d'actine au voisinage du fuseau crée un épaississement du réseau d'actine et des modifications de ses propriétés mécaniques, qui permet l'expulsion du premier globule polaire⁷⁸.

4. Méiose II

A la suite de la première division de méiose, l'activité du MPF chute brutalement à cause de la dégradation de la cycline B. Mais cette dégradation n'est pas complète, et la cycline B reste à une concentration suffisante dans l'ovocyte pour maintenir une faible activité du MPF, essentielle pour empêcher un nouveau cycle de réplication de l'ADN. Après l'expulsion du premier globule polaire, le fuseau se réassemble rapidement et parallèlement au cortex de l'ovocyte. Les chromatides sœurs se bioorientent sur le fuseau et les kinétochores frères sont disjoints. Les ovocytes s'arrêtent alors en métaphase II. A ce stade, les ovocytes sont matures et prêts à être ovulés. L'anaphase II ne sera induite que par l'entrée du spermatozoïde à la fécondation.

MEIOSE I



MEIOSE II

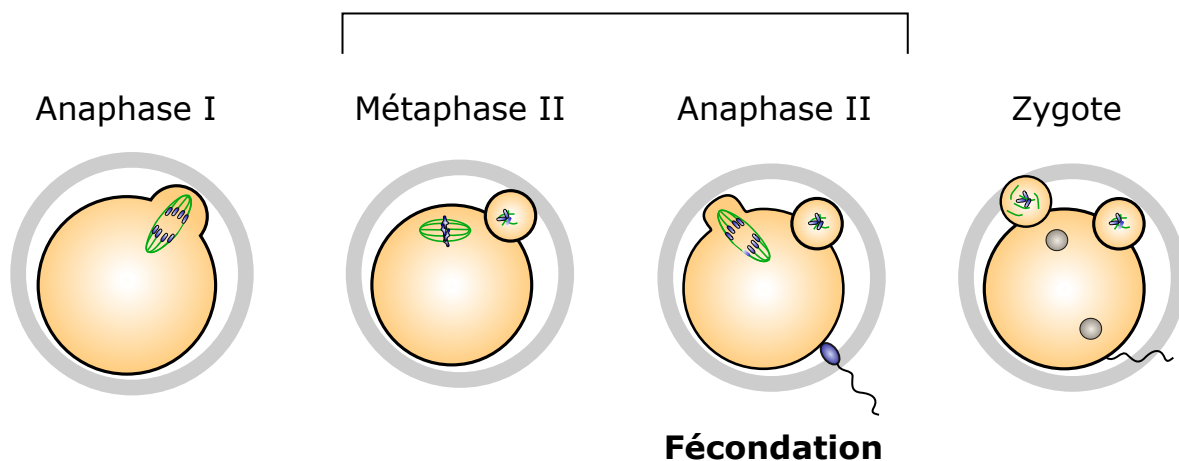


Figure 7 : La maturation méiotique dans l'ovocyte de souris.

La reprise de la méiose est visible par la rupture de la vésicule germinative (GVBD). S'ensuit une longue prométaphase I durant laquelle le fuseau de méiose s'assemble et les chromosomes s'attachent au fuseau. Lors de la transition métaphase-anaphase, les chromosomes homologues sont ségrégués et le premier globule polaire est expulsé (PBE). L'ovocyte entre aussitôt en méiose II et le fuseau de métaphase II se reforme. L'arrêt en métaphase II est dû à l'activité CSF (Cytostatic Factor). C'est la fécondation par le spermatozoïde qui permet la levée de l'arrêt et la transition métaphase II anaphase II, puis la formation du zygote.

L'arrêt en méiose II aussi appelé arrêt **CSF** (Cytostatic Factor) est dû au maintien de l'activité du MPF et permet d'empêcher une activation parthénogénétique de l'ovocyte⁷⁹. L'activité responsable de ce maintien a été identifiée en premier lieu chez le xénope⁸⁰. En effet, l'injection de cytoplasme d'ovocyte bloqué en méiose II dans un blastomère en division bloque la progression du cycle. L'activité du MPF est maintenue grâce à l'inhibition de l'APC/C^{cdc20} par la protéine Emi2 qui empêche sa liaison avec son coactivateur CDC20. Ainsi, la Cycline B n'est pas dégradée. Aussi, la Cdk1 est gardée active par l'activité de la phosphatase Cdc25A, qui retire les phosphorylations inhibitrices sur Cdk1⁸¹.

A la fécondation, l'entrée du spermatozoïde provoque une vague calcique intra cytoplasmique. En réponse, la protéine CamKII est activée et phosphoryle Emi2, ce qui entraîne son inhibition⁸². L'APC/C se retrouve activé et permet la dégradation de la cycline B, ce qui concourt à la sortie de la méiose II. Aussi, la cohésine centromérique n'est plus protégée de l'action de la séparase en méiose II ce qui permet la ségrégation des chromatides sœurs⁸³. Toutefois, lors de la méiose II, il n'est pas clairement établi si la séparation des chromosomes est régulée par le point de contrôle du fuseau.

LES ATTACHEMENTS KINETOCHORE-MICROTUBULE ET LE FUSEAU

Lors de l'anaphase, les chromosomes sont distribués équitablement dans les deux cellules filles. Pour que chaque cellule fille hérite d'une seule copie de chaque chromosome, il faut que les chromosomes homologues soient attachés aux pôles opposés du fuseau. La force de traction exercée par les microtubules au niveau des kinétochores permet la ségrégation équitable des chromosomes homologues aux deux pôles opposés du fuseau. C'est pourquoi le bon déroulement de cette étape repose sur l'attachement correct des chromosomes aux microtubules du fuseau.

1. Les microtubules

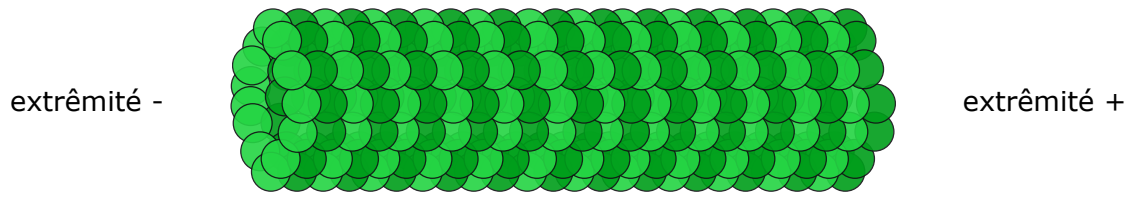
Structure et dynamique des microtubules

Le fuseau de division est formé d'un ensemble très organisé de microtubules. Ces microtubules forment l'unité de base du fuseau. Un microtubule est une structure tubulaire d'environ 25 nm de diamètre et formé d'un assemblage de treize protofilaments (figure 8). Chaque protofilament est composé d'une succession d'hétérodimères de tubuline α - β , qui s'associent toujours dans la même direction. Les protofilaments s'assemblent en parallèle dans le même sens avec une extrémité (-) exposant des tubulines α , et une extrémité (+) exposant des tubulines β ⁸⁴. De ce fait, les microtubules sont des structures polarisées. Les microtubules sont aussi des structures très dynamiques, qui s'allongent et se raccourcissent en permanence aux deux extrémités. Cependant la polymérisation, c'est à dire l'ajout de tubulines α - β , est plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-), notamment parce que les dimères de tubuline s'ajoutent préférentiellement sur une β tubuline. Ainsi, le microtubule va croître à l'extrémité (+) et se dépolymériser à l'extrémité (-). Ce phénomène est appelé « **tapis roulant** » (treadmilling) car un dimère de tubuline ajouté à l'extrémité (+) va progressivement se rapprocher de l'extrémité (-) qui dépolymérise⁸⁴ (figure 9).

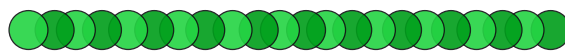
La dynamique des microtubules est influencée par la quantité de tubulines libres présente dans le cytoplasme car un équilibre se crée entre la quantité de tubulines libres et la quantité de tubulines polymérisées. Ainsi, plus il y a de tubulines libres, plus les microtubules vont polymériser. La dynamique des microtubules est également influencée par le GTP porté par chaque dimère de tubuline. En effet, peu après l'ajout d'un dimère α - β tubuline à l'extrémité d'un microtubule, le GTP est hydrolysé en GDP. Or les dimères portant un GDP ont une affinité réduite pour les dimères voisins, ce qui se traduit par

Microtubule

13 protofilaments associés



Protofilament



Dimère de tubuline

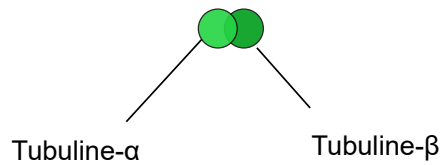


Figure 8 : Structure d'un microtubule.

Les microtubules sont formés de l'assemblage de 13 protofilaments qui s'associent latéralement entre eux. Ces protofilaments sont des polymères d' α -tubuline et β -tubuline.

l'incurvation des protofilaments et favorise la dépolymérisation de l'extrémité du microtubule. Ce type d'événement est appelé catastrophe⁸⁴. Cependant, lorsque la vitesse d'addition de nouvelles sous-unités est plus rapide que la vitesse d'hydrolyse du GTP, il se forme une coiffe de GTP qui stabilise l'extrémité et empêche sa dépolymérisation. La perte de cette coiffe entraîne une catastrophe. Ce comportement qui alterne polymérisation et catastrophe est appelé **instabilité dynamique**⁸⁵ (figure 10).

Récemment, il a été montré que les microtubules pouvaient aussi incorporer de nouvelles sous-unités sur toute la longueur du microtubule, et en particulier aux endroits où les contraintes mécaniques sont les plus importantes, ce qui favorise la réparation des microtubules dans ces régions⁸⁶. De la même manière, des ilots de β tubuline liées au GTP subsistent le long de certains microtubules, les protégeant des catastrophes.

Il est paradoxal qu'un polymère dont la fonction est de former des attachements durables avec les chromosomes lors de la métaphase, soit aussi dynamique. Nous verrons que cette instabilité dynamique est néanmoins indispensable pour que le fuseau exerce sa fonction, et ce de la capture initiale du chromosome en prophase à sa ségrégation lors de l'anaphase.

Protéines associées aux microtubules (MAPs)

La dynamique des microtubules est contrôlée par un ensemble de protéines appelées **MAPs** (Microtubule Associated Proteins). Ces protéines modifient les propriétés structurales des microtubules et contrôlent ainsi la vitesse de polymérisation ou la fréquence des catastrophes⁸⁷.

Les premières protéines identifiées comme MAPs sont les protéines appartenant à la famille tau (Tubuline-associated unit). Les protéines tau stabilisent les microtubules en se fixant latéralement aux protofilaments, ce qui empêche la courbure des microtubules et donc les catastrophes⁸⁸. La phosphorylation des protéines tau empêche leur interaction avec les tubulines et donc leur effet stabilisateur des microtubules. En mitose, la protéine MAP4 de la famille des protéines tau, est phosphorylée par CDK1 favorisant ainsi l'instabilité des microtubules nécessaire à la capture des chromosomes⁸⁹.

CLIP-170 appartient à une autre famille de MAPs stabilisatrice qui s'associe à l'extrémité (+) des microtubules. Elle s'associe uniquement avec la coiffe de GTP tubuline des microtubules, d'où son

Flux de microtubule par le phénomène du tapis roulant

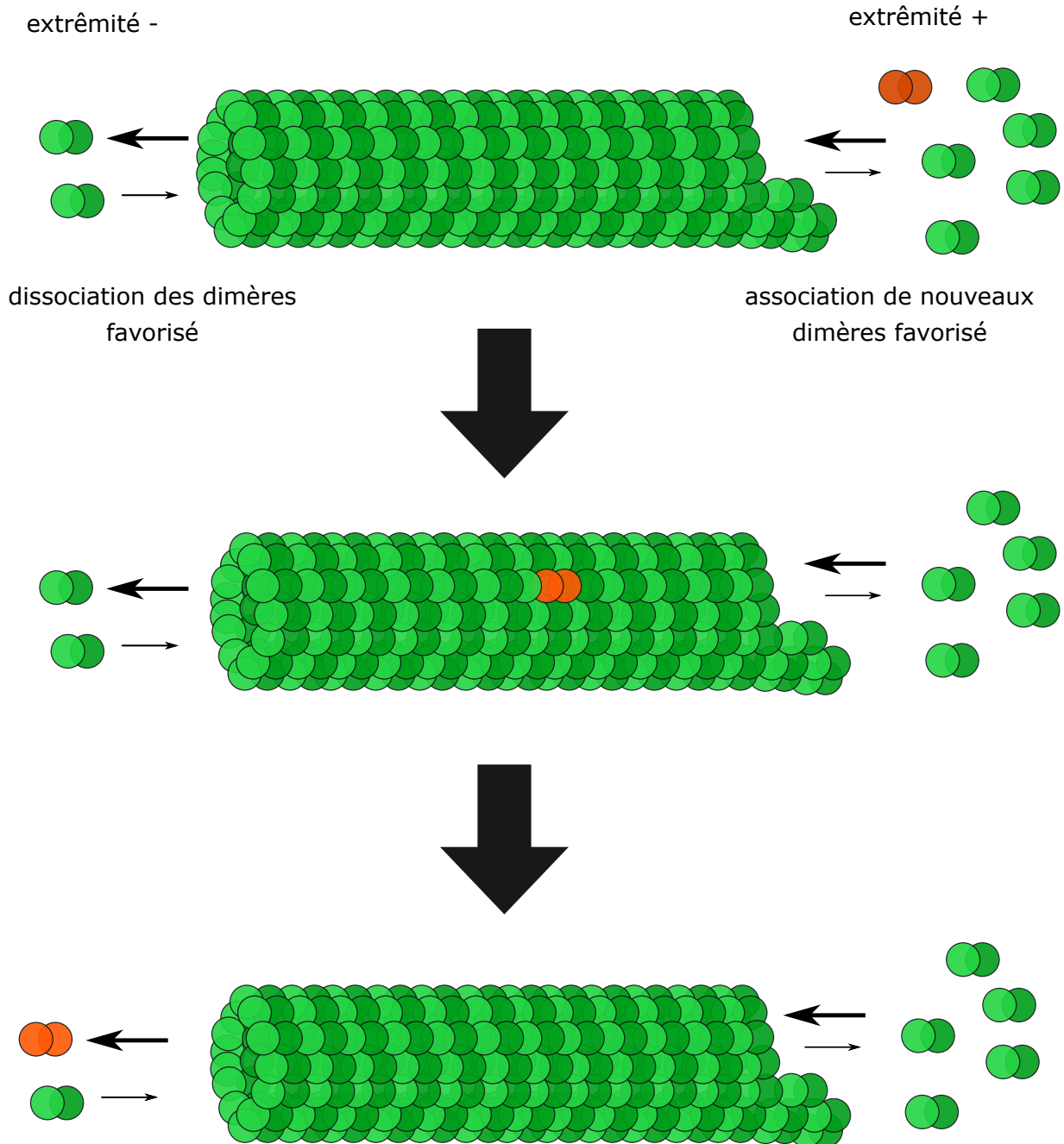


Figure 9 : Le phénomène de tapis roulant.

L'association des dimères de tubuline se fait préférentiellement du côté +, tandis que la dissociation est favorisée à l'extrémité -. Ainsi il existe un flux de microtubule, de l'extrémité + vers l'extrémité - à l'origine du phénomène du tapis roulant (treadmilling en anglais).

comportement parfois qualifié de « comète » lorsqu'elle est observée au vidéo-microscope à fluorescence⁹⁰.

Le recrutement des MAPs à l'extrémité (+) des microtubules est en général dépendant des protéines de la famille EB (end binding). Il existe trois protéines EB chez l'homme, EB1, EB2 et EB3 ayant des fonctions similaires⁹¹. Les protéines EB établissent une liaison entre les microtubules et les autres MAPs, grâce à deux domaines de liaison distincts⁹².

Enfin, XMAP215 (appelée Tog chez l'homme) stabilise les microtubules et favorise leur polymérisation par un autre mécanisme que les protéines tau. XMAP215 agit comme une polymérase des microtubules, qui ajoute successivement des dimères de tubuline aux extrémités (+)⁹³.

La dynamique des microtubules est aussi régulée par des facteurs déstabilisateurs qui augmentent la fréquence de catastrophe. La plus connue des MAPs déstabilisatrice est la kinésine-13 appelée MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin). Elle est associée au centromère et son rôle consiste à courber l'extrémité (+) des protofilaments pour favoriser leur dépolymérisation⁹⁴. Elle permet ainsi de détacher les microtubules des kinétochores.

Un autre facteur déstabilisateur est la Stathmine ou OP18 (Oncoprotein 18). Son mode d'action consiste à se lier aux protofilaments et selon les modèles, soit elle empêche l'interaction latérale entre protofilaments, soit elle induit directement la courbure des protofilaments. Après dissociation des dimères du protofilament, OP18 reste associé aux dimères de tubuline et inhibe leur réincorporation, favorisant donc localement la dépolymérisation du microtubule⁹⁵.

Les moteurs moléculaires forment une large famille de protéines capable de se mouvoir le long des microtubules. Ils appartiennent soit à la famille des **kinésines**, soit à la famille des **dynéines**, et utilisent l'hydrolyse de l'ATP couplé à des changements de conformation pour se déplacer. On distingue les moteurs qui se dirigent vers l'extrémité (+) du microtubule (mouvement antérograde) des moteurs qui se dirigent vers l'extrémité (-) (mouvement rétrograde).

Les kinésines se déplacent le plus souvent vers l'extrémité (+), et se répartissent en 14 familles différentes, de la kinésine-1 à la kinésine-14⁹⁶. Elles permettent de transporter des cargos comme les chromosomes le long des microtubules, de lier des microtubules entre eux et de les faire glisser l'un par rapport à l'autre. Elles peuvent aussi lier les microtubules avec les kinétochores. Elles sont ainsi

Instabilité dynamique des microtubules

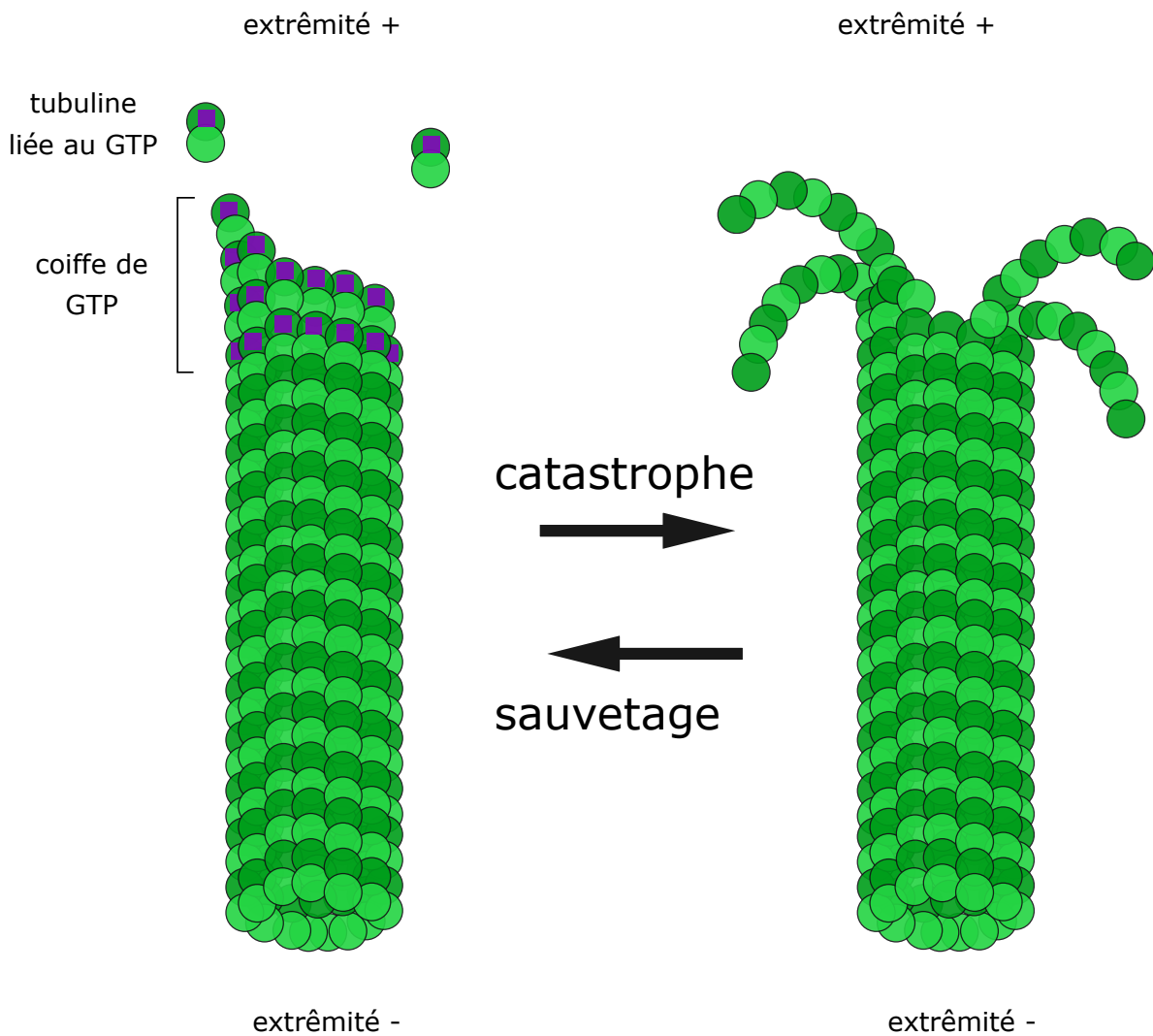


Figure 10 : Instabilité dynamique des microtubules.

Lorsque l'association des dimères de tubuline est plus rapide que la vitesse d'hydrolyse du GTP en GDP, les dimères nouvellement incorporés présentent tous du GTP, ce qui constitue la coiffe de GTP. Cette coiffe favorise la croissance rapide du microtubule. La perte de cette coiffe peut entraîner la dissociation rapide des dimères de tubuline, appelée catastrophe.

essentielles à l'établissement d'un fuseau bipolaire. Certaines kinésines comme la kinésines-13 ou MCAK cité précédemment, joue un rôle dans la dépolymérisation des microtubules⁹⁷.

Les dynéines se dirigent vers l'extrémité (-) des microtubules et sont impliqués dans la focalisation des microtubules aux pôles du fuseau, dans le transport des chromosomes en anaphase, mais aussi dans le transport rétrograde des protéines du point de contrôle du fuseau des kinétochores vers les pôles.

Agents pharmacologiques ciblant les microtubules

De nombreuses molécules naturelles présentent une activité qui interfère avec la dynamique des microtubules. Elles ont suscité un grand intérêt en tant que fongicide ou anti parasitaire, mais surtout en tant qu'agent anti cancéreux⁹⁸.

Elles constituent aussi un outil de choix pour le biologiste cellulaire, pour synchroniser les cellules ou permettent de modifier la dynamique des microtubules.

La plupart des drogues isolées agissent en inhibant l'assemblage des microtubules. L'incorporation des dimères de tubuline peut être empêchée par la colchicine ou le nocodazole, qui se lient aux dimères libres et empêchent leur incorporation dans un nouveau protofilament, ce qui inhibe la polymérisation du microtubule. Certaines drogues, comme la noscapine ou le bénomyl agissent ralentissant le taux de croissance et de désassemblage des microtubules ce qui supprime l'instabilité dynamique des microtubules^{98,99}.

Enfin, le taxol (ou paclitaxel) est une drogue qui permet de stabiliser les microtubules et empêche les catastrophes, probablement en stabilisant la conformation droite des protofilaments à la manière de tau¹⁰⁰.

2. Assemblage du fuseau

En mitose et en méiose, la formation d'un fuseau bipolaire constitué d'un réseau organisé de microtubules est commune à l'ensemble des eucaryotes (figure 11). Le fuseau est un assemblage bipolaire de trois types de microtubules. Les **microtubules kinétochoriens** s'attachent aux chromosomes via les kinétochores et sont à l'origine des forces de traction qui s'exercent sur les kinétochores¹⁰¹. Ce sont les microtubules les plus stables. Les **microtubules interpolaires** se chevauchent dans la zone centrale du fuseau et sont à l'origine de la séparation des pôles et donc de la bipolarité du fuseau. Les

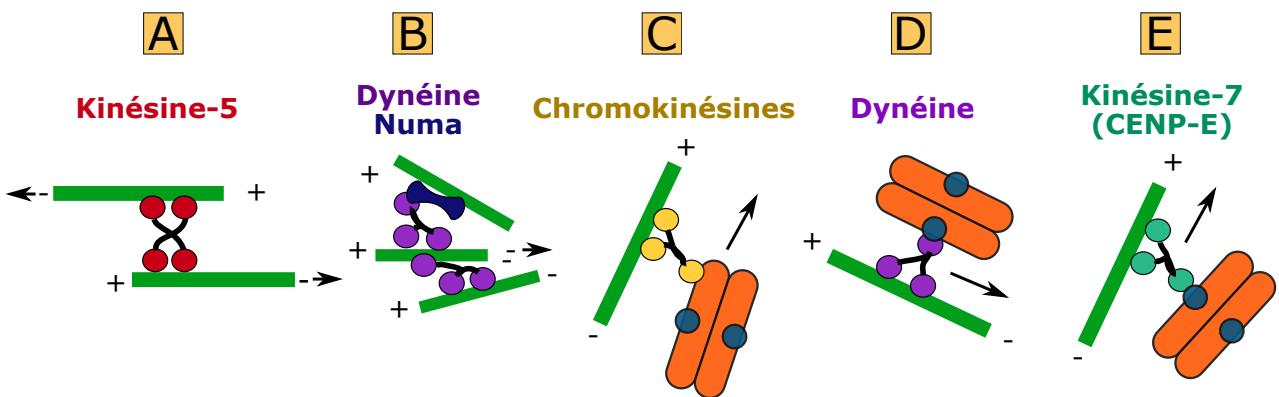
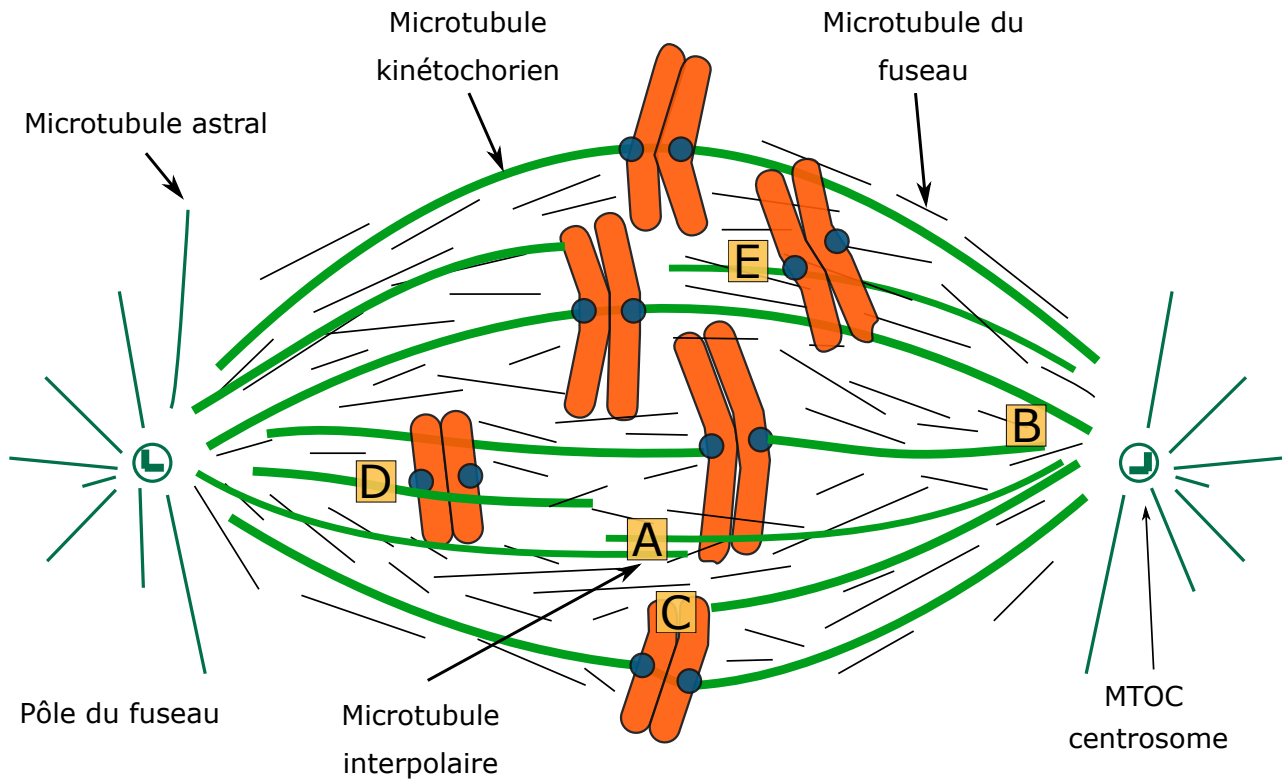


Figure 11 : Structure du fuseau et moteurs moléculaires.

Le fuseau est un assemblage de différents types de microtubules : certains s'associent aux kinétochores (microtubules kinétochoriens), certains explorent l'espace en dehors du fuseau et permettent l'ancrage du fuseau (microtubules astraux), tandis que d'autres se croisent à l'équateur (microtubules interpolaires). Le fuseau est organisé par le jeu des forces exercées par les différents moteurs moléculaires. En A, la kinésine-5 permet d'éloigner deux microtubules anti-parallèles. En B, la dynéine en lien avec NuMa, permet de focaliser les pôles et d'aligner les microtubules dans le même sens. En C, les chromokinésines relient la chromatine d'un chromosome à un microtubule et permet son transport antérograde. En D, la dynéine peut directement s'associer au kinétochore et transporte le chromosome vers les pôles. En E, la kinésine-7 permet de transporter un chromosome vers l'équateur.

microtubules astraux partent des pôles vers le cortex et permettent le positionnement du fuseau dans le cytoplasme grâce aux nombreux points de contacts avec le cortex cellulaire.

Nucléation des microtubules du fuseau

Dans les cellules en mitose, les microtubules sont nucléés à partir d'un centre organisateur constitué d'un centrosome. Un centrosome est composé d'une paire de centrioles – des cylindres formés de microtubules – entouré de matériel péricentriolaire (**PCM** : Peri-Centriolar Material)¹⁰². Les microtubules vont croître à partir de ce matériel péricentriolaire dans toutes les directions, de manière à explorer l'espace à la recherche des chromosomes. Dans ce modèle, les microtubules peuvent capturer les chromosomes via des chromokinésines présentes sur les bras ou encore via les kinétochores. Ce modèle est appelé recherche et capture (search and capture) et constitue le principal moyen d'initier l'attachement des chromosomes avec le fuseau dans les cellules mitotiques¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Dans les ovocytes, il n'y a pas de centrosomes comme en mitose. Cependant, des **aMTOC** (acentriolar Microtubule Organizing Center) possédant tous les éléments du PCM permettent la nucléation des microtubules. Après la rupture de l'enveloppe nucléaire, les aMTOC se rassemblent en deux clusters pour former les deux pôles du fuseau¹⁰⁶.

Parallèlement à ce mécanisme qui dépend des MTOC, les microtubules peuvent aussi être nucléés à partir de la chromatine. Ce mécanisme repose sur la présence au niveau des chromosomes d'un facteur d'échange de la guanosine, RCC1, qui catalyse la formation d'un gradient de RanGTP¹⁰⁷. Le gradient ainsi formé permet la libération de divers facteurs d'assemblage du fuseau à partir de l'importine qui leur est liée, comme par exemple TPX2, qui stabilise les microtubules et favorise leur nucléation¹⁰⁸. Deux autres mécanismes de formation du fuseau ont été découverts plus récemment et coopèrent pour parvenir à l'assemblage du fuseau. Dans le premier, c'est le complexe Augmin qui permet d'amplifier la nucléation des microtubules sur des microtubules préexistants, ce qui augmente la densité des microtubules du fuseau. Dans le second, c'est la protéine kinase Aurora B, présente au niveau de la chromatine, qui permet de favoriser la nucléation des microtubules en inhibant des facteurs de catastrophe comme la kinésine-13 (MCAK)¹⁰⁸.

Rôle organisateur des moteurs

Quel que soit le mode de nucléation des microtubules, des moteurs moléculaires interviennent pour organiser les microtubules entre eux et former un fuseau bipolaire. La bipolarisation du fuseau dans les cellules et en particulier dans l'ovocyte est principalement dû à la **kinésine-5**, aussi appelée Eg5¹⁰⁹ qui

se déplace vers l'extrémité (+) des microtubules. Ces kinésines s'associent tête bêche en tétramère et relient deux microtubules antiparallèles. Le déplacement du dimère d'Eg5 vers l'extrémité (+) des deux microtubules induit un glissement des deux microtubules l'un par rapport à l'autre. A l'échelle du fuseau, Eg5 contribue ainsi à éloigner les deux pôles pour établir la bipolarité. Lorsque Eg5 est inhibée par des inhibiteurs tels que le STLC ou le monastrol, le fuseau devient monopolaire, sous l'action d'autres moteurs qui tendent à contrecarrer l'effet de Eg5, comme la kinésine-14^{110,111}. La kinésine-14, comme la dynéine, sont des moteurs dirigés vers les extrémités (-) qui permettent de stabiliser et de focaliser les pôles du fuseau, en association avec NuMa, une protéine essentielle pour le maintien de la structure des pôles du fuseau^{112,113}. NuMa agit aussi de concert avec les dynéines pour aligner les microtubules du fuseau de manière parallèle¹¹⁴.

Congression des chromosomes

La formation du fuseau requiert aussi la capture des chromosomes par les microtubules du fuseau, ce qui permet leur **congression** c'est-à-dire la migration des chromosomes à l'équateur.

L'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique fait intervenir un groupe de kinésines appelés chromokinésines, qui se fixent sur la chromatine. Les chromokinésines lient les chromosomes et les microtubules indépendamment des kinétochores. Les kinésines 4 et 10 sont les chromokinésines qui contribuent ensemble à la congression des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale. Elles génèrent une force, appelée force d'éjection polaire, qui est une force de répulsion des pôles du fuseau. Les forces de répulsions s'équilibrent à l'équateur du fuseau, facilitant l'alignement des chromosomes à cet endroit¹¹⁵.

La congression des chromosomes en méiose dans les ovocytes de mammifères est considérablement plus longue qu'en mitose. Un modèle de congression en quatre phases dans l'ovocyte de souris a été proposé¹¹⁶. Dans la première phase qui dure une heure, les chromosomes s'organisent autour d'une sphère de microtubules. Dans la seconde phase, les chromosomes restent à la surface du fuseau et forment une ceinture à l'équateur du fuseau deux heures après GVBD. Dans la troisième phase, les chromosomes migrent vers l'intérieur du fuseau et se répartissent progressivement pour s'aligner sur la plaque métaphasique quatre heures après GVBD. Enfin, dans la dernière phase, les chromosomes oscillent sur la plaque métaphasique sous l'effet des forces qui tirent de chaque côté. A l'issue de cette phase, le fuseau est complètement formé et bipolaire, et les chromosomes sous tension ont achevé leur bi-orientation.

3. Le kinétochore

Les kinétochores sont des structures protéiques complexes qui s'associent au niveau des centromères des chromosomes. Ils permettent l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau, générant des forces de traction lors de la métaphase et l'anaphase. Ils recrutent aussi des protéines du point de contrôle du fuseau que nous verrons au chapitre suivant qui couple l'anaphase avec l'attachement des kinétochores.

Spécification des centromères

Les kinétochores s'assemblent à la surface des centromères et permettent la liaison physique entre microtubules et chromosome (figure 12). La découverte par microscopie électronique de la structure du kinétochore permet de distinguer le complexe de liaison aux microtubules (le kinétochore) de la région de la chromatine qui détermine le lieu d'assemblage du kinétochore (le centromère)¹¹⁷⁻¹²⁰.

Dans le cas le plus simple de la levure *S. cerevisiae*, le centromère est une très courte région d'environ 125 pb, qui est enroulée autour d'un nucléosome contenant le variant d'histone Cse4¹²¹. Cette configuration est appelée « point centromere ». Chez les eucaryotes supérieurs, la configuration la plus courante est appelée « regional centromere ». Dans ce cas, les centromères sont d'une taille bien plus grande (de quelques kilobases à plusieurs mégabases) et constitués d'ADN hautement répétitif. Comme chez *S. cerevisiae*, l'ADN centromérique est en partie enroulé autour de nucléosomes contenant un variant de l'histone H3 appelé CENP-A (selon la nomenclature en vigueur, on parle aussi de CenH3). La présence de ce variant d'histone définit la région centromérique sur laquelle va s'assembler le kinétochore. Contrairement à la levure, aucune séquence ne spécifie directement le positionnement des histones CENP-A¹²¹.

Alors que l'incorporation des histones H3 se fait pendant la réplication de l'ADN lors de la phase S¹²², il a été longtemps imaginé que les histones CENP-A étaient aussi incorporés lors de la réplication. Le mécanisme de déposition de CENP-A est en réalité découplé de la réplication de l'ADN, et ne se fait qu'une fois la ségrégation des chromosomes achevée, en G1^{123,124}. Le mécanisme de déposition fait principalement intervenir les protéines Mis18 et HJURP et se déroule en trois étapes distinctes : Amorçage (« priming ») du centromère, déposition de CENP-A, maturation de CENP-A.

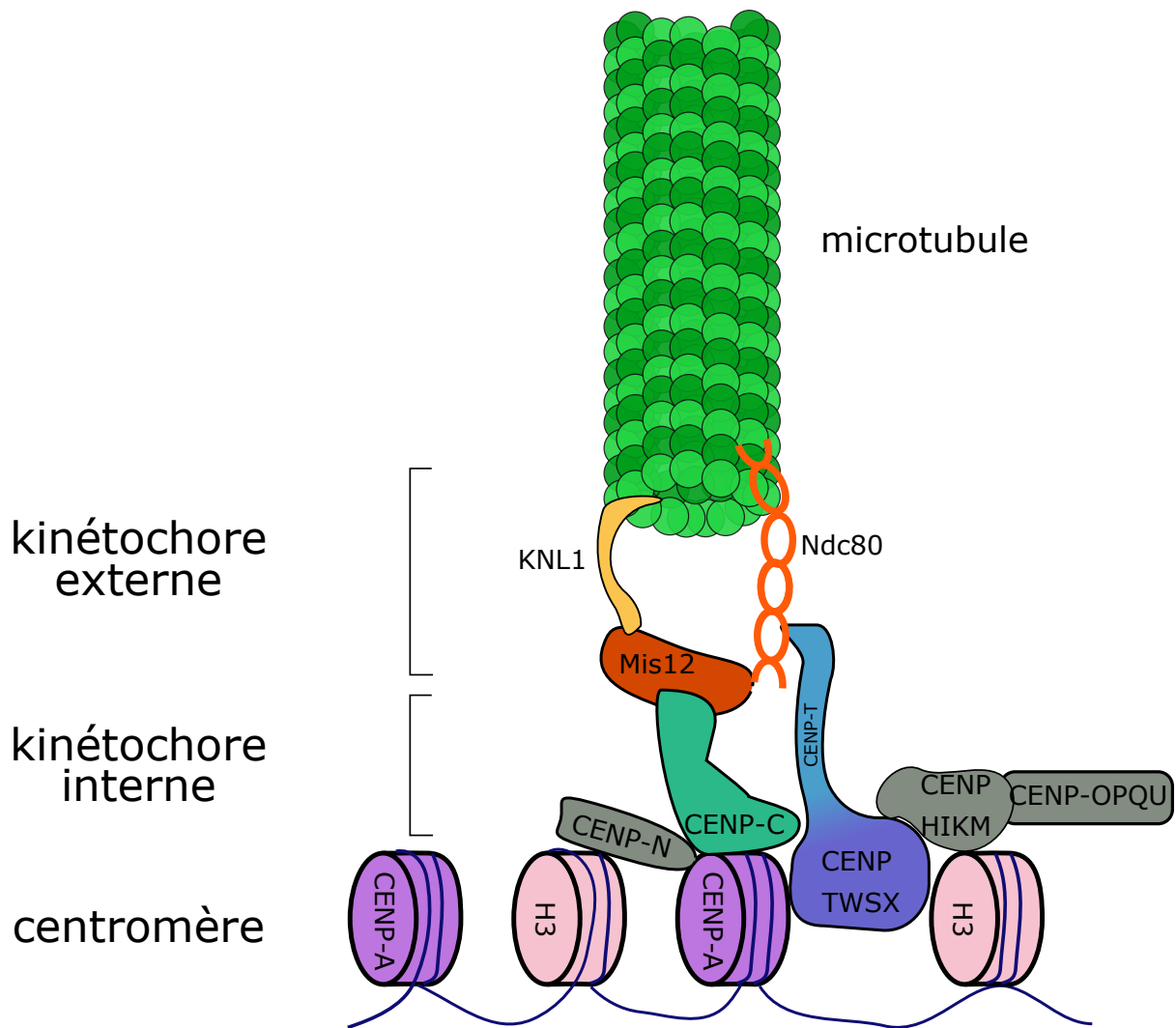


Figure 12 : Structure du kinétochore de vertébré.

Le kinétochore s'associe sur la chromatine centromérique marquée par le variant d'histone CENP-A. Le kinétochore interne, composé d'un grand nombre de protéines, s'y assemble et permet de recruter les protéines du kinétochore externe. Ces dernières permettent l'interaction avec les microtubules.

Structure et Assemblage du kinétochore

Le kinétochore est un complexe moléculaire formé de plus d'une centaine de protéines¹²⁵, et compte parmi les structures protéiques les plus complexes d'une cellule. Dans les années 1980, la caractérisation des protéines du kinétochore a été initiée grâce à la découverte fortuite des auto-anticorps dirigés contre le centromère¹²⁶. Ces anticorps sont produits par des individus souffrant d'un ensemble de manifestations cliniques connues sous le nom de syndrome **CREST** (en anglais : Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactily, Telangiectasia)¹²⁷. Ces anticorps sont en général nommés simplement CREST. Depuis lors, le kinétochore a été extensivement étudié et ses nombreux composants isolés et caractérisés.

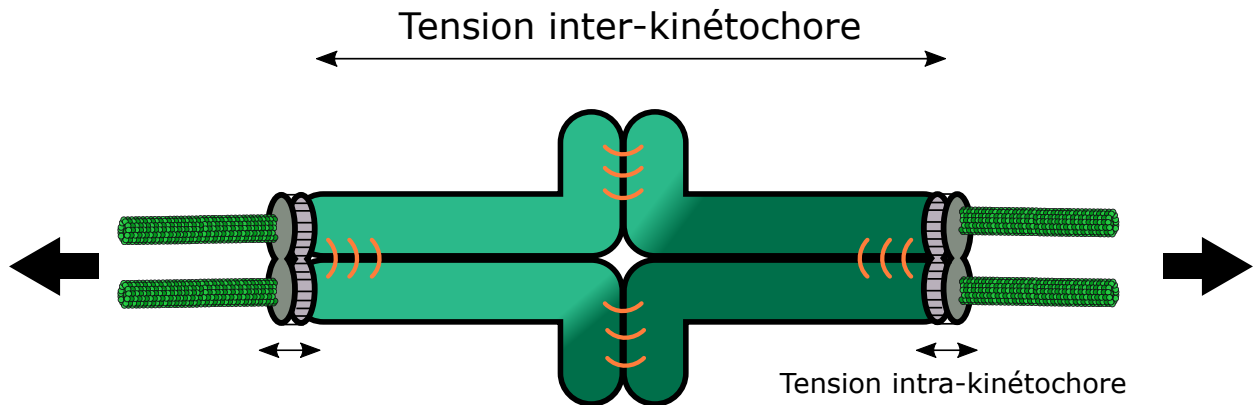
Les premières observations en microscopie électronique à transmission montrent que le kinétochore des vertébrés, se compose de trois parties : une région interne dense accolée à la chromatine, une région intermédiaire peu dense, puis une région externe dense, associée cette fois aux fibres de microtubule¹²⁸.

Le **kinétochore interne** est situé directement sur la chromatine. Il est constitué de protéines constamment associées au centromère, d'où son nom **CCAN** (Constitutive Centromere Associated Network)^{129,130}. Il comprend les quatre complexes CENP-TWSX, CENP-HIKM, CENP-LN et CENP-OPQRU ainsi que les protéines CENP-A, CENP-B et CENP-C.

De toutes ces protéines, seule CENP-B s'associe directement à la chromatine. La protéine CENP-B est capable de se fixer sur des courtes séquences d'ADN de 17pb localisées dans les séquences centromériques composées de répétitions¹³¹. L'assemblage du kinétochore sur la chromatine centromérique repose aussi sur l'interaction des protéines CENP-C et CENP-N avec le variant d'histone CENP-A^{132,133}. Ces protéines établissent une plateforme de recrutement qui va permettre l'association des autres complexes du CCAN au centromère¹³⁴. Le CCAN permet aussi de recruter les protéines qui contrôlent l'attachement des kinétochores aux microtubules¹³⁴.

Le **kinétochore externe** constitue l'interface de liaison entre les microtubules et le kinétochore. Il est composé des protéines **KMN** (Kn1-Mis12-Ndc80)¹³⁵⁻¹³⁷. Le complexe Mis12 permet de recruter les deux autres complexes, Ndc80 et Kn1 via les protéines CENP-C et CENP-T. Le complexe Ndc80 est responsable de la liaison des microtubules. C'est un tétramère composé des protéines Spc24, Spc25, Ndc80 (appelé aussi Hec1) et Nuf2. Au sein du complexe, Hec1 et Nuf2 s'associent ensemble et

MEIOSE I



MEIOSE II / MITOSE

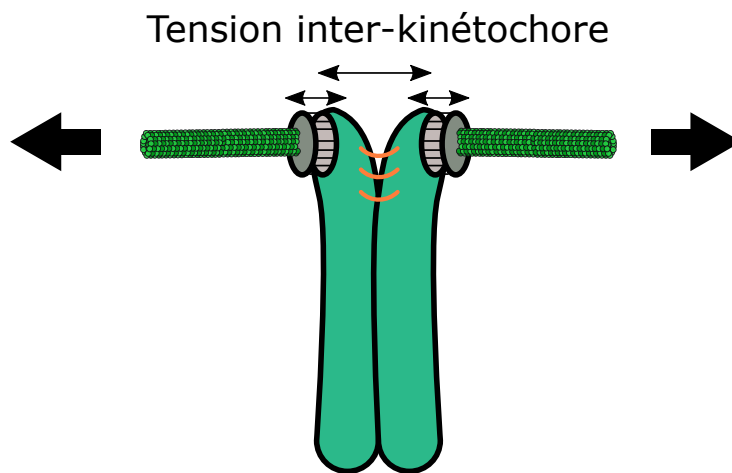


Figure 13 : Forces de tension.

En méiose I, la tension exercée par les microtubules du fuseau aux kinétochores permet de mettre sous tension l'ensemble du bivalent, et il n'existe pas de tension entre les kinétochores frères. En méiose II comme en mitose, les kinétochores frères sont bi-orientés et tirés dans deux directions opposées par les microtubules du fuseau. Par conséquent, il s'exerce une force entre les kinétochores frères. Dans les deux cas, il y a aussi étirement des kinétochores (parfois appelée tension intra-kinétochorienne).

interagissent directement avec les tubulines α et β ¹³⁸⁻¹⁴⁰. Ainsi Hec1 et Nuf2 permettent l'attachement moléculaire des microtubules avec le kinétochore.

Kn1 est une grande protéine qui interagit avec de nombreuses protéines, comme PP1, une phosphatase participant à la régulation des attachements ou encore Bub1, une protéine du point de contrôle du fuseau¹⁴¹.

Chez les métazoaires, le kinétochore externe se compose aussi d'un complexe formé de trois protéines, Rod, Zw10 et Zwilch qui s'associent pour former le complexe « **RZZ** »¹⁴². Ce complexe joue non seulement un rôle dans l'activité du SAC, mais est aussi important pour la capture des kinétochores par les microtubules en prométaphase en localisant protéine Spindly au kinétochore, ce qui assure le recrutement de la dynéine au kinétochore¹⁴³.

Le kinétochore externe est non seulement une interface de liaison avec les microtubules, mais il est aussi associé à des moteurs qui contribuent à la liaison des microtubules et à la congression des chromosomes. De plus, les protéines du point de contrôle du fuseau s'associent temporairement au kinétochore externe. Nous verrons que le complexe passager des chromosomes, le CPC, s'associe aux centromères et permet de coordonner la mise sous tension des chromosomes avec la stabilisation des attachements. C'est pourquoi le kinétochore forme une véritable plateforme qui permet de contrôler l'attachement aux microtubules, le mouvement des chromosomes et la séparation des chromosomes.

4. Attachement des microtubules et tension aux kinétochores

En mitose comme en méiose, au cours de la prométaphase, les microtubules capturent les chromosomes via leurs kinétochores. L'attachement des kinétochores aux microtubules est indispensable pour la congression des chromosomes à la plaque équatoriale ainsi que pour la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase. La capture des kinétochores par les microtubules est un processus aléatoire qui repose sur la dynamique de l'extrémité (+) des microtubules selon le modèle de recherche et capture.

En mitose, chaque kinétochore frère doit être attaché à un pôle opposé du fuseau. Cet attachement est appelé amphitélique et permet une ségrégation correcte des chromatides sœurs. Les kinétochores frères

ne s'attachent pas toujours en même temps, et la plupart des chromosomes passent par un attachement dit monotélique¹⁴⁴. Dans ce cas, seul un kinétochore est attaché, l'autre étant libre. Généralement, les attachements sont initialement latéraux, c'est-à-dire que le kinétochore est associé aux parois d'un microtubule. Les kinétochores peuvent ensuite se déplacer le long d'un microtubule grâce à la kinésine CENP-E, qui se dirige vers l'extrémité (+)¹⁴⁵. La conversion d'un attachement latéral en un attachement terminal (end-on attachement) n'est pas encore bien comprise mais semble nécessiter CENP-E et MCAK¹⁴⁶. Comme on a vu précédemment, la liaison entre l'extrémité (+) des microtubules et le kinétochore fait également intervenir les protéines Hec1 et Nuf2 présentes sur le kinétochore externe.

Lorsque les deux kinétochores frères ont établi un attachement terminal avec des microtubules venant de pôles opposés, les chromosomes oscillent autour de la plaque métaphasique. En effet, un kinétochore (le kinétochore meneur) est tiré vers le pôle avec lequel il est attaché, et par conséquent, l'autre kinétochore (le kinétochore suiveur), s'éloigne de l'autre pôle. Ces oscillations des chromosomes sont observées aussi bien en mitose qu'en méiose¹⁴⁷. C'est la conjonction de la dépolymérisation de l'extrémité (+) des microtubules au kinétochore, de l'activité des moteurs type dynéine tirant les chromosomes vers l'extrémité (-), ainsi que du phénomène du tapis roulant qui permet ce mouvement du kinétochore meneur¹⁴⁸. En effet, ces processus permettent ensemble de générer des forces qui tirent le kinétochore meneur vers un pôle du fuseau. Chez la drosophile, le kinétochore est principalement tiré à cause du flux de microtubules lié au phénomène de tapis roulant vers les pôles, tandis que dans les cellules animales, c'est principalement la dépolymérisation des microtubules qui génère une traction des kinétochores¹⁴⁹. Pour collecter ces forces de traction exercée par les microtubules, il faut que le kinétochore soit capable de maintenir un attachement physique avec les microtubules, même s'il dépolymérise. C'est ce qu'on appelle le couplage. Chez la levure, un complexe en anneau, DAM/DASH, enserre le microtubule et le relie au kinétochore. Lors de la dépolymérisation, l'anneau est poussé par les protofilaments incurvés tout en gardant un lien avec le kinétochore. Dans les cellules animales, aucun homologue n'a été trouvé, mais des études récentes suggèrent que le complexe Ska (Spindle and Kinetochore-Associated complex) pourrait avoir une fonction similaire^{150,151}.

En métaphase, les forces de traction exercées sur chaque kinétochore frère, s'opposent et finissent par s'équilibrer, générant une tension entre les kinétochores frère (**tension inter-kinétochore**) ainsi qu'au sein du kinétochore (**tension intra-kinétochore**)¹⁵² (figure 13).

En méiose, lors de la première division, les kinétochores frères sont mono-orientés et non pas bi-orientés, il n'y a donc pas de tension inter-kinétochore. En revanche, comme les chromosomes homologues sont liés au niveau des chiasmas, c'est l'ensemble du bivalent qui est mis sous tension et on peut supposer que cela suffit pour générer une tension intra-kinétochore¹⁵³. Dans l'ovocyte de souris, l'étirement des kinétochores en méiose I a été observé lorsque les bivalents sont sous tension, mais cet étirement semble moins important qu'en méiose II dans l'ovocyte de souris⁷.

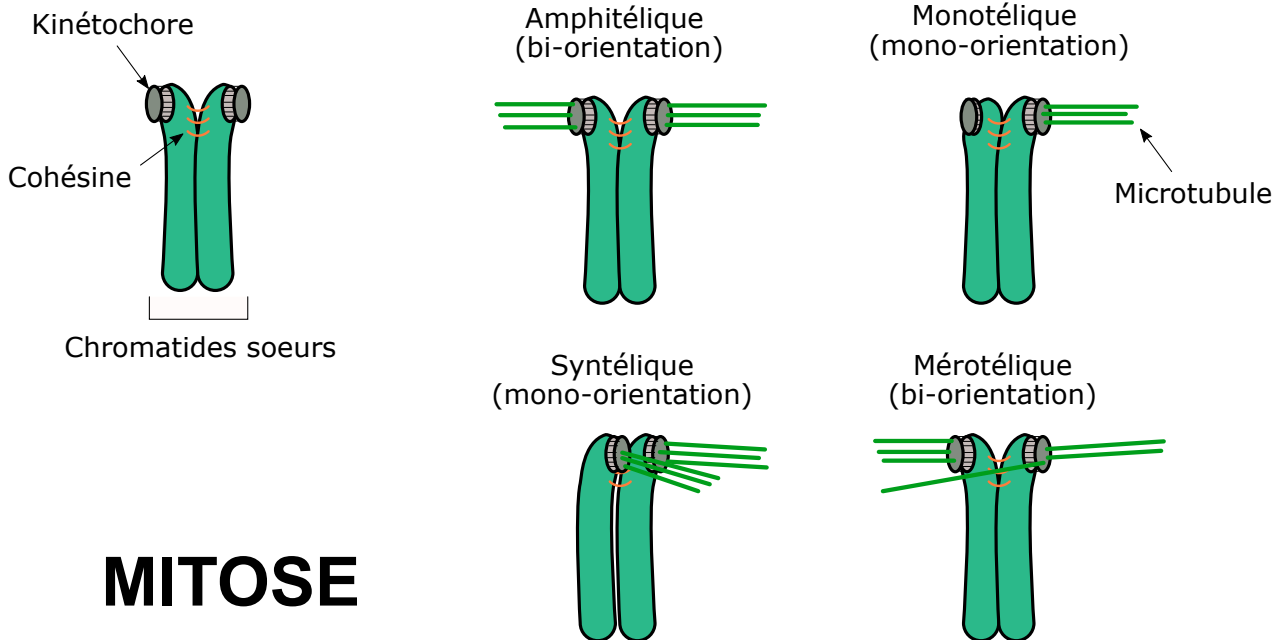
5. Correction des erreurs d'attachement

Les différents types d'attachement en mitose et en méiose

En mitose, pour permettre la bi-orientation des chromatides sœurs, les deux kinétochores frères doivent s'attacher à des microtubules de pôles opposés (attachement **amphitélique**). Comme la capture des kinétochores par les microtubules est un processus aléatoire, il peut arriver que les deux kinétochores frères s'attachent au même pôle du fuseau (attachement **syntélique**) ou même qu'un même kinétochore soit attaché simultanément aux deux pôles (attachement **mérotélique**)¹⁵⁴. Ces attachements ne permettent pas une ségrégation correcte des chromosomes en mitose. Il existe dans la cellule un mécanisme conservé de correction de ces erreurs qui permet la bi-orientation des chromosomes¹⁵⁵.

En méiose I, ce sont les chromosomes homologues qui doivent être bi-orientés. Ceci implique que les kinétochores frères d'un chromosome homologue doivent être mono-orientés vers un des pôles et ceux de l'autre chromosome vers l'autre pôle. Ainsi, l'attachement amphitélique des kinétochores frères comme en mitose n'est pas un attachement correct en méiose¹⁵⁴ (figure 14).

Dans des ovocytes de souris, l'attachement initial des chromosomes est très souvent mauvais et ne permet pas une bi-orientation correcte des chromosomes homologues. On estime qu'il y a en moyenne trois cycles de correction, c'est à dire que chaque kinétochore se détache trois fois, au cours de la méiose I avant d'établir un attachement correct. Ces cycles répétés d'attachement et de détachement génèrent des oscillations de forte amplitude dans l'ovocyte en fin de prométaphase¹¹⁶. Finalement, en métaphase, les chromosomes qui parviennent à se bi-orienter correctement sont stabilisés et sont alignés sur la plaque métaphasique.



MITOSE

MEIOSE I

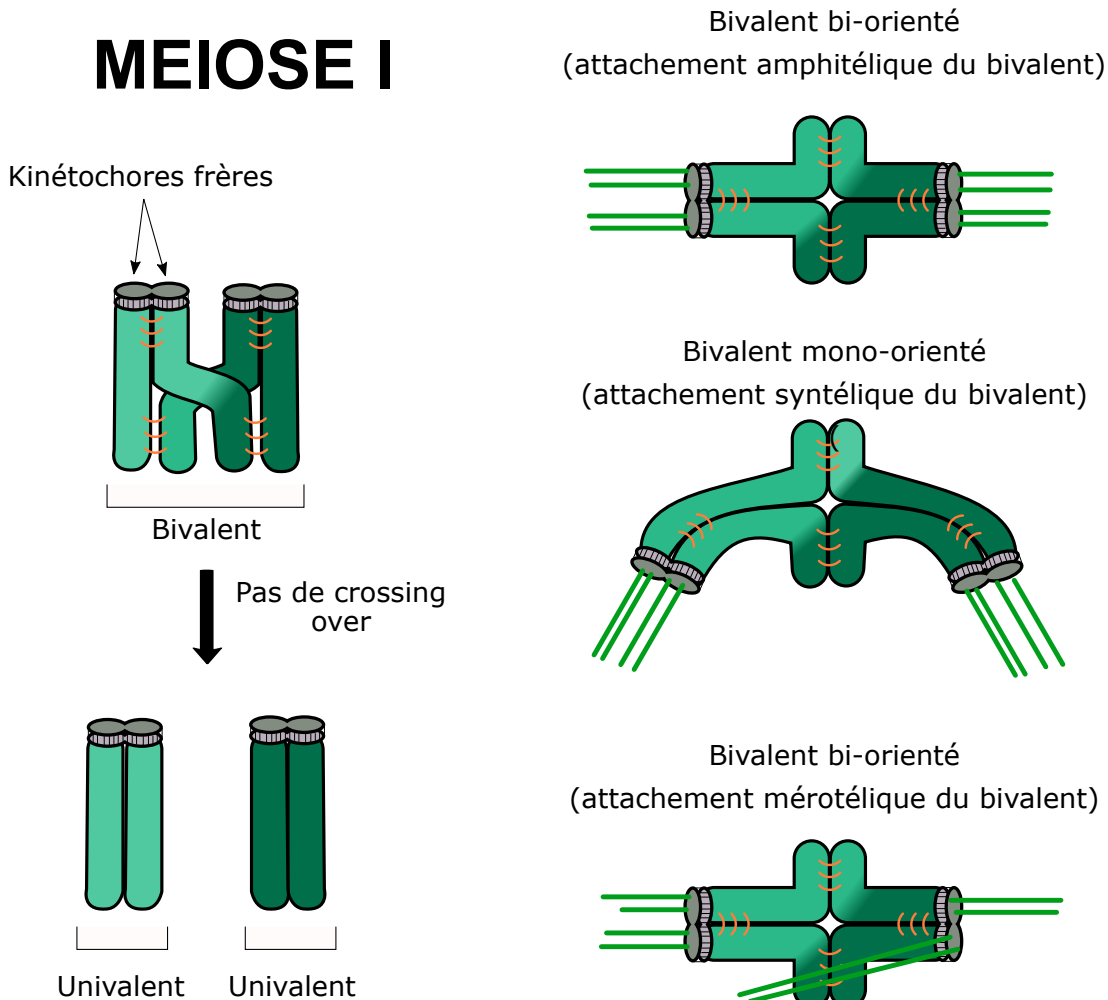


Figure 14 : Les différents types d'attachement en mitose et en méiose I. En mitose, les kinétochores frères sont normalement attachés aux deux pôles opposés du fuseau (bi-orientation). En méiose, les kinétochores frères sont mono-orientés (on dit aussi co-orientés) et doivent être attachés au même pôle du fuseau..

Le complexe passager des chromosomes

Le complexe passager des chromosomes, ou CPC, joue un rôle déterminant dans la régulation des attachements entre les microtubules et les kinétochores en mitose comme en méiose. C'est un complexe formé de quatre protéines, Aurora B, INCENP, Boréoline et Survivine¹⁵⁶. La localisation du complexe change au cours de la mitose, passant du centromère en métaphase à la région intermédiaire du fuseau lors de l'anaphase, ce qui explique son nom de complexe « passager ». La localisation cellulaire du CPC repose sur un module composé des protéines Boréoline, Survivine et INCENP. Ces trois protéines sont étroitement liées au sein d'une région structurée du centromère qui permet l'assemblage du complexe. La localisation au centromère du complexe est indispensable à sa fonction en mitose dans les cellules animales^{157,158}. Son recrutement au centromère dépend de la reconnaissance de deux marques épigénétiques, l'histone H3T3 et l'histone H2AT120¹⁵⁹. La superposition de ces deux marques n'a lieu qu'au centromère, ce qui permet un recrutement important du CPC à cet endroit. La kinase Aurora B n'est active que lorsqu'elle est associée à INCENP. L'activité kinase résultante est faible mais permet à Aurora B de s'auto-activer par une phosphorylation en trans sur la thréonine 232¹⁶⁰.

Le CPC est un régulateur des attachements entre microtubule et kinétochore. Chez la levure où ce complexe a été caractérisé en premier, l'homologue d'Aurora B est Ipl1 (Increase in Ploidy 1). La délétion du gène IPL1 entraîne une hausse des aneuploïdies mais n'induit pas un arrêt en mitose¹⁶¹. Chez ces mutants, l'attachement avec les microtubules n'est pas affecté par la délétion de Ipl1, mais en revanche de nombreux chromosomes échouent à se bi-orienter correctement^{162,163}. Chez les mammifères, Aurora B joue le même rôle. L'inhibition de son activité kinase par des inhibiteurs spécifiques entraîne de nombreux défauts d'orientation des chromosomes^{164,165}.

La régulation des attachements se fait principalement via Hec1, bien qu'Aurora B cible de nombreuses protéines du complexe KMN¹⁶⁶. L'affinité de Hec1 pour les microtubules dépend étroitement de l'état de phosphorylation de son domaine N-terminal. Lorsque Aurora B phosphoryle ces sites, l'affinité de Hec1 pour les microtubules est réduite et l'attachement perdu^{167,168}. Aurora B contrôle aussi la stabilisation des attachements en régulant la kinésine dépolymérisante MCAK. Aurora B est nécessaire pour recruter MCAK au kinétochore, et il semble que MCAK puisse déstabiliser les attachements incorrects en favorisant la dépolymérisation des microtubules mal attachés¹⁵⁵.

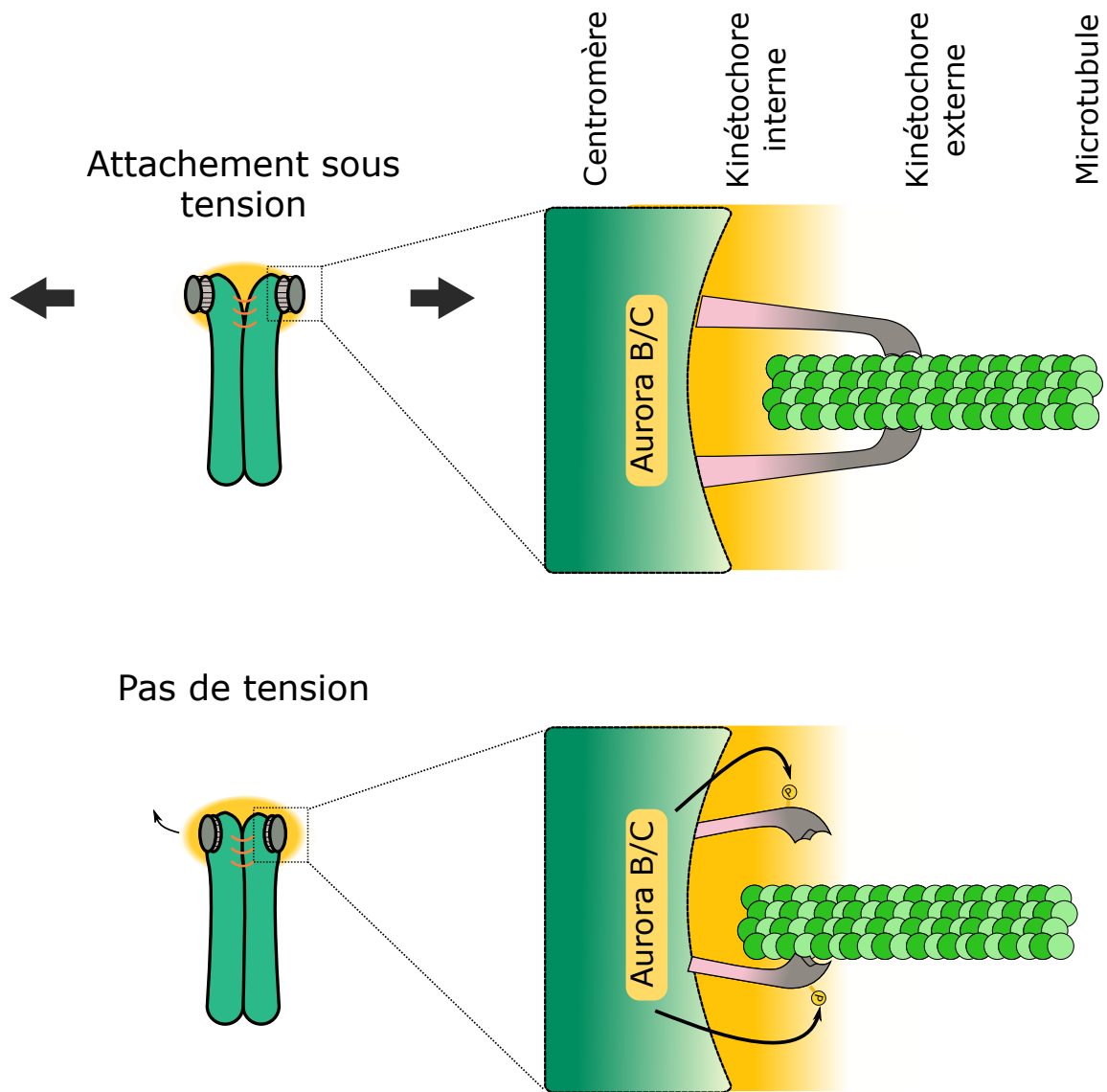


Figure 15 : Régulation des attachements par la tension et la kinase Aurora B/C.e. *Sous tension, le kinétochoire est étiré et Aurora B/C n'est pas capable de phosphoryler les protéines du kinétochoire externe, l'attachement est stable. Lorsque l'attachement est impropre, l'étirement du kinétochoire est moindre et il n'y a pas de tension. En conséquence, Aurora B/C peut phosphoryler ses cibles et déstabilise l'attachement du microtubule au kinétochoire.*

Différents modèles expliquent comment Aurora B est contrôlée, mais tous s'accordent sur le rôle prédominant de la tension¹⁶⁹. Dans la version la plus courante, la localisation d'Aurora B au centromère génère un gradient de phosphorylation vers le kinétochore externe. Lorsque les kinétochores ne sont pas sous tension, Aurora B est capable de phosphoryler le complexe KMN et réduit l'affinité des kinétochores pour les microtubules. Après bi-orientation des chromatides sœurs en mitose, la tension générée permet d'éloigner les kinétochores des centromères, et donc éloigne le complexe KMN du gradient d'Aurora B. Ainsi, Aurora B ne peut plus phosphoryler les complexes KMN, et l'attachement des microtubules est stabilisé (figure15). En effet, il est clairement établi que la tension permet de stabiliser les attachements^{170,171}. Les attachements qui ne peuvent générer une tension suffisante, comme les attachements syntéliques ou mérotéliques, sont déstabilisés¹⁶⁹. Aussi, la cinétique de phosphorylation de Hec1 est corrélée à l'activité d'Aurora B : Hec1 est phosphorylée en prométaphase et déphosphorylée progressivement jusqu'en métaphase¹⁶⁸ au fur et à mesure que des attachements corrects sous tension s'établissent.

Cependant, la manière dont le gradient est formé sur une aussi courte distance que l'échelle du kinétochore fait débat¹⁶⁹. D'autant plus que la localisation du CPC au centromère ne semble pas nécessaire à la correction des erreurs d'attachements chez la levure¹⁷².

Rôles d'Aurora B et C en méiose

Comme nous l'avons vu, la mono-orientation des kinétochores frères en méiose I implique la création d'une tension différente de la mitose. De plus, à l'inverse de la mitose, l'attachement synthétique des kinétochores frères est considéré comme correct alors que l'attachement amphitélique comme incorrect. Ainsi, si le mécanisme de correction des erreurs d'attachement est régulé de la même manière en méiose I est une question pertinente.

En méiose, il existe une troisième kinase de la famille Aurora appelée Aurora C, très apparentée à Aurora B¹⁷³. Aurora C, dont l'expression est essentiellement restreinte aux cellules germinales, pourrait donc être régulée différemment d'Aurora B pour permettre une correction des erreurs en méiose I¹⁷⁴. Cependant, leur similarité de séquence et de structure les rend difficile à distinguer en méiose, puisque la majorité des études sur le rôle d'Aurora B et C utilisent des molécules inhibitrices de la fonction kinase et ces drogues ne montrent pas de spécificité envers l'une ou l'autre de ces kinases¹⁷³. Le rôle de l'une par rapport à l'autre dans le mécanisme de correction des erreurs d'attachement n'étant pas clairement établi, je parlerai d'Aurora B/C concernant la méiose.

Dans l'ovocyte de souris, les chromosomes subissent plusieurs cycles de correction lors de la prométaphase¹¹⁶. Cependant en méiose I, Aurora B/C est colocalisée avec le kinétochore, même lorsque les chromosomes sont sous tension. Ainsi, Aurora B/C pourrait corriger des attachements même correctes en prométaphase I⁷. La stabilisation des attachements en métaphase dépendrait alors de l'inhibition progressive de Aurora B/C indépendamment de la tension.

Cependant de nombreuses études suggèrent que la présence d'un pool d'Aurora B/C au centromère reste indispensable à l'alignement des chromosomes et leur attachement correct en méiose I¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

LE POINT DU CONTROLE DU FUSEAU (SAC)

En mitose comme en méiose, le déclenchement de l'anaphase est un événement très synchronisé qui doit être finement régulé pour éviter les erreurs de ségrégation.

La séparation des chromosomes est déclenchée par l'activation de l'APC/C dont nous avons vu le rôle pour adresser des protéines spécifiques au protéasome. Le point de contrôle du fuseau va jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'APC/C pour coordonner le déclenchement de l'anaphase avec l'attachement et l'alignement de tous les chromosomes.

1. Transition métaphase-anaphase

En mitose, en métaphase, les chromatides sœurs sont bi-orientées et alignées sur la plaque métaphasique. La séparation des chromatides sœurs est initiée par le clivage des cohésines qui les maintiennent ensemble. En conséquence, il n'existe plus aucun lien physique entre les chromatides sœurs, et les forces opposées exercées par les microtubules du fuseau parviennent à les tirer vers chacun des pôles.

En méiose, il existe une sous-unité des cohésines spécifique, appelée Rec8, nécessaire sur les centromères pour lier les chromatides sœurs ensemble et au niveau des bras pour maintenir les chiasmas et donc les chromosomes homologues ensemble. Lorsqu'une forme mutée de Rec8 sensible à une protéase TEV est exprimée dans les ovocytes de souris, l'ajout de la TEV protéase permet immédiatement la résolution des chiasmas et la séparation des chromosomes homologues et des chromatides sœurs¹⁷⁸. Cependant, en méiose, seules les cohésines présentes sur les bras des chromosomes sont clivées en anaphase I pour permettre la séparation des chromosomes homologues, et les cohésines centromériques ne sont clivées qu'en méiose II pour séparer les chromatides sœurs. En méiose I, Rec8 est « protégée » au niveau des centromères. Ainsi, elle n'est pas clivée aux centromères, ce qui empêche la séparation des chromatides sœurs en méiose I⁴⁷.

En mitose et en méiose, c'est l'activation de la séparase qui permet le clivage des cohésines lors de l'anaphase^{45,75,179}. En prométaphase, la séparase est maintenue inactive à cause de sa liaison avec la sécurine, qui agit comme un inhibiteur de la séparase. A la transition métaphase-anaphase, la séparase est activée suite à la dégradation de la sécurine. Ainsi, l'expression d'une forme de sécurine non

dégradable empêche la ségrégation des chromosomes homologues dans l'ovocyte de souris¹⁸⁰. La séparase est également inhibée par Cdk1-cycline B, et il a été montré que la dégradation de la cycline B est nécessaire pour l'activation de la séparase¹⁸¹.

La cycline B est dégradée lors de la transition-métaphase anaphase, pour permettre la sortie de la mitose ou de la méiose I. En effet, en mitose, la dégradation de la cycline B permet l'inactivation du MPF. La déphosphorylation des substrats du MPF comme les lamines ou les histones, permet un retour à l'interphase. Le fuseau se désorganise, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reconstitue. Contrairement à la mitose, la dégradation de la cycline B n'est pas totale en méiose I. Ceci est essentiel pour éviter une phase S intermédiaire. Ainsi, à la fin de la méiose I, les chromatides sœurs s'alignent aussitôt sur le fuseau de métaphase II qui se forme juste après l'anaphase I sans décondensation des chromosomes ni reformation de l'enveloppe nucléaire.

La dégradation de ces deux protéines clés, la sécurine et la cycline B, est directement médiée par l'APC/C^{Cdc20}, qui les adresse au protéasome³³. La synchronisation entre l'attachement correct de tous les chromosomes et l'anaphase dépend du point de contrôle du fuseau. Ce point de contrôle permet l'activation de l'APC/C^{Cdc20} uniquement lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés et sous tension (figure 16).

2. Les protéines du SAC

Il est primordial d'éviter une activation précoce de l'APC/C tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés en métaphase, car sinon ceux-ci peuvent ségréger du même côté et créer des aneuploïdies. C'est le point de contrôle du fuseau ou SAC (Spindle Assembly Checkpoint) qui permet de contrôler que l'anaphase ne démarre pas tant que tous les chromosomes ne sont pas tous correctement attachés au fuseau. Pour cela, le SAC maintient l'APC inactif afin d'empêcher la dégradation de la sécurine et de la cycline B.

Le SAC a été identifié chez la levure au début des années 1990^{182,183}, comme un mécanisme qui inhibe la sortie de mitose lorsque le fuseau est altéré au moyen de drogues agissant sur les microtubules, comme le bénomyl. C'est pourquoi il a été nommé point de contrôle du fuseau même si nous allons voir que

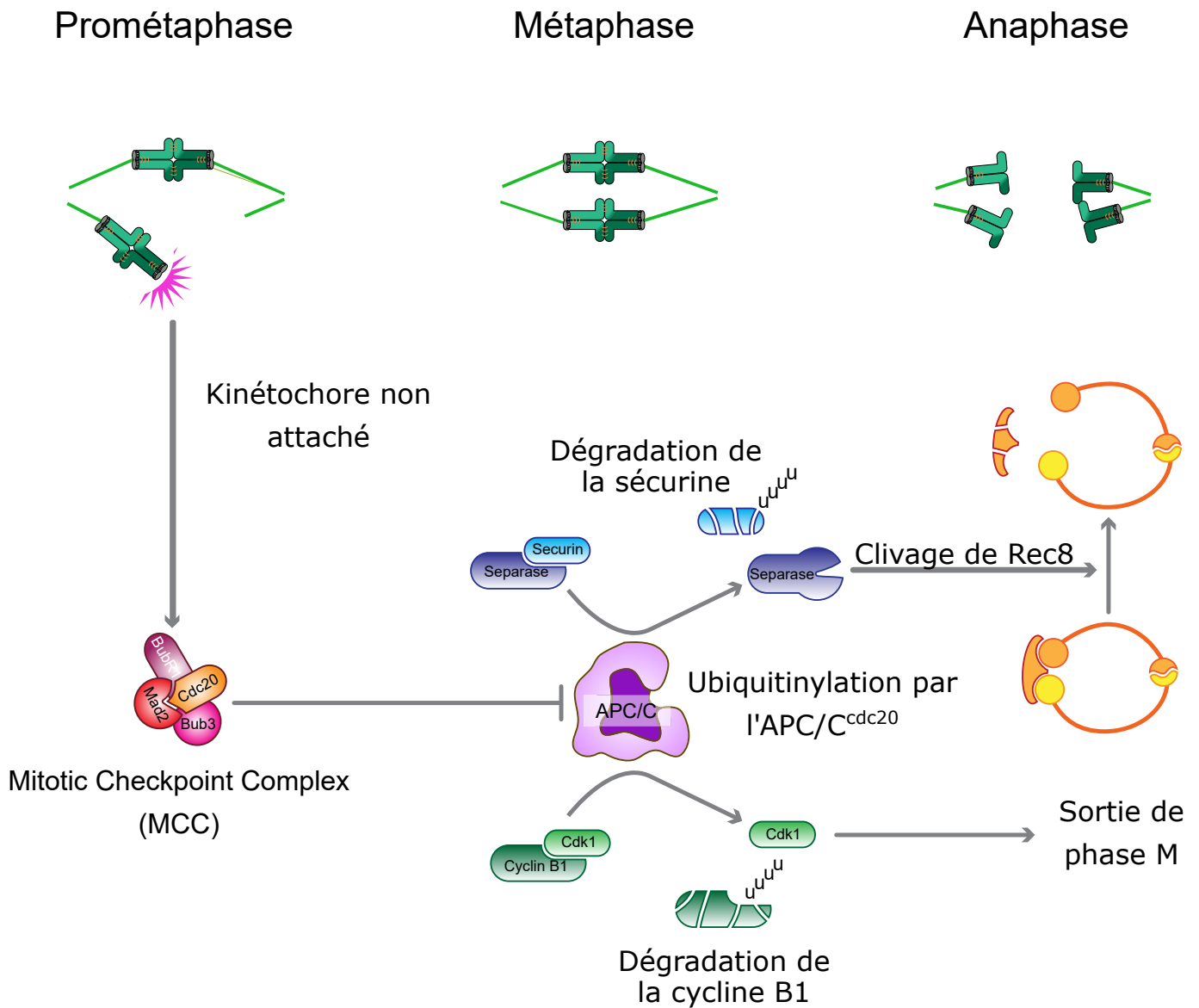
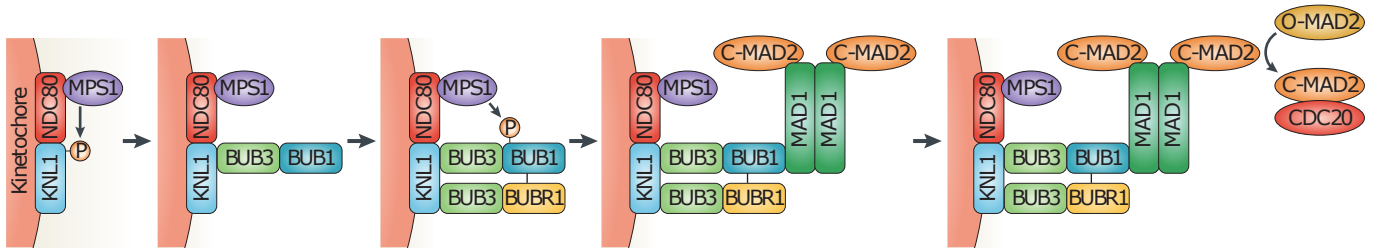


Figure 16 : Régulation de la transition métaphase-anaphase par l'APC/C. Un kinétochore non attaché génère un signal inhibiteur de l'APC/C, le MCC. Lorsque les chromosomes sont correctement attachés et mis sous tension, l'APC/C est actif et permet de diriger la dégradation de la sécurine et de la cycline B1. En conséquence, la séparase n'est pas inhibée par la sécurine et peut cliver les cohésines, ce qui permet la ségrégation des chromosomes. Aussi, la dégradation de la cycline B1 fait chuter l'activité MPF et permet la sortie de la phase M. (adapté de Lara-gonzalez, 2012)

Recrutement du SAC



Inhibition de l'APC/C par le MCC

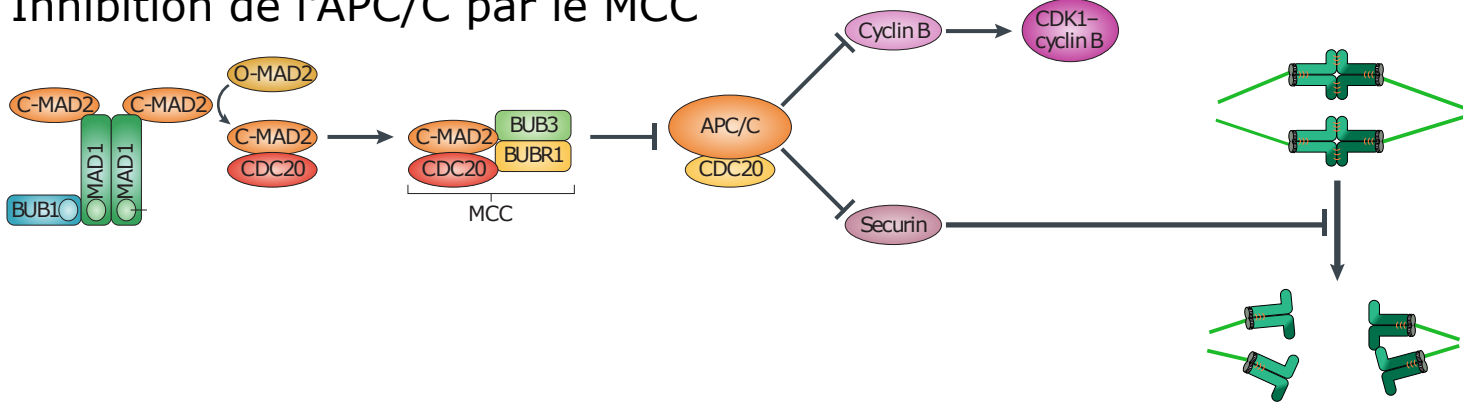


Figure 17 : Recrutement du SAC et inhibition de l'APC/C^{cdc20}

Le recrutement des protéines du SAC est un processus multi-étape, initié par le recrutement de la kinase Mps1 sur le kinétochore externe. Le recrutement séquentiel des protéines du SAC permet de former le complexe inhibiteur de l'APC/C^{cdc20}, le MCC, qui permet de retarder la ségrégation des chromosomes et la dégradation de la cycline B. (figure d'après London et Biggins 2014)

hautement dynamique et peut se dissocier rapidement du kinétochore. Il a été montré en mitose que lorsque le kinétochore est sous tension, Mps1 perd son affinité pour Hec1 à cause de la perte des phosphorylations de Hec1 par Aurora B. Ainsi, la tension permet d'empêcher le recrutement de Mps1 et permet la stabilisation des attachements¹⁹³.

Le recrutement de Mps1 s'effectue au kinétochore sur deux protéines du complexe Ndc80. D'une part, Mps1 se lie à Hec1 avec son domaine NTE (N-Terminal Extension). Cette interaction entre directement en compétition avec l'attachement de Hec1 avec les microtubules, puisque la tubuline et le domaine NTE se lient à la séquence CH (Calponin Homology) de Hec1. D'autre part, Mps1 se lie à la protéine Nuf2, cette fois via le domaine MR (Middle Region)^{194,195}. Une fois Mps1 localisée au kinétochore, elle phosphoryle directement la protéine Knl1 sur des motifs conservés, les motifs MELT¹⁹⁶. La protéine Knl1 joue ensuite le rôle de plateforme en permettant le recrutement de Bub3 sur ces motifs MELT. Bien qu'il existe une douzaine de sites MELT sur Knl1 chez l'homme, il n'est pas nécessaire qu'ils soient tous phosphorylés pour l'activité du SAC¹⁹⁷.

Bub3 joue un rôle d'adaptateur au kinétochore et permet de localiser deux autres protéines du SAC, Bub1 et BubR1. Ces deux protéines se lient à Bub3 via un domaine GLEBS. Le dimère formé par Bub3 et Bub1 au kinétochore est crucial dans le recrutement des autres protéines du SAC. Bub1 est une protéine kinase mais cette fonction n'est pas nécessaire à l'activité du SAC¹⁹⁸. Elle permet de stabiliser l'interaction entre Bub3 et Knl1 et de recruter la protéine Mad1. BubR1 est une kinase qui forme aussi un dimère avec Bub1. Parallèlement à son rôle dans le SAC, elle participe à la stabilisation des attachements kinétochore-microtubules en recrutant la phosphatase PP2A-B56 qui contrecarre les phosphorylations par Aurora B¹⁹⁹⁻²⁰¹. Finalement, c'est la localisation de Bub1 et sa phosphorylation par Mps1 au kinétochore qui permet de localiser les protéines Mad1 et Mad2^{202,203}.

Les protéines Mad1 et Mad2 vont s'associer au kinétochore en complexe tétramérique qui catalyse le changement de conformation de la protéine Mad2²⁰⁴. Cette étape est indispensable pour former le complexe inhibiteur de l'APC/C : le MCC (« Mitotic Checkpoint Complex ») formé de l'association des protéines BubR1, Mad2, Cdc20 et Bub3^{205,206}.

Le recrutement des protéines du SAC aux kinétochores non attachés est très dynamique. Par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), une étude a permis d'étudier la demi-vie aux kinétochores des protéines du SAC. Ainsi, les protéines du MCC comme Cdc20 ou BubR1 ont une demi vie de quelques secondes aux kinétochores, de la même manière, Mad2 et Bub3 ont une

cinétique rapide de l'ordre de 20-22 secondes^{207,208}. En revanche, Mad1 est beaucoup moins dynamique, et près de 70% du Mad1 reste stable aux kinétochores, ce qui est cohérent avec son rôle de catalyseur aux kinétochores pour produire le MCC.

4. Inhibition de l'APC/C^{Cdc20}

L'inhibition de l'APC/C^{Cdc20} passe principalement par la séquestration par le MCC du cofacteur Cdc20, indispensable pour l'activité de l'APC/C^{Cdc20}²⁰⁹⁻²¹¹. L'assemblage du MCC nécessite que la protéine Mad2 adopte une conformation dite Fermée (C-Mad2, Closed), qui permet sa fixation à Cdc20²¹². Cette transition de la forme « ouverte » inactive (O-Mad2, Open) à la forme « fermée » active (C-Mad2, Closed) est catalysée au kinétochore non attaché par un mécanisme appelé « template model ». Dans ce modèle, c'est la présence des dimères Mad1-C-Mad2 au kinétochore qui catalyse le changement de conformation du stock de O-Mad2 cytoplasmique²¹³⁻²¹⁵. Le changement O-Mad2 vers C-Mad2 peut se dérouler indépendamment des kinétochores mais nécessite plusieurs heures^{215,216}. Son mécanisme est mal connu mais est probablement similaire aux protéines prions, capables elles aussi de catalyser leur changement de conformation. La forme O-Mad2 n'est pas convertie en C-Mad2 par le pool de C-Mad2 cytoplasmique, mais par le pool lié à Mad1 au kinétochore²¹⁷⁻²¹⁹.

Non seulement le MCC empêche l'activité de l'APC/C^{Cdc20} en séquestrant le coactivateur Cdc20, mais il est aussi capable d'inhiber directement l'APC/C^{Cdc20}. Le MCC interagit avec l'APC/C au niveau des sites de reconnaissance de ses cibles, et empêche l'APC/C^{Cdc20} de lier ses substrats^{220,221}.

L'activation complète de l'APC/C^{Cdc20} en méiose ne dépend pas que de la levée de l'inhibition du MCC. Par exemple, la kinase PLK1 (Polo Like Kinase 1), permet d'induire la dégradation de l'inhibiteur de l'APC/C^{Cdc20} Emi1 dans l'ovocyte de souris. Aussi, CDK1 phosphoryle directement l'APC/C et permet d'activer l'APC/C^{222,223}. La combinaison de ces trois facteurs, dégradation de Emi1, du MCC et activation par CDK1 permet une activation complète de l'APC/C^{Cdc20}.

5. Rôle controversé de Aurora B dans le SAC

Les kinases de la famille Aurora sont impliquées dans un grand nombre d'évènements de la mitose. Il y a deux membres chez les métazoaires, Aurora A et B, ainsi qu'un troisième membre chez les vertébrés, Aurora C, qui est exprimé spécifiquement en méiose²²⁴⁻²²⁶.

Nous avons vu qu'Aurora B est au centre du mécanisme de correction des erreurs d'attachement en induisant le détachement des microtubules attachés aux kinétochores de manière incorrecte. Ainsi, en générant des kinétochores non attachés, Aurora B contribue indirectement à l'activation du SAC. Cependant, en mitose, Aurora B est aussi impliquée directement dans l'activité du SAC en phosphorylant les protéines du kinétochore externe permettant le recrutement, l'assemblage et l'activation des protéines du SAC^{166,167,227,228}.

En effet, Aurora B permet de favoriser la liaison de Mps1 aux kinétochores, probablement en phosphorylant Mps1 sur les sites d'interaction avec Hec1²²⁹. Comme Mps1 est aussi impliquée dans la localisation d'Aurora B, il est possible que Mps1 et Aurora B constituent une boucle de régulation positive, qui permet la localisation rapide de Mps1 et Aurora B au début de la prométaphase pour coordonner le délai induit par le SAC et la correction des erreurs d'attachement^{229,230}. Aurora B est aussi importante pour stimuler le recrutement du complexe RZZ en phosphorylant ZWINT1^{231,232}.

Des auteurs ont suggéré qu'Aurora B est impliquée directement dans l'activation du point de contrôle du fuseau indépendamment de son rôle dans la correction des erreurs d'attachement^{229,233}. En effet, lorsque les kinétochores sont détachés suite à de fortes concentrations de nocodazole, l'inhibition d'Aurora B permet de réduire le temps passé en mitose dans ces cellules^{229,233}.

Deux problèmes cependant sont à noter : d'une part, l'inhibition d'Aurora B a lieu avant même l'entrée en mitose. Or, Aurora B est nécessaire au recrutement de certaines protéines du kinétochore externe comme Mis12, en phosphorylant les sérines 100 et 109²³⁴. Donc on peut se demander si les kinétochores peuvent seulement être assemblés. D'autre part, plusieurs études ont montré que l'inhibition d'Aurora B seule permet d'empêcher la réponse du SAC lorsque les cellules sont traitées au taxol, qui réduit la tension aux kinétochores²³⁵⁻²³⁷. Or le modèle proposé par Santaguida et al., où Aurora B est indispensable pour l'activité du SAC, ne permet pas d'expliquer pourquoi l'inhibition simultanée d'Aurora B et Mps1 n'a pas un effet supérieur à l'inhibition d'Aurora B ou Mps1 seule dans les cellules traitées au Taxol.

Une étude plus récente montre que Aurora B n'est pas essentielle pour recruter les protéines du SAC suite à un traitement au nocodazole²³⁸. De plus, en présence d'un inhibiteur d'Aurora B, les cellules traitées au nocodazole restent bloquées en métaphase²³⁸. En revanche l'inhibition d'Aurora B suivie d'un traitement au taxol diminue significativement le recrutement des protéines du SAC au kinétochore. Les auteurs proposent que le rôle d'Aurora B est de maintenir les protéines du SAC au kinétochore en inhibant le transport rétrograde des protéines du SAC le long des microtubules²³⁸. Ceci expliquerait donc pourquoi l'inhibition d'Aurora B en présence de microtubules permet de contourner le SAC. Une autre hypothèse, qui n'est pas exclusive, est que Aurora B permet de détecter la baisse de tension induite par le Taxol et permet de générer des kinétochores non attachés, ce qui recruterait les protéines du SAC.

6. Extinction du SAC

L'activation du SAC suite à des erreurs d'attachement doit être rapide, mais l'inhibition de l'APC/C par le SAC doit pouvoir être levée de manière aussi dynamique après l'attachement du dernier kinétochore. Les mécanismes permettant l'extinction du SAC (silencing) sont encore assez mal compris, mais plusieurs voies sont désormais connues (figure 18).

La première voie repose sur le transport rétrograde des protéines du SAC, du kinétochore vers les pôles. En effet, les protéines du SAC sont localisées aux kinétochores non attachés, et il est clair que l'extinction du SAC est liée à la perte de ces protéines aux kinétochores suite à leur attachement à des microtubules²³⁹. L'étude de la dynamique des protéines du SAC dans des cellules *in vivo* ont montré que non seulement elles sont localisées aux kinétochores non attachés, mais surtout qu'elles sont transportées sur les microtubules depuis les kinétochores jusqu'aux pôles du fuseau. La dynéine, dont nous avons vu le rôle majeur dans l'assemblage du fuseau, permet le transport des protéines du SAC vers les pôles via les microtubules^{239,240}. Cette fonction est essentielle à l'extinction du SAC, puisque la délétion de la dynéine bloque les cellules en métaphase. Dans les cellules animales, la localisation de la dynéine aux kinétochore requiert le complexe RZZ¹⁴².

Le retrait des protéines du SAC par le transport rétrograde des protéines permet d'empêcher la production de nouveaux complexes MCC. Il existe aussi plusieurs mécanismes qui permettent de désassembler le MCC déjà formé. Par exemple, la protéine p31^{comet} désassemble le MCC en

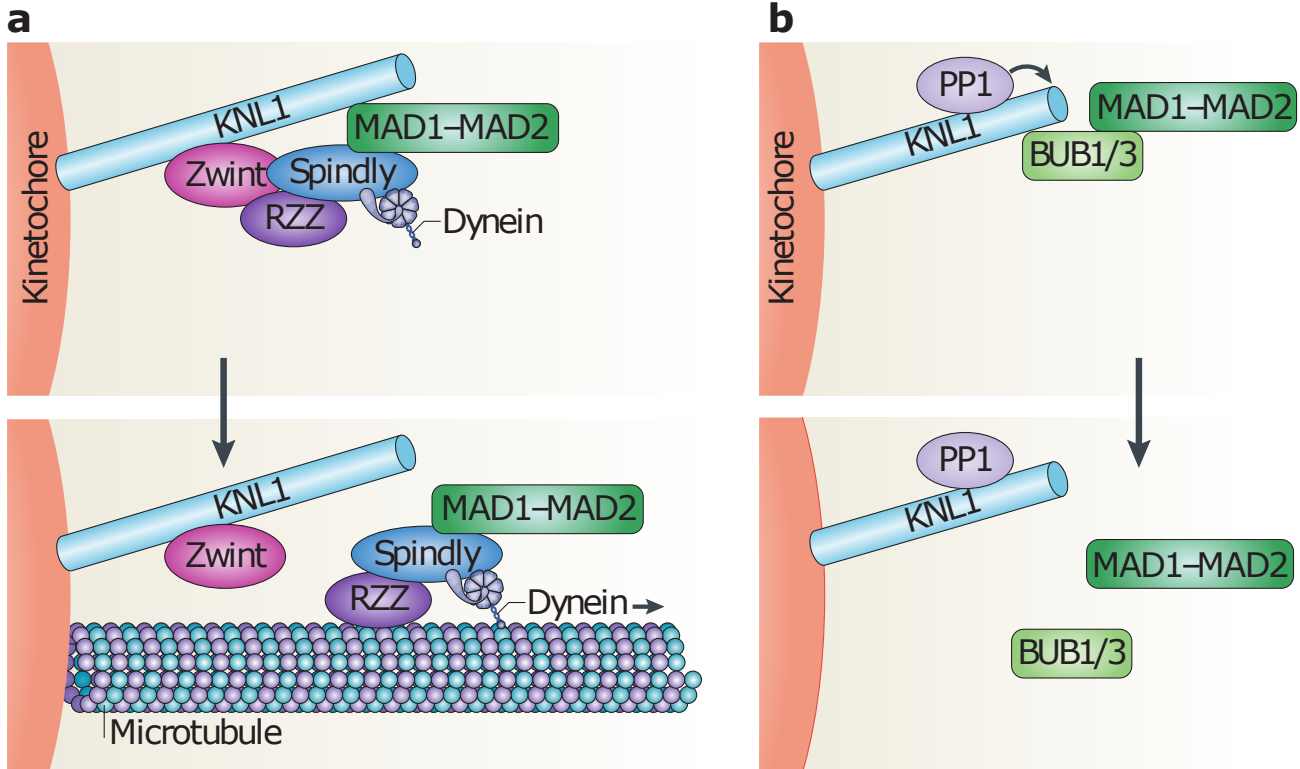


Figure 18 : Extinction du SAC.

Lorsque les kinétochores sont attachés aux microtubules, il y a transport rétrograde des protéines du SAC par la dynéine et le complexe RZZ et Spindly. L'extinction du SAC passe aussi par le recrutement de phosphatases au kinétochoire, comme PP1 (figure d'après London et Biggins, 2014).

interagissant avec C-Mad2²⁴¹. La protéine p31^{comet} s'associe de manière très dynamique au MCC, tout au long de la mitose. Cela permet probablement de favoriser le désassemblage rapide du MCC dès que la vitesse de formation du MCC par les kinétochores diminue après attachement des microtubules. Ceci confère une dynamique très réactive au mécanisme d'extinction du SAC.

L'activité du SAC et la stabilisation des attachements sont étroitement liées par un ensemble de boucles de régulation faisant intervenir des kinases et des phosphatases. Le rôle des phosphatases est de contrebalancer l'action des kinases au kinétochore. Deux phosphatases jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'activité du SAC : PP1 (Protein Phosphatase 1) et PP2A (Protein Phosphatase 2 A)¹⁹⁸.

Le rôle de PP1 en mitose consiste à retirer les phosphorylations induites par Aurora B au niveau du kinétochore externe. En particulier, PP1 déphosphoryle les domaines MELTs de Knl1^{196,242,243}, ce qui contribue à retirer les protéines du SAC du kinétochore²⁴⁴. PP2A, liée à la sous-unité régulatrice B56, est recrutée aux kinétochores par son interaction avec BubR1 via le domaine KARD^{199,200,245}. PP2A-B56 permet de s'opposer aux phosphorylations par Aurora B afin de stabiliser les attachements. De plus comme PP1, PP2A-B56 déphosphoryle Knl1, favorisant la dissociation des protéines du SAC²⁴².

7. Le SAC en méiose

Les premières études portant sur le contrôle de la première division méiotique ont été menées dans les années 1960 dans des spermatocytes d'insectes Mantoptères (Mantis) et Orthoptères (Grasshopper). Ces cellules possèdent des chromosomes de taille suffisante pour pouvoir être manipulés par une pipette en verre sous microscope. Une particularité étonnante est l'appariement des chromosomes sexuels. Il existe deux chromosomes X et un seul chromosome Y, et tous trois s'apparient pour former un trivalent, où le chromosome Y est lié aux deux chromosomes X. Dans environ 10% des cas, l'appariement n'est pas complet et un chromosome X reste seul (on parle d'univalent). Dans ce cas, les cellules sont bloquées en méiose I et ne forment jamais de spermatozoïdes²⁴⁶. Lorsqu'une tension opposée au site d'attachement est appliquée à cet univalent, l'anaphase a lieu¹⁸. De la même manière, quand des bivalents sont mono-orientés, c'est-à-dire quand les deux kinétochores frères de chaque homologue sont attachés au même pôle, l'application d'une tension opposée permet de déclencher l'anaphase. Ces observations suggèrent que la tension générée par la bi-orientation d'un univalent ou d'un bivalent est nécessaire pour déclencher l'anaphase (figure 19).

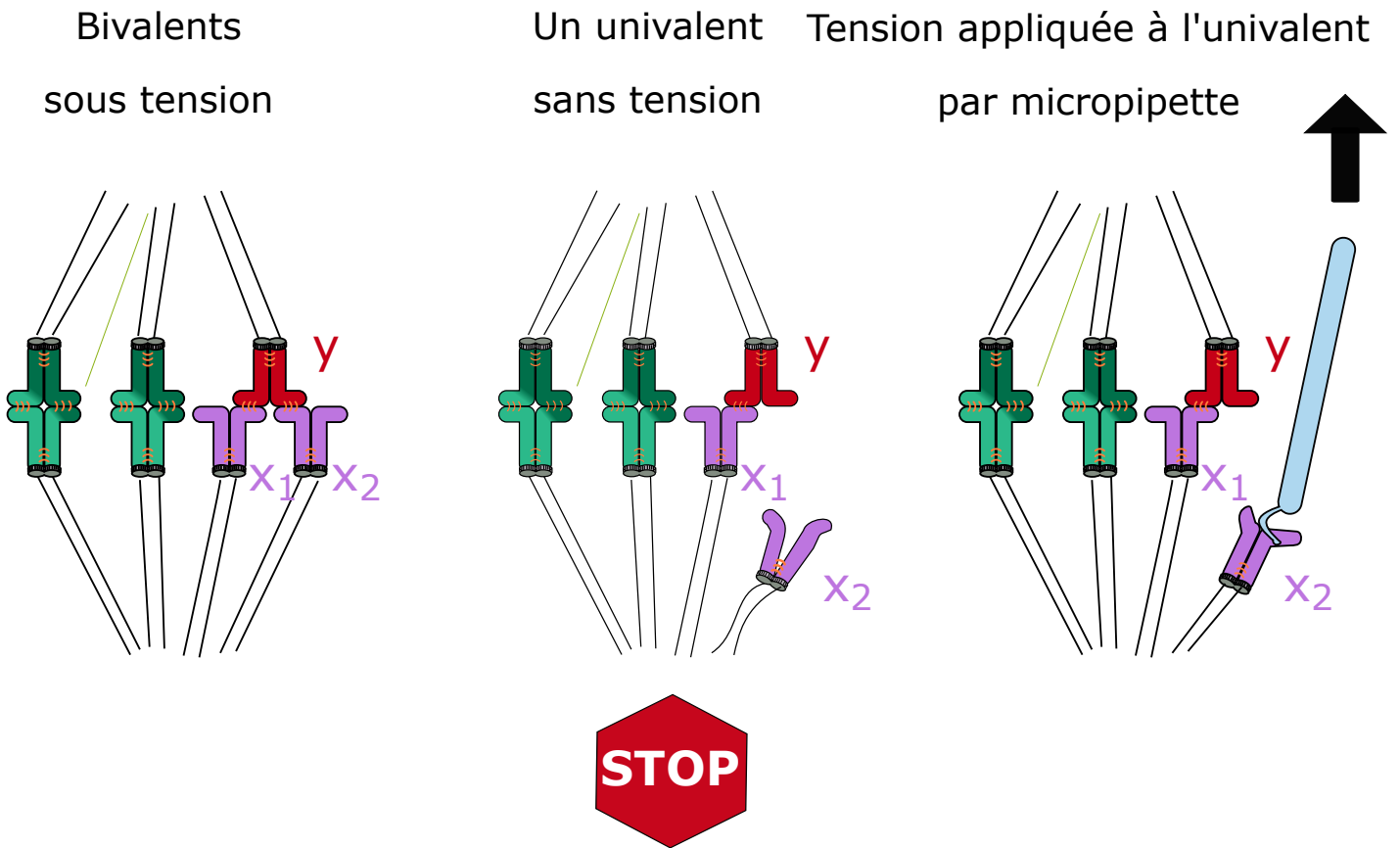


Figure 19 : Expériences de Nicklas en méiose I.

Dans les spermatocytes de certains insectes, il existe deux chromosomes X pour un chromosome Y. Lorsque les trois sont appariés, une force de tension peut s'appliquer, les cellules entrent en anaphase. Si un univalent non apparié est formé, l'anaphase n'a pas lieu et la cellule reste bloquée en métaphase. Le rétablissement d'une tension appliquée à l'univalent au moyen d'une micropipette en verre permet à la cellule de progresser en anaphase.

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'altération du fuseau dans l'ovocyte consécutive à des mutations dans les gènes *mei-1* et *zyg-9* n'entraîne aucun arrêt en métaphase^{247,248}. Aussi, la déplétion par RNAi de divers composants du SAC n'entraîne pas une entrée prématurée en anaphase²⁴⁹. Ces résultats suggèrent que le SAC n'a pas d'activité dans les ovocytes de nématode. Ceci est cohérent avec le fait que la séparation des chromosomes homologues dans l'ovocyte de nématode lors de l'anaphase ne requiert pas la présence de kinétochores²⁵⁰. Dans cet organisme, les composants du kinétochore sont perdus à l'anaphase et la ségrégation des chromosomes se déroule normalement. La ségrégation des chromosomes homologues pourrait être médiée par un mécanisme de poussée des chromosomes par les microtubules, ou encore grâce à des moteurs de type dynéine qui permettent le transport des chromosomes le long des microtubules²⁵⁰⁻²⁵².

Dans le cas des vertébrés, les études sur la méiose ont principalement porté sur les ovocytes de xénope et de souris. Chez le xénope, la prométaphase et la métaphase sont très courtes comparées aux mammifères²⁵³. La cinétique d'accumulation-dégradation de la cycline B est différente comparée à la mitose, avec une dégradation très partielle de la cycline B en prométaphase, et une relative stabilité lors de la transition métaphase-anaphase²⁵⁴. Plus récemment, une étude a montré que les ovocytes de xénope ne possèdent pas de SAC fonctionnel²⁵⁵. En effet, un traitement au nocodazole ne permet d'affecter la séparation des chromosomes homologues. Cette absence de SAC n'est curieusement pas corrélée à une augmentation des erreurs de ségrégation, ce qui suggère que le mécanisme d'attachement et/ou de correction des erreurs d'attachement est particulièrement robuste, même si les preuves expérimentales restent à établir²⁵⁶.

Chez la souris, les premières études suggèrent que le point de contrôle du fuseau est très permissif dans l'ovocyte. Le suivi de la méiose dans des ovocytes de souris XO, qui présentent toujours un chromosome X non apparié, montre que l'anaphase a lieu normalement sans délai⁵. La situation est très différente pour des spermatocytes qui présentent aussi un chromosome X univalent, car dans ce cas, les cellules restent arrêtées en métaphase²⁵⁷. En revanche, lorsque les ovocytes sont traités au nocodazole, les attachements kinétochore-microtubules sont compromis et les cellules s'arrêtent en métaphase I⁷⁶. Il semble que les ovocytes répondent différemment à ces deux types de défauts : les kinétochores non attachés génèrent un arrêt SAC-dépendant, tandis que des chromosomes mal alignés sur le fuseau ne sont pas reconnus par le SAC²⁵⁸. Il est désormais clairement établi que les ovocytes de souris possèdent un point de contrôle du fuseau fonctionnel en méiose I. Les protéines du SAC sont retrouvées aux kinétochores en prométaphase I, lorsque les attachements ne sont pas encore stabilisés. Aussi, la déplétion des protéines du SAC, comme Mad2, Mps1 ou BubR1 entraîne une entrée prématurée des

ovocytes en anaphase, accompagnée d'une dégradation précoce de la sécurine et de la cycline B^{201,259,260}. Sans point de contrôle fonctionnel, les ovocytes sont très largement aneuploïdes en méiose II des suites d'erreurs de ségrégation des chromosomes²⁶¹. La mise en perspective de ces études avec mon travail de thèse sera abordée dans la discussion.

8. La tension satisfait-elle le SAC ?

En mitose, lorsque les kinétochores frères sont attachés à deux pôles opposés du fuseau (donc bi-orientés), ils s'exercent une tension inter-kinétochore entre les kinétochores frères, ainsi qu'une tension intra-kinétochore correspondant à l'étirement du kinétochore lui-même. En effet, la structure du kinétochore, entre le centromère et le kinétochore externe, peut subir des déformations en fonction des forces exercées par les microtubules^{262,263}. Si les deux kinétochores frères sont orientés vers le même pôle (mono-orientation), il ne peut pas s'établir de tension.

En méiose, comme les kinétochores frères sont mono-orientés, il n'y a pas de tension inter-kinétochore. En revanche, il existe une tension entre les bivalents, puisqu'ils sont tirés dans deux directions opposées. Il est aussi possible qu'en méiose, il existe une tension intra-kinétochore.

En mitose, il existe plusieurs preuves expérimentales que la tension générée entre les chromatides sœurs après leur bi-orientation, est reconnue par le SAC. Par exemple, des cellules HeLa s'arrêtent en métaphase après traitement avec de faibles doses de vinblastine, qui déstabilisent les microtubules²⁶⁴. Ce traitement n'entraîne que la diminution de la distance inter-kinétochore et n'affecte pas l'attachement des kinétochores aux microtubules. Un arrêt en métaphase est aussi observé lorsque les cellules sont traitées au monastrol, qui entraîne la formation de fuseaux monopolaires et empêche la tension de se développer entre les chromatides sœurs¹¹⁰. Chez la levure, des mutants incapables de répliquer leur génome mais dont on force l'entrée en mitose présentent des chromatides isolés capables de ne s'attacher qu'à un seul pôle. Ainsi, aucune tension ne peut se développer, et le point de contrôle du fuseau est activé²⁶⁵.

Dans des cellules HeLa ou S2, si l'étirement du kinétochore (stretching) est perturbé par l'usage de faibles concentrations de nocodazole, la dégradation de la cycline B et l'anaphase sont retardées, suggérant une activation du SAC^{266,267}. Dans ce cas, très peu de kinétochores sont enrichis en Mad2, alors que le niveau de BubR1 aux kinétochores est augmenté.

Le modèle généralement admis pour expliquer la réponse des cellules à l'absence de tension intra-kinétochore est le suivant : en absence de tension, le kinétochore externe est accessible à Aurora B et peut être phosphorylé sur certaines protéine clés comme Hec1. La phosphorylation de Hec1 réduit son affinité avec les microtubules et favorise donc le détachement des microtubules. Ceci crée des kinétochores non attachés qui activent le SAC. Quand la tension s'établit entre deux kinétochores frères, l'étirement du kinétochore suffirait à éloigner Aurora B du kinétochore externe et en particulier de Hec1. Hec1 non phosphorylé par Aurora B favorise la stabilisation des attachements.

Récemment, deux travaux ont confirmé ce modèle. L'expression d'un phosphomutant de Hec1 pour les sites ciblés par Aurora B génère des attachements hyperstables¹⁶⁷. Dans ce cas, les cellules HeLa sont incapables de retarder l'anaphase, quand bien même le kinétochore n'est pas étiré^{268,269}. Ainsi, l'étirement du kinétochore ne serait pas un paramètre directement reconnu par les protéines du SAC, mais permettrait de stabiliser l'attachement kinétochore-microtubule, critère principal permettant la satisfaction du SAC.

RESULTATS

ARTICLE : AURORA B/C EST REQUISE POUR LA REPONSE DU SAC A LA BAISSSE DE TENSION AUX BIVALENTS, MAIS PAS POUR LA REPONSE AUX KINETOCHORES NON ATTACHES

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre si le SAC était capable de répondre à une baisse de la tension sur les bivalents en méiose I dans l'ovocyte de souris.

Pour répondre à cette question, nous avons mis au point des conditions dans lesquelles la tension est efficacement réduite sans affecter pour autant la bipolarité du fuseau ni l'alignement des chromosomes.

La première question que nous avons adressée concerne le rôle direct d'Aurora B/C dans le recrutement des protéines du SAC. Est-ce que l'activité kinase d'Aurora B/C est requise pour la réactivation du SAC face aux kinétochores non attachés ? Nous avons réalisé une expérience dans laquelle les ovocytes sont collectés puis maturés jusqu'en métaphase I, lorsque les chromosomes sont correctement alignés et le fuseau bipolaire. Nous inhibons à ce moment la kinase Aurora B/C en incubant les ovocytes dans l'inhibiteur d'Aurora B/C, le ZM447439, à une concentration adéquate pour l'inhibition spécifique d'Aurora B et C. Après 15 minutes de traitement, les ovocytes sont traités au nocodazole, une drogue qui dépolymérise les microtubules, et conservés ou non dans l'inhibiteur d'Aurora B/C. Nous avons réalisé des étalements chromosomiques en fin de métaphase I, à GVBD +6h et observé la présence de la protéine Mad2 – un marqueur de l'activation du SAC – aux kinétochores. A GVBD +6h, le point de contrôle du fuseau est éteint et le niveau de Mad2 aux kinétochore est faible, à la fois dans la condition contrôle et lorsque Aurora B/C est inhibé. En revanche, si on incube les ovocytes avec le nocodazole par la suite, Mad2 est massivement recruté aux kinétochores, avec ou sans inhibiteur d'Aurora B/C, ce qui indique qu'Aurora B/C n'est pas nécessaire à la réactivation du SAC en réponse à des kinétochores non attachés.

Nous avons aussi mesuré l'activité de l'APC/C à la fin de la méiose I, en injectant une sécurine couplée à la YFP dans les ovocytes avant la reprise de la méiose. Le suivi par vidéo-microscopie de la fluorescence dans les ovocytes permet de mesurer précisément la cinétique de dégradation de la sécurine, et donc le timing de la transition métaphase-anaphase. Les ovocytes non traités dégradent la sécurine à partir de 6h après GVBD, et la dégradation atteint un minimum 8h après GVBD. Les ovocytes

traités à l'inhibiteur d'Aurora B/C présentent une dégradation prématurée de la sécurine. Lorsque les ovocytes sont incubés en présence de nocodazole, il y a un délai conséquent de plusieurs heures dans la dégradation de la sécurine, et celle-ci n'est pas aussi complète que dans le cas contrôle, ce qui indique que le SAC est bien activé. Lorsque Aurora B/C est inhibée au préalable, la dégradation de la sécurine est aussi largement retardée dans ces ovocytes, ce qui montre que le SAC peut être réactivé en réponse aux kinétochores non attachés sans l'aide de la kinase d'Aurora B/C.

Pour étudier la réponse du SAC à la baisse de tension des bivalents, nous avons testé différentes drogues connues pour affecter la dynamique du fuseau. D'une part le traitement par le taxol (paclitaxel), est connu pour stabiliser les microtubules et diminuer la dynamique du fuseau, en agissant directement sur la tubuline polymérisée. D'autre part, nous avons inhibé la kinésine-5, ou Eg5, au moyen du Monastrol ou du STLC (S-trityl-L-cystéine). Cette kinésine est nécessaire pour générer des forces d'éloignement au niveau des microtubules interpolaires du fuseau, ce qui contribue à la bipolarisation du fuseau. Lorsque ces deux inhibiteurs sont utilisés à de fortes doses, le fuseau est monopolaire. Cependant, si de faibles doses de STLC ou Monastrol sont utilisées, le fuseau reste bipolaire et facilite l'observation des attachements des bivalents bi-orientés. Nous avons obtenu une meilleure reproductibilité de ce phénotype de fuseau en utilisant de faibles doses de STLC, c'est pourquoi nous utilisons principalement cette approche dans la suite de l'étude.

L'incubation des ovocytes avec le STLC lors de la métaphase induit la formation de fuseaux bipolaires et courts. Nous avons observé que l'alignement des chromosomes sur le fuseau n'est pas perturbé dans ces ovocytes, ce qui suggère les bivalents sont correctement orientés. De plus, nous avons mesuré la distance inter-kinétochore dans les ovocytes, qui permet d'estimer la baisse de tension. En STLC, nous observons en moyenne une baisse de plus de 1.2 μm de cette distance comparé au contrôle, nous diminuons donc efficacement la tension avec ce traitement. De manière similaire, le traitement au taxol induit une baisse de la tension du même ordre de grandeur.

L'alignement des chromosomes à l'équateur dans les ovocytes traités au STLC soulève la question de l'attachement de ces chromosomes au fuseau. Nous avons utilisé une approche de microscopie confocale à haute résolution pour imager des fuseaux de méiose I en métaphase. Avec cette approche, nous pouvons précisément analyser l'attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau. Ainsi, dans les ovocytes contrôles, les chromosomes sont très majoritairement correctement attachés au

fuseau. En revanche, le traitement au STLC génère un nombre élevé d'erreurs d'attachement, et environ 21% des kinétochores ne sont pas correctement attachés au fuseau. Le mécanisme de correction des erreurs est connu pour réguler l'attachement des kinétochores aux microtubules. Ainsi, nous avons testé si l'inhibition d'Aurora B/C préalablement à la baisse de tension permettait de modifier les attachements. Lorsque Aurora B/C est inhibée avant la baisse de tension, le nombre d'erreurs d'attachement est moindre qu'en STLC seul.

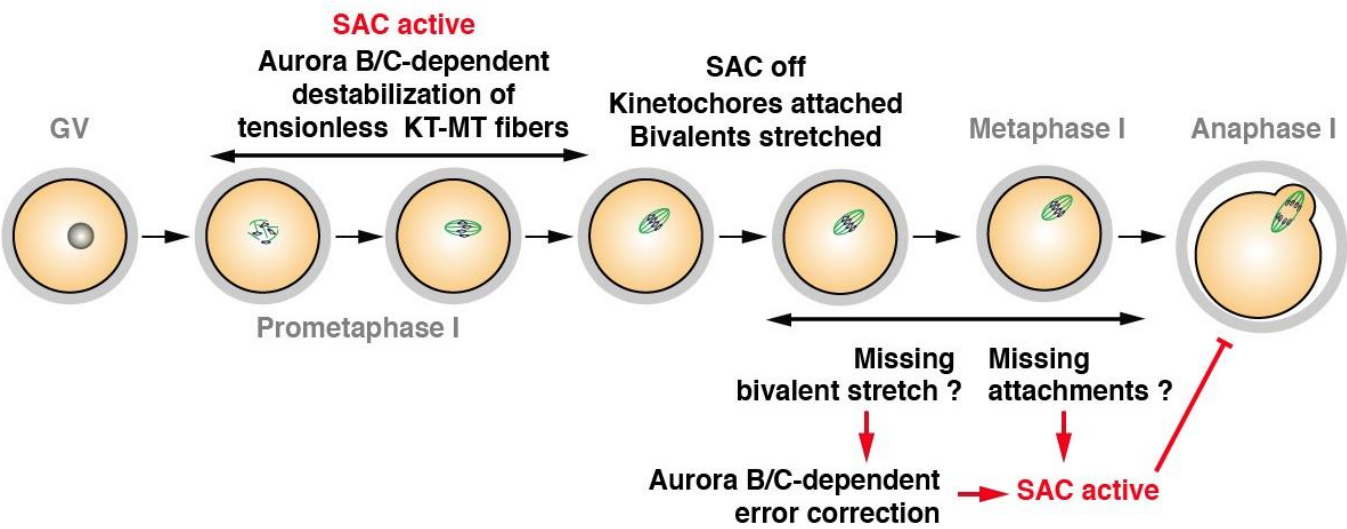
Pour étudier la réponse du SAC à la baisse de tension, nous avons observé la cinétique de dégradation de la sécurine couplée à la YFP. Dans les ovocytes traités au STLC à GVBD +5h, la dégradation de la sécurine est retardée de plusieurs heures comparée au contrôle, ce qui suggère une activation du SAC. Nous avons testé cette hypothèse en traitant les ovocytes avec la réversine, un inhibiteur de la kinase Mps1. Dans les ovocytes traités au STLC puis à la réversine, la cinétique de dégradation de la sécurine est similaire au contrôle traité à la réversine. Ainsi, ce résultat montre que le délai induit par le traitement au STLC est dépendant du SAC. De la même manière, le traitement au taxol permet de diminuer la tension et induit un retard de la dégradation de la sécurine. Lorsque ces ovocytes sont ensuite traités à la réversine, le délai n'est plus observé. Ces résultats suggèrent que la tension appliquée au bivalent par les microtubules du fuseau est reconnue par le SAC en méiose I dans l'ovocyte de souris.

Comme nous avons vu que le traitement au STLC induit des erreurs d'attachement, nous avons voulu vérifier si le sauvetage de ces erreurs d'attachement par l'inhibition d'Aurora B/C permettait de satisfaire le point de contrôle du fuseau. Nous avons donc traité les ovocytes avec le ZM447439 à GVBD +4h45 puis les ovocytes sont incubés dans le STLC à GVBD +5h. Ensuite, nous avons suivi la dégradation de la sécurine dans ces ovocytes. Lorsque Aurora B/C est inhibée et que la tension est abaissée, la dégradation de la sécurine n'est pas retardée. Aussi, les étalements chromosomiques réalisés en métaphase après les traitements au ZM447439 et au STLC montrent une dépendance à Aurora B/C pour le recrutement de Mad2 aux kinétochores. Ces deux résultats montrent que Aurora B/C est requise pour l'activation du SAC en réponse à une baisse de tension.

L'activation du SAC en réponse aux défauts de tension est donc consécutive à l'activité d'Aurora B/C. En accord avec ce résultat, nous observons une hausse significative du niveau de phosphorylation de Dsn1 aux kinétochores, une cible d'Aurora B/C, lorsque la tension est diminuée.

L'ensemble de ces résultats montre donc que dans l'ovocyte de souris, la tension est un paramètre reconnu indirectement par le point de contrôle du fuseau, et qu'Aurora B/C est requise pour cette activité en corrigeant les attachements qui ne sont pas sous une tension normale.

Graphical Abstract



Aurora B/C is required for checkpoint response to less stretched chromosomes, but not to missing attachments, in oocyte meiosis I

Antoine Vallot^{1, 2}, Ioanna Leontiou^{1,2,3}, Damien Cladière^{1, 2}, Warif El Yakoubi^{1, 2}, Susanne Bolte^{1,4}, Eulalie Buffin^{1,2,6}, and Katja Wassmann^{1, 2, 5, 6}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS FRE3631 Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), Paris, 75005 France

²CNRS UMR7622 Developmental Biology Lab, F-75005, Paris, France

³present address: Wellcome Trust Centre for Cell Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, EH9 3JR,

UK

⁴CNRS FRE3631, IBPS Imaging Facility, F-75005, Paris, France

⁵Lead contact

⁶Corresponding authors: Eulalie Buffin (eulalie.buffin@upmc.fr) and Katja Wassmann (katja.wassmann@upmc.fr)

Tel.: +33 1 44 27 33 01

Fax: +33 1 44 27 34 45

Keywords: Meiosis, Spindle Assembly Checkpoint, Aurora B/C kinase, Bivalent stretch, Attachments, Mouse oocytes

Summary (250w)

Meiotic divisions in mammalian oocytes are highly error prone compared to mitosis, with severe consequences for fertility and health of the offspring. Spindle assembly checkpoint (SAC) control is thought to be much more permissive in meiosis than mitosis, contributing to the observed high error rate [1, 2]. In mitosis, the SAC monitors the biorientation of chromosomes to the spindle through the detection of kinetochore-microtubule attachments and the tension generated between sister chromatids. The SAC delays anaphase onset until all chromosomes are correctly bioriented and aligned. In meiosis I, homologous chromosomes and not sister chromatids such as in mitosis or meiosis II are segregated. The meiotic SAC was thought to be insensitive to the absence of tension applied on paired chromosomes (bivalents) because the presence of some unaligned bivalents that were not stretched did not delay anaphase I onset under certain conditions [3]. Here, we set out to address whether absence of tension applied by the spindle on bioriented bivalents activates the SAC in meiosis I. Treatment of oocytes in late prometaphase with an inhibitor of the kinesin Eg5 affects spindle dynamics but not attachments, as we show here using an optimized protocol for confocal imaging. Our work shows that after Eg5 inhibition, bivalents are correctly aligned but under less tension and as a result, the SAC is transiently activated. In oocytes, this checkpoint response requires Aurora B/C kinase activity, whereas initial SAC activation upon loss of attachments does not require Aurora B/C.

Results

The core SAC proteins Mad1, 2, Bub1, 3, BubR1, and Mps1 are required for SAC response to unattached kinetochores. Whether the kinase Aurora B is essential for initial SAC activation is still controversial, but Aurora B kinase activity is necessary for prolonged SAC arrest. In mitosis, incorrect attachments that do not generate tension at kinetochores are destabilized in an Aurora B kinase-dependent manner, creating unattached kinetochores that maintain the SAC active[4-6]. In oocytes, the essential SAC protein Mad2 is recruited to all kinetochores when oocytes enter meiosis I, indicating SAC activation before correct attachments are established[3, 7-9]. The SAC ensures that a threshold level of Cdk1 activity is reached before chromosome segregation takes place and prevents precocious anaphase I onset. Accordingly, in the absence of SAC control, precocious anaphase I onset with low Cdk1 activity takes place[10, 11]. The meiotic SAC is less stringent than in mitosis, and induces a cell cycle arrest only in the presence of several unattached kinetochores[1]. In the contrary to mitosis, segregation of homologous chromosomes in meiosis I requires side-by-side (mono-) orientation of sister kinetochores. Whether attachment errors of mono-oriented kinetochore pairs that do not generate stretched bivalents, are recognized by the SAC in oocytes was unknown. Aurora B and the closely related meiotic Aurora C kinase detach even correctly attached microtubule fibers during prometaphase I[12], giving rise to the attachment and detachment cycles observed on kinetochore pairs by live-imaging[9]. Therefore, it was proposed that error correction has to be turned off progressively as oocytes continue from prometaphase into metaphase I to allow attachments to persist, implying that error correction is not functional in late

prometaphase/metaphase I[12]. Given the importance of the SAC and Aurora B for the fidelity of cell division, we decided to clarify a potential role for Aurora B/C in the meiotic SAC upon either loss of attachments or less spindle tension in oocytes.

In mammals, hormonal stimulation induces some oocytes arrested in GV (Germinal Vesicle) stage, to enter meiosis I and to progress until metaphase of meiosis II to await fertilization. Mouse oocytes can be induced *in vitro* to enter the first meiotic division in a synchronized manner, which is visible as Germinal Vesicle Breakdown (GVBD). Bivalents are attached and aligned around 5 hours after GVBD, and extrude polar bodies (PBs) 7 to 9 hours after GVBD in the mouse strain and culture conditions we are using here. In our experiments, taking advantage of the high temporal resolution of prometaphase I in mouse oocytes, we allowed oocytes to form a stable bipolar spindle before adding drugs perturbing spindle dynamics. At this time, 5-6 hours after GVBD, spindles are already well attached to kinetochores. As pools of oocytes can be induced to enter meiosis at approximately the same time (+/- 10 minutes), we were able to study SAC response to different drugs affecting tension when kinetochores are already attached.

First we wanted to establish whether SAC response *per se* in oocytes requires Aurora B/C kinase activity. SAC activation leads to recruitment of checkpoint proteins such as Mad2 to unattached kinetochores, and prevents APC/C-dependent ubiquitination and proteasome-dependent degradation of Cyclin B1 and Securin and therefore metaphase I arrest[13]. Because loss of Aurora B/C leads to cytokinesis defects[14], we used degradation of exogenously expressed YFP-tagged Securin (and not Polar Body extrusion) as a read-out for SAC inactivation in live oocytes[15]. As expected[7, 16], treatment of oocytes in late prometaphase, when bivalents are stably attached and under stretch, with low doses of the spindledepolymerizing drug Nocodazole, led to a metaphase I arrest. This was indicated by recruitment of Mad2 to kinetochores and stabilization of Securin-YFP, demonstrating SAC activation in response to Nocodazole (**Fig. 1a, b**). To address whether Aurora B/C kinases are required for SAC response, we inhibited their kinase activities before treating oocytes with Nocodazole, and checked for Securin-YFP degradation. We used the drug ZM447439, which mimics loss of both Aurora B and C in oocytes[14] (accelerated anaphase I onset, defects in cytokinesis, and no PB extrusion, data not shown). Penetrance of the drug and efficient inhibition of Aurora B/C kinase activity was additionally demonstrated by staining for Histone H3 phosphorylation on Serine 10, a prominent substrate of both Aurora B and C, which becomes phosphorylated early in prometaphase I [14] (**Fig. S1**). Surprisingly though, treating oocytes with ZM447439 did not suppress SAC response to Nocodazole, showing that unattached kinetochores activate the meiotic SAC in an Aurora B/C-independent manner (**Fig. 1b**). Accordingly, strong recruitment of Mad2 to kinetochores was observed upon low doses of Nocodazole, independently of whether Aurora B/C was inhibited, or not (**Fig. 1a**). Nevertheless, SAC-dependent stabilization of Securin-YFP was less robust in the presence of ZM447439, suggesting that Aurora B/C is required for maintaining a prolonged SAC arrest (**Fig. 1b**). Our results indicated that the contributions of Aurora B and C to recognize missing attachments are not essential in oocytes.

To address whether less tension applied by the bipolar spindle onto the chromosomes activates the SAC in oocyte meiosis I, we tested different drugs that have been used in mitosis to reduce tension and show SAC responsiveness to missing tension (see [4-6] for reviews on SAC activation and tension in mitosis). Our aim was to create a situation where bivalents are correctly attached, but under less

stretch, in late prometaphase I (**Fig. S2a**). Oocytes were exposed to increasing concentrations of Taxol, Monastrol, or STLC (s-trityl-l-cysteine) in late prometaphase I (GVBD+5h) for one to two hours. Taxol slows down spindle dynamics[17] and leads to the hyperstabilization of microtubule fibers reducing the pulling forces on kinetochores. Monastrol[18, 19] and STLC[20-22] are inhibitors of Eg5 kinesin, which is required for establishing spindle tension by crosslinking anti-parallel microtubules[23]. Before fixation in metaphase I, oocytes were subjected to a very short cold treatment to depolymerize unstable microtubule fibers so that only stable fibers are visualized, such as those attached to kinetochores. In Taxol-treated oocytes, hyperstabilization of microtubule fibers was observed, even at low concentrations (**Fig S3a**). As expected, high concentrations of Monastrol and STLC resulted in collapsed, monopolar spindles. Lower concentrations of both drugs allowed oocytes to maintain bipolar spindles with stable microtubule fibers (**Fig. S2b**). Compared to Monastrol, treatment with STLC resulted in highly reproducible changes in spindle morphology at different concentrations, therefore we used STLC for subsequent experiments, and confirmed key results with Taxol.

Bivalents that are not attached to both poles cannot be maintained at the metaphase plate and move towards the poles, a phenotype observed in oocytes that are defective in stabilizing kinetochore fibers, such as oocytes devoid of BubR1[10, 24, 25]. Addition of low concentrations of STLC in late prometaphase did not perturb alignment of bivalents, indicating that all bivalents were attached in a bipolar manner and stably maintained at the metaphase plate (**Fig. 2a**). Spindles did not show any obvious defects, but were significantly shorter than spindles of untreated oocytes, in accordance with the role of Eg5 for crosslinking anti-parallel microtubules (**Fig. 2b**). Importantly, bivalents were under less stretch, as determined by measuring the distance between pairs of sister kinetochores from each bivalent (**Fig. 2b**). Similar phenotypes (chromosomes aligned, decreased interkinetochore distance) were observed with low doses of Taxol (**Fig. S3a**).

To better characterize kinetochore attachments in STLC-treated oocytes, we performed optimized confocal image acquisitions, followed by deconvolution[26]. Kinetochore pairs of cold-treated oocytes with or without STLC treatment were imaged and analysed for the presence of end-on syntelic, or merotelic/ lateral attachments (**Fig. 3a**). The percentage of sister kinetochore pairs with clearly recognizable microtubule fibers was determined. All kinetochores were attached in STLC-treated oocytes, as well as in control oocytes, but the frequency of merotelic and lateral attachments increased from around 5% in controls to more than 20% (**Fig. 3b and c**). Overlays of the whole spindles showed stable end-on attachments with hardly any interpolar fibers in control oocytes, whereas STLC-treated oocytes harbor additionally interpolar, lateral, and merotelic attached fibers (**Fig. 3d**). In short, bivalents are under less stretch in the presence of STLC, and some merotelic or lateral attached kinetochores are present. Because no unattached kinetochores were detected, we could address whether missing stretch of bivalents activated the SAC in STLC-treated oocytes.

Securin-YFP was stabilized in STLC-treated oocytes, indicating a SAC response. 50% of Securin-YFP was degraded 7 hours after GVBD in control oocytes, and 12.5 hours after GVBD in STLC-treated oocytes (**Fig. 4a**). Inhibiting the essential SAC kinase Mps1 with the drug Reversine rescued Securin-YFP degradation in STLC-treated oocytes. This confirms that stabilization of Securin-YFP upon STLC treatment depends on SAC activation (**Fig. 4a**). A comparable SAC response was also observed in Taxol-treated oocytes (**Fig. S3b**). These results demonstrate that wrongly attached and less stretched

bivalents activate the meiotic SAC. We asked whether SAC response to less bivalent stretch required the kinase activities of Aurora B and C. Unlike SAC response after Nocodazole treatment, inhibition of Aurora B/C with ZM447439 prevented SAC response to STLC treatment. Securin-YFP degradation was not delayed and took place at the same time as in oocytes treated with ZM447439 alone (**Fig. 4b**). Similar to SAC response to missing tension in mitosis, Mad2 was recruited to kinetochores at low levels upon STLC treatment, and importantly, also in an Aurora B/C-dependent manner (**Fig. 4c**). These results show that the SAC is activated by less stretched bivalents through the activation of Aurora B/C, and suggest that Aurora B/C-dependent error correction may then create unattached kinetochores recruiting Mad2.

It is known that Aurora B-dependent phosphorylation of several kinetochore substrates is required for kinetochore-microtubule error correction[27]. We analyzed Aurora B-dependent phosphorylation of Hec1/Dsn1 on S109 with a phospho-specific Dsn1 antibody[28] to determine whether ongoing error correction occurred in STLC-treated oocytes. In accordance with Aurora B/C being required for SAC response through error correction after STLC treatment, Hec1/Dsn1 was indeed phosphorylated (**Fig. S4**).

To address whether merotelic and lateral attachments were observed in STLC treated oocytes because of ongoing Aurora B/C-dependent error correction, we added STLC and ZM447439 simultaneously and visualized cold-stable microtubule fibers. The ratio of merotelic attachments dropped to a value around 5%, similar to untreated oocytes (**Fig. 3b and c**). Overlays of the whole spindles show stable end-on attachments in control and STLC-ZM447439 treated oocytes. Our results demonstrate that the lateral and merotelic attachments observed in oocytes treated with STLC are due to ongoing error correction by Aurora B/C, and not to STLC treatment *per se* (**Fig. 3d**). In STLC treated oocytes, Aurora B/C-dependent destabilization of tension-less microtubule fibers takes place, leading to the observed increase in merotelic and lateral attachments. Accordingly, only weak Mad2 recruitment was observed, correlating with the fact that no completely unattached kinetochores were detected (**Fig. 4**). Therefore we conclude that SAC response to less stretched bivalents depends on the error correction activity of Aurora B/C.

Discussion

Mono-orientation in meiosis I does not allow for the detection of tension applied between sister kinetochores attached to the opposite poles of the spindle, such as in mitosis. Whether the SAC in meiosis I can recognize if bivalents are stretched by tension applied by the spindle was unknown. Arguing against the recognition of less stretched bivalents by the SAC is the phenotype of oocytes without NuMa, a protein required for anchoring microtubules at spindle poles. NuMa's loss leads to elongated spindles with unaligned chromosomes that are under less tension[29]. Still, *NuMA*^{-/-} oocytes do not arrest in metaphase I[29], suggesting that the SAC is not activated. Nevertheless, the observed hyperfocused spindle poles in these oocytes may lead to precocious spindle checkpoint silencing allowing anaphase I onset on time [30, 31]. Also arguing against recognition of less stretched bivalents is the fact that Aurora B/C substrate phosphorylation decreases independently of bivalent stretching during progression through prometaphase I. This was proposed to be mediated by

increasing PP2A recruitment to kinetochores that may counteract Aurora B/C. Gradually shutting off Aurora B/C activity is thought to allow stabilization of attachments, independently of whether they are correct or not[12]. Alternatively, the increase in PP2A concentrations at kinetochores and centromeres may instead be related to PP2A's additional role for protection of centromeric cohesin in meiosis I[32]. Transient Aurora B/C-dependent substrate phosphorylation on some less stretched bivalents may also be too short-lived to be easily detected, compared to early prometaphase I[12]. Arguing for a functional, tension-sensing error correction pathway to promote bipolar attachments that are under tension is the fact that univalents of *Sycp3*^{-/-} oocytes, or the single X chromosome of XO mice, were shown to bi-orient on the meiotic spindle, albeit without causing an obvious SAC arrest. Similarly arguing for the detection of missing tension are results obtained from *Mlh1*^{-/-} oocytes, where the presence of several univalents can elicit a checkpoint response[33-36].

We decided to clarify whether less stretched bivalents affected meiosis I progression in mouse oocytes, by using drugs that reduce spindle tension. We show here that Aurora B/C plays an important role in detecting whether bivalents are under tension in oocyte late prometaphase I. Significant improvements in microtubule visualization from whole mount oocytes by confocal microscopy and high temporal resolution of meiotic maturation allowed us -in a manner not possible in somatic cells- to distinguish initial SAC activation from SAC maintenance. We have established conditions to study meiotic SAC response to attached bivalents, which are correctly aligned at the metaphase plate, but not under tension and therefore not stretched. Our data fit with the recent model that the SAC *per se* is satisfied by attachments and not intra-kinetochore stretch, and Aurora B is activating the SAC in a tension-dependent manner by removing incorrectly attached tension-less microtubule fibers [5, 6, 37-40]. We propose that in oocytes, Aurora B/C's role is essential for the destabilisation of microtubule fibers that do not generate tension on kinetochores, to activate the SAC (**Fig. S4b**). The presence of high levels of merotelic attachments in STLC oocytes, but not after additional inhibition of Aurora B/C, demonstrates ongoing correction of tension-less kinetochore fibers (even though they are correctly attached). It also demonstrates that STLC treatment *per se* does not cause these attachment defects. Therefore, even though in early meiosis Aurora B/C seemingly indiscriminately destabilizes all attachments[12], Aurora B/C becomes important as oocytes progress into metaphase I to detect bivalents that are not under tension. We conclude that inhibition of Aurora B/C activity early in meiosis may indeed help oocytes establish stable attachments earlier[12], nevertheless Aurora B/C function is still important in late prometaphase for SAC control in response to less bivalent stretch. Our results fit with the original model proposed for the role of Aurora B in mitotic SAC control, where Aurora B was proposed to be important for maintenance of SAC arrest by destabilizing incorrectly attached tension-less microtubule fibers, thereby creating unattached kinetochores which further activate the SAC[5, 39, 40].

Precocious separation of bivalents into univalents before meiosis I is thought to be a major factor contributing to the high incidence of age-related meiosis I errors in humans[2, 41]. Univalents cannot form attachments that are under tension, if sister kinetochores are mono-oriented. It is attractive to speculate that functional Aurora B/C-dependent SAC control is required for the observed re-orientation of monooriented kinetochores of a univalent, to attach sisters in a bipolar manner. The prevalence of univalents increases with age in oocytes of mice and humans. Our work suggests that the Aurora B/C dependent SAC control should be able to induce a cell cycle delay in the presence of univalents that are not under tension. SAC proteins are lost with age in human oocytes[42, 43], and

with the additional increase in the number of univalents the loss of SAC proteins may at least in part explain the high error rate in oocytes with age.

Author Contributions:

A.V., I.L., and E.B. performed most of the experiments with technical help from D.C., W.E.Y. was supervising I.L., and provided help with statistical analysis and chromosome spreads. S.B. and D.C. developed the workflow for high-resolution confocal imaging. E. B. supervised A.V. and took part in the conceptualization of this study with K.W. Overall supervision, funding acquisition and project administration was done by K.W. Figures were prepared by A.V. and E.B., and the manuscript was written by K.W., E.B. and A.V., with input from all authors.

Acknowledgements

We are grateful to I. Cheeseman for phospho-Dsn1 antibody. We thank E. Nikalayevich, L. Keating, and A. Dupre for comments on the manuscript, all lab members for suggestions and discussion, and members from administrative services and the animal facility (UMR7622) for support. A.V. received a PhD fellowship from the French Ministère de la Recherche, W.E.Y. a postdoctoral fellowship from ARC (Association de la Recherche sur le Cancer), and I.L. an ERASMUS fellowship. This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Subvention ANR-12-BSV2-0005-01, ANR-16-CE92-0007-01), and the Fondation de la Recherche Médicale (Equipe DEQ20160334921) to K. Wassmann, as well as the UPMC and CNRS.

Material and Methods

Animals

Adult CD-1 mice (Janvier lab, France) were maintained according to current French guidelines. All experiments were subject to ethical review and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (authorization n° B-75-1308).

Oocyte collection and culture

Oocytes were harvested from CD-1 mice aged 8 to 16 weeks. Mice were killed by cervical dislocation and the dissected ovaries were transferred directly into home-made M2 medium at 38°C. Oocytes were isolated from follicular cells by careful mouth pipetting with torn-out pasteur pipettes with a diameter not exceeding 80µm. For microinjection experiments, oocytes were kept at GV stage in commercial M2 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 100µg/ml dbcAMP (Sigma-Aldrich). Oocytes were cultured in petri dishes containing M2 drops covered with mineral oil (Sigma-Aldrich), to prevent evaporation. Oocytes undergoing GVBD within 90 minutes after ovary dissection or alternatively, release from dbcAMP containing medium to maintain them in GV, were collected. All manipulations involving oocytes were done on heating plates at 38°C.

Small molecule inhibitors

All drugs were added to home-made M2 medium at the indicated final concentrations. Nocodazole (Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 400nM, Taxol (Paclitaxel from Sigma-Aldrich) was used at 1µM. For Eg5 inhibition, Monastrol (Sigma-Aldrich) was used at 35µM and 70µM, STLC (Strityl-S-cystein, Sigma-Aldrich) at 0.75µM and 1µM, as indicated. For Mps1 inhibition, Reversine (Calbiochem) was used at 0.5µM, and for Aurora B inhibition, ZM447439 (Tocris) at 10µM.

Microinjection and live imaging

Securin-YFP capped mRNA was obtained by *in vitro* transcription, using the T3 Ambion mMessage Machine kit[44]. 1 to 10pM of capped mRNA was purified on RNeasy purification columns from Qiagen. GV oocytes were microinjected on the stage of an inverted Nikon Eclipse Ti microscope with self-made micropipettes and manipulated using a holding pipette (VacuTip from Eppendorf). The injection flow was controlled by a FemtoJet Microinjector pump (Eppendorf). Live imaging of oocytes was performed on a Nikon eclipse TE 2000-E inverted microscope with motorized stage, equipped with PrecisExite High

Power LED Fluorescence (LAM 1: 400/465, LAM 2: 585), a temperature chamber (Life Imaging Services), a Märzhäuser Scanning Stage, a CoolSNAP HQ2 camera, and controlled by Metamorph software. Oocytes were maintained in a Ludin chamber (Roper Scientific). Images were taken using a Plan APO (20 x 0.75 NA) objective.

Immunofluorescence and chromosome spreads

The zona pellucida of oocytes was removed in successive baths in Tyrode's acid solution, and oocytes were left to recover[45]. For whole-mount immunofluorescence, oocytes were first transferred in chambers coated with Concanavaline A (Sigma-Aldrich), in M2 PVP (Polyvinylpyrrolidone from Sigma-Aldrich) medium followed by centrifugation at 1400 rpm for 13 minutes, all at 38°C. Prior to fixation, oocytes were incubated in a cold treatment solution (0.08M PIPES, 1mM MgCl₂, pH 7.4) on top of an ice-water bath to maintain a temperature of 4°C for 4 minutes. Oocytes were then fixed in a formaldehyde solution (BRB80 medium with 0.3% Triton X-100, 1.9% formaldehyde (Sigma-Aldrich, F1635)) at 38°C. For chromosome spreads, oocytes were fixed in a spread solution (1% paraformaldehyde, 0.15% Triton X-100 and 3mM 1,4 Dithiothreitol, all from Sigma-Aldrich) at room temperature[45]. Antibody staining was done using the following antibodies at the indicated dilutions: human CREST serum autoimmune antibody (Cellon SA, HCT-0100, 1:100), mouse monoclonal alpha-tubulin antibody (DM1A) coupled to FITC (Sigma-Aldrich, F2168, 1:100), rabbit polyclonal H3pS10 (Cell signaling, #9701, 1:50), rabbit polyclonal Mad2[46] (1:100) and Dsn1 (a kind gift from Ian Cheesmann, 1:100). The following secondary antibodies were used: anti-human Alexa 488 (Life Technologies, A11013, 1:200), and anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 713-165-147, 1:200). Chromosomes were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen, H21492) at a 1:200 dilution. Preparation of the slides was done using AF1 (Cityfluor) mounting medium.

Image acquisition

Images of chromosome spreads and whole mount oocytes were acquired on a Zeiss spinning disk confocal microscope, using a 100X (1.4 Oil) objective coupled to an EMCCD (Evolve 512, Photometrics). 10z sections of 0.4µm were taken for spreads, and 10-15 z sections of 2.5-3µm for whole mount oocytes. For high-resolution kinetochore attachment pictures, acquisitions were performed on a Leica TCS SP5-II using a Leica 63x oil immersion objective (HCX Plan AOI CS, 1.4 NA). 150-300 z-sections of 80nm were taken for acquisition; raw pictures were then deconvoluted with Huygens 3.7 software. For detailed description of the optimised workflow see[26]. 3-D reconstitutions of whole mount oocytes in Figure 3d were obtained using Arivis 4D, all other stacks were assembled in Image J.

Data analysis

For quantification of fluorescence signals at kinetochores, fluorescence intensity was calculated as follows: for each kinetochore, a 10 x 10 pixels square was manually placed at the middle of the kinetochore structure detected with the CREST signal. Another 10 x 10 pixel square was placed adjacent to the first square to measure the background signal. Summed pixel values for each channel were measured and then subtracted with the background. Signal intensities were normalized to CREST signal from the same kinetochore. For any given oocyte, values from at least 20 kinetochores were calculated. All measurements were performed on maximum intensity Z-projections of stacks of the original acquisitions. Measurements were performed with the ImageJ software. For Securin-YFP quantifications, a rectangle of 100x100 pixels was manually placed at the center of the oocyte and next to it, to measure the background signal. The YFP-signal was measured for the indicated number of oocytes, for each time point, and the mean background signal was subtracted. For each oocyte,

values were normalized relative to the highest value of the time-lapse. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 6 software. Student's t-tests were performed on unpaired data and were two-tailed (ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$). Error bars indicate means \pm standard deviation unless otherwise specified.

Figure Legends

Figure 1

SAC activation in response to missing attachments does not require Aurora B/C kinase activity in metaphase I.

(a) Scheme of meiotic maturation in mouse oocytes. Chromosomes are in blue and spindle microtubules in green. GV: Germinal Vesicle stage, GVBD: Germinal Vesicle Breakdown. (b) Chromosome spreads of metaphase I oocytes. Where indicated, oocytes were treated with the drug ZM447439 (10 μ M) at 4 hours 45 minutes after GVBD, prior to Nocodazole treatment (400nM) at 5 hours after GVBD. Chromosomes were stained with Hoechst (blue), CREST (green) and anti-Mad2 antibodies (red). Scale bar: 5 μ m. The graph on the right shows the distribution of Mad2 signal intensities normalized to CREST. The values corresponding to all kinetochores measured are displayed (n=363, 379, 738, 795 kinetochores), statistical analysis was performed on the mean value calculated for each oocyte (n=14, 11, 21, 21 from three independent experiments involving 3 to 4 mice per experimental group). p values were calculated with two-tailed unpaired Student's t-test (not significant [ns] p value > 0.05, ***p value < 0.0001). Error bars show Standard Deviation. (c) Oocytes were injected at GV stage with Securin-YFP encoding mRNA. YFP signal intensity was monitored by time-lapse fluorescence imaging and normalized to the highest value for each oocyte. Mean and standard deviation of the population are plotted in arbitrary units against time. The total number of oocytes are n=14, 11, 11, 14, from two independent experiments involving a total of 4 mice per experimental group. P values were calculated with two-tailed unpaired Student's t-test.

The scheme on the left illustrates the experimental set-up. See also Fig. S1.

Figure 2

Addition of STLC reduces spindle length as well as chromosome stretch.

(a) Whole-mount immunofluorescence staining of cold-treated spindles from oocytes fixed at 6 hours after GVBD. Where indicated, oocytes were treated with STLC (0.75 μ M) at 5 hours after GVBD. Microtubules were stained with anti-Tubulin antibody (green), kinetochores with CREST (red) and chromosomes with Hoechst (blue). Scale bar: 5 μ m. Any chromosome that is at least partially in the pole region was scored as unaligned. The relative frequency of well-aligned (0 unaligned chromosomes), mild alignment defects (12 unaligned chromosomes) and strong alignment defects (3 or more unaligned chromosomes) is shown. Two-tailed unpaired Student's t-test was performed for statistical test (not significant [ns] p value = 0.16). (b) As in (a), magnifications of fully and weakly stretched chromosomes are shown in the insets. Scale bar: 2 μ m The graphs show the distribution of spindle length values (n=15, 16 oocytes from three independent experiments involving a total of 3 mice per experimental group) and of interkinetochore distance (same samples, n=289, 122 chromosomes), as indicated. Interkinetochore distances were determined as shown in the magnifications and the scheme on the left. Means and standard deviation are shown (*** p value < 0.0001). See also Fig. S2 and S3.

Figure 3

Presence of merotelic and lateral attachments in STLC-treated oocytes depends on Aurora B/C.

(a) Whole-mount immunofluorescence staining of cold-treated spindles from oocytes fixed at 6 hours after GVBD. Spindles were imaged with a confocal microscope, using a workflow enabling near superresolution pictures. Microtubule fibers were stained with anti-Tubulin antibody (green), kinetochores with CREST (red) and chromosomes with Hoechst (blue). An example of an amphitelic, merotelic and lateral attachment is shown. Scale bar: 2 μ m. (b) As in (a), where indicated, oocytes were treated either with STLC (0.75 μ M) at 5 hours after GVBD, or additionally with ZM447439 (10 μ M) 15 minutes prior to STLC treatment. For each condition, correct attachments are shown above, and merotelic/lateral attachments below. Shown are representative examples of all 40 kinetochore-microtubule attachments from one oocyte for each condition. (c) Quantification of the percentage of incorrect attachments per oocyte (n=13, 13, 11 oocytes from 3 independent experiments involving a total of 6 mice per experimental group.). The mean of merotelic/lateral attachments per oocyte is shown. Error bars show the standard error of the mean. Two-tailed unpaired Student's t-test was performed (not significant [ns] p value= 0.21, *** p value < 0.0001). (d) Representative images of oocytes analyzed in (a-c) are shown as 3D reconstructions.

Scale bar: 5 μ m.

Figure 4

STLC treatment leads to SAC activation in an Aurora B/C-dependent manner.

(a) Oocytes were injected with Securin-YFP encoding mRNA at GV stage, and treated with STLC (0.75 μ M) 5 hours after GVBD. Where indicated, Reversine (0.5 μ M) was added at 5.5 hours after GVBD. Securin-YFP signal intensity was monitored by time-lapse fluorescence imaging and normalized to the highest value for each oocyte. Mean and standard deviation of the population are plotted in arbitrary units against time. (n=28, 31 oocytes from three independent experiments and n=16, 17 oocytes from two independent experiments involving a total of 6 mice per experimental group). (b) Oocytes were injected with Securin-YFP mRNA at GV stage. Where indicated, oocytes were treated with ZM447439 (10 μ M) at 4 hours 45 minutes after GVBD, and with STLC (0.75 μ M) at 5 hours after GVBD. Securin-YFP signal intensity was monitored by time-lapse fluorescence imaging and normalized to the highest value for each oocyte. Mean and standard deviation of the population are plotted in arbitrary units against time (n=23, 8,

25, 21 oocytes from four independent experiments involving a total of 8 mice per experimental group). (c) Chromosome spreads of metaphase I oocytes. As above, oocytes were treated with the drug ZM447439 (10 μ M) 15 minutes prior to STLC treatment (0.75 μ M) at 5 hours after GVBD, where indicated. Chromosomes were stained with Hoechst (blue), CREST (green) and anti-Mad2 (red) antibodies. Scale bar: 5 μ m. On the right, the distribution of Mad2 signal intensity relative to CREST is shown. The values corresponding to all kinetochores measured are displayed (n=599, 810, 858, 795 kinetochores), statistical analysis was performed on the mean value calculated for each oocyte (n=16, 19, 18, 17 oocytes from 3 independent experiments involving a total of 3 to 4 mice per experimental group). Mean and standard deviation of the whole population are shown (not significant [ns] p value > 0.05, ***p value < 0.0001). p values were calculated with two-tailed unpaired Student's t-test. See also Fig. S4.

References

1. Touati, S.A., and Wassmann, K. (2016). How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* *125*, 321-335.
2. Herbert, M., Kalleas, D., Cooney, D., Lamb, M., and Lister, L. (2015). Meiosis and Maternal Aging: Insights from Aneuploid Oocytes and Trisomy Births. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*.
3. Lane, S.I., Yun, Y., and Jones, K.T. (2012). Timing of anaphase-promoting complex activation in mouse oocytes is predicted by microtubule-kinetochore attachment but not by bivalent alignment or tension. *Development* *139*, 1947-1955.
4. Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 785-795.
5. Khodjakov, A., and Pines, J. (2010). Centromere tension: a divisive issue. *Nature cell biology* *12*, 919-923.
6. Etemad, B., Kuijt, T.E., and Kops, G.J. (2015). Kinetochore-microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nature communications* *6*, 8987.
7. Wassmann, K., Niaux, T., and Maro, B. (2003). Metaphase I Arrest upon Activation of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint in Mouse Oocytes. *Curr Biol* *13*, 1596-1608.
8. Hached, K., Xie, S.Z., Buffin, E., Cladiere, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P.K., and Wassmann, K. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* *138*, 2261-2271.
9. Kitajima, T.S., Ohsugi, M., and Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* *146*, 568-581.
10. Touati, S.A., Buffin, E., Cladiere, D., Hached, K., Rachez, C., van Deursen, J.M., and Wassmann, K. (2015). Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nature communications* *6*, 6946.
11. Rattani, A., Vinod, P.K., Godwin, J., Tachibana-Konwalski, K., Wolna, M., Malumbres, M., Novak, B., and Nasmyth, K. (2014). Dependency of the spindle assembly checkpoint on Cdk1 renders the anaphase transition irreversible. *Curr Biol* *24*, 630-637.
12. Yoshida, S., Kaido, M., and Kitajima, T.S. (2015). Inherent Instability of Correct Kinetochore-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Developmental cell* *33*, 589-602.
13. Lischetti, T., and Nilsson, J. (2015). Regulation of mitotic progression by the spindle assembly checkpoint. *Mol Cell Oncol* *2*, e970484.
14. Balboula, A.Z., and Schindler, K. (2014). Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS genetics* *10*, e1004194.
15. Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., and McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature cell biology* *5*, 1023-1025.

16. Homer, H.A., McDougall, A., Levasseur, M., Murdoch, A.P., and Herbert, M. (2005). Mad2 is required for inhibiting securin and cyclin B degradation following spindle depolymerisation in meiosis I mouse oocytes. *Reproduction* *130*, 829-843.
17. Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 9552-9556.
18. Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., and Mitchison, T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* *286*, 971-974.
19. Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., and Mitchison, T.J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *The Journal of cell biology* *150*, 975-988.
20. Paull, K.D., Lin, C.M., Malspeis, L., and Hamel, E. (1992). Identification of novel antimitotic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. *Cancer Res* *52*, 3892-3900.
21. Brier, S., Lemaire, D., Debonis, S., Forest, E., and Kozielski, F. (2004). Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochemistry* *43*, 13072-13082.
22. Skoufias, D.A., DeBonis, S., Saoudi, Y., Lebeau, L., Crevel, I., Cross, R., Wade, R.H., Hackney, D., and Kozielski, F. (2006). S-trityl-L-cysteine is a reversible, tight binding inhibitor of the human kinesin Eg5 that specifically blocks mitotic progression. *The Journal of biological chemistry* *281*, 17559-17569.
23. Valentine, M.T., Fordyce, P.M., and Block, S.M. (2006). Eg5 steps it up! *Cell division* *1*, 31.
24. Homer, H., Gui, L., and Carroll, J. (2009). A spindle assembly checkpoint protein functions in prophase I arrest and prometaphase progression. *Science* *326*, 991-994.
25. Wei, L., Liang, X.W., Zhang, Q.H., Li, M., Yuan, J., Li, S., Sun, S.C., Ouyang, Y.C., Schatten, H., and Sun, Q.Y. (2009). BubR1 is a spindle assembly checkpoint protein regulating meiotic cell cycle progression of mouse oocyte. *Cell cycle Georgetown*, 11121121.
26. Lam, F., Cladiere, D., Guillaume, C., Wassmann, K., and Bolte, S. (2017). Superresolution for everybody: An image processing workflow to obtain high-resolution images with a standard confocal microscope. *Methods* *115*, 17-27.
27. van der Waal, M.S., Hengeveld, R.C., van der Horst, A., and Lens, S.M. (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental cell research* *318*, 1407-1420.
28. Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J.R., 3rd, Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* *38*, 383-392.
29. Kolano, A., Brunet, S., Silk, A.D., Cleveland, D.W., and Verlhac, M.H. (2012). Errorprone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E1858-1867.
30. Chen, J., and Liu, J. (2014). Spatial-temporal model for silencing of the mitotic spindle assembly checkpoint. *Nature communications* *5*, 4795.

31. Chen, J., and Liu, J. (2015). Erroneous Silencing of the Mitotic Checkpoint by Aberrant Spindle Pole-Kinetochore Coordination. *Biophys J* *109*, 2418-2435.
32. Gutierrez-Caballero, C., Cebollero, L.R., and Pendas, A.M. (2012). Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends in genetics : TIG* *28*, 351-360.
33. Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., Borsos, M., Rattani, A., Adams, D.J., and Nasmyth, K. (2013). Spindle assembly checkpoint of oocytes depends on a kinetochore structure determined by cohesin in meiosis I. *Curr Biol* *23*, 2534-2539.
34. Nagaoka, S.I., Hodges, C.A., Albertini, D.F., and Hunt, P.A. (2011). Oocyte-specific differences in cell-cycle control create an innate susceptibility to meiotic errors. *Curr Biol* *21*, 651-657.
35. Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjold, M., Herbert, M., and Hoog, C. (2007). Biorientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nature genetics* *39*, 966-968.
36. Hodges, C.A., LeMaire-Adkins, R., and Hunt, P.A. (2001). Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *Journal of cell science* *114*, 2417-2426.
37. Tauchman, E.C., Boehm, F.J., and DeLuca, J.G. (2015). Stable kinetochore-microtubule attachment is sufficient to silence the spindle assembly checkpoint in human cells. *Nature communications* *6*, 10036.
38. Magidson, V., He, J., Ault, J.G., O'Connell, C.B., Yang, N., Tikhonenko, I., McEwen, B.F., Sui, H., and Khodjakov, A. (2016). Unattached kinetochores rather than intrakinetochore tension arrest mitosis in taxol-treated cells. *The Journal of cell biology* *212*, 307-319.
39. Pinsky, B.A., Kung, C., Shokat, K.M., and Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nature cell biology* *8*, 78-83.
40. Pinsky, B.A., and Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol* *15*, 486-493.
41. Hassold, T., and Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Current opinion in pediatrics* *21*, 703-708.
42. Riris, S., Webster, P., and Homer, H. (2014). Digital multiplexed mRNA analysis of functionally important genes in single human oocytes and correlation of changes in transcript levels with oocyte protein expression. *Fertility and sterility* *101*, 857-864.
43. Lagirand-Cantaloube, J., Ciabrini, C., Charrasse, S., Ferrieres, A., Castro, A., Anahory, T., and Lorca, T. (2017). Loss of Centromere Cohesion in Aneuploid Human Oocytes Correlates with Decreased Kinetochore Localization of the Sac Proteins Bub1 and Bubr1. *Sci Rep* *7*, 44001.
44. Niauxt, T., Hached, K., Sotillo, R., Sorger, P.K., Maro, B., Benezra, R., and Wassmann, K. (2007). Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I. *PloS one* *2*, e1165.
45. Chambon, J.P., Hached, K., and Wassmann, K. (2013). Chromosome spreads with centromere staining in mouse oocytes. *Methods Mol Biol* *957*, 203-212.

46. Wassmann, K., and Benezra, R. (1998). Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11193-11198.

Figure 1

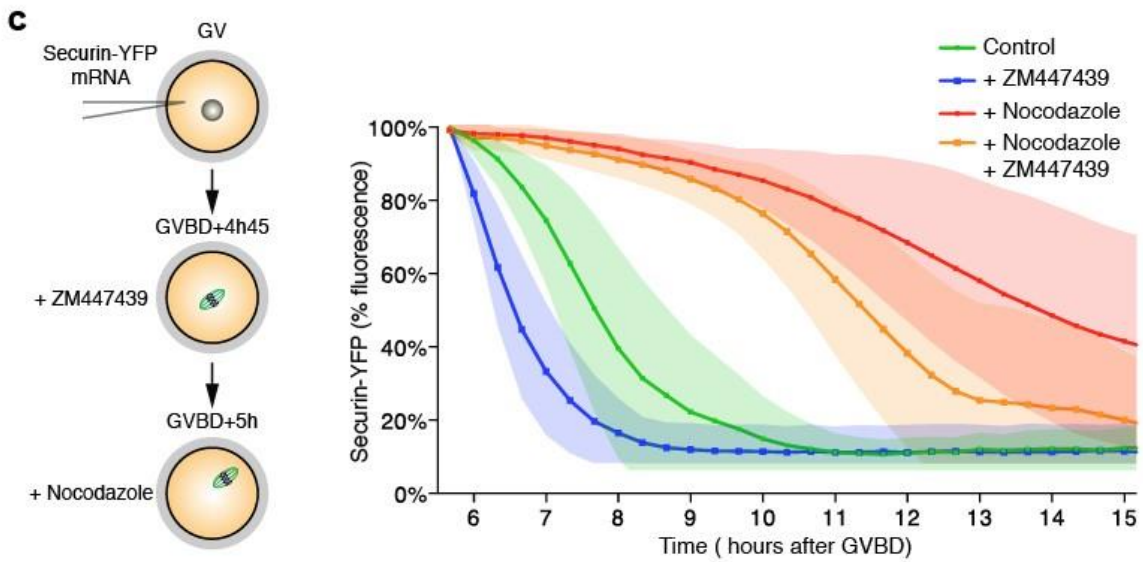
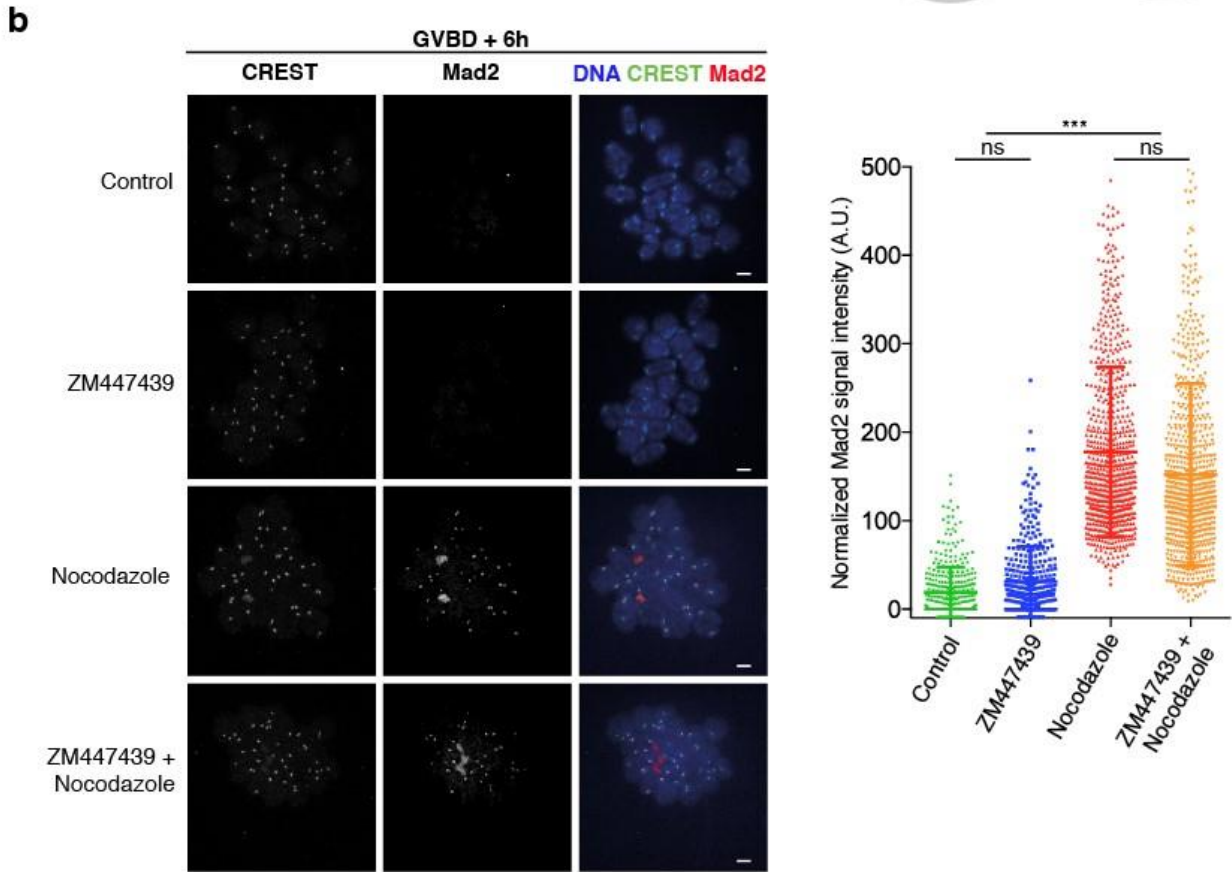
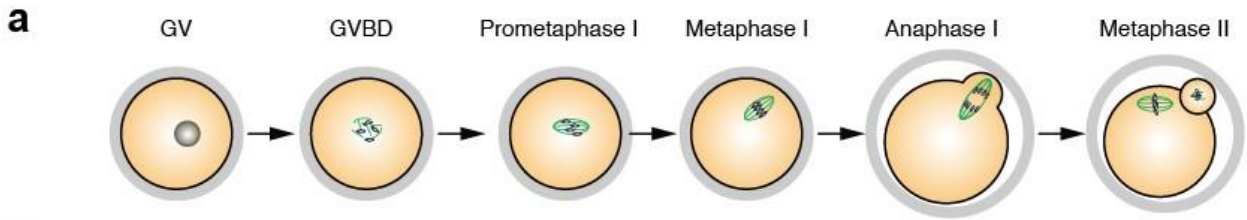
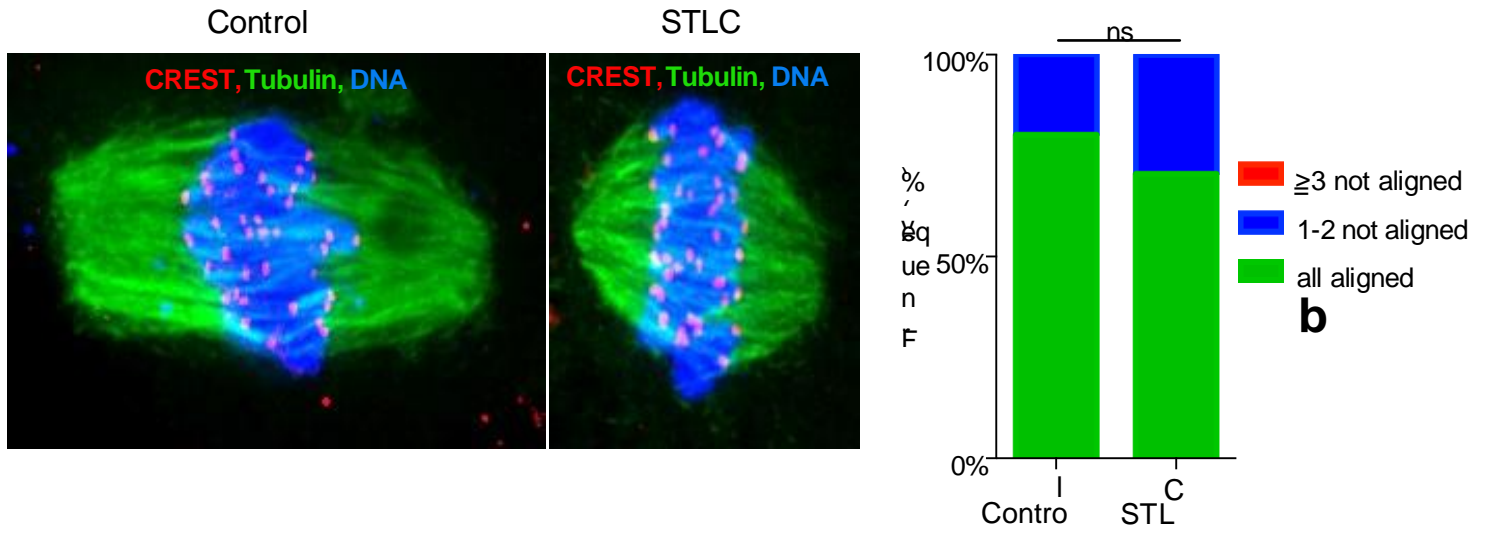


Figure 2

a



b

GVBD +6h

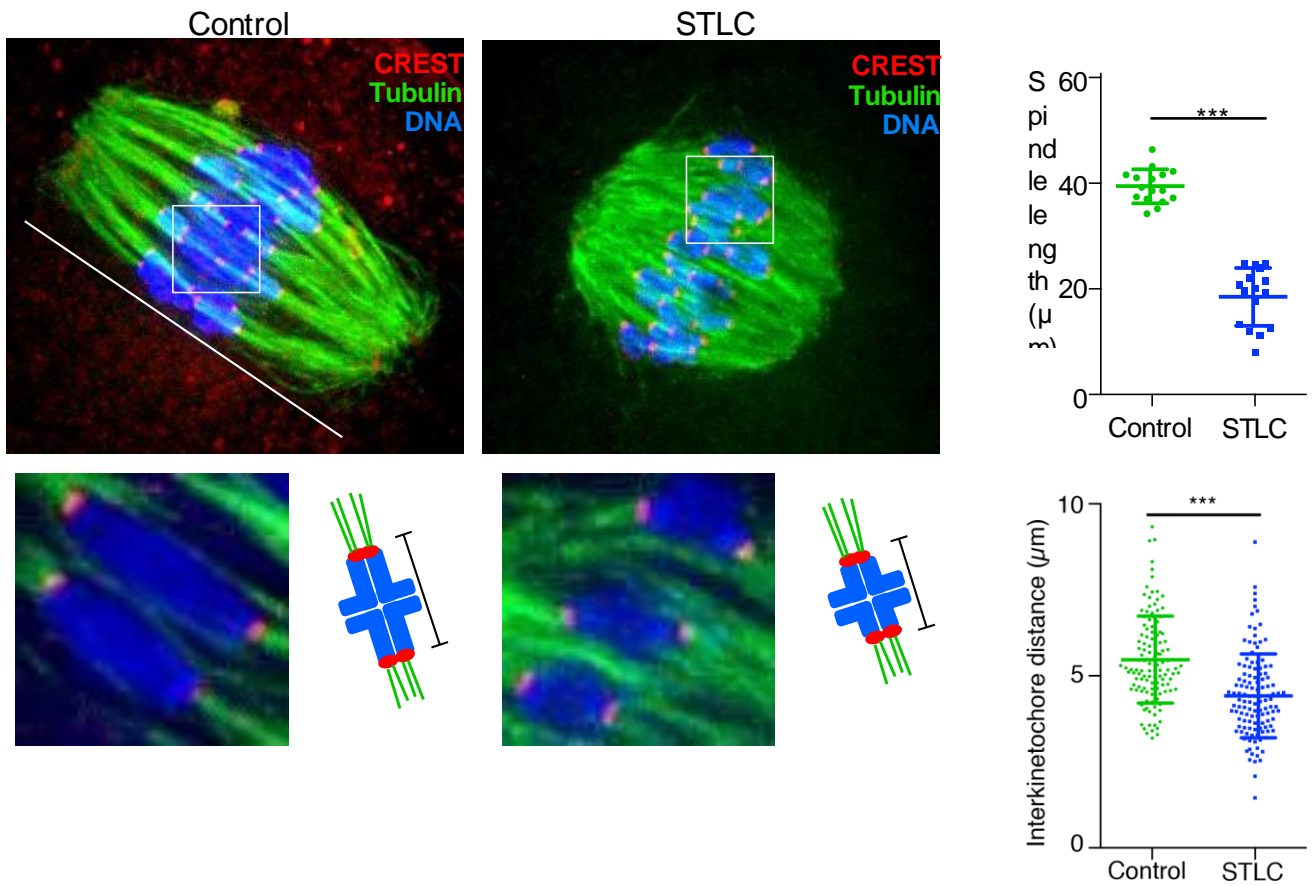


Figure 3

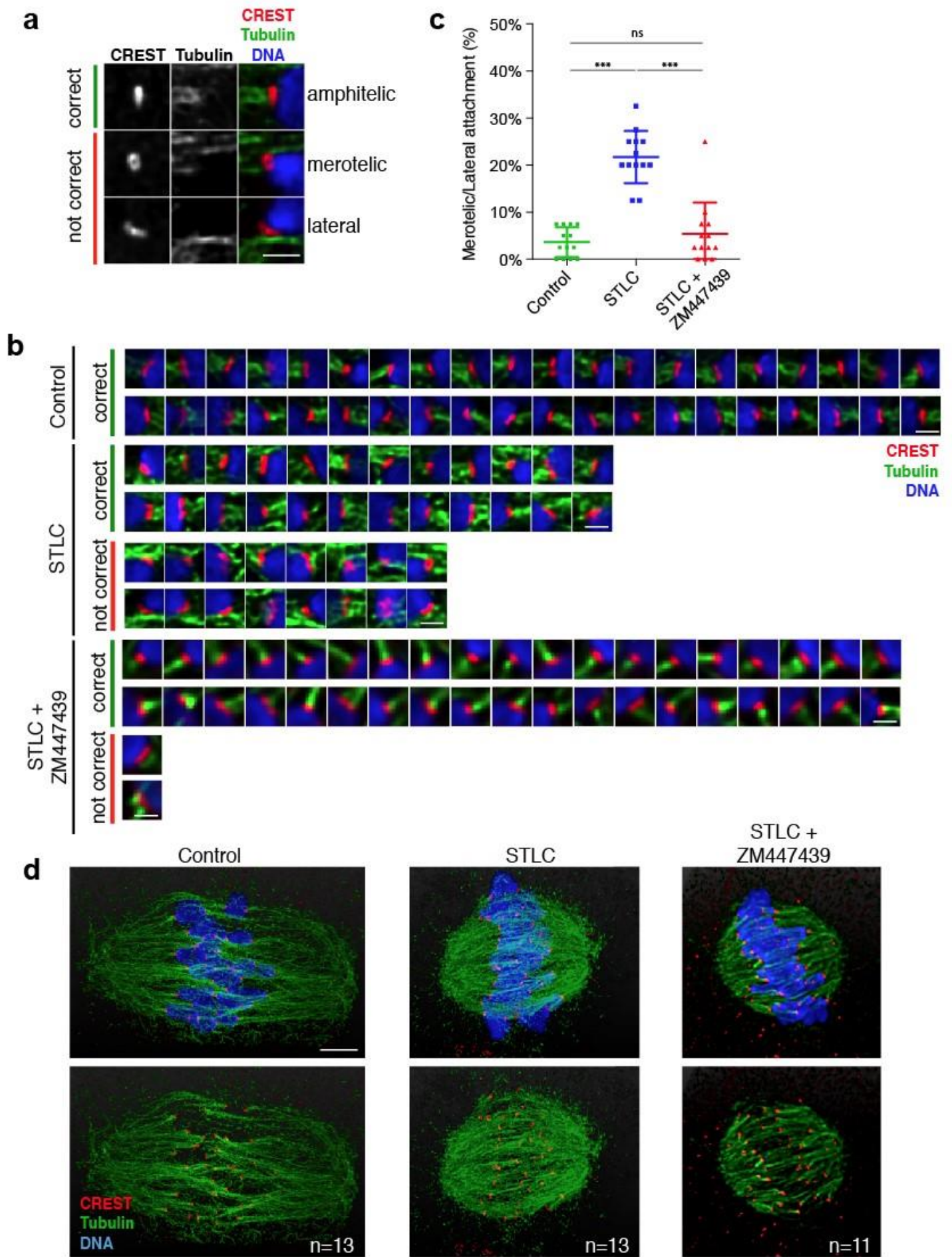


Figure 4

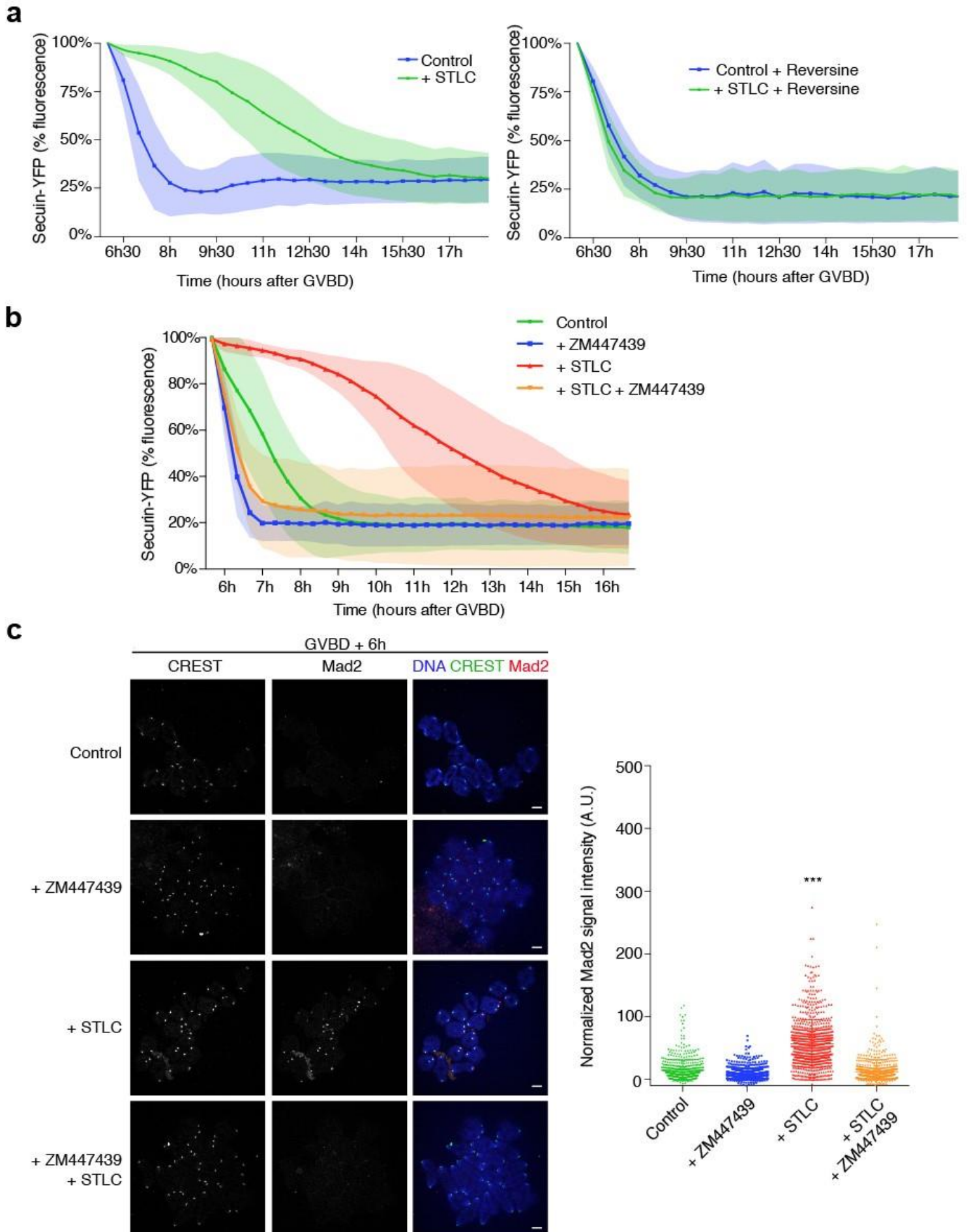


Figure S1

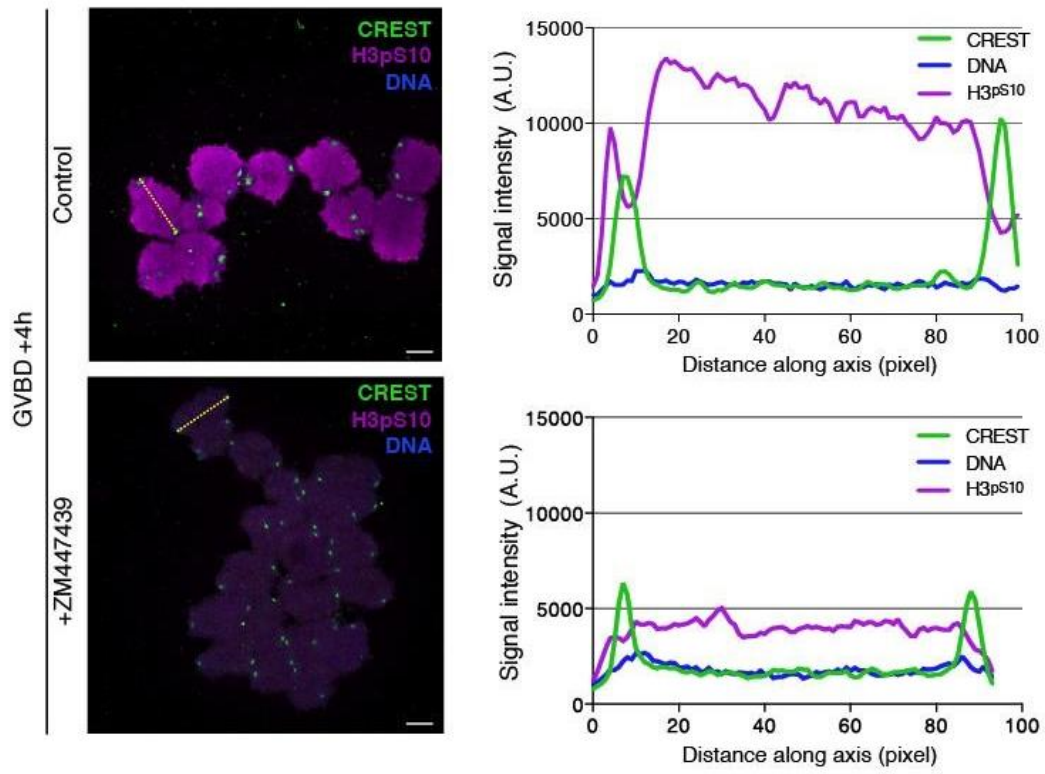


Figure S1

ZM447439 treatment efficiently inhibits phosphorylation of Histone H3S10.

Chromosome spreads of prometaphase oocytes. Where indicated, oocytes were treated with ZM447439 (10 μ M) at the time of GVBD. Chromosomes were stained with Hoechst (blue), anti-H3pS10 (purple) and CREST (green). Scale bar: 5 μ m. An example of H3pS10 signal intensity along the chromosome axis is shown for both cases. Images and quantifications of the H3pS10 signal along chromosome axis are representative of n=11, 18 oocytes from two independent experiments involving a total of 2 to 3 mice per experimental group. Related to Fig. 1.

Figure S2

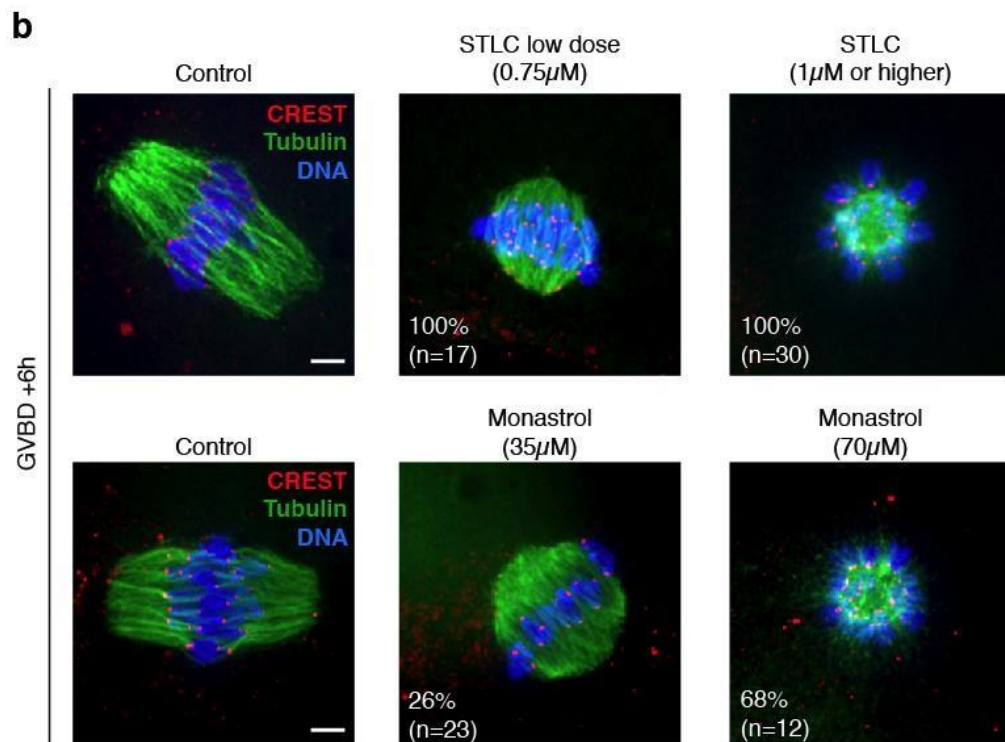
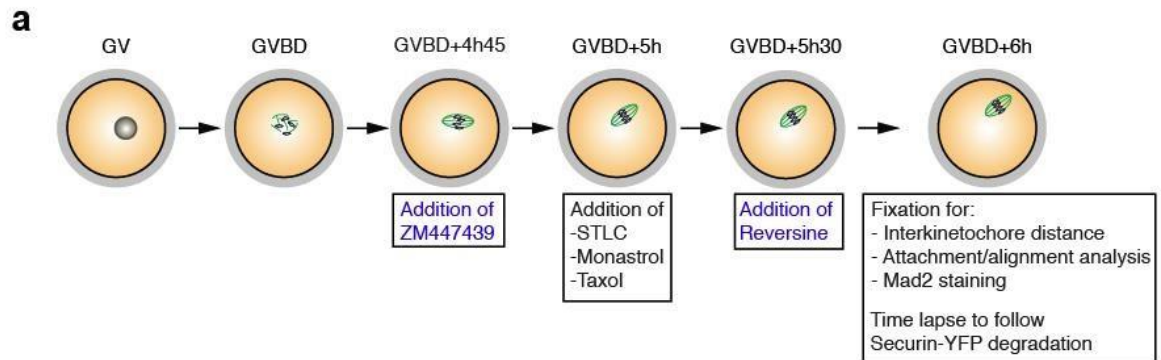


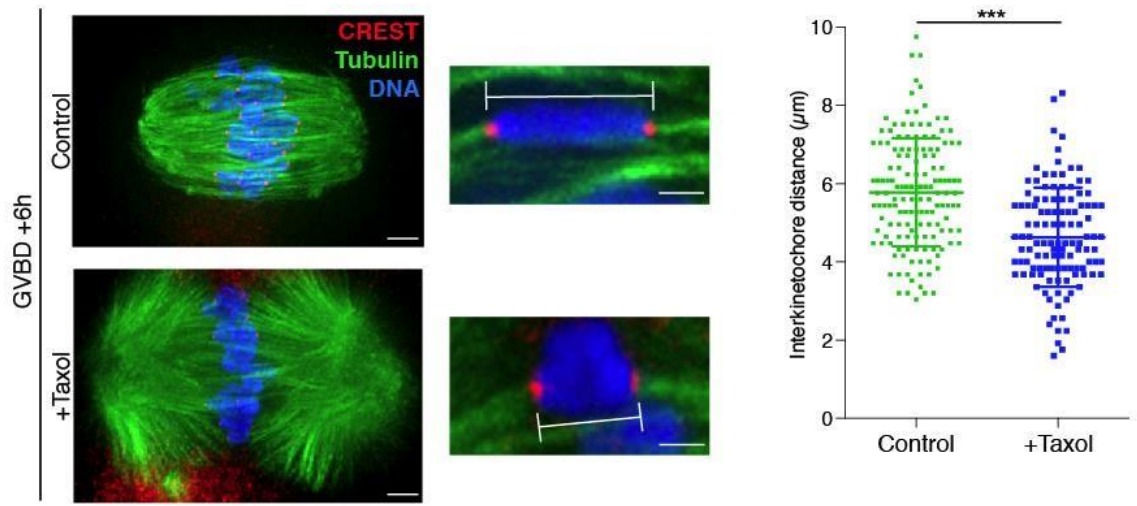
Figure S2

Inhibition of Eg5 activity with STLC and Monastrol at different doses

(a) Scheme of the experimental set-up, indicating when the drugs were added for the different experiments. Note that STLC, Monastrol or Taxol were always added at 5 hours after GVBD, when chromosomes have reached the metaphase plate. Where indicated, ZM447439 was added 15 min before, and Reversine 30 min after addition of STLC, or Taxol. Subsequent procedures were performed at 6 hours after GVBD. (b) Wholemout immunofluorescence staining of cold-treated spindles from oocytes fixed 6 hours after GVBD. Oocytes were treated either with STLC or with Monastrol at the given concentration at 5 hours after GVBD at the concentrations indicated. Microtubule fibers were stained with anti-Tubulin antibody (green), kinetochores with CREST (red) and chromosomes with Hoechst (blue). Pictures are representative of the spindle phenotype observed from at least 3 independent experiments for each condition (n=15, 17, 30 oocytes for the upper panel, and n=15, 23, 16 oocytes for the lower panel involving a total of at least 4 mice per experimental group). Scale bar: 5 μ m. Related to Fig. 2.

Figure S3

a



b

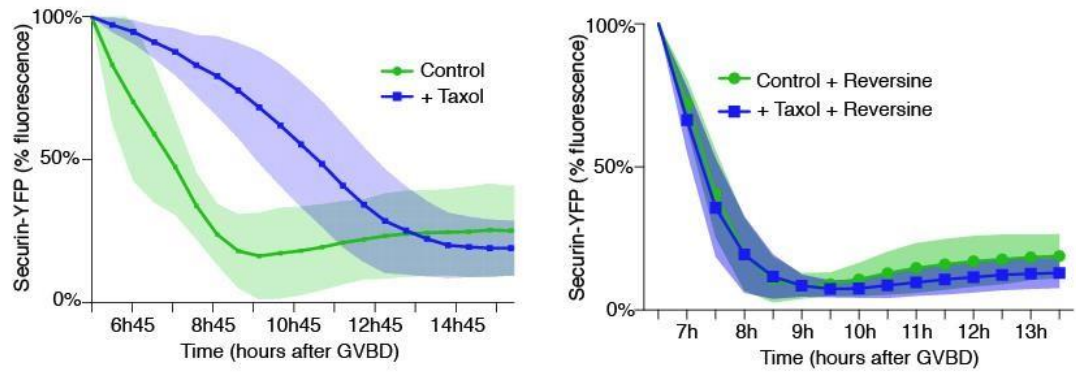


Figure S3

Taxol treatment reduces bivalent stretch and activates the SAC.

(a) Whole-mount immunofluorescence staining of cold-treated spindles from oocytes fixed at 6 hours after GVBD. Where indicated, oocytes were treated with Taxol (1 μ M) at 5 hours after GVBD. Microtubules fibers were stained with anti-Tubulin antibody (green), kinetochores with CREST (red) and chromosomes with Hoechst (blue). Scale bar: 5 μ m. Magnifications of a fully stretched chromosome and a weakly stretched chromosome are shown in the insets. Scale bar: 2 μ m. Interkinetochore distances were determined as indicated. On the right, the distribution of interkinetochore distances is shown (n=146, 117 chromosomes from n=12, 8 oocytes from two independent experiments involving a total of 2 to 3 mice per experimental group). Mean and standard deviation are indicated (***) p value < 0.0001). Two-tailed unpaired Student's ttest was performed for the statistical test. (b) Oocytes were injected with Securin-YFP mRNA at GV stage. Oocytes were treated with Taxol (1 μ M) at 5 hours after GVBD and additionally with Reversine (0.5 μ M) at 5 hours 30 minutes after GVBD, where indicated. Securin-YFP signal intensity was monitored by time-lapse fluorescence imaging and normalized to the highest value for each oocyte. Mean and standard deviation of the population are plotted in arbitrary units against time. (n=23, 41 oocytes (left) and n=24, 19 oocytes (right) from two independent experiments, involving a total of 4 mice per experimental group). Related to Fig. 2.

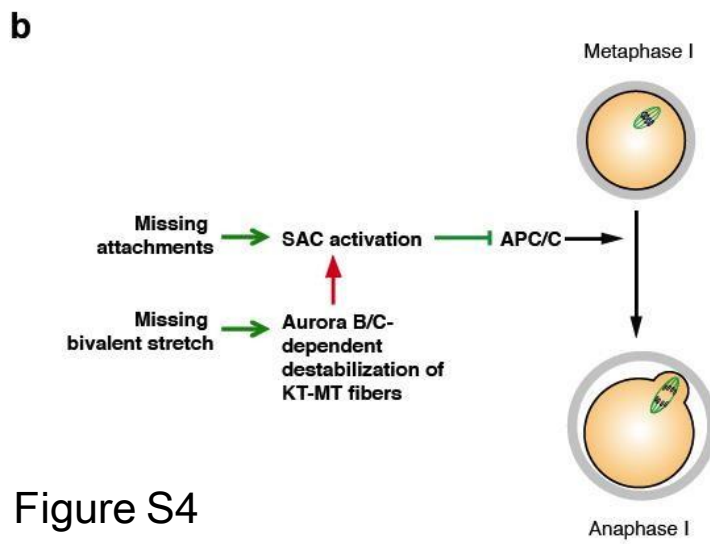
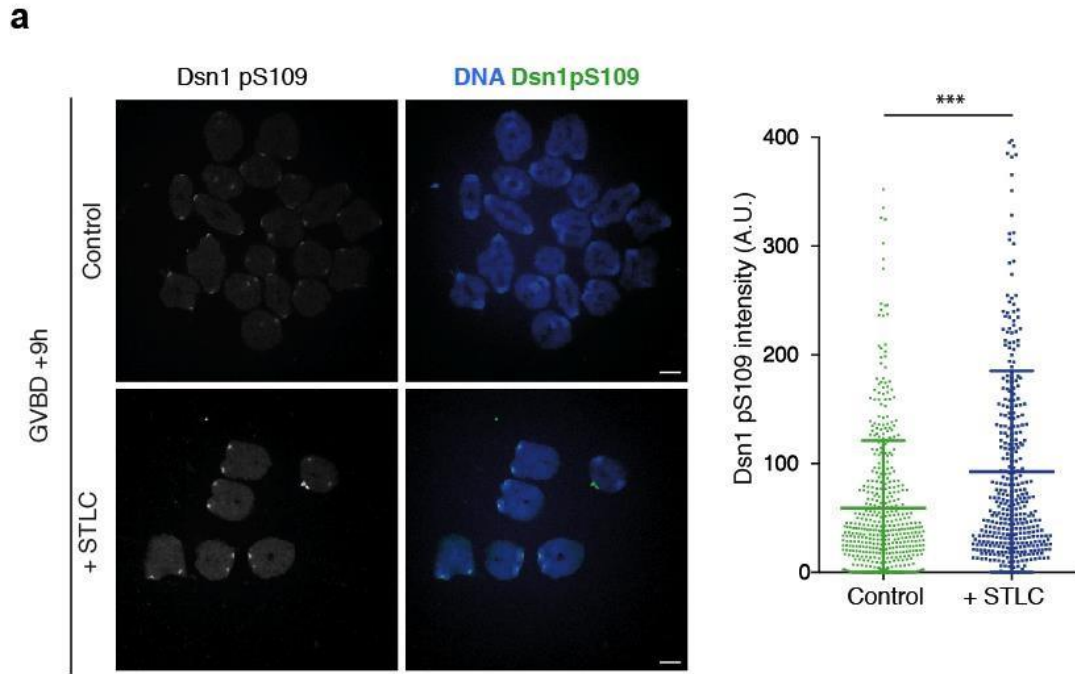


Figure S4

Figure S4

Aurora B dependent Dsn1 S109 phosphorylation is increased upon STLC treatment.

(a) Chromosome spreads of metaphase I chromosomes. Oocytes were treated with STLC (0.75 μ M) at 5 hours after GVBD. Chromosomes were stained with Hoechst (blue) and anti-Dsn1pS109 antibody (red). Scale bar: 5 μ m. All individual Dsn1pS109 intensity values are plotted (n=468, 370 kinetochores from n=14, 12 oocytes of two independent experiments involving a total of 2 to 3 mice per experimental group). Mean and standard deviation are shown (***) p value < 0.0001). Two-tailed unpaired Student's t-test was performed for the statistical test. **(b)** Aurora B/C kinases are required for the recognition of less stretched bivalents in metaphase I by creating unattached kinetochores that are recognized by the SAC, causing a delay in APC/C activation and anaphase I onset. KT-MT fibers: kinetochore-microtubule fibers. See text for details. Related to Fig. 4.

DISCUSSION

QUEL SIGNAL EST DETECTE PAR LE SAC DANS L'OVOCYTE DE SOURIS ?

Aurora B n'est pas essentielle à la réactivation du SAC en réponse à des kinétochores non attachés

Mon travail de thèse a porté sur la détection des erreurs d'attachement et des défauts de tension dans l'ovocyte de souris. J'ai montré que l'activité kinase d'Aurora B/C n'est pas essentielle pour le recrutement des protéines du SAC et la réponse du SAC en présence de kinétochores non attachés. En effet, même lorsqu'Aurora B/C est inhibée, Mad2 est recrutée sur les kinétochores et le SAC est capable de retarder le déclenchement de l'anaphase après traitement au nocodazole en métaphase.

En mitose, des études ont montré qu'Aurora B était requise pour le recrutement initial des protéines du SAC ainsi que pour l'assemblage du fuseau¹⁶⁹. Dans mes expériences, j'ai regardé plus précisément la réponse du SAC au nocodazole en métaphase, c'est-à-dire après la formation du fuseau et après le recrutement initial des protéines du SAC. Même s'il est possible qu'Aurora B/C puisse aussi jouer un rôle en début de prométaphase lors du recrutement initial des protéines du SAC, mes résultats montrent clairement que l'activité kinase d'Aurora B/C n'est pas requise pour réactiver le point de contrôle du fuseau en métaphase en réponse à des kinétochores non attachés.

Une étude dans les ovocytes de souris montre que l'inhibition de Aurora B/C en prométaphase provoque une dégradation prématurée de la cycline B²⁷⁰. De la même manière, nous avons observé une dégradation prématurée de la sécurine – qui a une cinétique de dégradation similaire à la cycline B^{180,271} - quand Aurora B/C est inhibée en métaphase. Ce résultat suggère qu'en absence d'Aurora B/C, les attachements entre microtubules et kinétochores sont stabilisés et permettent l'inactivation du SAC prématurément.

Dans cette étude, l'inhibition de Aurora B/C dans des cellules préalablement traitées par le nocodazole, donc déjà arrêtées avec un SAC actif, provoque la dégradation de la cycline B²⁷⁰, suggérant que Aurora B/C est requise pour le maintien de l'activité du SAC. Or j'ai montré que lorsque Aurora B/C est inhibée avant le traitement au nocodazole, le SAC est capable de recruter Mad2 au kinétochore et de retarder la dégradation de la sécurine, ce qui montre que Aurora B/C n'est pas nécessaire pour la réactivation du SAC. Dans cette étude, la dégradation prématurée de la cycline B observée après inhibition d'Aurora B est certainement dûe à l'inactivation prématurée du SAC grâce à la stabilisation des attachements, ce qui est aussi suggéré par une récente étude en mitose²³⁸. La concentration de nocodazole utilisée

n'induit pas une dépolymérisation complète des microtubules, mais perturbe fortement la structure du fuseau. Ainsi, même en présence de nocodazole, des attachements peuvent se former qui seraient stabilisés prématurément en absence de Aurora B.

La baisse de tension consécutive au STLC provoque une réactivation du SAC

Dans mes expériences, le traitement au STLC qui inhibe la kinésine-5 permet de conserver un fuseau bipolaire malgré une taille rétrécie. Excepté ce changement, la morphologie du fuseau n'est pas altérée et les chromosomes restent alignés avec une distance inter-kinétochore réduite révélatrice d'une baisse de tension. Dans ce cas, j'ai pu observer un délai important de la dégradation de la sécurine, qui est dépendant du point de contrôle du fuseau. Ce résultat suggère que le SAC est capable de répondre à l'absence de tension en méiose I. Dans une étude sur la perte de fonction de la protéine NuMa, protéine essentielle à la focalisation des pôles en mitose et en méiose, les auteurs observent également une baisse de la tension entre les bivalents en méiose I mais pas d'arrêt de la méiose⁶. Dans cette étude, le fuseau est gravement altéré par la perte de fonction de NuMa : très allongé et pôles du fuseau hyper-focalisés. Sur le fuseau, les bivalents ne sont pas tous alignés mais demeurent néanmoins attachés. Dans cette étude, les ovocytes déficients pour NuMa conservent un SAC actif en réponse aux kinétochores non attachés, ce qui suggère que la fonction du SAC n'est pas altérée par la mutation de NuMa. On peut envisager quatre hypothèses pour expliquer ces résultats :

1. La perte de tension n'est pas reconnue par le SAC.
2. Le SAC est moins robuste dans les ovocytes mutés pour NuMa et ne pourrait pas répondre à un défaut de tension.
3. L'extinction du SAC est plus efficace dans les ovocytes mutés pour NuMa
4. La baisse de tension n'est pas suffisante pour activer le SAC.

Mon travail de thèse exclut la première hypothèse. La seconde et la troisième hypothèse n'ont pas été explicitement testées dans ce travail, mais la réponse de ces ovocytes aux faibles doses de nocodazole indique que le SAC est aussi robuste. La quatrième me paraît plus probable : dans les ovocytes mutés pour NuMa, la diminution de la distance inter-kinétochore est d'environ 0.6µm en moyenne, tandis que dans mes expériences, la perte de la tension induite par le STLC est plus conséquente et la distance inter-kinétochore baisse en moyenne de 1.2 µm. La perte de tension après le traitement au taxol est du

même ordre. Il y aurait donc un seuil à partir duquel la baisse de tension permet d'activer le point de contrôle du fuseau, et ce seuil ne serait pas atteint dans les ovocytes mutés pour NuMa.

Aurora B/C est nécessaire à l'activation du SAC en réponse à des défauts de tension

Lors de mon travail de thèse, j'ai pu montrer que l'inhibition d'Aurora B/C avant la baisse de tension induite par le STLC empêche la réponse du SAC et permet la dégradation de la sécurine. Comme nous l'avons vu, ce n'est pas à cause d'un défaut dans le recrutement direct des protéines du SAC, puisqu'après inhibition de Aurora B/C en métaphase, Mad2 est recrutée et le SAC activé en réponse au nocodazole. Notre hypothèse est que Aurora B/C reconnaît les attachements avec moins de tension, les déstabilise et permet ainsi le recrutement des protéines du SAC. Cette hypothèse est confortée par nos résultats sur l'attachement des kinétochores aux microtubules. Nous avons observé que la baisse de tension due au STLC entraîne des défauts d'attachement des chromosomes au fuseau. De nombreux kinétochores sont attachés latéralement ou de manière mérotéliques, alors qu'à ce moment de la métaphase, les chromosomes sont normalement bien attachés et il y a peu d'erreurs d'attachement. Nous interprétons ces mauvais attachements comme le résultat d'une activité impropre de correction des attachements lorsque les chromosomes ne sont plus sous tension. Ceci expliquerait pourquoi l'inhibition d'Aurora B avant le traitement au STLC restaure un attachement correct des chromosomes en métaphase. Le rôle que nous proposons pour Aurora B/C dans la méiose I est donc de corriger les erreurs d'attachement, en particulier les attachements sans tension.

Dans une étude récente⁷, les auteurs montrent que les attachements sont progressivement stabilisés dans l'ovocyte de souris, de telle manière que la majorité des attachements sont corrects en méiose I dès GVBD +5h. Cependant, les auteurs montrent que la distance entre le kinétochore interne et le kinétochore externe lors la métaphase I est bien plus faible qu'en métaphase II. D'après ces résultats, le pool d'Aurora B/C au centromère est donc très proche du kinétochore externe, et il ne semble pas pouvoir y avoir de séparation spatiale entre les deux. Par exemple, entre 4h et 6h après GVBD, la distance intra-kinétochore ne varie pas mais les cibles d'Aurora B/C sont moins phosphorylés à GVBD +6h. D'après les auteurs, l'activité d'Aurora B/C ne varie pas significativement en méiose I, mais en revanche, le niveau de phosphatase PP2A-B56 qui contrebalance Aurora B/C augmente. Cette augmentation permettrait donc de stabiliser les attachements au fur et à mesure que l'ovocyte progresse dans la métaphase. Une prédiction de cette hypothèse est que l'inhibition d'Aurora B en

métaphase améliore la fidélité de la séparation des chromosomes en méiose. Or selon une autre étude, l'inhibition d'Aurora B/C par le ZM447439 à GVBD +4h entraîne au contraire une augmentation des aneuploïdies de 15% dans les ovocytes en méiose II²⁷⁰.

Nos résultats n'excluent pas que le recrutement graduel de PP2A-56 permette de stabiliser les attachements, et il serait intéressant d'étudier la réponse au STLC lorsque l'activité de PP2A-B56 varie. Nous montrons que la protéine Aurora B/C permet de détecter en métaphase I, les kinétochores qui ne sont pas sous tension et d'activer le SAC, et que cela constitue probablement le mécanisme par lequel les ovocytes détectent la tension en méiose I. Ainsi, même si l'augmentation de l'étirement des kinétochores en méiose I n'est pas substantielle en métaphase I d'après l'étude de Yoshida et al., la perte de tension pourrait suffire à augmenter la phosphorylation des cibles d'Aurora B et entraîner la déstabilisation des attachements. Il serait donc intéressant d'observer dans nos ovocytes traités au STLC si une telle diminution de l'étirement du kinétochore a lieu.

Quelle est la robustesse du SAC par rapport à la tension en méiose I dans l'ovocyte de souris ?

En utilisant des modèles de souris XO, où seul un chromosome X est présent dans la cellule, des études ont montré que la présence d'un univalent X dans le spermatocyte entraîne un blocage en métaphase I, suivi par l'apoptose de la cellule²⁵⁷. Au contraire, les femelles XO sont fertiles et bien qu'il y ait un univalent, on peut observer des chromatides sœurs séparées après la première division de méiose. Ce résultat montre que l'anaphase peut avoir lieu même en présence d'un univalent^{5,272}. On note aussi que dans cette étude, environ les deux tiers des chromatides sœurs X s'attachent au même pôle, il n'y a donc pas de séparation prématurée des chromatides sœurs dans ce cas. Cela suggère que les propriétés des kinétochores frères fusionnés en méiose I empêchent un attachement bipolaire de se faire. Enfin, les auteurs montrent que l'entrée en anaphase n'est pas retardée par la présence d'un univalent X. Cette étude suggère que l'absence de tension d'un seul univalent n'est pas suffisante pour activer le SAC.

Une autre étude, menée sur des souris déficientes pour un élément du complexe synaptonémal SCP3 mène à des conclusions différentes^{4,273}. Dans ces souris, les chromosomes homologues ne sont pas capables de s'apparier donc on observe des univalents. Dans les ovocytes SYCP3^{-/-}, l'anaphase n'est pas retardée, alors qu'un arrêt en métaphase I est observé suite à un traitement au nocodazole. Ces

ovocytes ne contiennent que peu d'univalents (entre 1 à 3) et ces univalents sont capables de s'attacher au fuseau de manière bipolaire. Dans ce cas, la protéine Mad2 est rapidement perdue au kinétochore, et l'anaphase a lieu. Il n'y a donc pas de correction de cet attachement incorrect en méiose I. C'est-à-dire qu'Aurora B/C n'est pas capable de déstabiliser de tels attachements incorrects, qui sont à l'origine de la séparation prématurée des chromatides sœurs en méiose I. Si nous considérons qu'Aurora B/C n'est sensible qu'à l'étirement du kinétochore, un attachement bipolaire des univalents ne pourra pas être déstabilisé par Aurora B/C car le kinétochore est lui-même étiré par cet attachement bipolaire. Cette hypothèse est confortée par une étude récente en méiose II dans l'ovocyte de souris, qui montre que des chromatides isolées peuvent s'attacher de manière bipolaire via leur unique kinétochore²⁷⁴. Cet attachement génère probablement une tension au sein du kinétochore, qui permet l'alignement de la chromatide à l'équateur mais aussi la stabilisation des attachements. Sur ce dernier point, on peut penser que l'étirement du kinétochore est suffisante pour empêcher Aurora B/C de phosphoryler les protéines du kinétochore externe en méiose II, ce qui stabilise les attachements.

Un nombre élevé d'univalents en méiose I déclenche-t-il une réponse du SAC ?

Le nombre d'univalent dans l'ovocyte peut être très important, par exemple dans des ovocytes déplétés pour la protéine Mlh1. Cette protéine est requise pour former les échanges génétiques en prophase, et sa déplétion entraîne une réduction drastique du nombre de chiasmas par ovocyte (environ 2 chiasmas par ovocyte)²⁷⁵ et la majorité des chromosomes reste sous forme d'univalents. Les chromosomes sont dispersés sur le fuseau et ne parviennent pas à se bi-orienter et l'ovocyte reste arrêté en métaphase I. Un résultat similaire est observé pour des ovocytes dont la protéine HORMA est déplétée : on observe un grand nombre d'univalents, qui sont incapables de s'aligner sur la plaque métaphasique, et l'ovocyte reste arrêté en métaphase I²⁷⁶.

Si les univalents échouent à s'aligner sur la plaque métaphasique, c'est probablement que l'attachement bipolaire des chromatides sœurs ne se fait pas correctement. Ainsi la majorité de ces univalents sont attachés de manière monopolaire au fuseau, et il n'y a pas d'étirement du kinétochore. Ceci entraînerait une déstabilisation des attachements par Aurora B/C et permet l'arrêt dépendant du SAC. L'activité du SAC dépendrait du nombre d'univalents qui ne sont pas sous tension, c'est-à-dire attachés de manière monopolaire. On peut émettre l'hypothèse que chaque univalent qui n'est pas sous

tension génère un faible signal pour le SAC, et que c'est la somme totale de ces faibles signaux qui permet, *in fine*, de générer un arrêt durable par le SAC.

Cette hypothèse est confortée par l'observation suivante : Si un grand nombre d'univalents parviennent à s'attacher de manière bipolaire, il n'y a plus d'arrêt en métaphase I, mais seulement un délai. En effet, dans certains fonds génétiques, les univalents s'attachent de manière bipolaire plus souvent que dans d'autres. Ainsi, dans le fond C3H, le nombre d'univalents attachés de manière bipolaire est supérieur que dans le fond C57/B6 utilisé dans l'étude. Nagaoka *et al.* ont étudié la méiose dans des ovocytes *Mlh1*^{-/-} issus de ce fond génétique. Dans ce cas, l'arrêt en métaphase n'est pas aussi prononcé que dans l'autre fond génétique, et les ovocytes parviennent à expulser un globule polaire avec un délai de deux à trois heures. Cette levée de l'arrêt résulte probablement de la capacité des univalents à former des attachements bipolaires. Par exemple, les deux kinétochores des univalents forment une structure très allongée juste avant l'anaphase I, alors que ce n'est pas observé dans l'autre fond génétique C57B6³. Il est tout à fait possible que cet étirement résulte de l'attachement bipolaire de ces univalents, et que le SAC soit finalement satisfait, à la manière des ovocytes *SYCP3*^{-/-}. Le délai observé résulterait selon les auteurs de défauts dans la formation d'un fuseau bipolaire, puisque dans ces ovocytes *Mlh1*^{-/-}, les fuseaux sont souvent allongés.

Pour résumer, il semble que si les univalents parviennent à se bi-orienter, le SAC est satisfait et permet la ségrégation des chromosomes.

On peut imaginer qu'un faible nombre d'univalents en méiose I, bien qu'ils ne soient pas sous tension, ne suffise pas à activer le SAC car la réponse du SAC à ces kinétochores sans tension serait faible. C'est l'addition d'un grand nombre de kinétochores non attaché qui, collectivement, permettra une activation du SAC, comme nous l'avons observé dans les ovocytes traités au STLC.

Dans ce cas, comment l'ovocyte peut détecter comme incorrect l'attachement mérotélique de deux kinétochores frères au sein d'un bivalent ? Cette question reste encore à éclaircir mais une hypothèse est que la configuration des kinétochores frères qui sont fusionnés comme s'ils ne faisaient qu'un, ne favoriserait pas ces attachements mérotéliques.

Quel est le nombre minimal d'univalents détecté dans l'ovocyte ?

Un autre déterminant décisif pour la robustesse du SAC en méiose est le volume de la cellule. Nous avons vu que les ovocytes de xénope sont inaptes à répondre au nocodazole alors qu'ils possèdent les protéines du SAC^{255,277}. Il est possible que le volume de l'ovocyte de xénope dilue le signal inhibiteur émis par le SAC qui par conséquent n'est pas capable d'inhiber l'anaphase. Une étude réalisée dans les ovocytes de souris adresse cette question : les ovocytes sont divisés en deux au moyen d'une micropipette, et le niveau de cycline B est filmé dans ces ovocytes²⁷⁸. Ils montrent ainsi que lorsqu'un seul bivalent reste dans un demi ovocyte, celui-ci est capable de retarder la dégradation de la cycline B suite à un traitement au nocodazole alors qu'un seul bivalent dans un ovocyte entier n'en est pas capable. Cette étude montre ainsi que deux bivalents non attachés par ovocyte est le nombre minimum de chromosomes requis pour arrêter l'ovocyte de souris. En effet, un seul bivalent comporte 4 kinétochores et ne peut arrêter la cellule, tandis qu'un bivalent dans un demi ovocyte, qui équivaut à 8 kinétochores dans un ovocyte entier, est capable de générer un arrêt en métaphase. L'hypothèse de cette étude est élégante, mais elle nécessite implicitement que le signal inhibiteur diffuse dans tout l'ovocyte et ne soit pas spatialement restreint au fuseau, ce qui semble le cas en mitose²⁷⁹.

Dans certains embryons issus de zygotes au large volume cytoplasmique, comme chez le xénope ou le poisson-zèbre, il n'y a pas d'arrêt en métaphase suite à un traitement au nocodazole^{280,281}. Pour d'autres, comme l'embryon d'oursin, ou de nématode, l'arrêt en métaphase peut être initié par la dépolymérisation des microtubules mais l'arrêt n'est pas durable^{282,283}. Chez la souris, le traitement des embryons par des agents dépolymérisant génère un arrêt durable en métaphase^{284,285}. Des études récentes montrent clairement un lien entre d'une part le volume cytoplasmique et d'autre part la robustesse du SAC. Chez le nématode, le SAC arrête les cellules plus longtemps au fur et à mesure des divisions embryonnaires. La raison principale est la diminution du volume cytoplasmique au fur et à mesure des divisions, et la corrélation entre volume cytoplasmique et durée de l'arrêt est très nette. C'est manifestement le rapport « nombre de kinétochores sur volume cytoplasmique » qui détermine la longueur de l'arrêt, puisqu'une cellule embryonnaire qui possède un rapport élevé de « kinétochore sur volume cytoplasmique » s'arrête plus longtemps encore en métaphase²⁸⁶.

Il est cependant difficile de généraliser cette hypothèse pour tous les modèles, dans la mesure où chez le nématode, les kinétochores sont répartis sur tout le chromosome et donc en nombre conséquent comparés aux embryons de xénope ou de mammifères, qui possèdent un faible rapport « nombre de

kinétochore sur volume cytoplasmique ». Dernièrement, la question du rapport entre volume du cytoplasme et point de contrôle du fuseau a été adressé dans des ovocytes de souris²⁸⁷. Cette étude montre que le volume de l'ovocyte affecte à la fois la morphologie du fuseau mais aussi la dilution du MCC. Dans des ovocytes dont le volume est divisé par deux, l'alignement des chromosomes se fait plus rapidement mais l'anaphase a lieu avec un délai, malgré des attachements corrects. L'ensemble de ces études montre que le rapport entre nombre de kinétochores non attachés et volume cytoplasmique constitue un paramètre important pour la robustesse du point de contrôle du fuseau.

Y-a-t-il un lien entre le SAC et l'augmentation des aneuploïdies liées à l'âge dans les ovocytes de mammifères ?

L'augmentation du risque d'aneuploïdies liée à l'âge dans les ovocytes de mammifères a de multiples causes, environnementales mais aussi génétiques^{288,289}. Ainsi, on estime que pour une femme de 34 ans, près de 20% des ovocytes sont aneuploïdes, alors qu'à 40 ans c'est plus de 40% des ovocytes qui sont aneuploïdes²⁹⁰. Plusieurs études ont suggéré qu'une des raisons majeures était la baisse de la robustesse du SAC dans les ovocytes âgés. En effet, on observe dans ces ovocytes une réduction du niveau d'ARNm codant pour des protéines du SAC comme Bub1, BubR1 ou encore Mad2²⁹¹⁻²⁹³, ce qui pourrait altérer la fonction du SAC. Lors de la méiose I, les ovocytes âgés expulsent leur globule polaire au même moment que les ovocytes jeunes et le SAC semble donc aussi fonctionnel dans ces ovocytes²⁹⁴. Cependant, lorsque le SAC est davantage sollicité, comme par exemple pour répondre à la présence de kinétochores non attachés en métaphase I, le SAC ne semble pas aussi robuste dans les ovocytes âgés²⁹⁵. Dans cette étude, les auteurs observent la récupération des ovocytes après une exposition transitoire au nocodazole. Ils observent dans les ovocytes âgés un triplement des aneuploïdes comparé au contrôle et en concluent que le SAC est moins apte à protéger les ovocytes âgés contre des erreurs.

Dans ces conditions, ce n'est pas tant l'activation du SAC face aux kinétochores non attachés qui est testé, mais plus la capacité de corriger des erreurs d'attachement. En effet, les chromosomes ne sont plus attachés après ce traitement au nocodazole, et les auteurs observent la reformation des attachements en métaphase. Ils observent aussi une augmentation du nombre de chromosomes non alignés et cela pourrait être dû à des mauvais attachements non corrigés.

Est-ce qu'une moindre activité de correction des erreurs en méiose I dans les ovocytes âgés explique la survenue des aneuploïdies ?

Cette hypothèse est intéressante, car l'étude de Yun et al. montre une réduction de 50% de l'intensité d'Aurora C actif aux kinétochores dans les ovocytes âgés, ce qui est corrélé avec une moindre proportion de bivalents qui parviennent à se bi-orienter correctement²⁹⁵. Comme Aurora C est impliquée dans le mécanisme de correction des erreurs dans les ovocytes²⁹⁶, on peut donc penser que les ovocytes âgés ont une moindre capacité à corriger ces erreurs d'attachement. En accord avec cette hypothèse, les attachements mérotéliques et latéraux sont deux fois plus fréquents dans les ovocytes âgés en méiose I²⁹⁷. Récemment, il a été montré que les ovocytes de souris âgés présentent des anomalies lors de la formation du fuseau, et en particulier une moindre dynamique des microtubules²⁹⁸. Il serait très intéressant de vérifier si, dans ce cas, la tension des bivalents est affectée. On peut supposer que cela sera le cas, étant donné qu'un faible nombre de bivalents présente des attachements corrects²⁹⁸. D'après mon travail de thèse, et en prenant en compte l'ensemble de ces études, nous pouvons imaginer le scénario suivant : Dans les ovocytes âgés, le mécanisme de correction des erreurs est suffisamment altéré pour ne plus reconnaître efficacement la perte de tension. Ce défaut entraîne à son tour une incapacité du SAC à être activé face à ces problèmes, et autorise la transition métaphase anaphase alors même que subsiste un grand nombre d'erreurs. La ségrégation des chromosomes est donc incorrecte et cela pourrait contribuer à expliquer l'augmentation des aneuploïdes liées à l'âge dans les ovocytes de mammifères.

BIBLIOGRAPHIE

1. Nagaoka, S. I., Hassold, T. J. & Hunt, P. a. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 493–504 (2012).
2. Potapova, T. & Gorbsky, G. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)*. **6**, 12 (2017).
3. Nagaoka, S. I., Hodges, C. A., Albertini, D. F. & Hunt, P. A. Oocyte-specific differences in cell-cycle control create an innate susceptibility to meiotic errors. *Curr. Biol.* **21**, 651–657 (2011).
4. Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjöld, M., Herbert, M. & Höög, C. Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat. Genet.* **39**, 966–8 (2007).
5. LeMaire-Adkins, R., Radke, K. & Hunt, P. A. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: A mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J. Cell Biol.* **139**, 1611–1619 (1997).
6. Kolano, A., Brunet, S., Silk, A. D., Cleveland, D. W. & Verlhac, M.-H. Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1858–E1867 (2012).
7. Yoshida, S., Kaido, M. & Kitajima, T. S. Inherent Instability of Correct Kinetochores-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Dev. Cell* **33**, 589–602 (2015).
8. Hunt, T., Nasmyth, K. & Novak, B. The cell cycle. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**, 3494–3497 (2011).
9. Norbury, C. & Nurse, P. Animal Cell Cycles and Their Control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 441–468 (1992).
10. Johnson, A. & Skotheim, J. M. Start and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 717–723 (2013).
11. Hanaoka, F. & Sugawara, K. DNA replication, recombination, and repair: Molecular mechanisms and pathology. *DNA Replication, Recomb. Repair Mol. Mech. Pathol.* 1–555 (2016).

doi:10.1007/978-4-431-55873-6

12. Haarhuis, J. H. I., Elbatsh, A. M. O. & Rowland, B. D. Cohesin and Its Regulation: On the Logic of X-Shaped Chromosomes. *Dev. Cell* **31**, 7–18 (2014).
13. Tanenbaum, M. E. & Medema, R. H. Mechanisms of Centrosome Separation and Bipolar Spindle Assembly. *Developmental Cell* **19**, 797–806 (2010).
14. Kalitsis, P., Zhang, T., Marshall, K. M., Nielsen, C. F. & Hudson, D. F. Condensin, master organizer of the genome. *Chromosom. Res.* **25**, 61–76 (2017).
15. Güttinger, S., Laurell, E. & Kutay, U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 178–191 (2009).
16. Sazer, S., Lynch, M. & Needleman, D. Deciphering the Evolutionary History of Open and Closed Mitosis. *Curr. Biol.* **24**, R1099–R1103 (2014).
17. Prosser, S. L. & Pelletier, L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 187–201 (2017).
18. Nicklas, R. B. How cells get the right chromosomes. *Science* **275**, 632–637 (1997).
19. Suryadinata, R., Sadowski, M. & Sarcevic, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci. Rep.* **30**, 243–255 (2010).
20. Jones, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 1–5 (2004).
21. Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187–190 (1995).
22. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D., Franza, B. & Roberts, J. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science (80-.).* **257**, 1689–1694 (1992).
23. Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**, 961–971 (1992).
24. Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P. & Clarke, P. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **173**, 83–105 (2017).
25. Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* **23**, 345–356 (2013).
26. Teixeira, L. K. & Reed, S. I. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 387–

- 414 (2013).
27. Mocchiari, A. & Rape, M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J. Cell Sci.* **125**, 255–263 (2012).
 28. Tanaka, K. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J. Med.* **62**, 1–12 (2013).
 29. Zhou, Z., He, M., Shah, A. A. & Wan, Y. Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div.* **11**, 9 (2016).
 30. Fujimitsu, K., Grimaldi, M. & Yamano, H. Cyclin-dependent kinase 1 – dependent activation of APC / C ubiquitin ligase. **3925**, (2016).
 31. Qiao, R., Weissmann, F., Yamaguchi, M., Brown, N. G., VanderLinden, R., Imre, R., Jarvis, M. A., Brunner, M. R., Davidson, I. F., Litos, G., Haselbach, D., Mechtler, K., Stark, H., Schulman, B. A. & Peters, J.-M. Mechanism of APC/CCDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E2570-8 (2016).
 32. Zhang, S., Chang, L., Alfieri, C., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M. & Barford, D. Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* **533**, 260–264 (2016).
 33. Thornton, B. R. & Toczyski, D. P. Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1090–1094 (2003).
 34. Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 369–381 (2006).
 35. Hartwell, L. & Weinert, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (80-)*. **246**, 629–634 (1989).
 36. Khodjakov, A. & Rieder, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J. Biol.* **8**, 88 (2009).
 37. Carr, A. M., Moudjou, M., Bentley, N. J. & Hagan, I. M. The chk1 pathway is required to prevent mitosis following cell-cycle arrest at 'start'. *Curr. Biol.* **5**, 1179–1190 (1995).
 38. Kornbluth, S. & Fissore, R. Vertebrate Reproduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
 39. Page, S. L. & Hawley, R. S. Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet. *Science (80-)*. **301**, 785–790 (2003).

40. Koehler, K. E., Hawley, R. S., Sherman, S. & Hassold, T. Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum. Mol. Genet.* **5 Spec No**, 1495–504 (1996).
41. Bardhan, A. Complex regulation of sister kinetochore orientation in meiosis-I. *J. Biosci.* **35**, 485–495 (2010).
42. Monje-Casas, F., Prabhu, V. R., Lee, B. H., Boselli, M. & Amon, A. Kinetochore Orientation during Meiosis Is Controlled by Aurora B and the Monopolin Complex. *Cell* **128**, 477–490 (2007).
43. Kim, J., Ishiguro, K., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A. M., Takeda, N., Sakakibara, Y., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Sakuno, T. & Watanabe, Y. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* **517**, 466–71 (2015).
44. Yokobayashi, S. & Watanabe, Y. The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* **123**, 803–17 (2005).
45. Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., Ellenberg, J., de Boer, P. & Nasmyth, K. Resolution of Chiasmata in Oocytes Requires Separase-Mediated Proteolysis. *Cell* **126**, 135–146 (2006).
46. Chambon, J. P., Touati, S. A., Berneau, S., Cladière, D., Hebras, C., Groeme, R., McDougall, A. & Wassmann, K. The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II. *Curr. Biol.* **23**, 485–490 (2013).
47. Wassmann, K. Sister chromatid segregation in meiosis II : Deprotection through phosphorylation. *Cell Cycle* **12**, 1352–1359 (2013).
48. McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* **262**, 1–15 (2003).
49. Magnusdottir, E. & Surani, M. A. How to make a primordial germ cell. *Development* **141**, 245–252 (2014).
50. Wear, H. M., McPike, M. J. & Watanabe, K. H. From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *J. Ovarian Res.* **9**, 36 (2016).
51. Pepling, M. E. & Spradling, a C. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* **125**, 3323–8 (1998).
52. Su, Y. Q., Sugiura, K. & Eppig, J. J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 32–42

- (2009).
53. BORUM, K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp. Cell Res.* **24**, 495–507 (1961).
 54. Findlay, J. K., Hutt, K. J., Hickey, M. & Anderson, R. A. What is the 'ovarian reserve'? *Fertil. Steril.* **103**, 628–630 (2015).
 55. Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K. & Tilly, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**, 145–150 (2004).
 56. Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R. & Wu, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell Biol.* **11**, 631–636 (2009).
 57. Horan, C. J. & Williams, S. A. Oocyte stem cells: fact or fantasy? *Reproduction* **154**, R23–R35 (2017).
 58. Zhang, H., Liu, L., Li, X., Busayavalasa, K., Shen, Y., Hovatta, O., Gustafsson, J.-Å. & Liu, K. Life-long in vivo cell-lineage tracing shows that no oogenesis originates from putative germline stem cells in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 17983–17988 (2014).
 59. Hillier, S. . Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**, 39–46 (2001).
 60. Adhikari, D. & Liu, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 480–487 (2014).
 61. Masciarelli, S., Horner, K. & Liu, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J. Clin. Invest.* **114**, 196–205 (2004).
 62. Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O. & Jaffe, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* **136**, 1869–1878 (2009).
 63. Pirino, G., Wesco, M. P. & Donovan, P. J. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* **8**, 665–670 (2009).
 64. Seung, J. H., Chen, R., Paronetto, M. P. & Conti, M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr. Biol.* **15**, 1670–1676 (2005).
 65. Bornslaeger, E. A., Wilde, M. W. & Schultz, R. M. Regulation of mouse oocyte maturation:

- involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev Biol* **105**, 488–499 (1984).
66. Reis, A., Chang, H., Levasseur, M. & Jones, K. T. APC-cdh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat. Cell Biol.* **8**, 539–40 (2006).
 67. Holt, J. E., Weaver, J. & Jones, K. T. Spatial regulation of APCCdh1-induced cyclin B1 degradation maintains G2 arrest in mouse oocytes. *Development* **137**, 1297–1304 (2010).
 68. Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R. M. & Kopf, G. S. Acquisition of Meiotic Competence in Mouse Oocytes: Absolute Amounts of p34cdc2, Cyclin B1, cdc25C, and wee1 in Meiotically Incompetent and Competent Oocytes1. *Biol. Reprod.* **63**, 1610–1616 (2000).
 69. Fulka, J. J., Motlik, J., Fulka, J. & Jilek, F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.* **77**, 281–285 (1986).
 70. Marangos, P., Verschuren, E. W., Chen, R., Jackson, P. K. & Carroll, J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APCCdh1. *J. Cell Biol.* **176**, 65–75 (2007).
 71. Dekel, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev. Reprod.* **1**, 82–88 (1996).
 72. Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D. & Goldman, R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamina and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **112**, 523–533 (1991).
 73. Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. & Nigg, E. A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**, 591–602 (1990).
 74. Verlhac, M. & Terret, M. Oocyte Maturation and Development. *F1000Research* **5**, 1–8 (2016).
 75. Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J. M. & Verlhac, M. H. The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity. *Curr. Biol.* **13**, 1797–1802 (2003).
 76. Wassmann, K., Niaux, T. & Maro, B. Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. *Curr. Biol.* **13**, 1596–608 (2003).
 77. Chaigne, A., Terret, M.-E. & Verlhac, M.-H. Asymmetries and Symmetries in the Mouse Oocyte and Zygote. in *Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer* (eds. Tassan, J.-P. & Kubiak, J. Z.) 285–299 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-

78. Chaigne, A., Campillo, C., Gov, N. S., Voituriez, R., Sykes, C., Verlhac, M. H. & Terret, M. E. A narrow window of cortical tension guides asymmetric spindle positioning in the mouse oocyte. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
79. Schmidt, A. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J. Cell Sci.* **119**, 1213–1218 (2006).
80. Masui, Y. & Markert, C. L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129–145 (1971).
81. Oh, J. S., Susor, A., Schindler, K., Schultz, R. M. & Conti, M. Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **126**, 1081–5 (2013).
82. Clift, D. & Schuh, M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 549–562 (2013).
83. Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M. & Watanabe, Y. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 42–52 (2008).
84. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 711–726 (2015).
85. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
86. Aumeier, C., Schaedel, L., Gaillard, J., John, K., Blanchoin, L. & Théry, M. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1054–1064 (2016).
87. Amos, L. A. & Schlieper, D. Microtubules and maps. *Adv. Protein Chem.* **71**, 257–298 (2005).
88. Breuzard, G., Hubert, P., Nouar, R., Bessa, T. De, Barbier, P., Sturgis, J. N. & Peyrot, V. Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells. 2810–2819 (2013). doi:10.1242/jcs.120832
89. Ookata, K., Hisanaga, S. I., Sugita, M., Okuyama, A., Murofushi, H., Kitazawa, H., Chari, S., Bulinski, J. C. & Kishimoto, T. MAP4 is the in vivo substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: Identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4. *Biochemistry* **36**, 15873–15883 (1997).

90. Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. & Kreis, T. E. CLIP-170 Highlights Growing Microtubule Ends In Vivo. *Cell* **96**, 517–527 (1999).
91. Bu, W. & Su, L. K. Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene* **20**, 3185–3192 (2001).
92. Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F. J. A., Buey, R. M., Lawera, A., Jelesarov, I., Winkler, F. K., Wüthrich, K., Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell* **138**, 366–376 (2009).
93. Brouhard, G. J., Stear, J. H., Noetzel, T. L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S. C., Howard, J. & Hyman, A. A. XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell* **132**, 79–88 (2008).
94. Mulder, A. M., Glavis-Bloom, A., Moores, C. A., Wagenbach, M., Carragher, B., Wordeman, L. & Milligan, R. A. A new model for binding of kinesin 13 to curved microtubule protofilaments. *J. Cell Biol.* **185**, 51–57 (2009).
95. Gupta, K. K., Li, C., Duan, A., Alberico, E. O., Kim, O. V., Alber, M. S. & Goodson, H. V. Mechanism for the catastrophe-promoting activity of the microtubule destabilizer Op18/stathmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20449–20454 (2013).
96. Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., *et al.* A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**, 19–22 (2004).
97. Cross, R. a. & McAinsh, A. Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 257–271 (2014).
98. Amos, L. A. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **22**, 916–926 (2011).
99. Rathinasamy, K. & Panda, D. Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. *FEBS J.* **273**, 4114–4128 (2006).
100. Zhao, Y., Mu, X. & Du, G. Pharmacology & Therapeutics Microtubule-stabilizing agents : New drug discovery and cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **162**, 134–143 (2016).
101. Dumont, S. & Mitchison, T. J. Force and Length in the Mitotic Spindle. *Curr. Biol.* **19**, R749–R761

- (2009).
102. Gönczy, P. Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 425–435 (2012).
 103. Mitchison, T. J. & Kirschner, M. W. Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding. *J. Cell Biol.* **101**, 755–765 (1985).
 104. Holy, T. E. & Leibler, S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl. Aca. Sci., USA* **91**, 5682–5685 (1994).
 105. Helmke, K. J., Heald, R. & Wilbur, J. D. Interplay between spindle architecture and function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **306**, 83–125 (2013).
 106. Schuh, M. & Ellenberg, J. Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell* **130**, 484–498 (2007).
 107. Clarke, P. R. & Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 464–477 (2008).
 108. Meunier, S. & Vernos, I. Acentrosomal Microtubule Assembly in Mitosis: The Where, When, and How. *Trends Cell Biol.* **26**, 80–87 (2016).
 109. Kapitein, L. C., Peterman, E. J. G., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M. & Schmidt, C. F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **435**, 114–118 (2005).
 110. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L. & Mitchison, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* **150**, 975–988 (2000).
 111. Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando, A., Schatten, G. & Compton, D. A. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **147**, 351–365 (1999).
 112. Silk, A. D., Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J. Cell Biol.* **184**, 677–690 (2009).
 113. Wu, J., Mikule, K., Wang, W., Su, N., Petteruti, P., Gharahdaghi, F., Code, E., Zhu, X., Jacques, K., Lai, Z., Yang, B., Lamb, M. L., Chuaqui, C., Keen, N. & Chen, H. Discovery and mechanistic study of a small molecule inhibitor for motor protein KIFC1. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2201–8 (2013).

114. Forth, S., Hsia, K., Shimamoto, Y. & Kapoor, T. M. Asymmetric Friction of Nonmotor MAPs Can Lead to Their Directional Motion in Active Microtubule Networks. *Cell* **157**, 420–432 (2014).
115. Auckland, P. & McAinsh, A. D. Building an integrated model of chromosome congression. *J. Cell Sci.* **128**, jcs.169367-3374 (2015).
116. Kitajima, T. S., Ohsugi, M. & Ellenberg, J. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* **146**, 568–581 (2011).
117. Luykx, P. The structure of the kinetochore in meiosis and mitosis in *Urechis* eggs. *Exp. Cell Res.* **39**, 643–657 (1965).
118. Brinkley, B. R., Zinkowski, R. P., Mollon, W. L., Davis, F. M., Pisegna, M. A., Pershouse, M. & Rao, P. N. Movement and segregation of kinetochores experimentally detached from mammalian chromosomes. *Nature* **336**, 251–254 (1988).
119. Jokelainen, P. T. The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *J. Ultrastruct. Res.* **19**, 19–44 (1967).
120. Santaguida, S. & Musacchio, A. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* **28**, 2511–31 (2009).
121. Fukagawa, T. & Earnshaw, W. C. The centromere: Chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev. Cell* **30**, 496–508 (2014).
122. Osley, M. A. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 827–61 (1991).
123. Jansen, L. E. T., Black, B. E., Foltz, D. R. & Cleveland, D. W. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* **176**, 795–805 (2007).
124. Silva, M. C. C., Bodor, D. L., Stellfox, M. E., Martins, N. M. C., Hochegger, H., Foltz, D. R. & Jansen, L. E. T. Cdk Activity Couples Epigenetic Centromere Inheritance to Cell Cycle Progression. *Dev. Cell* **22**, 52–63 (2012).
125. Takeuchi, K. & Fukagawa, T. Molecular architecture of vertebrate kinetochores. *Exp. Cell Res.* **318**, 1367–1374 (2012).
126. Earnshaw, W. C. Discovering centromere proteins: from cold white hands to the A, B, C of CENPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 443–449 (2015).
127. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., Steigerwald, J. & Tan, E. M. Autoantibody to centromere

- (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1627–31 (1980).
128. Brinkley, B. R. & Stubblefield, E. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma* **19**, 28–43 (1966).
 129. Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C. B., Welburn, J. P., Dong, Y., Mcewen, B. F., Shang, W., Suzuki, E., Okawa, K., Cheeseman, I. M. & Fukagawa, T. CCAN Makes Multiple Contacts with Centromeric DNA to Provide Distinct Pathways to the Outer Kinetochore. *Cell* **135**, 1039–1052 (2008).
 130. Cheeseman, I. M. & Desai, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 33–46 (2008).
 131. Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. & Okazaki, T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J. Cell Biol.* **109**, 1963–1973 (1989).
 132. Kato, H., Jiang, J., Zhou, B.-R., Rozendaal, M., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T. S., Straight, A. F. & Bai, Y. A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. *Science (80-.).* **340**, 1110–1113 (2013).
 133. Carroll, C. W., Silva, M. C. C., Godek, K. M., Jansen, L. E. T. & Straight, A. F. Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat. Cell Biol.* **11**, 896–902 (2009).
 134. Musacchio, A. & Desai, A. A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function. *Biology (Basel)*. **6**, 5 (2017).
 135. De Wulf, P., McAinsh, A. D. & Sorger, P. K. Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev.* **17**, 2902–2921 (2003).
 136. Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. & Desai, A. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* **127**, 983–997 (2006).
 137. McClelland, M. L., Gardner, R. D., Kallio, M. J., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Burke, D. J. & Stukenberg, P. T. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev.* **17**, 101–114 (2003).
 138. Wei, R. R., Al-Bassam, J. & Harrison, S. C. The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 54–59 (2007).

139. Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J. G., De Wulf, P., Salek, M., Rappsilber, J., Moores, C. A., Salmon, E. D. & Musacchio, A. Implications for Kinetochore-Microtubule Attachment from the Structure of an Engineered Ndc80 Complex. *Cell* **133**, 427–439 (2008).
140. Valverde, R., Ingram, J. & Harrison, S. C. Conserved Tetramer Junction in the Kinetochore Ndc80 Complex. *Cell Rep.* **17**, 1915–1922 (2016).
141. Ghongane, P., Kapanidou, M., Asghar, A., Elowe, S. & Bolanos-Garcia, V. M. The dynamic protein Knl1 - a kinetochore rendezvous. *J. Cell Sci.* **127**, 3415–23 (2014).
142. Karess, R. Rod-Zw10-Zwlich: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol.* **15**, 386–92 (2005).
143. Barisic, M. & Geley, S. Spindly switch controls anaphase: Spindly and RZZ functions in chromosome attachment and mitotic checkpoint control. *Cell Cycle* **10**, 449–456 (2011).
144. Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolić-Nørrelykke, I. M. & Cimini, D. Merotelic kinetochore attachment: Causes and effects. *Trends Cell Biol.* **21**, 374–381 (2011).
145. McEwen, B. F., Chan, G. K., Zubrowski, B., Savoian, M. S., Sauer, M. T. & Yen, T. J. CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2776–89 (2001).
146. Shrestha, R. L. & Draviam, V. M. Lateral to end-on conversion of chromosome-microtubule attachment requires kinesins cenp-e and MCAK. *Curr. Biol.* **23**, 1514–1526 (2013).
147. Khodjakov, A., Cole, R. W., McEwen, B. F., Buttle, K. F. & Rieder, C. L. Chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J. Cell Biol.* **136**, 229–40 (1997).
148. Mitchison, T. J. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: Evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* **109**, 637–652 (1989).
149. Salmon, E. D. & Bloom, K. Tension sensors reveal how the kinetochore shares its load. *BioEssays* **39**, 1600216 (2017).
150. Auckland, P., Clarke, N. I., Royle, S. J. & McAinsh, A. D. Congressing kinetochores progressively load Ska complexes to prevent force-dependent detachment. *J. Cell Biol.* **216**, 1623–1639 (2017).
151. Cheerambathur, D. K., Prevo, B., Hattersley, N., Lewellyn, L., Corbett, K. D., Oegema, K. & Desai,

- A. Dephosphorylation of the Ndc80 Tail Stabilizes Kinetochore-Microtubule Attachments via the Ska Complex. *Dev. Cell* **41**, 424–437.e4 (2017).
152. Maresca, T. J. & Salmon, E. D. Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal. *J. Cell Sci.* **123**, 825–835 (2010).
153. Sakuno, T., Tanaka, K., Hauf, S. & Watanabe, Y. Repositioning of aurora b promoted by chiasmata ensures sister chromatid mono-orientation in meiosis I. *Dev. Cell* **21**, 534–545 (2011).
154. Watanabe, Y. Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 370–382 (2012).
155. Cimini, D. Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle* **6**, 1558–1564 (2007).
156. Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. & Earnshaw, W. C. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 789–803 (2012).
157. Lens, S. M. A., Rodriguez, J. A., Vader, G., Span, S. W., Giaccone, G. & Medema, R. H. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1897–909 (2006).
158. Wang, F., Dai, J., Daum, J. R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P. T., Gorbsky, G. J. & Higgins, J. M. G. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* **330**, 231–5 (2010).
159. Van Der Horst, A. & Lens, S. M. a. Cell division: Control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma* **123**, 25–42 (2014).
160. Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L. B., Schneider, T. R., Stukenberg, P. T. & Musacchio, A. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol. Cell* **18**, 379–391 (2005).
161. Chan, C. S. M. & Botstein, D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* **135**, 677–691 (1993).
162. Biggins, S. & Murray, A. W. The budding yeast protein kinase Ipl1 / Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. 3118–3129 (2001). doi:10.1101/gad.934801.complete.
163. Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J. R. &

- Nasmyth, K. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**, 317–329 (2002).
164. Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., Van Meel, J., Rieder, C. L. & Peters, J. M. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **161**, 281–294 (2003).
165. Lampson, M. A., Renduchitala, K., Khodjakov, A. & Kapoor, T. M. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* **6**, 232–237 (2004).
166. Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T. & Cheeseman, I. M. Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochore-Microtubule Interface. *Mol. Cell* **38**, 383–392 (2010).
167. DeLuca, K. F., Lens, S. M. A. & DeLuca, J. G. Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J. Cell Sci.* **124**, 622–34 (2011).
168. Zaytsev, A. V, Mick, J. E., Maslennikov, E., Nikashin, B., DeLuca, J. G. & Grishchuk, E. L. Multisite phosphorylation of the NDC80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity. *Mol. Biol. Cell* **26**, 1829–44 (2015).
169. Krenn, V. & Musacchio, A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front. Oncol.* **5**, 225 (2015).
170. Akiyoshi, B., Sarangapani, K. K., Powers, A. F., Nelson, C. R., Reichow, S. L., Arellano-santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J. A., Asbury, C. L. & Biggins, S. Tension directly stabilizes reconstituted. *Nature* **468**, 576–579 (2010).
171. Miller, M. P., Asbury, C. L. & Biggins, S. A TOG Protein Confers Tension Sensitivity to Kinetochore-Microtubule Attachments. *Cell* **165**, 1428–1439 (2016).
172. Campbell, C. & Desai, a. Tension sensing by Aurora B kinase is independent of survivin-based centromere localization. *Nature* **497**, 118–121 (2013).
173. Yang, K., Tang, C.-J. C. & Tang, T. K. Possible Role of Aurora-C in Meiosis. *Front. Oncol.* **5**, 178 (2015).
174. Nguyen, A. L. & Schindler, K. Specialize and Divide (Twice): Functions of Three Aurora Kinase Homologs in Mammalian Oocyte Meiotic Maturation. *Trends Genet.* **33**, 349–363 (2017).

175. Nguyen, a. L., Gentilello, a. S., Balboula, a. Z., Shrivastava, V., Ohring, J. & Schindler, K. Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **127**, 5066–5078(2014).
176. Balboula, A. Z. & Schindler, K. Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet.* **10**, e1004194(2014).
177. Shuda, K., Schindler, K., Ma, J., Schultz, R. M. & Donovan, P. J. Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 1094–1105(2009).
178. Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., van der Weyden, L., Champion, L., Kudo, N. R., Adams, D. J. & Nasmyth, K. Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev.* **24**, 2505–16(2010).
179. Uhlmann, F. Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep.* **2**, 487–492(2001).
180. Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A. & McDougall, A. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1023–1025(2003).
181. Gorr, I. H., Boos, D. & Stemmann, O. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol. Cell* **19**, 135–141(2005).
182. Li, R. & Murray, a W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519–31(1991).
183. Hoyt, M. a, Totis, L. & Roberts, B. T. S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507–517(1991).
184. Fraschini, R., Venturetti, M., Chioli, E. & Piatti, S. The spindle position checkpoint: how to deal with spindle misalignment during asymmetric cell division in budding yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 416–420(2008).
185. Winey, M., Goetsch, L., Baum, P. & Byers, B. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* **114**, 745–54(1991).
186. Weiss, E. & Winey, M. The *Saccharomyces cerevisiae* Spindle Pole Body Duplication Gene MPS1 encodes Part of a Mitotic Checkpoint. *J. Cell Biol.* **132**, 111–123(1996).
187. Kops, G. J. P. L., Kim, Y., Weaver, B. A. A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J. R., Tagaya, M. & Cleveland, D. W. ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J. Cell*

- Biol.* **169**, 49–60 (2005).
188. Buffin, E., Emre, D. & Karess, R. E. Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* **9**, 565–572 (2007).
 189. Varma, D., Wan, X., Cheerambathur, D., Gassmann, R., Suzuki, A., Lawrimore, J., Desai, A. & Salmon, E. D. Spindle assembly checkpoint proteins are positioned close to core microtubule attachment sites at kinetochores. *J. Cell Biol.* **202**, 735–746 (2013).
 190. Silió, V., McAinsh, A. D. & Millar, J. B. KNL1-Bubs and RZZ Provide Two Separable Pathways for Checkpoint Activation at Human Kinetochores. *Dev. Cell* **35**, 600–613 (2015).
 191. Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. & Sluder, G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **130**, 941–948 (1995).
 192. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, R966–R980 (2012).
 193. Sacristan, C. & Kops, G. J. P. L. Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol.* **25**, 21–28 (2015).
 194. Ji, Z., Gao, H., Yu, H., Cayirlioglu, P., Kadow, I. G., Vosshall, L. B., Stornetta, R. L., West, G. H., Guyenet, P. G., Isacson, O., Nishiyama, A., Mulkey, D. K. & Koschnitzky, J. E. CELL DIVISION CYCLE. Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* **348**, 1260–4 (2015).
 195. Hiruma, Y., Sacristan, C., Pachis, S. T., Adamopoulos, A., Kuijt, T., Ubbink, M., von Castelmur, E., Perrakis, A. & Kops, G. J. P. L. CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* **348**, 1264–7 (2015).
 196. London, N., Ceto, S., Ranish, J. A. & Biggins, S. Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr. Biol.* **22**, 900–906 (2012).
 197. Zhang, G., Lischetti, T. & Nilsson, J. A minimal number of MELT repeats supports all the functions of KNL1 in chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **127**, 871–84 (2014).
 198. Manic, G., Corradi, F., Sistigu, A., Siteni, S. & Vitale, I. *Molecular Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint by Kinases and Phosphatases. International Review of Cell and Molecular Biology/International Review of Cell and Molecular Biology* **328**, (Elsevier Inc., 2017).

199. Xu, P., Raetz, E. A., Kitagawa, M., Virshup, D. M. & Lee, S. H. BUBR1 recruits PP2A via the B56 family of targeting subunits to promote chromosome congression. *Biol. Open* **2**, 479–86 (2013).
200. Kruse, T., Zhang, G., Sofie, M., Larsen, Y., Lischetti, T., Streicher, W., Nielsen, T. K., Bjørn, S. P. & Nilsson, J. Direct binding between BubR1 and B56 – PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. 1086–1092 (2013). doi:10.1242/jcs.122481
201. Touati, S. a., Buffin, E., Cladière, D., Hached, K., Rachez, C., van Deursen, J. M. & Wassmann, K. Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nat. Commun.* **6**, 6946 (2015).
202. Brady, D. M. & Hardwick, K. G. Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. *Curr. Biol.* **10**, 675–678 (2000).
203. London, N. & Biggins, S. Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* **28**, 140–152 (2014).
204. Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K.-T. & Musacchio, A. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a ‘safety belt’ binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* **21**, 2496–506 (2002).
205. Sudakin, V., Chan, G. K. T. & Yen, T. J. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**, 925–936 (2001).
206. Chao, W. C. H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E. H. & Barford, D. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* **484**, 208–213 (2012).
207. Howell, B. J., Moree, B., Farrar, E. M., Stewart, S., Fang, G. & Salmon, E. D. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* **14**, 953–964 (2004).
208. Vink, M., Simonetta, M., Transidico, P., Ferrari, K., Mapelli, M., De Antoni, A., Massimiliano, L., Ciliberto, A., Faretta, M., Salmon, E. D. & Musacchio, A. In Vitro FRAP Identifies the Minimal Requirements for Mad2 Kinetochore Dynamics. *Curr. Biol.* **16**, 755–766 (2006).
209. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* **12**, 1871–1883 (1998).
210. Hardwick, K. G., Johnston, R. C., Smith, D. L. & Murray, A. W. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* **148**, 871–882 (2000).

211. Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. & Yu, H. Mad2-Independent Inhibition of APCCdc20 by the Mitotic Checkpoint Protein BubR1. *Dev. Cell* **1**, 227–237 (2001).
212. Musacchio, A. & Hardwick, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 731–741 (2002).
213. Shah, J. V, Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M. & Cleveland, D. W. Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr. Biol.* **14**, 942–52 (2004).
214. Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J. & van Deursen, J. M. BubR1 N Terminus Acts as a Soluble Inhibitor of Cyclin B Degradation by APC/CCdc20 in Interphase. *Dev. Cell* **16**, 118–131 (2009).
215. Kulukian, A., Han, J. S. & Cleveland, D. W. Unattached Kinetochores Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor that Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding. *Dev. Cell* **16**, 105–117 (2009).
216. Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J. & Yu, H. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 338–345 (2004).
217. Skinner, J. J., Wood, S., Shorter, J., Englander, S. W. & Black, B. E. The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching. *J. Cell Biol.* **183**, 761–768 (2008).
218. Mapelli, M., Filipp, F. V, Rancati, G., Massimiliano, L., Nezi, L., Stier, G., Hagan, R. S., Confalonieri, S., Piatti, S., Sattler, M. & Musacchio, A. Determinants of conformational dimerization of Mad2 and its inhibition by p31comet. *EMBO J.* **25**, 1273–1284 (2006).
219. Yang, M., Li, B., Liu, C. J., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H. & Luo, X. Insights into Mad2 regulation in the spindle checkpoint revealed by the crystal structure of the symmetric Mad2 dimer. *PLoS Biol.* **6**, 0643–0655 (2008).
220. Alfieri, C., Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M. & Barford, D. Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature* **536**, 431–6 (2016).
221. Ligation, U., Yamaguchi, M., Vanderlinden, R., Weissmann, F., Peters, J., Stark, H., Schulman, B. A., Yamaguchi, M., Vanderlinden, R., Weissmann, F., Qiao, R. & Dube, P. Cryo-EM of Mitotic Checkpoint Complex-Bound APC / C Reveals Reciprocal and Conformational Regulation of Article

- Cryo-EM of Mitotic Checkpoint Complex-Bound APC / C Reveals Reciprocal and Conformational Regulation of Ubiquitin Ligation. *Mol. Cell* **63**, 593–607 (2016).
222. Solc, P., Kitajima, T. S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J. & Ellenberg, J. Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PLoS One* **10**, 1–25 (2015).
223. Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J. & Peters, J. M. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 6598–6609 (2003).
224. Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A. & Parry, H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95–105 (1995).
225. Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J. & Swedlow, J. R. Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 672–683 (2003).
226. Tseng, T. C., Chen, S. H., Hsu, Y. P. & Tang, T. K. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol.* **17**, 823–33 (1998).
227. Kim, S. & Yu, H. Multiple assembly mechanisms anchor the KMN spindle checkpoint platform at human mitotic kinetochores. *J. Cell Biol.* **208**, 181–196 (2015).
228. Vázquez-Novelle, M. D. & Petronczki, M. Relocation of the Chromosomal Passenger Complex Prevents Mitotic Checkpoint Engagement at Anaphase. *Curr. Biol.* **20**, 1402–1407 (2010).
229. Saurin, A. T., van der Waal, M. S., Medema, R. H., Lens, S. M. a & Kops, G. J. P. L. Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat. Commun.* **2**, 316 (2011).
230. Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J. F., Cruijssen, C. W. A., van Osch, M. H. J., Lens, S. M. A., Medema, R. H. & Kops, G. J. P. L. Mps1 Phosphorylates Borealin to Control Aurora B Activity and Chromosome Alignment. *Cell* **132**, 233–246 (2008).
231. Famulski, J. K. & Chan, G. K. Aurora B Kinase-Dependent Recruitment of hZW10 and hROD to Tensionless Kinetochores. *Curr. Biol.* **17**, 2143–2149 (2007).
232. Kasuboski, J. & Bader, J. Zwint-1 is a novel Aurora B substrate required for the assembly of a dynein-binding platform on kinetochores. *Mol. Biol. ...* **22**, 3318–30 (2011).

233. Santaguida, S., Vernieri, C., Villa, F., Ciliberto, A. & Musacchio, A. Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J.* **30**, 1508–1519 (2011).
234. Yang, Y., Wu, F., Ward, T., Yan, F., Wu, Q., Wang, Z., McGlothen, T., Peng, W., You, T., Sun, M., Cui, T., Hu, R., Dou, Z., Zhu, J., Xie, W., *et al.* Phosphorylation of HsMis13 by Aurora B kinase is essential for assembly of functional kinetochore. *J. Biol. Chem.* **283**, 26726–26736 (2008).
235. Yang, Z., Kenny, A. E., Brito, D. A. & Rieder, C. L. Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. **186**, 675–684 (2009).
236. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **14**, 111–122 (2008).
237. Shi, J., Orth, J. D. & Mitchison, T. Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res.* **68**, 3269–3276 (2008).
238. Gurden, M. D., Anderhub, S. J., Faisal, A. & Linardopoulos, S. Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10657
239. Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L. & Salmon, E. D. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* **155**, 1159–1172 (2001).
240. Mische, S., He, Y., Ma, L., Li, M., Serr, M. & Hays, T. S. Dynein light intermediate chain: an essential subunit that contributes to spindle checkpoint inactivation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4918–29 (2008).
241. Westhorpe, F. G., Tighe, A., Lara-Gonzalez, P. & Taylor, S. S. p31^{comet}-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J. Cell Sci.* **124**, 3905–16 (2011).
242. Espert, a., Uluocak, P., Bastos, R. N., Mangat, D., Graab, P. & Gruneberg, U. PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* **206**, 833–842 (2014).
243. Nijenhuis, W., Vallardi, G., Teixeira, A., Kops, G. J. P. L. & Saurin, A. T. Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1257–1264 (2014).
244. Etemad, B. & Kops, G. J. P. L. Attachment issues: Kinetochore transformations and spindle

- checkpoint silencing. *Current Opinion in Cell Biology* **39**, 101–108 (2016).
245. Suijkerbuijk, S. J. E., van Dam, T. J. P., Karagöz, G. E., von Castelmur, E., Hubner, N. C., Duarte, A. M. S., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S. G. D., Snel, B. & Kops, G. J. P. L. The Vertebrate Mitotic Checkpoint Protein BUBR1 Is an Unusual Pseudokinase. *Dev. Cell* **22**, 1321–1329 (2012).
246. Callan, H. G. & Jacobs, P. A. The meiotic process in mantis religiosa L. males. *J. Genet.* **55**, 200–217 (1957).
247. Clark-Maguire, S. & Mains, P. E. Localization of the mei-1 gene product of *Caenorhabditis elegans*, a meiotic-specific spindle component. *J. Cell Biol.* **126**, 199LP-209 (1994).
248. Matthews, L. R., Carter, P., Thierry-Mieg, D. & Kemphues, K. ZYG-9, a *Caenorhabditis elegans* protein required for microtubule organization and function, is a component of meiotic and mitotic spindle poles. *J. Cell Biol.* **141**, 1159–68 (1998).
249. Davis-Roca, A. C., Muscat, C. C. & Wignall, S. M. *Caenorhabditis elegans* oocytes detect meiotic errors in the absence of canonical end-on kinetochore attachments. *J. Cell Biol.* **216**, 1243–1253 (2017).
250. Dumont, J., Oegema, K. & Desai, A. A kinetochore-independent mechanism drives anaphase chromosome separation during acentrosomal meiosis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 894–901 (2010).
251. Dumont, J. & Desai, A. Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends Cell Biol.* **22**, 241–249 (2012).
252. Muscat, C. C., Torre-Santiago, K. M., Tran, M. V, Powers, J. A. & Wignall, S. M. Kinetochore-independent chromosome segregation driven by lateral microtubule bundles. *Elife* **4**, e06462 (2015).
253. Ohsumi, K., Sawada, W. & Kishimoto, T. Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 3005–13 (1994).
254. Philpott, A. & Yew, P. R. The *Xenopus* Cell Cycle: An Overview. *Mol. Biotechnol.* **39**, 9–19 (2008).
255. Shao, H., Li, R., Ma, C., Chen, E. & Liu, X. J. *Xenopus* oocyte meiosis lacks spindle assembly checkpoint control. *J. Cell Biol.* **201**, 191–200 (2013).
256. Liu, D., Shao, H., Wang, H., Liu, X. J., Liu, D., Shao, H., Wang, H. & Liu, X. J. Meiosis I in *Xenopus* oocytes is not error-prone despite lacking spindle assembly checkpoint Meiosis I in *Xenopus* oocytes is not error-prone despite lacking spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle* **4101**,

- (2014).
257. Sutcliffe, M. J., Darling, S. M. & Burgoyne, P. S. Spermatogenesis in XY, XYSxra and XOSxra mice: A quantitative analysis of spermatogenesis throughout puberty. *Mol. Reprod. Dev.* **30**, 81–89 (1991).
 258. Lane, S. I. R., Yun, Y. & Jones, K. T. Timing of anaphase-promoting complex activation in mouse oocytes is predicted by microtubule-kinetochore attachment but not by bivalent alignment or tension. *Development* **139**, 1947–55 (2012).
 259. Hached, K., Xie, S. Z., Buffin, E., Cladiere, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P. K. & Wassmann, K. Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* **138**, 2261–2271 (2011).
 260. Niaux, T., Hached, K., Sotillo, R., Sorger, P. K., Maro, B., Benezra, R. & Wassmann, K. Changing Mad2 Levels Affects Chromosome Segregation and Spindle Assembly Checkpoint Control in Female Mouse Meiosis I. *PLoS One* **2**, e1165 (2007).
 261. Touati, S. A. & Wassmann, K. How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* **125**, 321–335 (2016).
 262. Wan, X., Quinn, R. P. O., Pierce, H. L., Joglekar, A. P., Gall, W. E., Deluca, J. G., Carroll, C. W., Liu, S., Yen, T. J., McEwen, B. F., Stukenberg, P. T., Desai, A. & Salmon, E. D. Protein Architecture of the Human Kinetochore Microtubule Attachment Site. *Cell* **137**, 672–684 (2009).
 263. Suzuki, A., Hori, T., Nishino, T., Usukura, J., Miyagi, A., Morikawa, K. & Fukagawa, T. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. *J. Cell Biol.* **193**, 125–140 (2011).
 264. Skoufias, D. A., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Wilson, L. & Margolis, R. L. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4492–7 (2001).
 265. Stern, B. M. & Murray, A. W. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol.* **11**, 1462–1467 (2001).
 266. Uchida, K. S. K., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T. & Hirota, T. Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **184**, 383–390 (2009).
 267. Maresca, T. J. & Salmon, E. D. Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J. Cell Biol.* **184**, 373–381

- (2009).
268. Etemad, B., Kuijt, T. E. F. & Kops, G. J. P. L. Kinetochores–microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun.* **6**, 8987 (2015).
269. Tauchman, E. C., Boehm, F. J. & DeLuca, J. G. Stable kinetochores–microtubule attachment is sufficient to silence the spindle assembly checkpoint in human cells. *Nat. Commun.* **6**, 10036 (2015).
270. Lane, S. I. R., Chang, H.-Y., Jennings, P. C. & Jones, K. T. The Aurora kinase inhibitor ZM447439 accelerates first meiosis in mouse oocytes by overriding the spindle assembly checkpoint. *Reprod.* **140**, 521–530 (2010).
271. Homer, H. A., McDougall, A., Levasseur, M., Murdoch, A. P. & Herbert, M. Mad2 is required for inhibiting securin and cyclin B degradation following spindle depolymerisation in meiosis I mouse oocytes. *Reproduction* **130**, 829–843 (2005).
272. Hunt, P., Lemaire, R., Embury, P., Sheean, L. & Mroz, K. Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: Monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2007–2012 (1995).
273. Yuan, L., Liu, J.-G., Hoja, M.-R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. & Höög, C. Female Germ Cell Aneuploidy and Embryo Death in Mice Lacking the Meiosis-Specific Protein SCP3. *Science (80-.)*. **296**, 1115 LP-1118 (2002).
274. Kouznetsova, A., Hernández-Hernández, A. & Höög, C. Merotelic attachments allow alignment and stabilization of chromatids in meiosis II oocytes. *Nat. Commun.* **5**, 4409 (2014).
275. Woods, L. M., Hodges, C. A., Baart, E., Baker, S. M., Liskay, M. & Hunt, P. A. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: Abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J. Cell Biol.* **145**, 1395–1406 (1999).
276. Daniel, K., Lange, J., Hached, K., Fu, J., Anastassiadis, K., Roig, I., Cooke, H. J., Stewart, A. F., Wassmann, K., Jasin, M., Keeney, S. & Tóth, A. Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 599–610 (2011).
277. Chen, R. H., Shevchenko, A., Mann, M. & Murray, A. W. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **143**, 283–295 (1998).
278. Hoffmann, S., Maro, B., Kubiak, J. Z. & Polanski, Z. A single bivalent efficiently inhibits cyclin B1 degradation and polar body extrusion in mouse oocytes indicating robust SAC during female

- meiosis I. *PLoS One* **6**, (2011).
279. Heasley, L. R., Markus, S. M. & DeLuca, J. G. 'Wait anaphase' signals are not confined to the mitotic spindle. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1186–1194 (2017).
280. Hara, K., Tydeman, P. & Kirschner, M. A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs (surface contraction waves/cell cycle/cleavage/time-lapse cinematography/biological oscillations). *Cell Biol.* **77**, 462–466 (1980).
281. Zhang, M., Kothari, P. & Lampson, M. A. Spindle assembly checkpoint acquisition at the mid-blastula transition. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
282. Cant, S. H. & Pitcher, J. A. G Protein-coupled Receptor Kinase 2–mediated Phosphorylation of Ezrin Is Required for G Protein-coupled Receptor–dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1–13 (2005).
283. Sluder, G. Role of spindle microtubules in the control of cell cycle timing. *J. Cell Biol.* **80**, 674 LP-691 (1979).
284. Siracusa, G., Whittingham, D. G. & De Felici, M. The effect of microtubule- and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **60**, 71 LP-82 (1980).
285. Wei, Y., Multi, S., Yang, C., Ma, J., Zhang, Q.-H., Wang, Z., Li, M., Wei, L., Ge, Z., Zhang, C., Ouyang, Y., Hou, Y., Schatten, H. & Sun, Q.-Y. Spindle assembly checkpoint regulates mitotic cell cycle progression during preimplantation embryo development. *PLoS One* **6**, e21557 (2011).
286. Galli, M. & Morgan, D. O. Cell Size Determines the Strength of the Spindle Assembly Checkpoint during Embryonic Development. *Dev. Cell* **36**, 344–352 (2016).
287. Kyogoku, H. & Kitajima, T. S. Large Cytoplasm Is Linked to the Error-Prone Nature of Oocytes. *Dev. Cell* **41**, 287–298.e4 (2017).
288. Jones, K. T. & Lane, S. I. R. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. *Development* **140**, 3719–30 (2013).
289. El Yakoubi, W. & Wassmann, K. Meiotic Divisions: No Place for Gender Equality. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1002**, 1–17 (2017).
290. Kuliev, A., Zlatopolsky, Z., Kirillova, I., Spivakova, J. & Janzen, J. C. Meiosis errors in over 20 , 000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod. Biomed.*

Online **22**, 2–8 (2011).

291. Pan, H., Ma, P., Zhu, W. & Schultz, R. M. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev. Biol.* **316**, 397–407 (2008).
292. Riris, S., Webster, P. & Homer, H. Digital multiplexed mRNA analysis of functionally important genes in single human oocytes and correlation of changes in transcript levels with oocyte protein expression. *Fertil. Steril.* **101**, 857–864 (2014).
293. Lagirand-Cantaloube, J., Ciabrini, C., Charrasse, S., Ferrieres, A., Castro, A., Anahory, T. & Lorca, T. Loss of Centromere Cohesion in Aneuploid Human Oocytes Correlates with Decreased Kinetochores Localization of the Sac Proteins Bub1 and Bub3. *Sci. Rep.* **7**, 44001 (2017).
294. Duncan, F. E., Chiang, T., Schultz, R. M. & Lampson, M. A. Evidence that a defective spindle assembly checkpoint is not the primary cause of maternal age-associated aneuploidy in mouse eggs. *Biol. Reprod.* **81**, 768–776 (2009).
295. Yun, Y., Holt, J. E., Lane, S. I. R., McLaughlin, E. A., Merriman, J. A. & Jones, K. T. Reduced ability to recover from spindle disruption and loss of kinetochores spindle assembly checkpoint proteins in oocytes from aged mice. *Cell Cycle* **13**, 1938–1947 (2014).
296. Schindler, K., Davydenko, O., Fram, B., Lampson, M. a. & Schultz, R. M. Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2215–22 (2012).
297. Shomper, M., Lappa, C. & FitzHarris, G. Kinetochores microtubule establishment is defective in oocytes from aged mice. *Cell Cycle* **13**, 1171–1179 (2014).
298. Nakagawa, S. & FitzHarris, G. Intrinsically Defective Microtubule Dynamics Contribute to Age-Related Chromosome Segregation Errors in Mouse Oocyte Meiosis-I. *Curr. Biol.* **27**, 1040–1047 (2017).

Table des illustrations

Figure 1 : Les principales étapes de la mitose.

Figure 2 : Phases du cycle cellulaire et leur contrôle.

Figure 3 : Points de contrôle du cycle cellulaire.

Figure 4 : Les principales étapes de la méiose.

Figure 5 : Formation du follicule ovarien à partir des cellules germinales.

Figure 6 : Contrôle moléculaire de l'arrêt en prophase I et reprise de la méiose dans l'ovocyte.

Figure 7 : La maturation méiotique dans l'ovocyte de souris.

Figure 8 : Structure d'un microtubule.

Figure 9 : Le phénomène de tapis roulant.

Figure 10 : Instabilité dynamique des microtubules.

Figure 11 : Structure du fuseau et moteurs moléculaires.

Figure 12 : Structure du kinétochore de vertébré.

Figure 13 : Forces de tension.

Figure 14 : Les différents types d'attachement en mitose et en méiose I.

Figure 15 : Régulation des attachements par la tension et la kinase Aurora B/C.

Figure 16 : Régulation de la transition métaphase-anaphase par l'APC/C.

Figure 17 : Recrutement séquentiel des protéines du SAC.

Figure 18 : Extinction du SAC.

Figure 19 : Différents signaux peuvent activer le SAC.

Résumé :

Au cours de mon travail de doctorat, je me suis intéressé aux mécanismes qui contrôlent la séparation équitable du génome lors de la méiose. La méiose est la division des cellules germinales permettant la formation de gamètes haploïdes. Elle est constituée de deux divisions successives : Méiose I et Méiose II. En méiose I, les chromosomes homologues sont ségrégués, tandis que ce sont les chromatides sœurs qui sont ségrégués en méiose II. Le partage équitable des chromosomes en méiose I et en méiose II est essentiel pour former des gamètes avec le nombre correct de chromosomes afin d'obtenir une ploïdie normale de l'embryon après fécondation.

Il existe en méiose, comme en mitose, un contrôle de la ségrégation des chromosomes. Ce mécanisme, appelé point de contrôle du fuseau, surveille l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau : en cas d'attachement incorrect, l'anaphase est retardée ce qui permet d'éviter les aneuploïdies. En métaphase, l'attachement des chromosomes homologues aux deux pôles opposés du fuseau, génère une force de tension au niveau des kinétochores.

Mon travail de thèse a consisté à déterminer si cette tension exercée sur les chromosomes est un signal qui permet de satisfaire le point de contrôle du fuseau en méiose I dans l'ovocyte de souris. Lorsque la tension exercée sur les chromosomes homologues par les microtubules est diminuée par un traitement pharmacologique, la dégradation de la sécurine, qui marque l'entrée en anaphase, est retardée. Si le point de contrôle du fuseau est inhibé en absence de tension, l'anaphase n'est pas retardée. Ainsi, la tension est reconnue par le point de contrôle du fuseau.

De plus, nous avons étudié l'implication de la kinase Aurora B/C dans ce processus. Nous avons montré que cette kinase n'est pas requise pour la réponse du point de contrôle du fuseau aux chromosomes non attachés, mais qu'elle est essentielle à la réponse du point de contrôle du fuseau à la baisse de tension. Cette kinase est en effet essentielle à la correction des attachements sans tension, et permet à la cellule d'activer le point de contrôle du fuseau en déstabilisant ces attachements.

Dans un contexte où les erreurs de ségrégation en méiose sont très fréquentes chez la femme et augmentent drastiquement avec l'âge, nos travaux pourraient permettre d'identifier si ces mécanismes de contrôle sont diminués et moins efficaces avec l'âge chez la femme.

Mots clés : cycle cellulaire, ovocyte, méiose, point de contrôle du fuseau, ségrégation des chromosomes