

Table des matières

Préambule au manuscrit.....	5
I. Chromatine et Noyau cellulaire.....	8
I.1 Quelques rappels sur le chromosome.....	9
I.1.1 Le nucléosome, premier niveau d'organisation du chromosome.....	9
I.1.1.1 ADN (diamètre caractéristique de 2nm).....	9
I.1.1.2 Histones (dimension caractéristique de 3 nm).....	10
I.1.1.3 Nucléosome (dimension caractéristique 10nm).....	11
I.1.2 Fibre de nucléosomes de 30 nm.....	13
I.1.3 Fibre de 30 nm in vivo.....	15
I.2 Organisation nucléaire chez <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	16
I.2.1 Organisation des chromosomes.....	17
I.3 Description de notre méthode de culture cellulaire et de marquage	22
I.3.1 La culture cellulaire	22
I.3.2 Marquage d'un site chromosomique	22
II. Montage expérimental de microscopie et Optimisation.....	24
II.1 L'avènement des protéines de fusion fluorescentes.....	24
II.1.1 Notions sur la physique de fluorescence.....	25
II.1.2 Le cube dichroïque.....	26
II.1.3 Microscopes optiques à fluorescence.....	28
II.2 Optimisation des conditions d'imagerie pour le suivi de particules.....	29
II.2.1 Généralités : critère d'Abbe et suivi de particules.....	29
II.2.2 Précision de pointé pour le suivi d'une particule unique.....	30
II.2.2.1 Approche de Thompson.....	30
II.2.2.2 Approche d'Ober.....	31
II.2.3 Éléments d'optimisation.....	32
II.2.3.1 Source de lumière.....	32
II.2.3.2 Filtres.....	33
II.2.3.3 Ouverture numérique et grossissement.....	33
II.2.3.4 Camera.....	34
II.2.3.4.1 Capteur EMCCD.....	34
II.2.3.4.2 Binning.....	36
II.2.3.5 Taille du pixel.....	37
II.2.4 Détermination de conditions de suivi de particules optimales.....	38
II.2.4.1 Simulation des images.....	39
II.2.4.2 Validation des conditions de suivi avec des nanoparticules fluorescentes.....	41

II.3 Méthodes de suivi de particules en 3D.....	44
II.3.1 Description des méthodes et évaluations des performances.....	44
II.3.1.1 La microscopie confocale.....	44
II.3.1.2 Microscopie astigmatique contrôlée.....	46
II.3.1.3 Microscopie multiplans et bifocales :.....	47
II.3.2 Micro-miroirs.....	48
II.3.2.1 Principe.....	48
II.3.2.2 Optimisation.....	50
II.3.2.3 Performances.....	53
II.3.3 Intérêt de l'information 3D.....	54
III. Méthode haut débit de suivi de particules.....	56
III.1 Comparaison d'algorithmes de suivi.....	57
III.2 Cahier des charges pour le développement du programme de suivi de segment de chromosomes dans la levure.....	60
III.2.1 Classification des trajectoires :.....	64
III.2.1.1 Stratégie de classement des trajectoires pour un signal comportant "une couleur".....	64
III.2.1.2 Stratégie de classification des trajectoires avec deux couleurs.....	67
III.2.1.3 Contrôle qualité.....	70
III.2.1.4 Données en sortie de l'algorithme.....	72
III.3 Calibration de la précision de pointé pour des films de levures.....	73
III.4 Détection de dérive	75
IV. Application à l'ensemble du génome.....	78
IV.1 État des lieux de la recherche sur la dynamique des chromosomes.....	78
IV.2 Stratégie expérimentale.....	79
IV.2.1 Dynamique indépendante de la taille du chromosome et de la position génomique du locus.....	80
IV.2.2 Dynamique indépendante de la position dans le noyau avec notre segmentation.....	82
IV.2.3 Modèle de Rouse et validation par analyse de la distribution de pas.....	83
V. Application à la structure et dynamique du chromosome XII.....	84
V.1 Stratégie expérimentale.....	84
V.2 Résultats.....	86
V.2.1 Adéquation avec les gene map.....	86
V.2.2 En fonction de la position le long du chromosome.....	87
VI. Conclusion générale :.....	90

Préambule au manuscrit

Ce mémoire de thèse est le fruit de 3 années de recherche dans des domaines multidisciplinaires au cours desquelles j'ai découvert les techniques de microscopie, d'analyse d'images, de biophysique et de culture cellulaire. Ce travail a été mené en s'appuyant sur de nombreuses collaborations notamment au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME - Université de Toulouse) et les équipes d'Olivier Gadal et Kerstin Bystricky, sans lesquelles rien n'aurait été possible. Le financement de ma thèse est d'ailleurs une bourse de l'université Paul Sabatier soutenant l'interaction entre le LAAS et le LMBE.

J'ai effectué ma thèse au sein du LAAS, laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, dans le groupe N2IS, Nano ingénierie et intégration des systèmes et plus précisément dans l'axe Intégration Micro et Nano-fluidique. J'ai été recruté en continuité de la thèse de Houssam Hajjoul, qui avait effectué un travail plus technologique puisqu'il avait développé un système de visualisation 3D fondé sur des micro-miroirs en sillons. Ce premier travail avait permis de mettre en évidence l'intérêt du développement de nouveaux outils d'analyse d'image pour augmenter le débit d'analyse des expériences d'imagerie. Mon profil d'Ingénieur à l'INSA de Toulouse en automatique et électronique, m'a permis de mettre en œuvre mes compétences en matière d'analyse de données, de conception de chaînes d'acquisition et de programmes de traitement nécessaires à la bonne marche du projet.

L'objectif de mon travail de thèse a été de développer des outils permettant de mesurer précisément les déplacements des chromosomes dans les cellules vivantes, d'automatiser le processus de traitement de l'information et de développer des modèles quantitatifs d'analyse des données expérimentales. Ces objectifs sont motivés par le fait que la description du mouvement des chromosomes dans la levure est encore mal documentée, alors que ce sujet constitue un enjeu important de la biologie du chromosome moderne. La technique essentielle de mon projet est la microscopie de fluorescence, que je décrirai avec précision dans ce manuscrit. Nous notons que nous avons fait un effort d'intégration très important pour nos développements logiciels, qui sont aujourd'hui disponibles sous la forme d'exécutables, potentiellement distribuables auprès de n'importe quel utilisateur. Ce volet d'ingénierie est au cœur des compétences historiques du LAAS, qui est spécialisé en Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes et vise à répondre à des besoins sociétaux et scientifiques du moment.

Le caractère pluridisciplinaire de ma thèse implique une présentation de domaines aussi divers que l'algorithmique de traitement d'images et la structure moléculaire d'un chromosome. D'un point de vue scientifique, cela constitue clairement un grand écart. J'ai donc tenté de présenter de manière synthétique les motivations essentielles à mon projet. Dans une première partie, je vais revenir sur la chromatine et le noyau cellulaire de façon à introduire le cadre biologique de mon travail de recherche ainsi que les questions qui restent en suspens sur l'organisation nucléaire de la levure. Dans une seconde partie, je reviendrai sur le montage expérimental de microscopie de fluorescence et les différentes optimisations que j'ai apportées pour améliorer la qualité des images et élargir la gamme temporelle des

acquisitions. Ensuite dans une troisième partie, je parlerai en détail des programmes de suivi de particule et du programme de traitement des trajectoire que j'ai développé. Dans une quatrième partie, je montrerai une application concrète de mon travail en étudiant les déplacements spatio-temporels de segments de chromosomes issus de plusieurs chromosomes de la levure. Enfin je présenterai une seconde application en décrivant les propriétés du chromosome XII de la levure à partir de l'étude de segments distribués régulièrement le long de celui-ci.

I. Chromatine et Noyau cellulaire

La taille du génome de la levure *Sacharomyces Cerevisiae* représentant 12,7 millions de paires de bases (pb) d'ADN et cette grande quantité de matériel génomique est stockée à l'intérieur d'un noyau de $\sim 4 \mu\text{m}^3$ grâce à un repliement compact et hiérarchisé de l'ADN [Fig. 1]. Ce repliement est fondé sur une succession de niveaux d'architecture discrets, à savoir l'ADN, les nucléosomes, les fibres de nucléosomes, les boucles de chromatine et le chromosome complet. Dans cette première partie, nous proposons de présenter un bref aperçu des propriétés physico-chimiques des premiers niveaux d'organisation du chromosome. Nous illustrerons nos propos avec des exemples essentiellement tirés des connaissances issues de la levure du boulanger, car nous avons utilisé presque exclusivement cet organisme pour nos travaux.

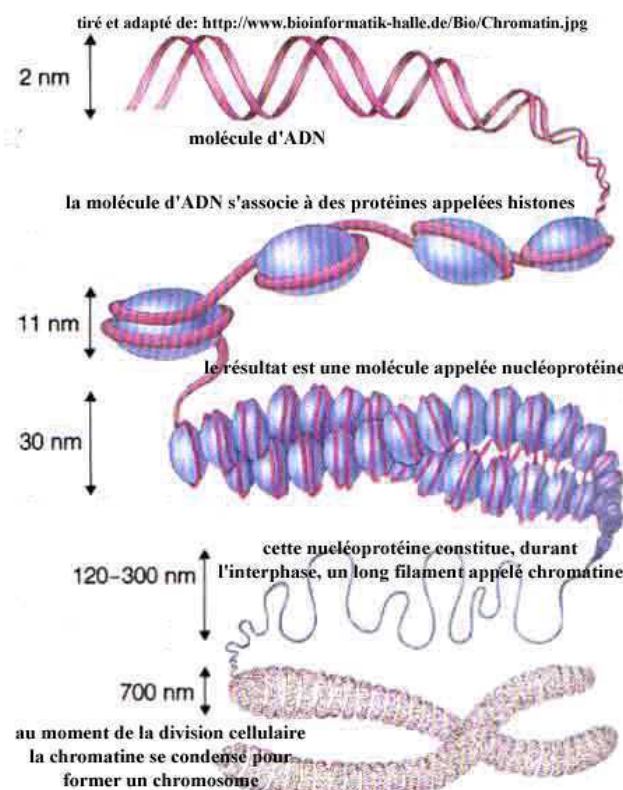


Figure 1: Schéma illustrant les différents niveaux d'enroulement de l'ADN dans un chromosome

1.1 Quelques rappels sur le chromosome

1.1.1 Le nucléosome, premier niveau d'organisation du chromosome

Le matériel génétique est stocké dans le noyau d'une cellule eucaryote sous forme de chromatine (Flemming, 1882), un assemblage issu de l'interaction de protéines chargées positivement « les histones » avec l'ADN. Nous nous proposons de décrire ces éléments et leur assemblage dans cette partie.

1.1.1.1 ADN (diamètre caractéristique de 2nm)

La structure moléculaire de l'ADN a été élucidée par Watson et Crick en 1953 [1]. D'un point de vue physique, l'ADN est chargé négativement du fait d'un groupement phosphate par base, ce qui correspond à une charge négative par 0,34 nm dans une double hélice. L'enroulement spontané de l'ADN en une double hélice se traduit par une grande rigidité. Cette rigidité se traduit en termes de longueur de persistance l_p , qui correspond à la longueur caractéristique au bout de laquelle les fluctuations thermiques suffisent à réorienter de manière arbitraire une chaîne de polymère. Dans le cas de l'ADN double brin, la longueur de persistance vaut 50 nm (ou 150 pb), soit beaucoup plus que le diamètre de cette molécule de 2 nm.

L'ADN a longtemps été considéré comme le support unique et universel de l'information génétique. Cette hypothèse est valable dans le cas des bactéries, mais elle est moins claire chez les eucaryotes. En effet, de multiples mécanismes de régulation génétique

impliquant un encodage d'information sur un support différent de l'ADN et permettant de contrôler l'expression des gènes ont été identifiés [2]. En d'autres termes, il reste difficile de savoir ce qui détermine la transcription ou l'extinction d'un gène. La plupart des connaissances récentes indiquent qu'un maillon essentiel de la régulation des gènes se situe au niveau de la composante protéinique du chromosome, en particulier à travers les histones.

1.1.1.2 Histones (dimension caractéristique de 3 nm)

La découverte des histones remonte à 1884 par Kossel [3]. Ces protéines sont parmi les mieux conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Il existe cinq types principaux d'histones H2A, H2B, H3, H4 et H1. La structure de ces histones est constituée d'un domaine central structuré et de queues non structurées N- et C- terminales de longueur variables. Les quatre histones dites de cœur (H2A, H2B, H3, H4) ont des caractéristiques de structure et de séquences similaires qui suggèrent qu'elles possèdent une origine commune. Leur masse moléculaire est environ 14 kDa et leurs extrémités N-terminales sont caractérisées par une fraction Arginine/Lysine importante (charges positives). L'histone de liaison H1 se distingue par une masse moléculaire plus grande de 21 kDa et une charge positive nette plus importante.

1.1.1.3 Nucléosome (dimension caractéristique 10nm)

L'unité fonctionnelle du chromosome est le nucléosome et sa description est récente puisqu'elle remonte à 1975 [4]. La particule cœur du nucléosome est formée de 146 pb d'ADN enroulées suivant une hélice gauche d'un tour et demi autour d'un octamère de protéines cylindrique contenant de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. Sa structure a été révélée avec une résolution atomique de 1,9 Å par cristallographie aux rayons X (Figure 2), montrant que sa formation est le résultat de deux effets antagonistes associés à une pénalité de courbure de l'ADN compensée par une forte énergie d'interaction d'origine électrostatique en particulier entre l'ADN et les histones.

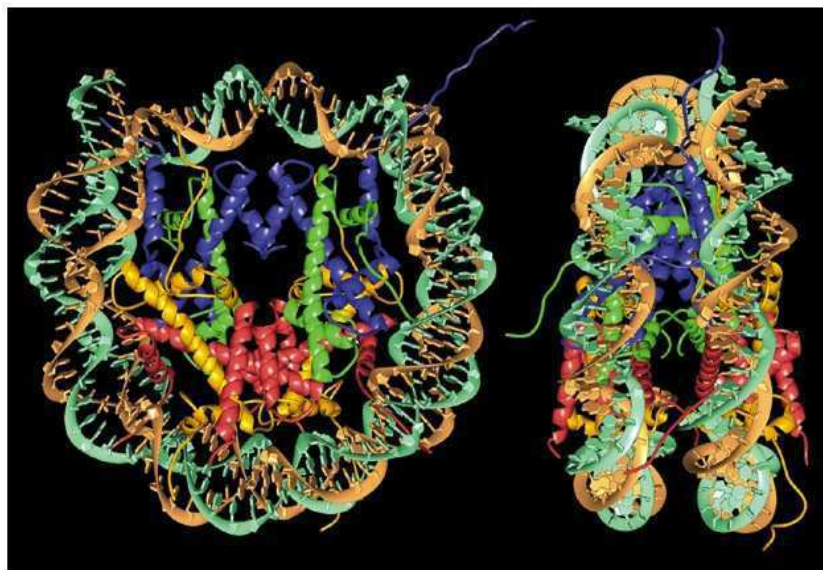


Figure 2: Structure d'un nucléosome avec les protéines H2A en jaune, H2B en rouge, H3 en bleu, H4 en vert

Les nucléosomes peuvent être purifiés ou reconstitués par des méthodes biochimiques éprouvées, ce qui a permis de réaliser de nombreuses études, en particulier focalisées sur leur rôle dans le contrôle et la régulation génétique. Ces travaux ont montré

dès les années 1980 que l'ADN capturé dans un nucléosome est peu accessible aux facteurs de transcription [5]. Plus récemment, le nucléosome a été décrit comme une structure polymorphe, qui peut subir des modifications chimiques dites post-traductionnelles sur les histones, ou avoir sa « personnalité » propre lorsque des variants d'histones remplacent les histones classiques [6]. Ces résultats ont incontestablement participé au fort lancement du domaine de l'épigénétique depuis les années 2000, qui est devenu un domaine de recherche central de la biologie moderne.

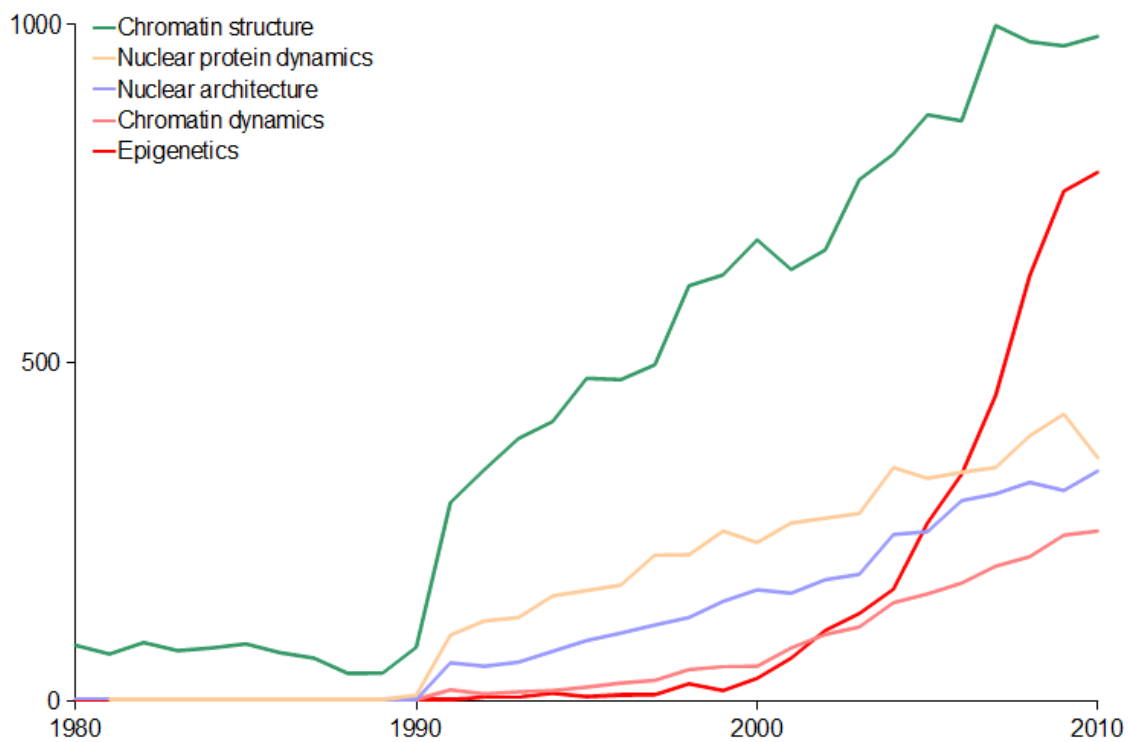


Figure 3: Courbe montrant le nombre de citation des différents thèmes de recherche au cours du temps dans les publications scientifiques (isi web of knowledge). Cette courbe montre un intérêt croissant des recherches sur la chromatine notamment depuis 1990 et le développement des recherches sur l'épigénétique.

I.1.2 Fibre de nucléosomes de 30 nm

L'ADN autour des nucléosome est protégé des actions enzymatiques. Aussi, en utilisant les protéines de digestion de l'ADN, il a été possible d'isoler des nucléosomes issus d'organismes vivants. En effectuant une digestion ménagée, on collecte des chapelets de plusieurs nucléosomes (1-2-3), qui peuvent être analysés avec les techniques de biochimie classiques. La migration de l'ADN sur gel a en particulier permis de mesurer la distance entre nucléosomes consécutifs. Une distribution régulière a été observée mais la distance entre deux nucléosomes consécutifs est très variable suivant les espèces entre 170 pb chez la levure *S. Cerevisiae* et 200 pb pour l'homme. Cela dit, en l'absence de conclusions claires à la suite de l'examen morphologique de noyaux et de chromosomes *in situ* par microscopie électronique, de nombreux chercheurs se sont intéressés à la chromatine purifiée comprenant des polynucléosomes de longueur ajustable. Les premiers travaux issus de la biologie moléculaire ont établi que l'état de compaction de polynucléosomes est fortement dépendant du milieu ionique. L'ADN nu est très fortement chargé négativement, ce qui se traduit par une forte auto-répulsion en milieu peu salin inférieure à 5 mM et la formation de structure en « collier de perles » [4] [7]. En augmentant la force ionique, une structure plus compacte caractérisée par un rayon de 30 nm a été détectée par microscopie électronique [8]. Ce résultat a été conforté grâce aux techniques de sédimentation analytique qui consistent à mesurer la vitesse de sédimentation de biomolécules, caractérisée par le rapport du poids moléculaire d'une structure divisée par sa friction visqueuse (en Sverdberg) :

$$S \sim \text{masse moléculaire} / 6\pi\mu R \quad (1)$$

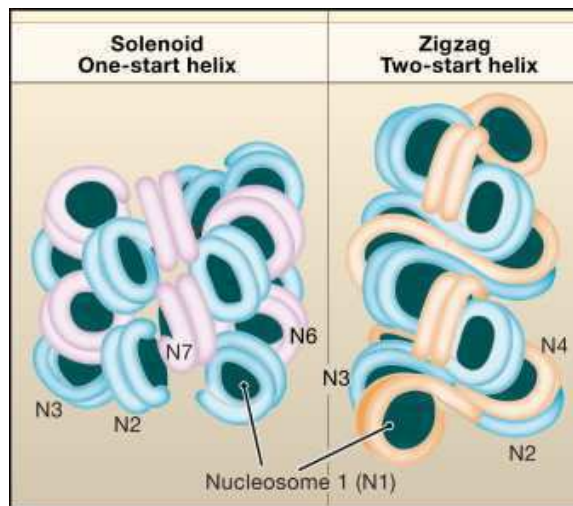


Figure 4: Modèle solénoïde (à gauche) et modèle zigzag (à droite) de la fibre de chromatine de 30 nm [12]

où R est le rayon hydrodynamique et μ est la viscosité. En effet, le nombre S augmente lorsque la concentration en sel augmente [9], mais il est difficile de corrélérer ce comportement à des caractéristiques microscopiques de la fibre de chromatine. Malgré un grand nombre de résultats expérimentaux, l'arrangement des nucléosomes et de l'ADN dans les fibres de 30 nm reste un problème très mal compris et controversé [10], plusieurs modèles de structure de films ont été proposés et restent d'actualité (Figure 4). De grandes améliorations ont récemment été apportées en utilisant des ADN dont la séquence est superpositionnante pour le nucléosome [11]. Une réalisation majeure de cette approche a été la cristallisation et la détermination de la structure par diffraction des rayons X d'une fibre de tetranucléosomes [12]. Bien que ce résultat soit très artificiel car obtenu avec des séquences très particulières, il démontre un arrangement en zigzag des nucléosomes, avec des contacts entre deux nucléosomes successifs via des interactions entre H2B et H3 et entre H2A et H4. Cette structure n'a toutefois pas fait l'unanimité car un modèle en solénoïde proposé par Robinson et al a été proposé sur la base d'observations par microscopie électronique de nucléofilaments contenant l'histone H1 [13].

Notons enfin que le facteur de compaction de la fibre de chromatine peut aussi être régulé par des protéines associées à la chromatine, en témoigne par exemple les clichés de microscopie électronique obtenus avec des polynucléosomes mis en présence de Sir3p [14], une protéine impliquée dans l'extinction de l'expression des gènes. De plus, une étude de Dorigo et al. [15] sur des polynucléosomes dans lesquels les queues N-terminales de H4 ont été supprimées a montré leur rôle essentiel pour la compaction de la chromatine.

I.1.3 Fibre de 30 nm *in vivo*

L'existence de la fibre de 30 nm *in vivo* reste très discutée : bien qu'il y ait un manque de preuves de son existence chez les eucaryotes supérieurs, la capacité à assembler cette structure *in vitro* et à l'extraire à partir des noyaux a fait valoir que la fibre de 30 nm est une structure secondaire. Des expériences de mesure de distance entre les sites chromatiniens *in vivo* réalisées par Bystricky et al. 2004 ont permis de suggérer l'existence d'une fibre de 30 nm *in vivo* dans la levure *S. Cerevisiae* [16] et de déterminer une longueur de persistance de la fibre de chromatine de 170-220 nm. Plus récemment, à partir des données de la technique 3C (Capture de conformation de chromosomes) et de modélisation, Dekker a suggéré que la chromatine de levure *S. Cerevisiae* est plus étendue qu'une fibre canonique de 30 nm [17]. Il a déterminé une longueur de persistance de 66-134 nm avec une densité de 11 nm/kb.

Nous avons présenté des éléments sur la physico-chimie de la fibre de chromatine, en particulier issus de données de méthodes d'analyse *in vitro*. Attachons nous maintenant à la structure plus macroscopique du noyau.

1.2 Organisation nucléaire chez Saccharomyces Cerevisiae

La levure du boulanger, *Saccharomyces Cerevisiae*, est un organisme largement utilisé par les scientifiques dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire. Cette levure est caractérisée par une organisation cellulaire proche de celle des eucaryotes supérieurs avec l'avantage d'être facilement cultivable en laboratoire et facilement manipulable génétiquement. De plus les mécanismes moléculaires de transcription, réparation et de réplication de l'ADN chez *S. Cerevisiae* impliquent des complexes protéiques présentant pour nombre d'entre eux des similitudes avec ceux des eucaryotes supérieurs, ce qui en fait un bon système pour étudier les transactions cellulaires *in vivo*. Son génome se compose de 16 chromosomes pour un total de 12,7 millions de paires de bases et de 6275 gènes [18]. Nous allons maintenant nous intéresser en détail à l'organisation nucléaire de *Saccharomyces Cerevisiae*, qui est l'objet de mon travail de thèse.

Le chromosome de levure comporte trois structures remarquables pour l'organisation nucléaire, à savoir le nucléole, les centromères et les télomères, qui sont des structures chez les eucaryotes supérieurs. Les centromères et les télomères correspondent respectivement à la partie centrale des chromosomes et à leurs extrémités terminales. Maintes fois étudié dans la littérature et faisant encore l'objet d'intenses recherches, le centromère est marqué par un code spécifique sur l'ADN et il présente aussi une composition en histone particulière à travers un variant d'histone, nommé CenpA [19]. Les télomères sont aussi repérés par des séquences répétées et des protéines spécifiques, de même que le nucléole, qui est imprimé dans la séquence du chromosome XII de la levure *S. Cerevisiae*. Les télomères sont souvent présentés comme des structures encodant l'âge des cellules, puisque le nombre de séquences télomériques diminue au cours de la vie cellulaire [20]. Le nucléole assure en particulier la

production soutenue de l'ARN ribosomal, qui est essentiel pour la traduction d'ARN en protéines.

Attachons-nous donc à décrire l'organisation du noyau de la levure en précisant le rôle fondamental de toutes les structures nucléaires que nous venons de présenter.

I.2.1 Organisation des chromosomes

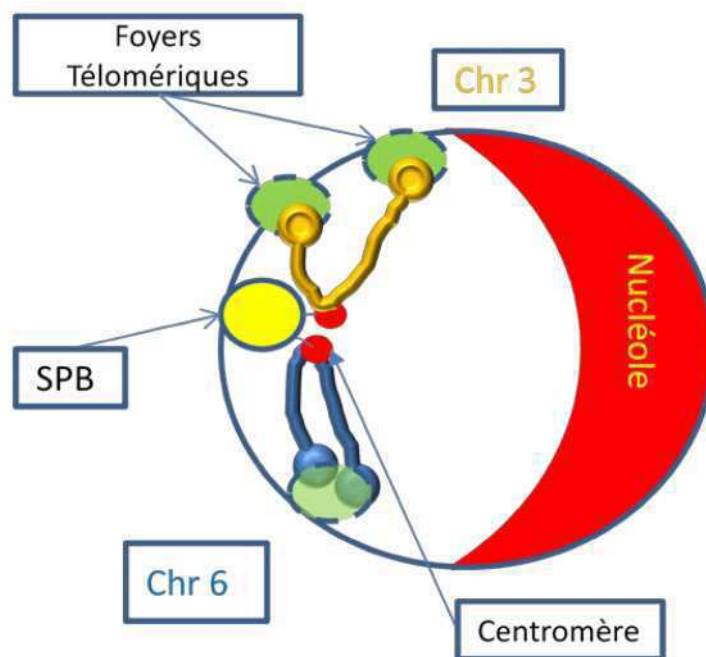


Figure 5: Configuration pseudo rable du noyau de la levure *S. Cerevisiae*

Carl Rabl a observé en 1885 une conformation repliée et polarisée des chromosomes au moment de l'anaphase chez les larves de salamandre par microscopie optique. Cette configuration a ensuite semblé pertinente dans le cas des chromosomes de levure. En effet, les centromères des chromosomes sont agglomérés ensemble dans un amas situé à environ 200 nm du corps polaire du fuseau (SPB, Spindle Pole Body en anglais) et à l'opposé du

nucléole. Les télomères sont quant à eux essentiellement liés à l'enveloppe du noyau (NE) et les techniques de microscopie optique de fluorescence ont permis de montrer que les 32 télomères d'une levure haploïde sont regroupés en 2-8 foyers [21] [22]. Au total, ces trois éléments suffisent à induire une organisation à grande échelle des chromosomes et une polarisation du noyau selon un axe défini par l'axe entre le nucléole et le SPB. Les chromosomes sont relativement polarisés entre le SPB et la membrane nucléaire, ce qui leur donne une conformation dite pseudo-Rabl.

En outre, Schober *et al.* [23] ont montré que les télomères du même chromosome ont tendance à interagir plus fréquemment si la longueur de leur bras chromosomique correspondant sont égales. Therizols *et al* [24] ont aussi observé que les télomères ne sont pas positionnés de façon aléatoire à la périphérie du noyau et que leur répartition dépend de la taille du bras de leurs chromosomes et du volume du nucléole. Berger *et al* [25] ont ajouté le marquage du nucléole comme second point de référence pour améliorer la localisation des gènes dans un noyau et ainsi réaliser une carte 2D de la distribution statistique des sites chromosomiques dans un noyau de levure (Figure 6). Ces cartes ont montré que les gènes sont confinés dans des « territoires » géniques assez diffus mais pas homogène dans le noyau. En outre les bras chromosomiques de longueur ~300 kb n'explorent pas tout le nucléoplasme et sont confinés à un territoire proche du SPB. Enfin, il a été établi que le volume des territoires géniques dépend de la position du gène sur les chromosomes et, pour certains en particulier, les gènes du métabolisme du galactose de leur niveau d'expression.

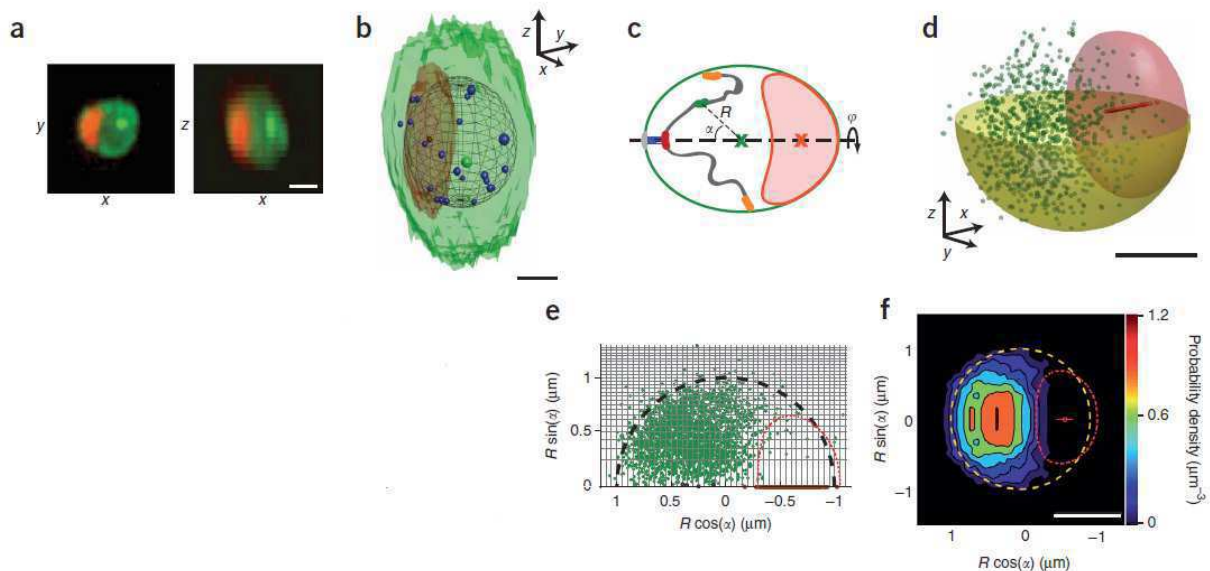


Figure 6: Construction d'une « gene map » [24]. (a) noyau de levure avec locus et pores nucléaires marqués en vert et le nucléole marqué en rouge. (b) Localisations extraites des images : locus (point vert), estimation de l'enveloppe nucléaire (ellipsoïde), centroïde du nucléole (point rouge) ; les surfaces vertes et rouges correspondent aux signaux nucléaires et nucléolaires filtrés et seuillés. (c) Structure nucléaire de la levure avec contraintes et système de mesure de coordonnées. (d) Vue 3D des positions des loci dans le noyau avec l'hémisphère jaune de rayon $1\mu\text{m}$ figurant le noyau et la surface rouge le nucléole « moyen ». (e) Positions des loci en coordonnées cylindriques avec le demi-cercle d' $1\mu\text{m}$ de rayon et la projection du nucléole en rouge. (f) Carte de densité de probabilité de présence, le noyau moyen est représenté en pointillé blanc et le nucléole moyen en rouge (échelle $1\mu\text{m}$)

Très récemment, Duan *et al.* [26] ont fourni le premier modèle tridimensionnel du génome de la levure du boulanger, en utilisant une méthode de type 4C (Coupling Chromosome Conformation Capture-on-chip), qui permet de détecter à l'échelle d'une population de levures les points d'interaction intra- et inter-chromosomique dans un génome (Figure 7). Leurs observations identifient l'existence de la configuration Rabl des chromosomes de la levure tandis que le Chromosome XII avec les répétitions ADN_r s'étend vers le nucléole. Après avoir quitté le nucléole, le reste de celui-ci interagit avec le bras long du chromosome IV. Les bras des chromosomes de petite taille sont entassés dans une zone proche du SPB, rendant ainsi les contacts avec d'autres chromosomes fréquents. En revanche, les bras des chromosomes plus longs occupent un terrain relativement peu fréquenté, impliquant moins de contacts avec d'autres chromosomes.

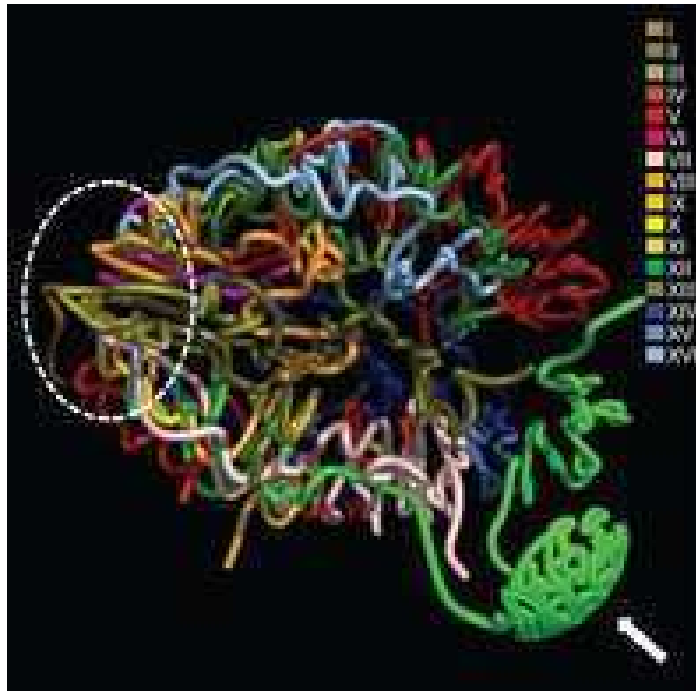


Figure 7: Modèle 3D du génome de la levure . Les chromosomes forment un amas à partir du centromère lié au SPB. Le chromosome 12 est indiqué en vert, il s'étend vers le nucléole occupé par des séquences répétées d'ADNr (indiqué par la flèche blanche).

Notons enfin que cette organisation macroscopique des chromosomes est en outre fonctionnelle pour le contrôle de l'expression des gènes. En effet, la chromatine est segmentée en deux compartiments appelés euchromatine, qui est enrichie en gènes transcrits et hétérochromatine, qui est plus compacte et peu transcrite, selon une première observation remontant à 1928 [27]. Or l'hétérochromatine est en particulier détectée au niveau des télomères chez *S. Cerevisiae*. et des loci silencieux pour la transcription. Il a en particulier été montré que les protéines Rap 1 et yKu70/80 recrutent le complexe impliquant Sir2, Sir3 et Sir4 qui se propagent ensuite le long du chromosome et participent à la répression de la transcription au niveau de l'hétérochromatine [28]. De même, la protéine ESC1, qui est distribuée dans des parcelles le long de la membrane nucléaire interne [29] [30], semble assurer l'ancrage des télomères à l'enveloppe nucléaire.

1.3 Description de notre méthode de culture cellulaire et de marquage

1.3.1 La culture cellulaire

Les souches ont été cultivées à une phase précoce de croissance exponentielle 0.2-0.4 × 10⁷ cellules/ml dans un milieu de culture YPD ou YNB à 30° C, à partir d'une culture fraîche préparée le soir. Juste avant l'expérience, les cellules ont été lavées une fois pour réduire l'autofluorescence du milieu. Un soin extrême doit être apporté afin d'assurer que les cellules sont à des étapes de croissance reproductibles pour la visualisation et de différencier les stades de l'interphase.

1.3.2 Marquage d'un site chromosomique

Une percée importante dans le domaine a été le développement d'une nouvelle approche pour le marquage spécifique de séquences d'ADN dans des cellules vivantes à l'aide de protéines fluorescentes (prix Nobel de chimie 2008). Le marquage de ces sites a été fait par intégration d'un plasmide linéarisé contenant, outre des marqueurs de sélection et des séquences nécessaires à son amplification, des répétitions d'opérateurs de l'opéron lactose (LacO) et une séquence de 400-600 bp homologue à la région d'insertion souhaitée. L'homologie créée par cette séquence génomique sur le plasmide dirige celui-ci au locus génomique désiré, qui s'intègre alors par recombinaisons homologues. Par ailleurs, la séquence codant le répresseur de l'opéron lactose (lacI) fusionnée à une séquence codant une protéine fluorescente (la GFP par exemple) est également insérée dans la cellule via un plasmide. Les protéines de fusion LacI-GFP vont venir se fixer sur les répétitions LacO pour

apparaître comme une particule fluorescente sur le site cible (Figure 8). Cette particule peut être suivie par microscopie à fluorescence et, en analysant sa trajectoire, des informations importantes sur la dynamique de la fibre chromatinienne sont déterminées. Cette technique est devenue commune pour visualiser des sites chromosomiques dans le génome des bactéries jusqu'aux cellules eucaryotes [31]. Straight et al [32] ont été les premiers à montrer la possibilité d'intégrer 256 répétitions de LacO dans le génome de la levure sans affecter la croissance de la cellule.

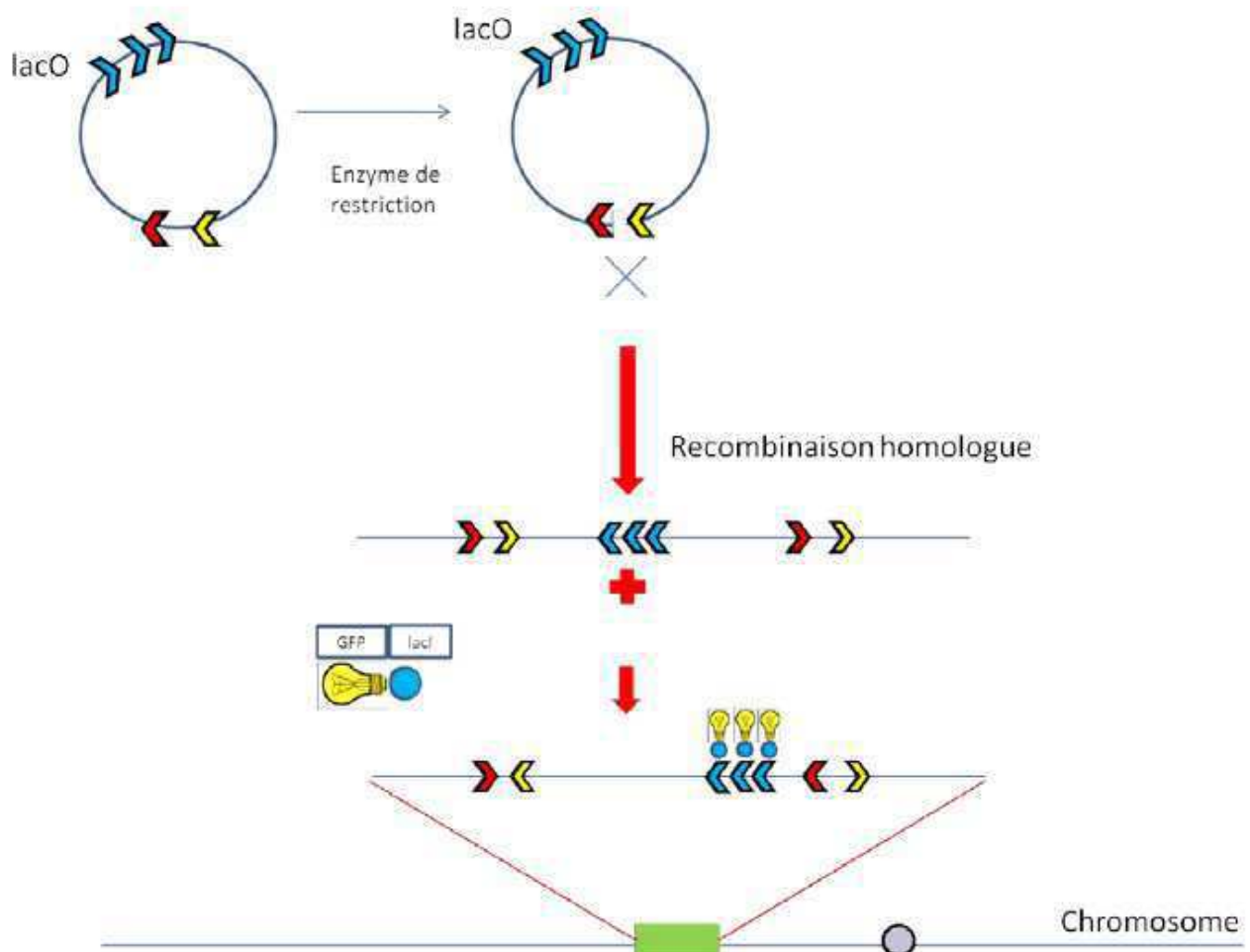


Figure 8: Le marquage d'un site sur le chromosome par intégration des opérateurs LacO. Le plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction avant d'être intégré dans le génome par recombinaison homologue. L'interaction de la protéine de fusion LacI-GFP avec les séquences répétées de LacO créent un point fluorescent.

II. Montage expérimental de microscopie et Optimisation

Comme nous venons de le voir, un atout essentiel de la levure est que son génome peut être modifié presque à volonté pour induire l'expression de protéines fluorescentes et ainsi accéder en temps réel à leur comportement dans la cellule. Ce mariage entre microscopie de fluorescence et imagerie cellulaire est un succès scientifique des 20 dernières années, qui s'appuie sur des principes d'imagerie beaucoup plus anciens. Dans ce chapitre, nous nous proposons de revenir sur la physique et la mise en œuvre d'un microscope de fluorescence, ainsi que sur les méthodes de suivi de particules individuelles.

II.1 L'avènement des protéines de fusion fluorescentes

La microscopie de fluorescence a été inventée il y a près d'un siècle lorsque des microscopistes ont eu l'idée de réaliser des expériences avec de la lumière ultraviolette afin d'augmenter la résolution spatiale. D'abord limitée aux spécimens naturellement fluorescent dédiés à l'observation, elle s'est perfectionnée avec le développement de colorants fluorescent pour la coloration de tissus et de cellules. Le développement de techniques de marquages avec les anticorps dans les années 1950 a permis de rendre la technique populaire en biologie cellulaire.

Dans les années 1960, Osamu Shimomura débute l'étude de la méduse bioluminescente "Aequorea victoria" sans se douter de la révolution scientifique que ses

travaux vont provoquer. Trente ans plus tard en 1994, Martin Chalfie concrétisera l'idée de réaliser des protéines de fusion fluorescentes en rendant la bactérie *Escherichia coli* et le ver *Caenorhabditis elegans* fluorescents. Aujourd'hui, les scientifiques sont capables d'étudier de nombreux processus biologiques grâce aux travaux de Roger Y. Tsien, obtenus par mutation de gène de la GFP. Le bleu, le cyan et le jaune viennent ainsi compléter le vert naturel de la GFP de la méduse. Une autre protéine naturelle, DsRed, rouge comme son nom l'indique, est ensuite découverte chez un organisme marin. Le prix Nobel de chimie 2008, décerné aux découvertes de protéines fluorescentes, atteste d'une manière évidente de l'importance de ce travail. Au final, l'ensemble des protéines fluorescentes offre aujourd'hui la possibilité d'observer de manière directe dans une cellule vivante et en temps réel plusieurs partenaires impliqués dans une transaction biologique.

II.1.1 Notions sur la physique de fluorescence

Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon incident caractérisé par une énergie en résonance avec une de ses transitions électroniques, elle bascule vers un niveau énergétique S1 d'énergie supérieure à l'état S0. La durée de vie de l'état excité est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-10} s. Pendant cette période, une partie de l'énergie est dissipée à cause des relaxations d'énergie vibrationnelle. La transition donnant naissance à un photon de fluorescence va donc se faire à partir d'un niveau d'énergie S1' inférieur à S1 vers l'état S0. Du fait de ces pertes d'énergie, les photons émis par fluorescence ont une énergie inférieure à celle des photons incidents et donc selon une longueur d'onde supérieure à celle de la

lumière d'excitation.

Un fluorophore excité par de la lumière bleue émet par exemple dans le vert (décalage de Stokes). En réalité, il existe une gamme de longueurs d'onde où l'on peut exciter la molécule (spectre d'excitation) et la fluorescence émise est également distribuée sur un spectre large de longueurs d'onde (spectre d'émission), (Figure 9).

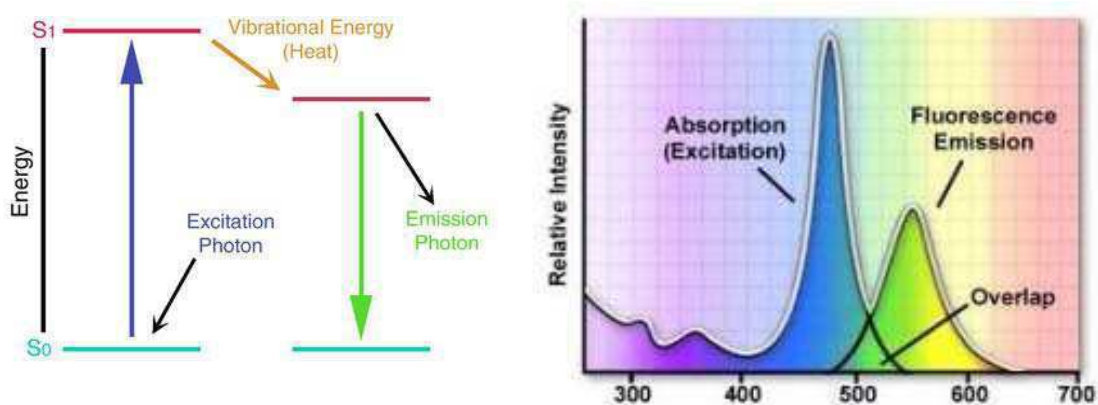


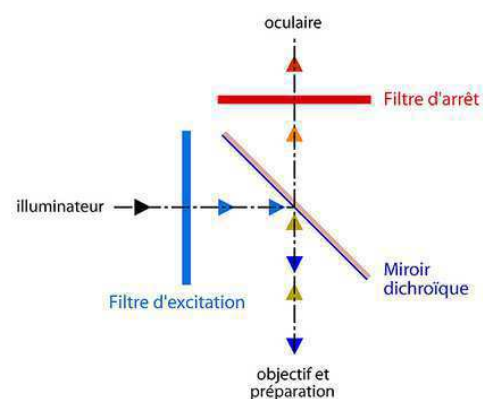
Figure 9: Schéma de principe des transitions électroniques et exemple de spectre d'absorption et d'émission.

II.1.2 Le cube dichroïque

Un composant essentiel des microscopes à fluorescence est le cube dichroïque (Figure 10), qui permet d'observer sélectivement la lumière de fluorescence en s'affranchissant de l'excitation. La lumière d'excitation est envoyée depuis une source vers l'échantillon. Si la source n'est pas monochromatique, on sélectionne une partie de son spectre par un filtre d'excitation. Cette lumière filtrée est ensuite réfléchiée vers l'échantillon par le miroir dichroïque, qui a pour rôle de séparer les chemins des lumières d'excitation et de fluorescence.

Les miroirs dichroïques sont caractérisés par une longueur d'onde λ_0 , qui correspond à une transmission de 50 %. Le miroir reflète la lumière de longueurs d'onde inférieure à λ_0 et transmet au-dessus, idéalement, λ_0 est choisie à l'intersection des spectres d'excitation et d'émission. Notons toutefois qu'un miroir dichroïque n'est pas aussi performant qu'un filtre optique dans la mesure où sa sélectivité en réflexion ou en transmission atteint au mieux 95 %.

Aussi, il est essentiel d'utiliser un filtre, dit d'émission, devant le capteur optique afin de collecter spécifiquement la lumière de fluorescence. Remarquons au passage que le filtre d'excitation et le filtre d'émission ont des propriétés spectrales opposées, car il est nécessaire de couper les basses longueurs d'onde à l'excitation et de ne garder que les hautes longueurs d'onde à l'émission, le miroir dichroïque étant situé entre ces deux barrière spectrales.



Ce "cube" remplace la lame semi-réfléchissante standard de l'éclairage Köhler par réflexion.

Figure 10: Exemple et schéma de principe d'un cube dichroïque

II.1.3 Microscopes optiques à fluorescence

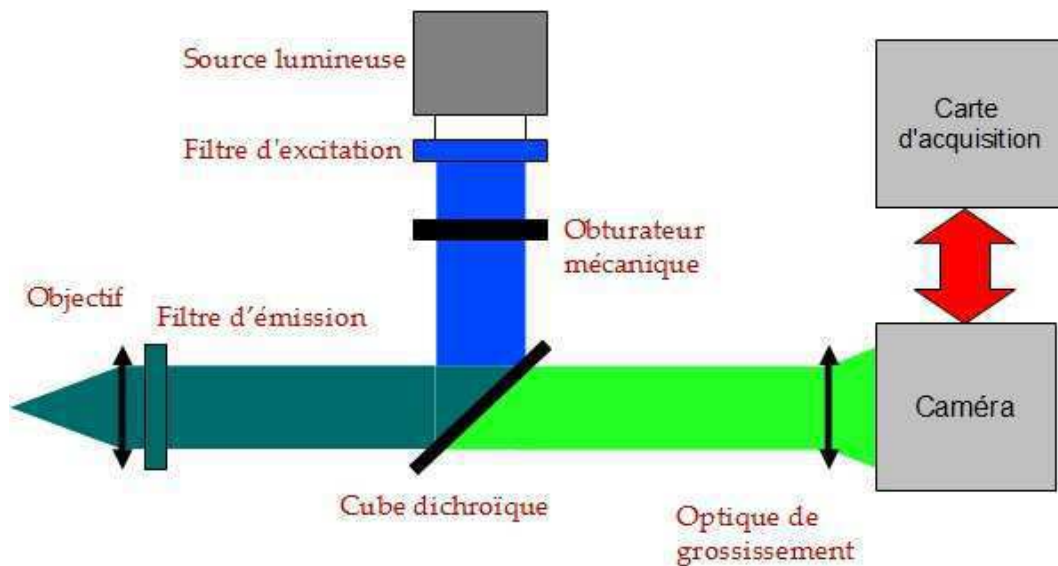


Figure 11: Schéma de microscope et des différentes parties à optimiser

Un objectif de microscope permet de zoomer avec plus ou moins de précision sur l'objet d'intérêt, il renvoie la lumière de fluorescence «à l'infini», c'est à dire que l'on peut changer de cube dichroïque sans modifier les réglages optiques des lentilles de collimation qui assurent l'homogénéité de la source lumineuse. Ainsi, plusieurs cubes dichroïques sont intégrés sur un même appareil afin d'observer différents fluorophores ciblés. On peut simplifier le montage optique en décrivant les différents éléments essentiels d'un microscope optique : la source lumineuse, le cube dichroïque, l'objectif, l'optique de collimation en sortie et la caméra. Dans la suite, nous détaillons les composants sur lesquels nous avons fait un effort expérimental pour optimiser la vitesse d'acquisition de notre microscope.

II.2 Optimisation des conditions d'imagerie pour le suivi de particules

II.2.1 Généralités : critère d'Abbe et suivi de particules

Revenons d'abord sur la notion du critère d'Abbe, qui définit la résolution spatiale en imagerie classique. En caractérisant la tâche de diffraction de deux objets, Abbe a en effet montré qu'ils ne sont pas discernables dès lors que leur distance est inférieure à $\lambda/2NA$ où NA est l'ouverture numérique de l'objectif et λ est la longueur d'onde. Dans notre cas, le pic d'émission de la GFP est à 520 nm et l'ouverture numérique de notre objectif est de 1,4, le critère d'Abbe nous donne donc une résolution spatiale optimale de 185 nm. Les techniques d'imagerie de particules individuelles permettent toutefois de largement dépasser ce critère. En effet, un objet individuel isolé se présente sous la forme d'une tâche de diffraction, souvent assimilée à une gaussienne, que l'on peut positionner avec une précision bien inférieure à la taille du pixel de la caméra. Pour parvenir à de telles performances, il est nécessaire de développer un banc optique permettant de collecter le plus grand nombre de photons issus de la cible fluorescente, c'est-à-dire améliorer le rapport signal/bruit. Pour définir la meilleure façon d'optimiser la résolution spatiale de notre système, revenons sur deux travaux ayant évalué la limite théorique de précision de positionnement.

II.2.2 Précision de pointé pour le suivi d'une particule unique

II.2.2.1 Approche de Thompson

En approchant la tâche de diffraction (notée PSF dans la suite en adoptant l'acronyme anglais Point Spread Function) par une gaussienne en deux dimensions, une approche statistique fondée sur la méthode des moindres carrés a permis d'extraire une approximation analytique décrivant l'erreur de localisation d'un point fluorescent : l'équation de Thompson [33].

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = s^2/N + (a^2/12)/N + (8\pi s^4 b^2) / (a^2 N^2) \quad (2)$$

où Δx désigne l'écart type des estimations de la position de la cible, s l'écart-type de l'image diffractée de la cible, a la taille effective d'un pixel du détecteur, N le nombre total des photons collectés et b , l'écart-type du bruit de fond.

L'information essentielle de cette équation est que la précision de positionnement est inversement proportionnelle au nombre de photons collectés et la maximisation du nombre de photons collectés implique de réaliser des acquisitions longues. La taille du pixel doit être judicieusement choisie en fonction de l'objet à imager. A ce jour, le record historique en positionnement a été réalisé par l'équipe de S. Chu aux USA [34], qui a pu localiser un objet fluorescent avec une résolution spatiale de 0,3 nm. Cette équipe a réalisé des acquisitions de 500 ms sur une molécule unique de Cy5, et ont collecté $1,7 \cdot 10^5$ photons à chaque image.

II.2.2.2 Approche d'Ober

En 2004, Ober et al ont développé une méthode théorique de localisation qui traite la PSF comme une fonction d'Airy (au lieu d'une gaussienne) et utilise un estimateur statistique de Fisher pour évaluer la position la plus vraisemblable d'un objet [35]. Cette stratégie semble être mieux adaptée lorsque le régime de collection des photons suit une distribution de Poisson. Ils ont montré que la limite de précision de localisation est donnée par

$$\langle(\Delta x^2)\rangle = \lambda_{em}/(2\pi NA\sqrt{\gamma At}) \quad (3)$$

où λ_{em} désigne la longueur d'onde d'émission de la molécule, NA l'ouverture numérique de l'objectif, γ l'efficacité du système optique, A le taux d'émission de la molécule unique et t le temps d'acquisition. Cette équation nous montre, une fois encore, qu'une précision maximale de mesure ne peut être obtenue que pour des temps d'acquisition longs. Elle permet aussi d'identifier l'ouverture numérique de l'objectif et l'efficacité du système optique comme des paramètres cruciaux pour l'optimisation du système.

Voyons maintenant pas à pas les différents éléments du montage ainsi que les améliorations apportées pour optimiser la précision de pointé en imagerie d'objets fluorescents individuels.

II.2.3 Éléments d'optimisation

II.2.3.1 Source de lumière.

Un éclairage performant à base de diodes lasers (LED, LUMENCOR) a été choisit pour l'éclairage. Grâce à un système commandé par ordinateur, il est possible de piloter l'intensité de 8 voies de longueurs d'onde distinctes. Cette solution est intéressante par rapport à une lampe à mercure car elle permet d'obtenir une lumière d'excitation de puissance paramétrable par ordinateur. En outre, la possibilité de piloter la source avec l'ordinateur permet de configurer facilement des durées d'expositions de façon à se passer d'obturateur mécanique, dont la vitesse de bascule est lente (~100 ms selon notre expérience) et qui génère des vibrations.

La source contient des filtres placés devant les diodes, ce qui permet de se passer de filtre d'excitation et de faciliter l'obtention de films en deux couleurs en modulant simplement la source LED et avec une dichroïque à double longueur d'onde. Toutefois, dans notre expérience personnelle, nous n'avons pas réussi à obtenir de bons signaux de fluorescence avec un système sans roue à filtre, car les fuites optiques entre les différents composants rendaient le bruit de fond trop important.

II.2.3.2 Filtres

Nous avons constaté que le choix des filtres est déterminant pour améliorer l'efficacité du système optique. Dans notre cas, nous avons utilisé essentiellement l'EGFP et dans une moindre mesure la RFP. La GFP présente un pic d'excitation théorique à 490 nm et d'émission à 510 nm. Dans la levure, l'absorbance est décalée vers 470-480 nm (O.gadal et données personnelles), nous avons choisi un filtre d'excitation dont le pic est à 470 nm avec une bande de 40 nm et un filtre d'émission avec un pic à 525 nm et une bande de 25 nm. Le dichroïque a une valeur de transition de 495 nm. Ce cube est le set 38 HE de chez ZEISS.

II.2.3.3 Ouverture numérique et grossissement

L'efficacité de la collecte de photons par l'objectif est reliée à son ouverture numérique NA et à son grossissement selon la formule : $E \propto NA^4/M^2$. Ainsi les lentilles de hautes NA sont préférables du fait de l'évolution en puissance 4 de la luminance. Cette amélioration du NA agit sur le paramètre N de l'équation de Thompson (Eq.(2)) et sur le paramètre NA de l'équation d'Ober (Eq. (3)) ce qui entraîne dans les deux cas une diminution de l'erreur de localisation. Nous avons utilisé un objectif 100x avec une ouverture numérique de 1,4. L'ajout d'une lentille de grossissement variable de 1, 1.25, 1.6 ou 2 devant la caméra a également été testé. L'ajout de cette lentille se traduit par une réduction du nombre de photons arrivant sur le détecteur, mais permet d'accélérer les cadences d'acquisition via l'utilisation du système de binning avec la caméra, que nous proposons de décrire dans la suite.

II.2.3.4 Camera

II.2.3.4.1 Capteur EMCCD

La technologie choisie pour notre caméra est la technologie EMCCD. Du fait de l'intégration d'un registre de multiplication analogique dans le capteur, les caméras EMCCD sont une des meilleures solutions pour réaliser une détection rapide avec de faibles flux lumineux. Les caméras EMCCD sont constituées d'une matrice de capteurs (Figure 12), eux mêmes formés par une photodiode qui sert de capteur de lumière et par un registre de lecture. La photodiode permet de convertir les photons incidents en photoélectrons piégés dans un puits de potentiel. A la fin de l'exposition, les photoélectrons accumulés dans les pixels sont transmis de manière séquentielle dans le registre de lecture. Une étape de gain permet de multiplier le signal sans ajouter de bruit supplémentaire. Cette dernière étape est lente car les données sont transmises séquentiellement lignes par lignes, ce temps de lecture incompressible constitue la principale limitation des caméras EMCCD.

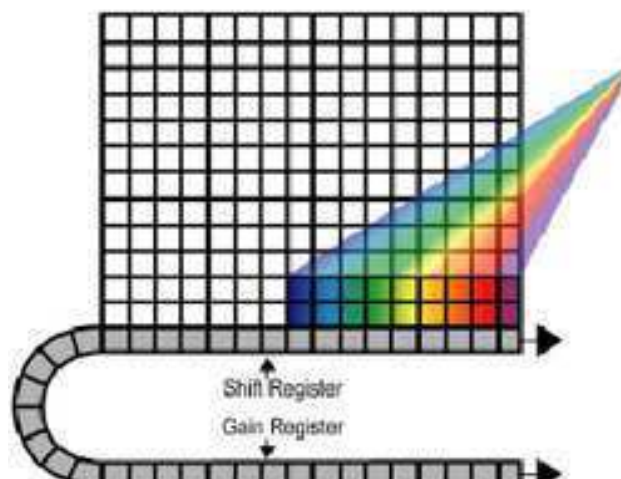


Figure 12: Illustration d'un capteur EMCCD avec son registre de transfert et son registre de gain. Il est possible de faire du Cropped sensor mode avec ce capteur en utilisant une portion du capteur et en couvrant le reste. Cette méthode permet d'accélérer le temps de lecture en ne lisant qu'une partie du capteur mais elle réduit le champ de la caméra

Nous avons utilisé un modèle Andor « Du 885 » refroidi à une température de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec un capteur de $1024*1024$ pixels. Cette caméra a une efficacité quantique, c'est-à-dire la probabilité de détecter un photon d'une longueur d'onde donnée, de 65 % et la taille de pixel est de $8*8\text{ }\mu\text{m}^2$.

L'utilisation de technique pour accélérer le temps de lecture (cropped mode), où l'utilisation d'une caméra CMOS nouvelle génération ont été testées et ont permis de réaliser des films avec un temps d'acquisition de 1 ms, mais les images obtenues présentent un rapport signal sur bruit médiocre et sont difficilement exploitables. En outre, dans notre domaine d'application, à savoir les mouvements de chromosomes dans la levure, une vitesse d'acquisition de moins de 20 ms nous est apparue peu utile, car l'amplitude des mouvements est faible et la description des mouvements nécessite donc une bonne précision de pointé, qui n'est pas accessible (figure 13). La plupart de nos travaux sont donc réalisés avec des cadences d'acquisition minimale de 20-50 ms, selon la qualité des souches de levures et des cultures.

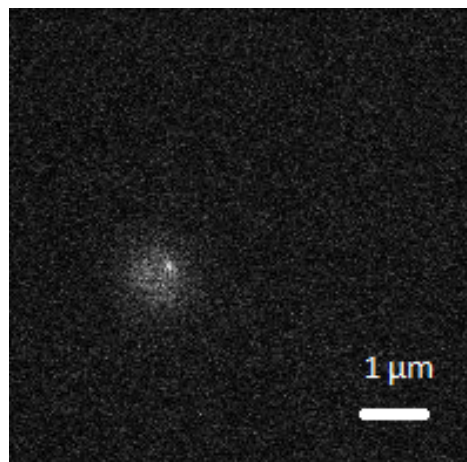


Figure 13: Image de levure obtenue avec un temps d'acquisition de 15 ms et un rapport signal sur bruit de 18 dB (obtenue par cropped mode)

II.2.3.4.2 Binning

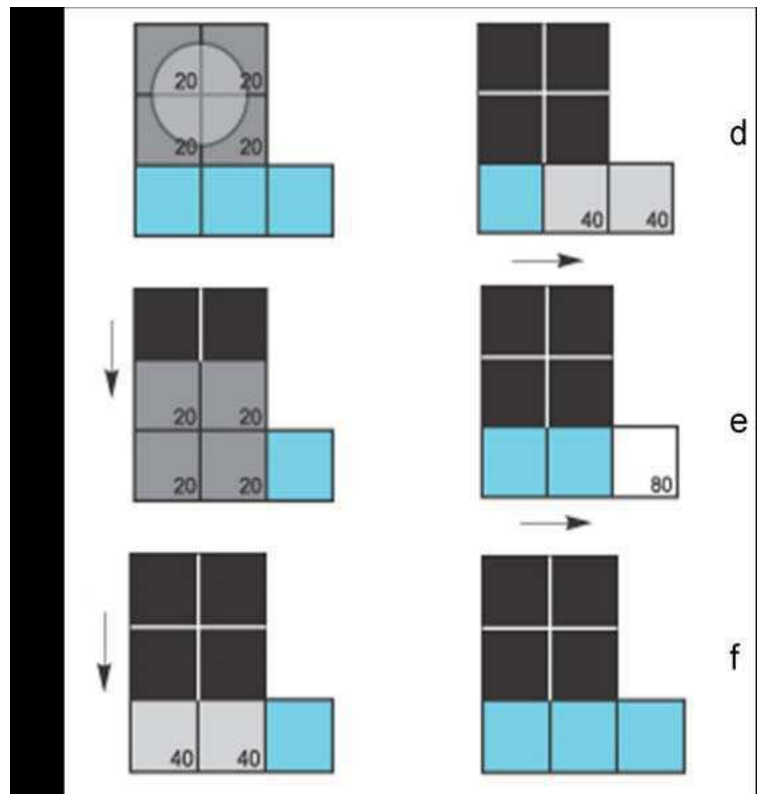


Figure 14: Schéma de principe du « Binning » 2x2, a) suite à une exposition de quatre pixels du CCD à la lumière il y a une création de 20 électrons dans chacun des quatre pixels. b) un transfert vertical vers le bas des charges vers le registre de lecture. c) un nouveau transfert des charges vers le bas d'où les 40 électrons. d) un transfert horizontal des 40 électrons du registre en série vers l'amplificateur de lecture. e) un nouveau transfert horizontal vers l'amplificateur de lecture des 40 électrons restants pour en avoir 80 électrons, la sommation des 4 pixels de 20 électrons. f) ensuite, cette charge est transférée du registre de série vers l'amplificateur de sortie où il est converti en une tension avant d'être numérisé.

Le binning est un processus de fusion des charges collectés par des pixels adjacents dans un capteur CCD en cours de lecture (figure 14). Ce processus est effectué avant l'étape d'amplification et de numérisation du signal. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet d'accélérer considérablement le temps d'acquisition puisque le transfert des photo-électrons est plus court, mais la résolution spatiale est réduite. Dans le cas d'un binning 2*2, la zone de quatre pixels adjacents est combinée en un seul pixel ($16*16 \mu\text{m}^2$) et la vitesse de lecture est deux fois plus rapide. En outre, le binning permet aussi d'améliorer le rapport signal sur bruit si la nouvelle taille du pixel est cohérente avec la taille de l'objet à imager.

II.2.3.5 Taille du pixel

Dans l'équation de Thompson (EQ.(2)), « a » représente la taille effective d'un pixel qui signifie la taille du pixel de la caméra CCD divisée par le grossissement. Un changement du grossissement affecte donc la taille du pixel. Dans l'article de J. Enderlein, E. Ropark et P. Selvin [36], les auteurs ont comparé plusieurs tailles des pixels et ont trouvé qu'une taille inférieure à 100 nm est requise pour une bonne précision. Dans notre cas, nous avons utilisé essentiellement 2 modes d'acquisition, à savoir le capteur complet caractérisé par un pixel de 80,5 nm ou bien un binning « 2*2 » qui augmente la taille du pixel à 162,6 nm. Grâce à la lentille de grossissement intermédiaire réglée à 2X, la taille de pixel effectif est 81,3 nm, qui est en concordance avec l'article précédent.

II.2.4 Détermination de conditions de suivi de particules optimales

Nous avons vu précédemment que les paramètres affectant la qualité des images sont nombreux : temps d'acquisition, conditions d'éclairage, binning, lentille de grossissement.

Nous avons donc voulu estimer de manière quantitative les conditions dans lesquelles notre méthode de suivi de particules était la plus performante en termes de précision de pointé et de vitesse d'acquisition. Une variable essentielle pour cette étude est le rapport signal sur bruit (SNR), qui est défini de la manière suivante : $SNR = (I_{max} - I_N) / \delta_{bruit}$ soit $SNR = (I_{max} - I_N) / \sqrt{I_{max}}$ dans le cas d'une hypothèse d'un bruit de poisson (Figure 15). C'est cette dernière définition qui sera utilisée tout au long de ce manuscrit.

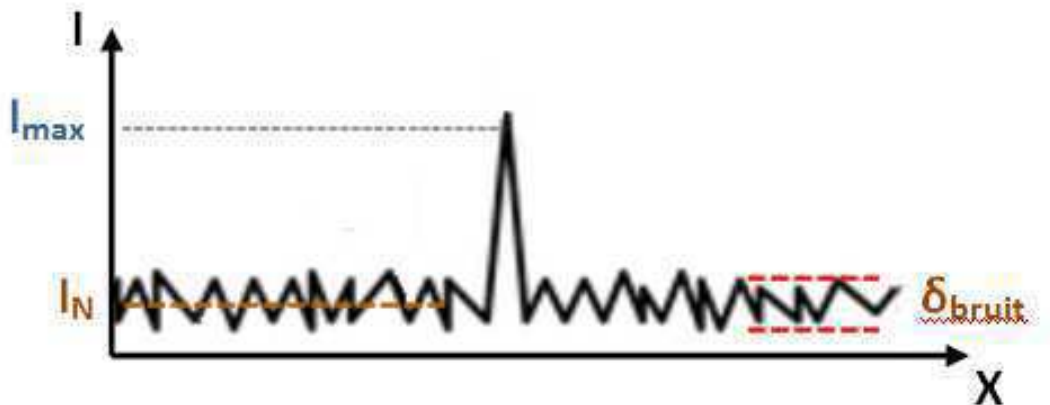


Figure 15: Illustration de la mesure du rapport Signal sur bruit ($SNR = (I_{max} - I_N) / \delta_{bruit}$)

Notons que dans les conditions expérimentales d'imagerie de cellules, le locus marqué dans les noyaux de levure est caractérisé par un SNR compris entre 20 et 90 dB (nous reviendrons plus tard sur ce point) (figure 16).

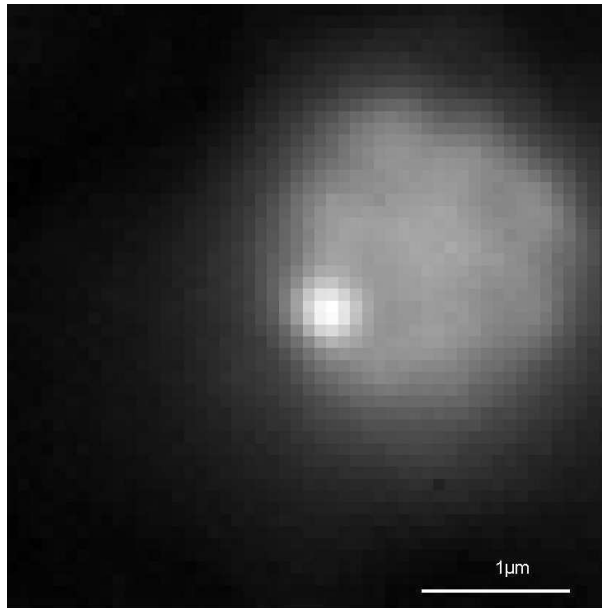


Figure 16: Exemple d'image obtenue par le microscope pour un temps d'acquisition de 200 ms, sans binning ni zoom (SNR = 45 dB)

II.2.4.1 Simulation des images.

Pour mesurer précisément l'erreur de pointé dans nos conditions d'imagerie, nous avons choisi de réaliser un banc de simulation de particules caractérisées par un signal ajustable et dans une image avec un bruit de fond lui aussi contrôlé. La simulation nous est apparue plus pertinente que les films réels car les simulations permettent d'ajuster finement les paramètres de taille de la particule et de rapport signal sur bruit, de s'affranchir des micro-mouvements du microscope et de générer un grand nombre d'images pour obtenir une mesure fiable statistiquement parlant.

Notre banc de simulation permet de générer des films avec une particule fixe au centre de l'image que l'on représente avec une gaussienne de largeur et d'amplitude déterminée. La largeur de la gaussienne est déterminée pour correspondre aux images réelles. Un bruit de Poisson est ensuite ajouté afin de reproduire des images réelles,

caractérisées par un rapport signal sur bruit. Il est également possible d'ajouter l'effet d'un binning et d'une lentille de grossissement pour coller au plus près à nos conditions expérimentales. Les différentes simulations sont ensuite envoyées vers un logiciel de suivi de trajectoires afin de déterminer la position du point et de mesurer ainsi une erreur de positionnement statique (biais de mesure) et une erreur quadratique moyenne. Notez que nous avons étalonné nos simulations à partir de films réels sur des nanoparticules fluorescentes encapsulées dans des gels physiques (en poly-acrylamide) afin de figer les mouvements. Ces films ont permis d'estimer les dimensions de gaussiennes et les effets de binning et de grossissement.

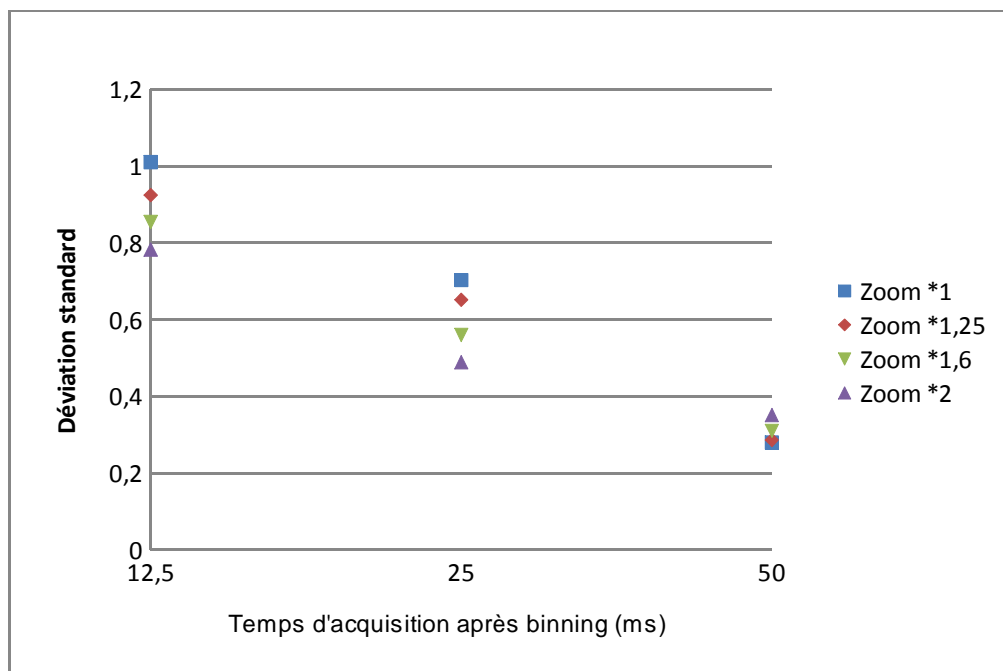


Figure 17: Courbe de la déviation standard en fonction du temps d'acquisition (binning) pour des zooms différents. La courbe montre une meilleure précision pour des images avec zoom*2 et binning *2 pour des temps d'acquisition court et une meilleure précision sans zoom ni binning pour des temps longs

Le résultat des simulations montre que l'ajout d'un binning *2 et d'une lentille de grossissement par 2 permet de minimiser l'erreur de positionnement pour des cadences d'acquisition importantes (Figure 17). Cependant, l'ajout d'un grossissement supplémentaire

réduit le champ de la caméra par deux, réduisant ainsi le nombre de cellules pouvant être imagées simultanément. Dans un souci d'efficacité, j'ai souvent choisi de travailler sans binning ni lentille de grossissement afin de maximiser le nombre de cellules sur le champ de la caméra et d'obtenir ainsi des statistiques robustes.

Pour valider le résultats de nos simulations, nous avons voulu détecter des mouvements nanométriques avec les conditions d'imagerie optimales. Pour cela nous avons mesuré les déplacement de billes de 200nm de diamètre fixées mises en mouvement par une platine de nano positionnement.

II.2.4.2 Validation des conditions de suivi avec des nanoparticules fluorescentes

L'objectif de cette expérience est de mettre en mouvement des billes fluorescentes et de comparer les mouvements mesurés grâce à la caméra à la consigne de déplacement donné à la platine de nano-positionnement (Figure 18). L'expérience est ensuite renouvelée pour différentes conditions d'imagerie afin de déterminer la précision des mesures.

Un programme de contrôle-commande de la platine de nano-positionnement a été développé en Labview pour permettre de déclencher des mouvements calibrés suivant l'axe x. Ces mouvements se composent de pas de taille croissante, suivi d'une pause permettant de mesurer sur plusieurs images la position des billes.

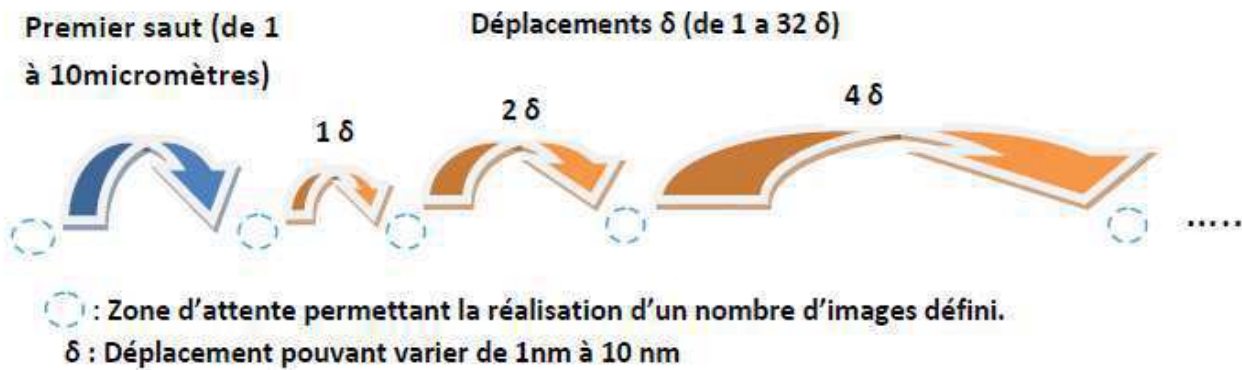


Figure 18: Séquences de déplacement de la platine de nano-positionnement

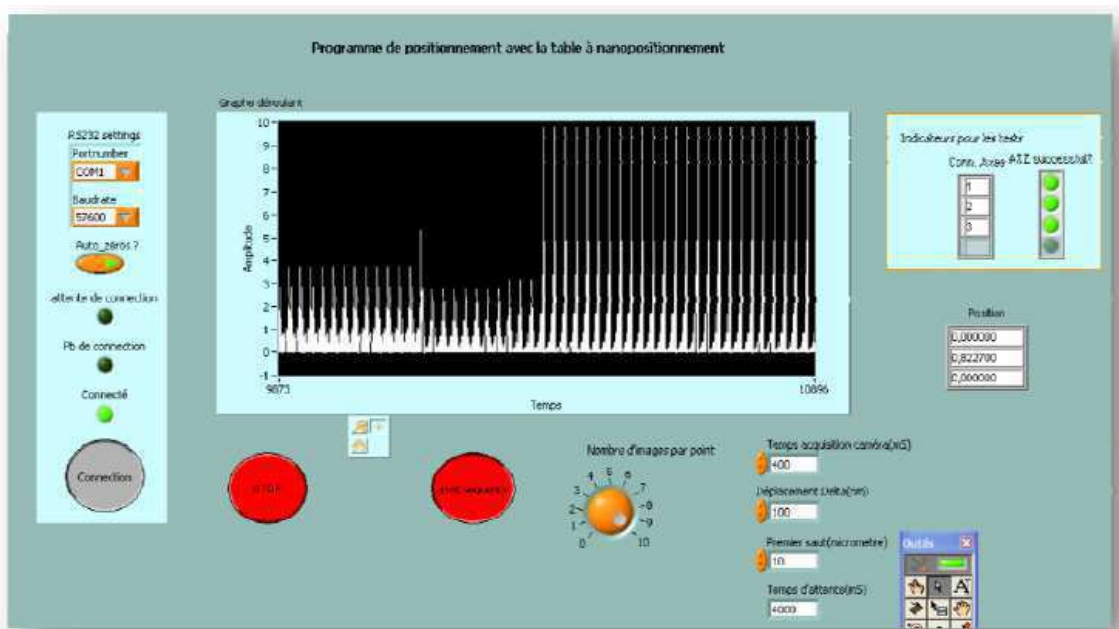


Figure 19: Interface homme machine du programme de nano positionnement développé avec Labview. Ce programme permet de faire varier les différents paramètres des mouvements des billes en concordance avec les réglages de la caméra EMCCD.

Une fois les billes mises en mouvement, un film est réalisé au moyen de la caméra EMCCD. Ces films sont ensuite analysés pour déterminer la précision théorique en fonction du rapport signal sur bruit ainsi que l'erreur sur la taille des pas de déplacement.

Les résultats de mesure des caractéristiques des films réels sont cohérents avec les simulations à savoir un meilleur rapport signal sur bruit et donc une meilleure précision pour

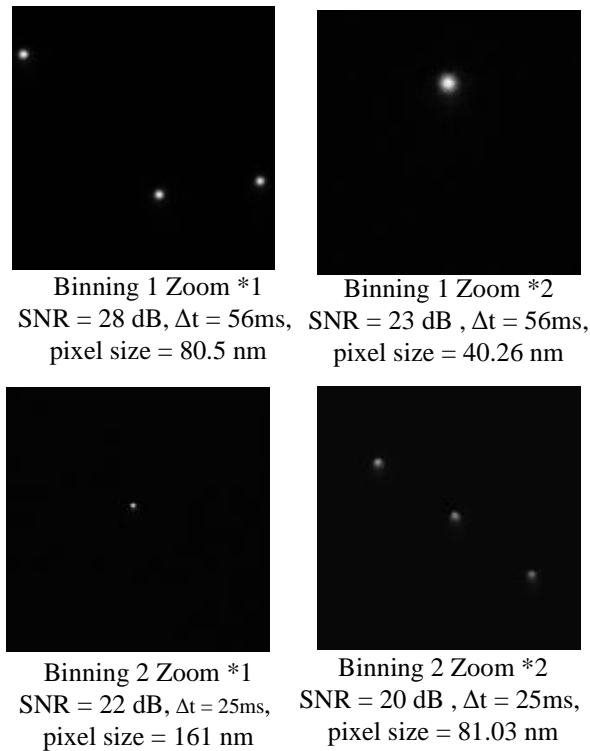


Figure 20: Exemples de films de micro-billes en faisant varier les paramètres de binning et de zoom optique

les films sans zoom ni binning. Le suivi des billes pour calculer la précision de pointé est difficilement exploitable du fait de l'incertitude de positionnement et du temps de stabilisation de la platine de nano-positionnement. Les données montrent quand même une précision de suivi suffisante pour mesurer les faibles déplacements (< 10 nm) dans le cas de SNR élevé (> 25 dB).

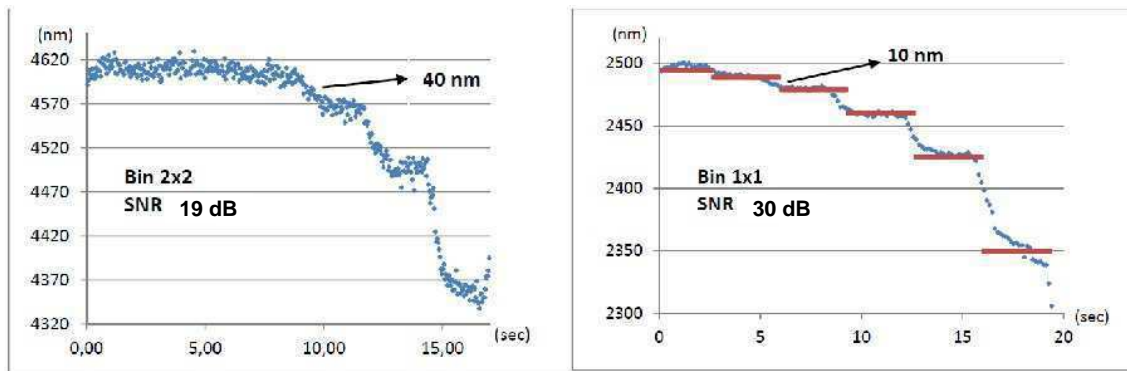


Figure 21: Résultats du suivi des micro-billes pour deux conditions d'imagerie différentes. La courbe de gauche montre une faible précision de suivi pour un film avec un SNR faible et un binning 2*2 (les pas de taille inférieure à 40 nm ne sont pas visibles). La courbe de droite montre une bonne précision pour un SNR fort et sans binning (les pas de 10 nm sont parfaitement discernables)

II.3 Méthodes de suivi de particules en 3D

II.3.1 Description des méthodes et évaluations des performances

Une cellule est un objet tri-dimensionnel généralement observé avec un microscope optique de fluorescence, qui fournit des images projetées dans un plan focal d'observation. Aussi, de nombreuses évolutions ont été apportées au microscope optique « conventionnel » afin d'obtenir des informations en 3D dans les cellules. Nous proposons de présenter quelques développements méthodologiques récents et plus anciens, ce qui nous permet d'introduire nos réalisations dans ce domaine de recherche et de comparer leurs performances.

II.3.1.1 La microscopie confocale

Le microscope confocal a été inventé pour éliminer la fluorescence émise hors du plan focal d'observation. Cette méthode a été proposée en 1957 par Marvin Minsky, qui imagina de placer un obturateur devant le photodétecteur pour sélectionner la fluorescence dans le plan focal d'observation (Figure 22). En utilisant une lumière d'excitation focalisée dans un point en limite de diffraction, on collecte spécifiquement la fluorescence issue du plan focal d'observation alors que la fluorescence parasite issue des couches supérieures et inférieures est filtrée par le diaphragme. L'image en deux dimensions (X,Y) est réalisée par balayage de l'échantillon, la troisième dimension est obtenue grâce à des coupes successives suivant l'axe Z. Les microscopes confocaux se sont réellement démocratisés dans les années 1980 grâce au progrès réalisés dans l'instrumentation électronique et informatique ainsi que le développement des sources laser.

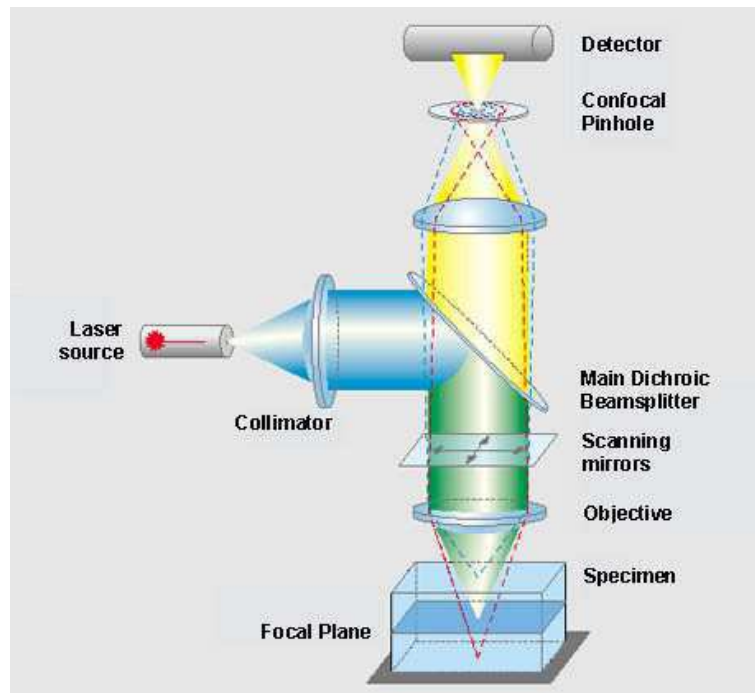


Figure 22: Schéma de principe d'un microscope confocal avec excitation Laser. La lumière émise par les couches hors du plan focal (en pointillé rouge et vert) est éliminée par le diaphragme situé à l'entrée du détecteur.

En termes de signal sur bruit, cette technologie est très performante. Son principal inconvénient tient à la surexposition lumineuse lors d'une acquisition point par point qui induit une dégradation rapide du signal (photoblanchiment) et une dégradation des échantillons biologiques (phototoxicité, échauffement). De plus, la reconstitution d'une image 3D nécessite de réaliser de nombreuses vues à une cadence temporelle lente (1s dans le meilleur des cas chez la levure après optimisation [37] [38] [39]). Cette méthode permet difficilement d'obtenir des informations de dynamiques rapides en 3D.

II.3.1.2 Microscopie astigmatique contrôlée

Cette technique repose sur l'ajout d'une lentille cylindrique dans le chemin optique d'émission d'un microscope à champ large. Cette lentille introduit un astigmatisme anisotrope, ce qui se traduit par une déformation de l'objet très dépendante de sa position par rapport au plan focal d'observation [40] (figure 23). L'information 3D est ensuite reconstruite grâce à une grille d'étalonnage préalablement établie par analyse de l'image.

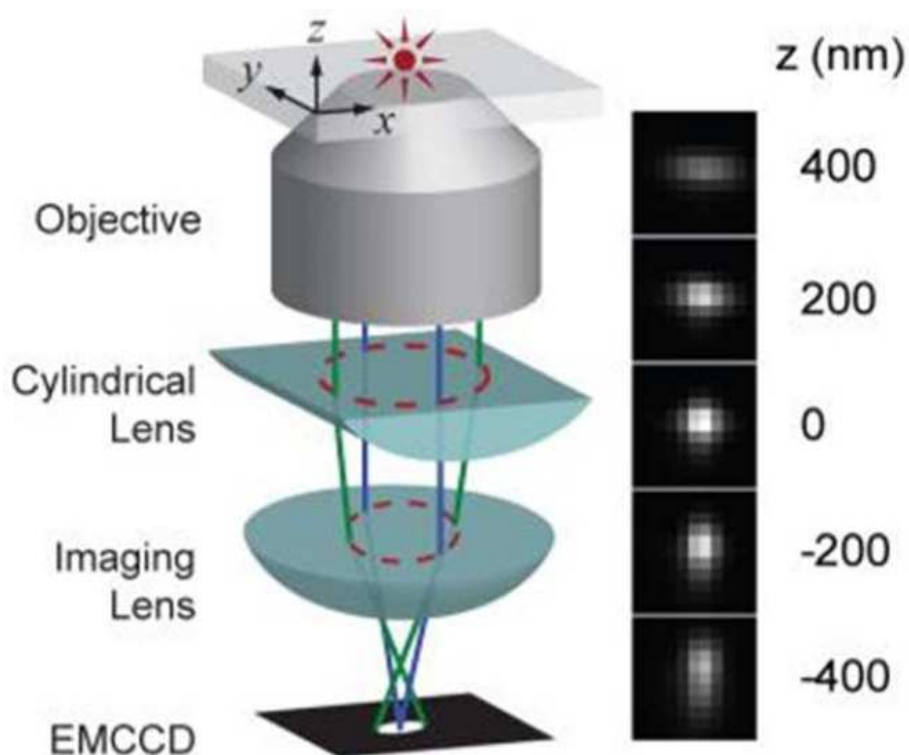


Figure 23: Schéma optique de la microscopie astigmatique (issu de [40]). L'ajout d'une lentille cylindrique dans le chemin d'optique d'émission induit une distorsion de l'image directement liée à la position de l'objet par rapport au plan focal d'observation.

Cette technique est très élégante car elle permet d'obtenir l'information 3D sur une seule image réduisant ainsi considérablement la quantité de lumière reçue par l'échantillon ainsi que les cadences d'acquisition. Son principal inconvénient est sa faible profondeur de

champ d'environ 600 nm pour un objectif à fort grossissement 100x [40].

II.3.1.3 Microscopie multiplans et bifocales :

Le principe de fonctionnement des microscopes multiplans et bifocaux [41] [42] consiste à diviser le faisceau dans le chemin optique d'émission d'un microscope à champ large classique et à introduire une lentille de défocalisation sur l'un des deux trajets optiques de sortie afin d'obtenir de manière simultanée une image focalisée et une image défocalisée [43] [44] (figure 24).

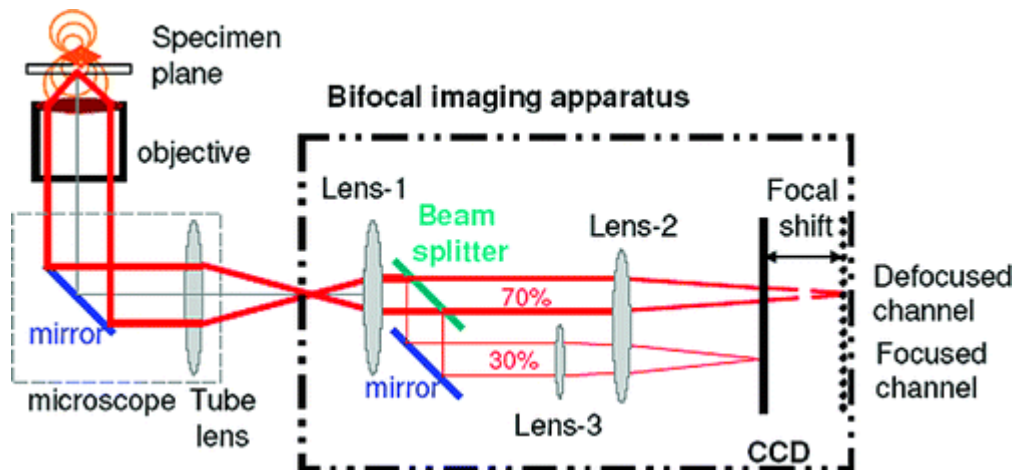


Figure 24: Schéma de principe d'un microscope bifocal

La profondeur de champs atteint 1 à 2,5 μm : on ne peut pas suivre la particule sur des déplacements de grande amplitude. La précision de pointé est nanométrique selon les trois axes de mesures, mais l'erreur de localisation en Z est trois fois supérieure à celle des axes X et Y [44]. Le principe de division du faisceau présente un inconvénient évident puisque le signal est divisé sur deux collecteurs, si bien qu'il est nécessaire de collecter plus de photons pour atteindre une bonne résolution de pointé.

II.3.2 Micro-miroirs

II.3.2.1 Principe

Cette technique de reconstruction 3D est fondée sur la stéréo-vision : la même scène filmée suivant plusieurs points de vue peut être reconstruite en 3 dimensions. Ce principe rappelle les méthodes d'observation en vision humaine : chaque œil envoie au cerveau une image de la scène projetée sur le cristallin, les deux yeux collectent une image légèrement décalée angulairement, ce qui permet à notre cerveau, après apprentissage, de percevoir notre environnement en 3 dimensions.

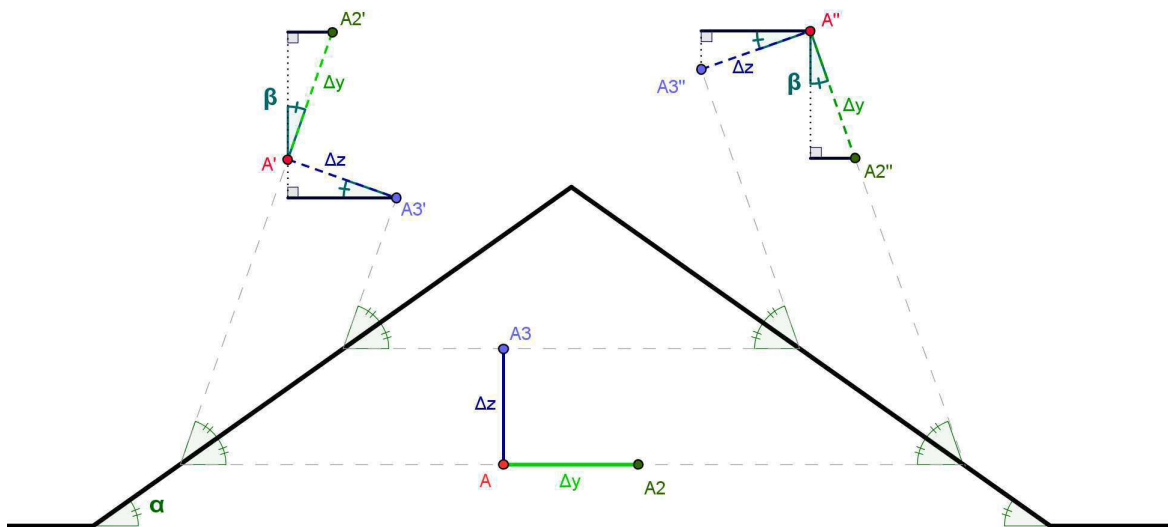


Figure 25: Illustration des micro-miroirs. Les points objet sont A , A_2 , A_3 , et leurs réflexions à travers les miroirs de gauche et de droite sont A' , A_2' , A_3' et A'' , A_2'' , A_3'' , respectivement. On note que l'angle $\beta = \pi/2 - 2\alpha$ permet de déterminer géométriquement la position des réflexions. Dans la pratique, $\alpha = 54^\circ$ ou 35°

Dans le cas des micro-miroirs, les échantillons à imager sont placés sur un laboratoire sur puce composé de deux miroirs qui renvoient vers la caméra deux images réfléchies (vue de coté). Ces deux images réfléchies ainsi que l'image directe de l'échantillon permettent de remonter aux coordonnées du point (Figure 25). Le suivi de trajectoire est effectué par reconstruction géométrique, ce qui ne demande pas de calibrage. En outre, le paramètre critique de la reconstruction 3D est l'angle de gravure du silicium par gravure humide à la potasse. Or, cet angle est contrôlé avec une précision atomique, puisqu'il est déterminé par la cristallographie du silicium. Les incertitudes liées au calibrage sont donc négligeables.

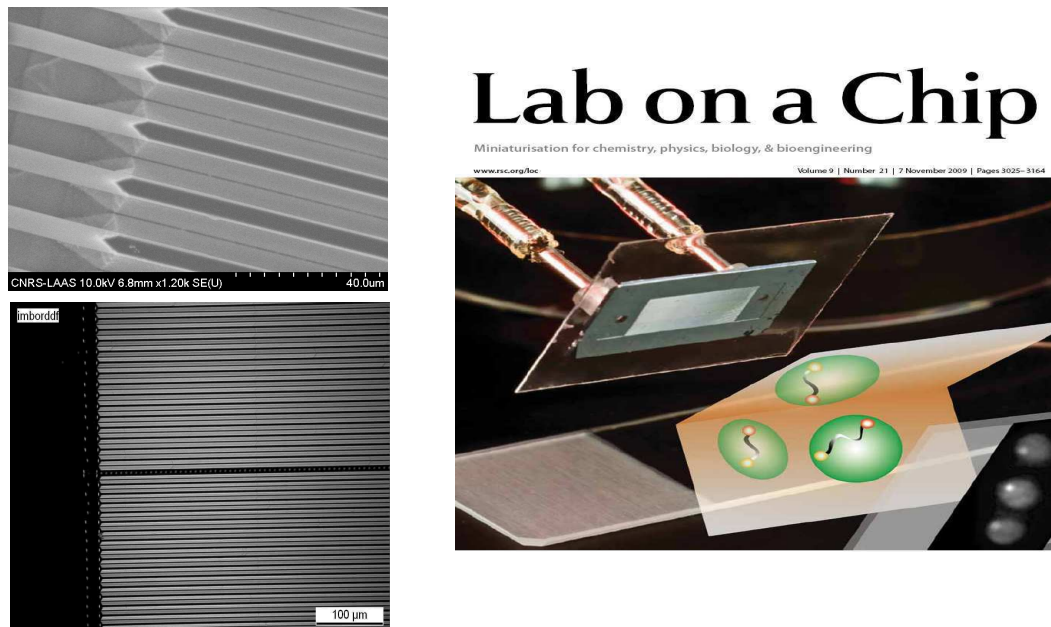


Figure 26: image de microscopie électronique à balayage du laboratoire sur puce et de la connectique micro fluidique intégrée [52]

Les miroirs sont obtenus avec les procédés de la microélectronique, ce qui permet de générer de nombreuses structures sur une seule étape de procédé (Figure 26). En outre, les méthodes d'intégration offrent des solutions efficaces à l'encapsulation en un laboratoire sur puce muni d'entrées-sorties fluidiques.

II.3.2.2 Optimisation

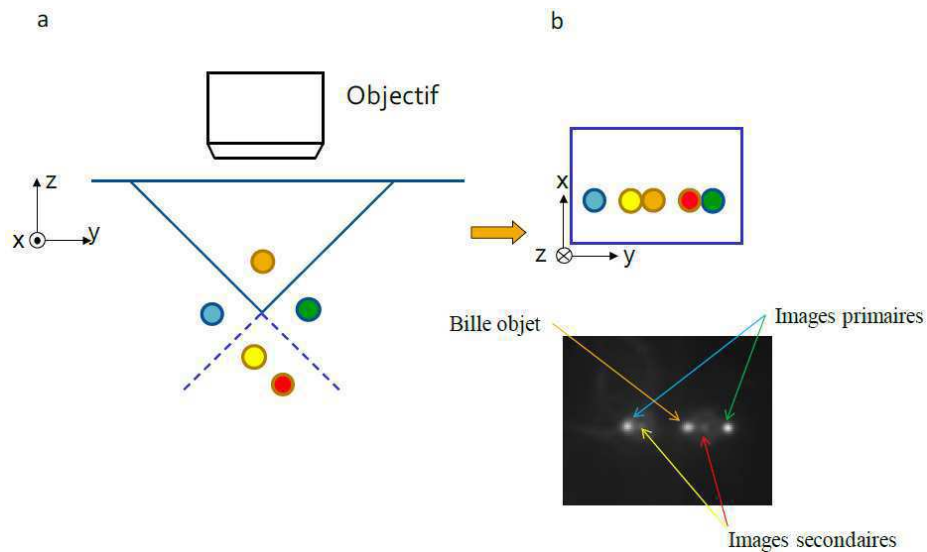


Figure 27: a) Schéma de la double réflexion dans les miroirs en V b) image d'une bille dans les micro-miroirs en V avec visualisation des doubles réflexions

Les miroirs en V sont de puissants outils pour la microscopie en 3D en termes de vitesse d'acquisition. Il existe toutefois une limite intrinsèque à cette technologie qui est liée au fait d'avoir deux miroirs placés en vis-à-vis. En effet un ensemble de réflexions apparaissent à partir d'un même objet, nous nous sommes jusqu'à présent limités aux réflexions primaires (points jaune et vert dans la Figure 27). Or, les images primaires peuvent à leur tour se réfléchir sur les miroirs pour former des réflexions secondaires (points rouge et jaune clair). En suivant des billes fluorescentes, nous avons détecté la présence de ces images réfléchies secondaires qui gênent l'observation des images réfléchies et diminuent la résolution [45].

Nous avons donc souhaité optimiser les performances de notre système d'imagerie, en réalisant des miroirs à 1 facette, dont le protocole de fabrication est décrit dans la thèse d'Houssam Hajjoul [45]. Dans ce travail ma contribution a été d'utiliser mon banc optique permettant de prédire la précision de pointé en fonction du SNR et ainsi de comparer de manière quantitative les technologies à 1 et 2 facettes.

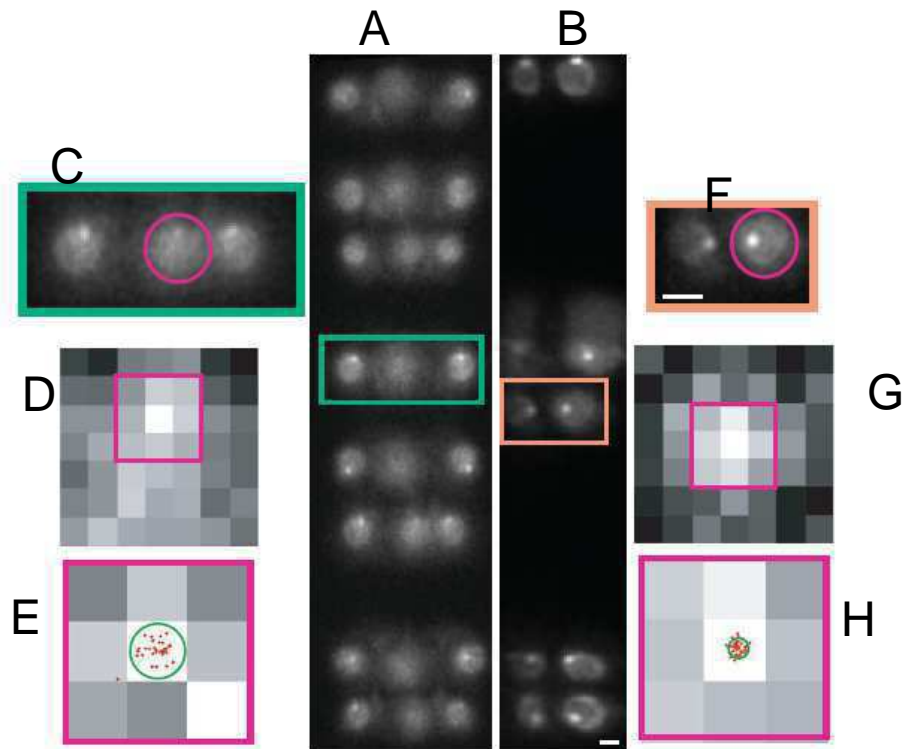


Figure 28: Image de levures avec les dispositifs à 1 (B) et deux facettes (A), (C et F) : zoom sur une cellule type pour déterminer les caractéristiques du point en vue de la mesure de l'erreur, (D et G) : images générés par le programme de simulation à partir des paramètres des images expérimentales, (E et H) superposition de l'image généré avec les positions du point calculés à partir d'une simulation. La répartition des positions mesurées donne une idée de la différence de précision de pointé. Le cercle vert contient 90% des points

L'analyse des images à montré un meilleur rapport signal sur bruit pour les miroirs à une facette (Figure 28). Or un seul miroir suffit à accéder l'information 3D, puisque la stéréovision utilise par définition deux vues d'une même scène. Du fait du design de

conception des miroirs à 1 facette, nous n'avons pas de réflexion secondaire possible, ce qui garantit un rapport signal sur bruit bien meilleur et donc une diminution sensible de l'erreur de positionnement. De plus, l'objet est exposé à la lumière réfléchiée par un seul miroir, le taux de photo-blanchiment est réduit passant de 4 fois plus que sans les miroirs à seulement 2 fois.

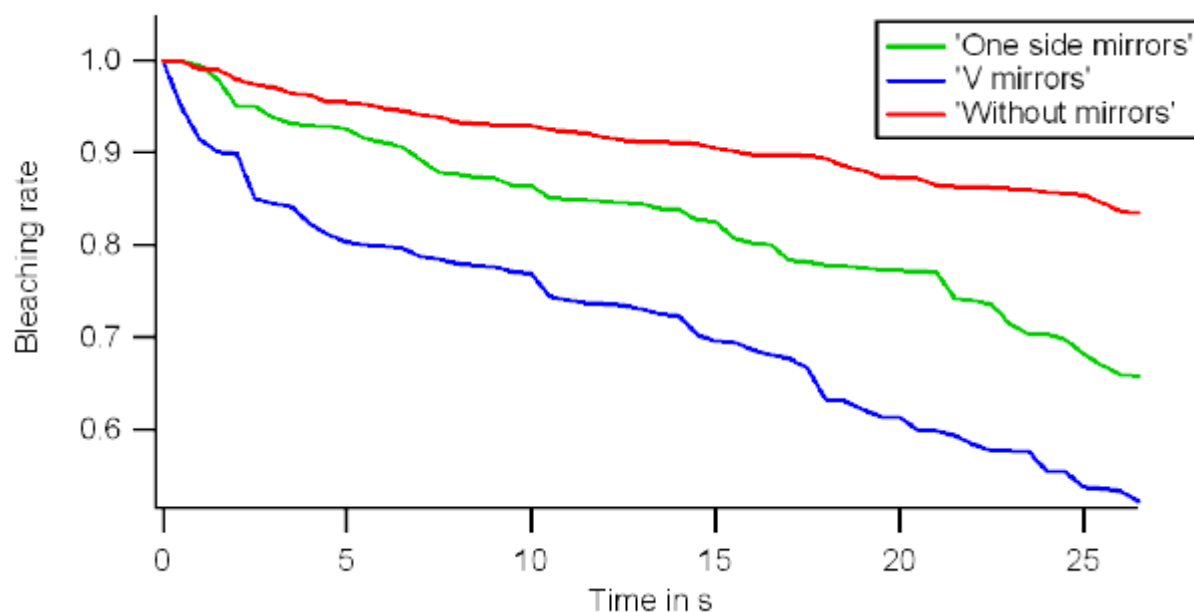


Figure 29: le graphe en rouge est le photoblanchiment d'une cellule de levure sans l'utilisation des miroirs, on voit l'effet de la lumière réfléchissante sur l'augmentation du taux de photoplachiment qui est de 2.1.

On note une nette augmentation du taux de photoblanchiment en utilisant les miroirs à 1 facette par rapport à ceux à une facette. Au final la solution à une seule facette a été préférée car elle permet de réduire le photo-blanchiment et d'améliorer le rapport signal sur bruit de l'image (Figure 29).

II.3.2.3 Performances

Technique	Performances temporelles	Limites	Profondeur de champ
OMX	100 ms Carlton2010	Acquisitions séquentielles	-
Confocal	1 sec Heun 2001	Acquisitions séquentielles	-
Spining Disk	1 sec Cabal 2006	Perte en signal de fluorescence	-
Astigmatisme	40-50 ms Henriques 2010	Calibration	~2 μm
Bifocale	50 ms Toprak 2007	Calibration 2 images	~2 μm
Micro-mirrors	20 ms <i>Hajjoul 2009</i>	Photoblanchiment	2 -10 μm en fonction de NA

Nous avons synthétisé les caractéristiques des différentes technologies d'imagerie 3D dans un tableau. La technique des micro-miroirs développée au sein de notre laboratoire permet d'atteindre parmi les meilleures performances dans le cadre de l'imagerie des levures : les vitesses d'acquisition en 3D atteignent 10 à 20 ms avec une erreur de positionnement faible (~27 nm). Toutefois, il nous semble que la comparaison des méthodes d'imagerie 3D, qui reste à mener dans la littérature, pencherait plutôt en faveur du système astigmatique. Sa mise en œuvre, qui nécessite seulement d'ajouter une lentille dans le trajet optique du microscope, est en outre particulièrement simple.

II.3.3 Intérêt de l'information 3D

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis consacré à l'étude de la dynamique spatio-temporelle des chromosomes par suivi des mouvements de segments de chromatine marqués en fluorescence. Dans cette communauté, les mouvements sont étudiés avec des techniques de microscopie 2D ou 3D, il n'est pas clair si l'information dans la troisième dimension est essentielle ou non à l'analyse des données. Dans le cas d'un mouvement isotrope, la mesure du déplacement quadratique moyen est proportionnelle au coefficient de diffusion suivant un préfacteur numérique dépendant de la dimension, à savoir : $MSD = 4Dt$ en 2D et $MSD = 6Dt$ en 3D.

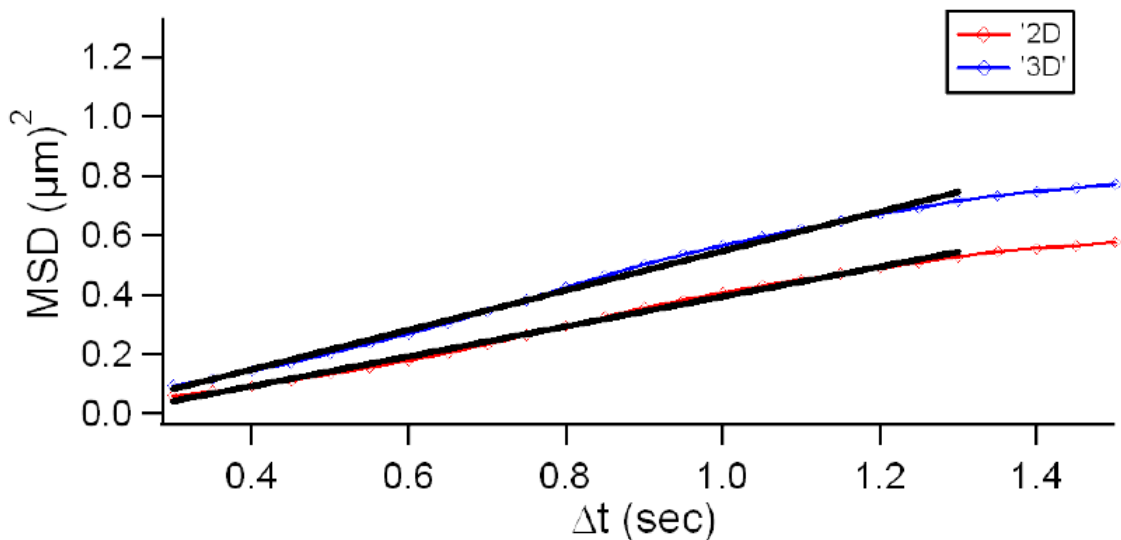


Figure 30: Comparaison du déplacement quadratique moyen (MSD) pour une bille fluorescente de 1 μm en 2D (rouge) et en 3D (bleu). Les coefficients de diffusion sont de 0,46 μm²/s et 0,68 μm²/s respectivement.

A titre, d'exemple, nous nous sommes amusés à suivre le mouvement d'une particule fluorescente de 1 μm de diamètre avec notre dispositif à micro-miroirs pour obtenir une information 2D et 3D selon que l'on considère ou non les images réfléchies. L'analyse du déplacement quadratique moyen montre une croissance linéaire augmentée par un facteur 1,45 pour un déplacement 3D, un rapport très proche du comportement théorique (Figure

30).

De fait quelle que soit la technique de microscopie 3D, des composants optiques (lentilles ou miroirs) doivent être ajoutés au schéma optique, ce qui se traduit nécessairement par une perte de lumière et donc à une baisse de la précision de pointé en suivi de particules. Ainsi, partant du constat que l'information 3D n'est pas nécessaire pour obtenir des informations de dynamique fiables, nous avons opté pour un dispositif optique minimal pour atteindre des cadences d'acquisition et des précisions de pointé maximales.

III.Méthode haut débit de suivi de particules

Au delà des différentes méthodes d'imagerie d'objets fluorescents en 2D ou 3D, nous avons constaté qu'un verrou technique pour l'étude du mouvement des chromosomes est le débit des outils d'analyse d'images. En effet, la plupart des études scientifiques sont menées à partir d'un nombre de cellules limité, ce qui ne simplifie pas l'analyse quantitative de trajectoires. Aussi, nous avons fait l'effort de développer un algorithme spécifique de suivi à haut débit de trajectoires de segments de chromosome dans la levure.

Dans la suite de ce chapitre, je vais présenter le programme de suivi de particule MTT (Multiple Target Tracking) dont je me suis servi dans mon travail. L'algorithme MTT est fondé sur un fit gaussien des objets dans un champ optique, il a été mis au point par l'équipe de Marseille Luminy en interaction avec l'institut Fresnel [46]. Nous décrivons ensuite les modifications et les nouvelles fonctionnalités apportées au programme pour l'adapter au suivi de trajectoires dans la levure. Enfin je présenterai les résultats obtenus sur pour l'étude des mouvements chromosomiques.

III.1 Comparaison d'algorithmes de suivi

Il existe de nombreuses méthodes de suivi de particules décrites dans la littérature [47]. Le choix d'une méthode de suivi est primordial et dépend fortement des contraintes de la plateforme de microscopie. Les algorithmes de suivi de particule vont permettre de mesurer la position des points sur les films, mais introduisent une erreur de mesure qui dépend de la taille de l'objet ainsi que du rapport signal sur bruit des images (Figure 31). On constate que les différentes méthodes donnent des résultats proches pour des rapport signal sur bruit forts (>20).

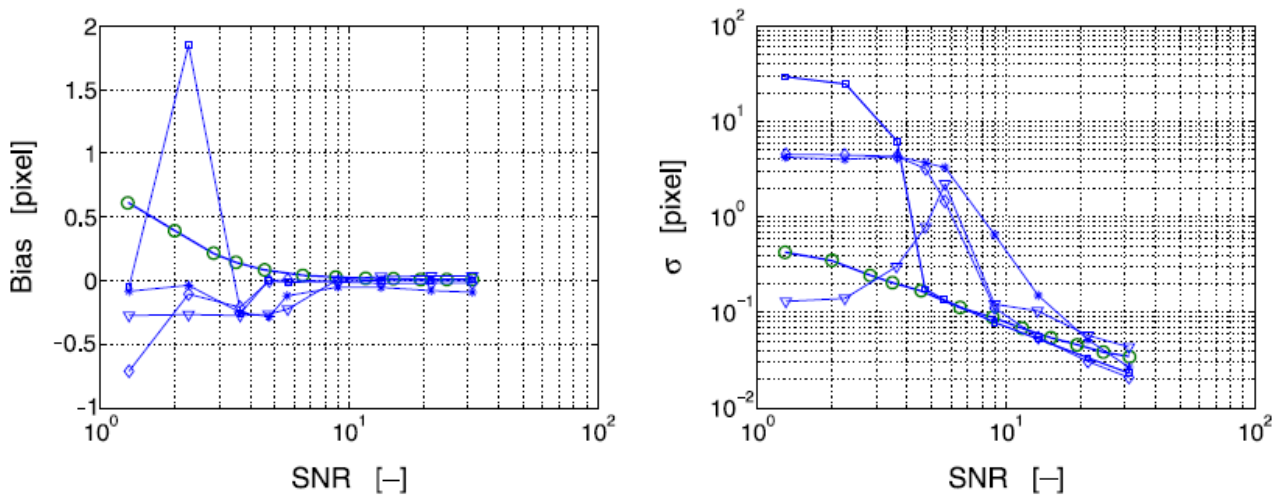
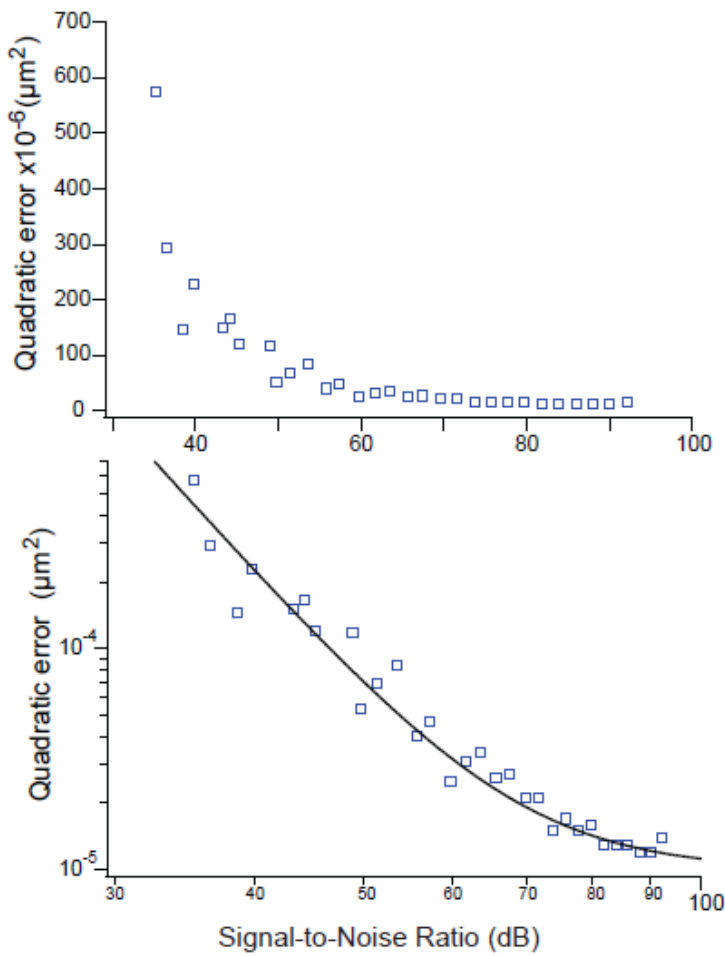


Figure 31: Courbes du biais de mesure (gauche) et de la déviation standard (droite) en fonction du SNR. Chaque point est une moyenne sur 1000 mesures indépendantes. L'algorithme de centre de masse filtré (cercles vert) est comparé aux algorithmes de fit gaussien (carré), centroïde (triangles), somme des différences absolues (étoiles), et cross corrélation (carreau). Tiré de [48]

Afin de déterminer quelle méthode est la plus précise dans nos conditions expérimentales, j'ai tiré partie du banc de simulation que j'ai présenté dans la partie II.2.4.1. J'ai ensuite cherché à comparer les erreurs de positions avec deux algorithmes de suivi, l'algorithme MTT [46] et une algorithme de centre de masse (plugin ImageJ : particule tracker [48]) en simulant des particules avec des SNR et des caractéristiques spatiales

cohérentes avec nos conditions expérimentales.



Position	SNR (dB) fast	SNR (dB) slow
-136	32	57
-80	61	73
-30	65	71
0	40	62
90	39	61
170	51	50
rDNA1	84	81
rDNA2	82	79
rDNA3	87	82
680	33	53

Figure 32: Récapitulatif des conditions d'imageries (partie V) mesurées sur des films de levure et erreur quadratique de positionnement associés les indications fast et slow correspondent à des cadences d'acquisition de 50 et 200 ms.

Après avoir déterminé la gamme de rapport signal sur bruit attendues avec notre système d'observation des levures qui est comprise entre SNR= 30-90 dB, nous avons généré des films en faisant varier le rapport signal sur bruit d'un point fixe au centre de l'image. Nous avons déterminé l'erreur de positionnement (biais de mesure), ainsi que l'erreur quadratique moyenne de la mesure en suivi de particules (figure 32). Les résultats montrent que l'erreur quadratique moyenne décroît de façon exponentielle quand la qualité de l'image augmente (rapport signal sur bruit), ce qui était attendu. L'analyse par

Gaussienne est plus performante dès lors que le rapport signal sur bruit est suffisamment élevé (>19dB), comme indiqué dans la littérature (figure 33).

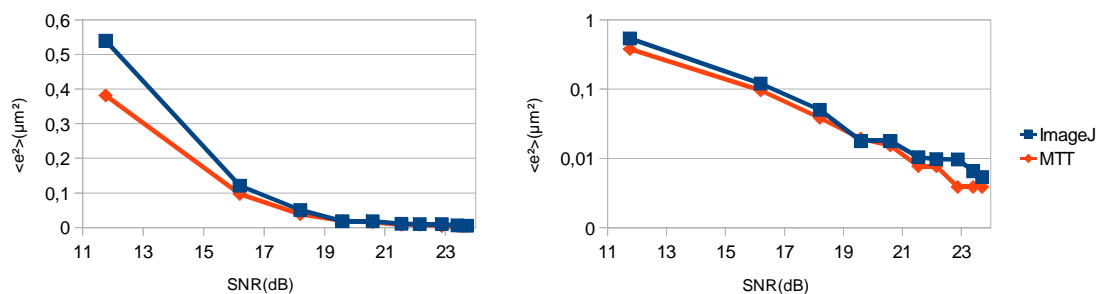


Figure 33: Courbe montrant l'erreur quadratique de position mesurées sur des images simulées avec un programme par calcul de centre de masse (en bleu) et le programme MTT (en rouge). Cette courbe montre une meilleur précision du programme MTT pour des SNR suffisamment important (>19)

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai opté pour l'algorithme de suivi de particules Multiple Target Tracking, qui a été mis au point par l'équipe de Sergé du centre d'Immunologie de Marseille-Luminy [46]. Cet algorithme permet d'effectuer du suivi de particules à haut débit et il est distribué sous forme de script Matlab facilement interfaçable avec des scripts de traitement des données selon les besoins de nos expériences.

III.2 Cahier des charges pour le développement du programme de suivi de segment de chromosomes dans la levure

Nous souhaitons mettre au point une méthode de suivi de particules à haut débit, c'est-à-dire dédiée à l'exploitation d'un grand nombre de trajectoires à partir de films en microscopie en champ large et à l'agrégation des données issues de films réalisés avec des conditions expérimentales différentes. Ce travail nécessite des aller-retour réguliers entre algorithme et expérimentation, car il est toujours difficile d'exploiter correctement des films de qualité insuffisante pour un logiciel. Avec cette solution optimisée pour l'analyse d'image, nous souhaitons obtenir des données de dynamique spatio-temporelle de fragments chromosomiques sur une gamme temporelle la plus étendue possible, afin d'analyser les résultats avec des modèles physiques quantitatifs.

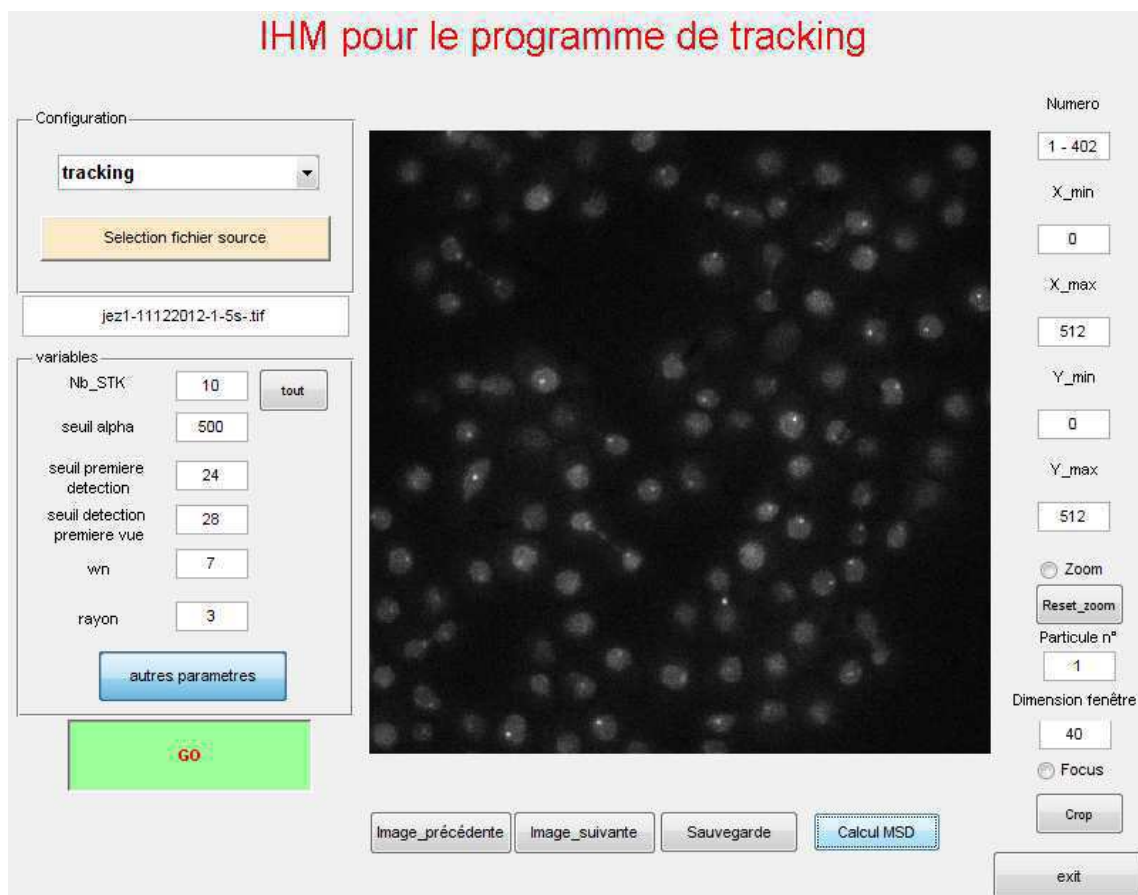


Figure 34: Interface Homme Machine de notre programme de suivi de particule dédié à l'analyse du mouvements de segments de chromosomes dans des cellules vivantes.

Du point de vue de l'usage de notre logiciel, nous avons souhaité développer un fichier exécutable facilement distribuable et muni d'une interface homme machine complète (Figure 34). Ce travail d'intégration est au cœur des compétences du LAAS-CNRS, un laboratoire spécialisé en sciences de l'ingénieur du composant aux outils informatiques associés.

Le programme de suivi de particule MTT [46] permet de détecter des objets dont les caractéristiques sont spécifiées par l'utilisateur et de suivre leurs trajectoires tout au long du film. Le programme a été spécialement optimisé pour le suivi de particules avec une importante densité de points (marqueurs membranaires) et des rapports signal sur bruit importants, il permet de faire une boucle de déflation qui soustrait à l'image de départ les particules déjà détectées et ainsi de repérer des particules situées à courte distance, dont les tâches de diffraction sont partiellement superposées. Il permet également de gérer les disparitions transitoires des particules détectées et d'affecter chaque particule à une trajectoire en utilisant les caractéristiques passées de la particule.

Dans le cadre de notre protocole expérimental, la détection de particule est un peu différente (figure 35). Il n'y a qu'un point par cellule, ce qui rend les boucles de déflation inutiles. Le signal est faible et l'auto-fluorescence du noyau est importante. Les paramètres de suivi doivent donc être déterminés avec précaution pour garantir une précision de pointé satisfaisante. De plus la position géométrique du site chromosomique à l'intérieur du noyau de la levure ou vis à vis de structures comme le nucléole doit pouvoir être déterminée pour faire une classification statistique de la position des points dans le noyau.

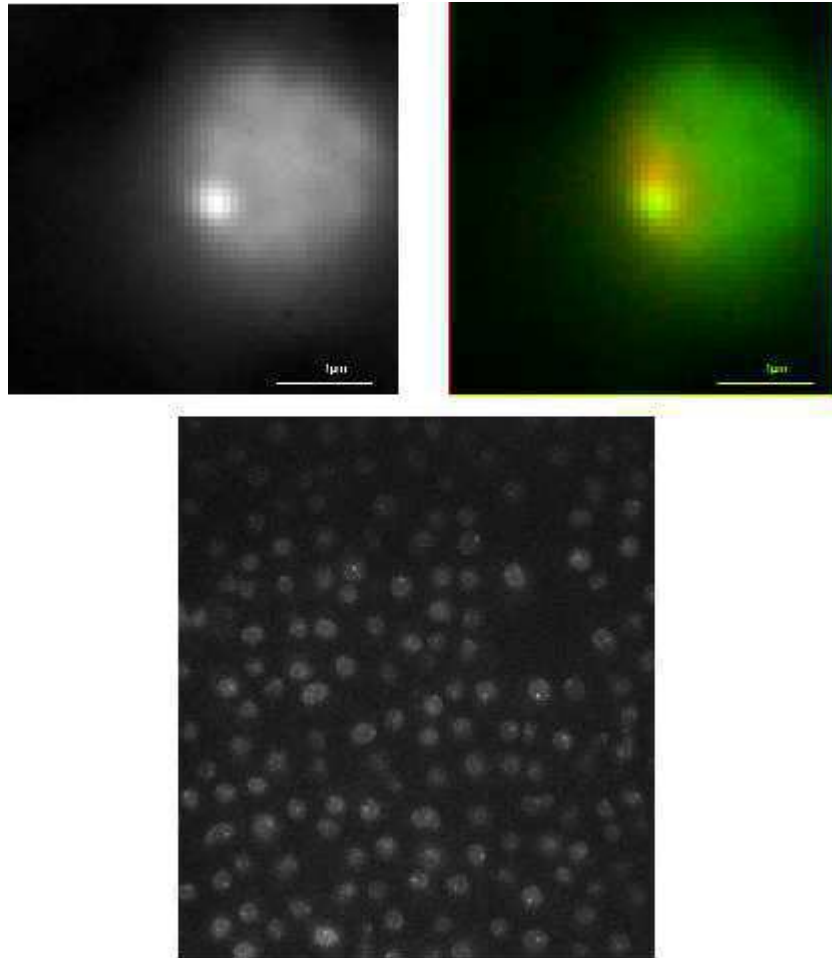


Figure 35: Le panneau en haut et à gauche représente l'image du noyau d'une levure (cercle fluorescent) dans lequel un site chromosomique a été marqué par insertion d'une séquence Lac bactérienne. Le panneau en haut à droite est la même cellule en superposant le signal Lac avec celui du nucléole marqué avec la protéine Nop-1 marqué avec un fluorophore rouge. L'image du bas est un champ collecté avec un objectif 100X.

Notre cahier des charges vis-à-vis de l'algorithme de suivi de particules comporte des contraintes importantes :

Pour assurer la détection de particules dans les cellules vivantes, le programme doit :

- être suffisamment robuste pour être utilisé dans des conditions diverses:
 - un rapport signal sur bruit varié (30 à 90),
 - Une taille de point et une surface nucléaire variables selon les conditions d'imagerie,
- être capable de « gérer » des conditions de suivi particulières :

- une seule particule par cellule,
- bruit important et particules peu brillantes qui peuvent blanchir rapidement,
- Possibilité d'apparition et de disparitions de points en cours de film (focus fixe),

En termes de suivi de particules, le programme doit permettre d'assurer :

- Le suivi de particules avec une erreur de positionnement minimale
- Le filtrage des trajectoires courtes et non pertinentes
- La validation par l'utilisateur, qui permet de limiter les erreurs de détection
- L'exportation facile et rapide des résultats (coordonnées et déplacement quadratique moyen (MSD))
- Identifier des trajectoires et proposer des classifications de trajectoires selon des critères prédéfinis (Il ne s'agit là que d'une aide à la décision, car la décision finale de considérer ou ne pas considérer une trajectoire revient à l'utilisateur dans une étape de contrôle).

Nous souhaitons ajouter au programme des modules de reconnaissance de forme automatique, afin de segmenter les trajectoires en fonction de critères objectifs, lorsque cela est nécessaire. Nous avons en particulier extrait des informations topologiques concernant le volume du noyau et la distance au nucléole.

Du point de vue de l'utilisation, nous avons souhaité répondre aux contraintes suivantes:

- A chaque étape, le logiciel permet de générer des fichiers de sorties directement utilisables par les modules de calcul, ainsi que par un utilisateur qui souhaiterait effectuer sa propre analyse des données.
- Permettre d'interfacer des scripts de traitement supplémentaires.

III.2.1 Classification des trajectoires :

L'outil MTT permet d'extraire des trajectoires et de les sélectionner selon des critères liés à la longueur de la trajectoire et à la tolérance de sauts pendant la trajectoire. Nous avons en plus ajouté des outils spécifiques à la dynamique dans un noyau de levure afin d'isoler les trajectoires pertinentes avec une bonne sélectivité. Ces outils spécifiques sont fondés sur de la reconnaissance de forme. Nous proposons de revenir sur ces développements dans les paragraphes qui suivent.

III.2.1.1 Stratégie de classement des trajectoires pour un signal comportant "une couleur"

La position d'un locus de chromatine n'est pas aléatoire dans un noyau de levure, comme le démontre l'approche du gene map (voir section II.2.1) : la position des gènes télomériques est proche de la périphérie, alors qu'un gène situé entre le centromère et le télomère est au centre du noyau. Ainsi, la position spatiale et la dynamique du point associé sont des variables à prendre en compte pour classifier les trajectoires. Cette classification est classique dans la littérature, l'équipe de Susan Gasser définit par exemple un noyau en trois sous-régions d'égales surfaces sur la première image en utilisant une approche somme toute assez proche des gene maps [49]. Un module de mesure des paramètres du noyau a ainsi été mis en place afin de déterminer précisément la position du segment de chromosome par rapport au centre et au bord du noyau.

Pour chaque particule identifiée comme exploitable, le programme découpe une zone de recherche de taille paramétrable dans laquelle doit se trouver le noyau entier. L'image est ensuite filtrée et envoyée vers une programme de détection de contour. La détection de

contour est effectuée avec à un filtre de Canny [50]. Ce filtre est implémenté naturellement sur Matlab avec les filtres Sobel, Prewitt et Roberts. Cette méthode de détection de contour a été préférée car les contours du noyau sont souvent peu discernables et le filtre Canny a l'avantage d'être peu sensible au bruit. Une fois que le contour du noyau à été obtenu, le programme détermine le centroïde du noyau, mesure la distance entre le point et le centre (Dpn), la distance minimale entre le point et le bord du noyau (Dpn_min), le périmètre et la surface du noyau. Le périmètre va servir à déterminer le rayon (Rn) en faisant l'hypothèse d'un noyau circulaire. Cette hypothèse est ensuite vérifiée en faisant le rapport entre la surface mesurée du noyau et la surface calculé grâce à l'hypothèse circulaire. Si ce rapport est inférieur à un seuil critique (0,8), le noyau de la cellule n'est pas suffisamment régulier pour être considéré dans la suite du calcul et la trajectoire est rejetée.

Le critère de régularité minimale du noyau n'est pas le seul critère. Un seuillage sur le rayon du noyau permet d'écarter les noyaux aberrants et les fausses détections, un seuillage de la distance au centre et de la distance minimale au bord permet enfin de valider l'association entre la noyau et la particule.

Le noyau est ensuite découpé en deux zones de surfaces équivalentes (Figure 36) : une zone centrale qui correspond à une distance minimale au bord supérieure à 29% ($=1-1/\sqrt{2}$) du rayon ou de manière équivalente une distance au centre inférieure à 71% ($=1/\sqrt{2}$) du rayon et une zone périphérique qui correspond à une distance minimale au bord inférieure à 29% du rayon et une distance au centre inférieure à 150% du rayon. La particule est ensuite classée en fonction de sa position initiale dans le noyau.

Un seuil de tolérance permet à la particule de se trouver en dehors du noyau car la détection de contour n'est pas toujours précise à 100% en cas de contours peu marqués, il

revient alors à l'utilisateur de faire un choix.

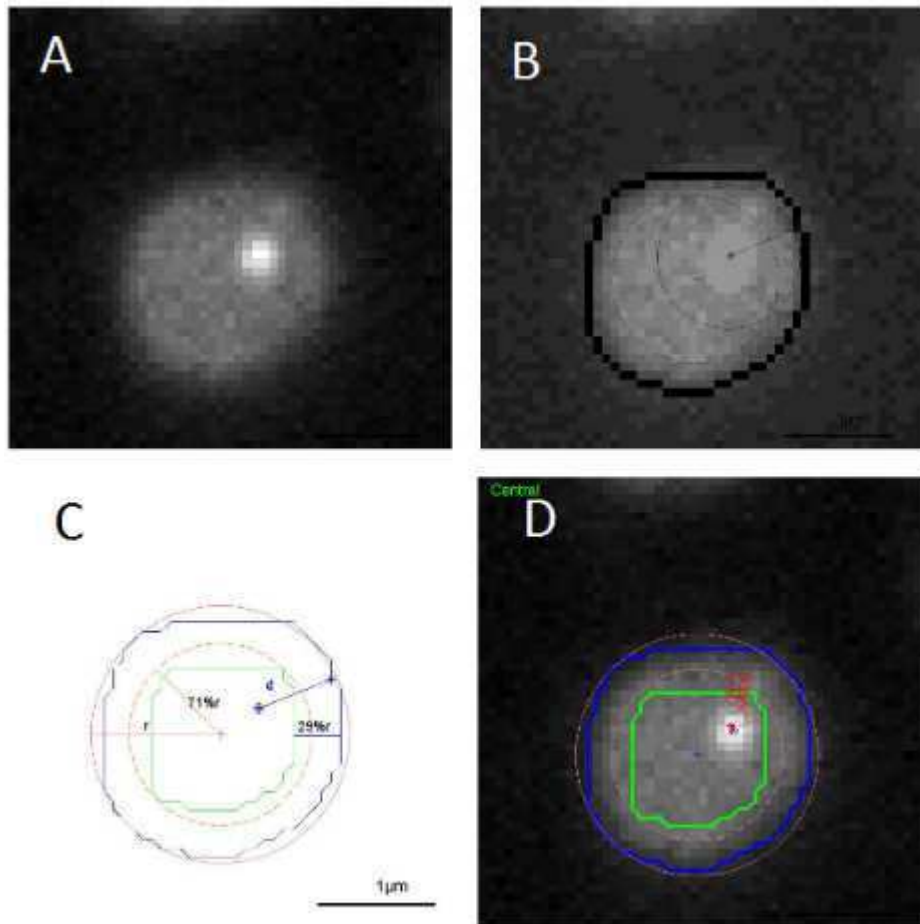


Figure 36: Exemple de classification de la position d'un point : A : Image brute obtenue par le microscope B: Zones détectés par le programme de détection de contours C: Validation des caractéristiques du noyau et détermination des zones centrale(en vert) et périphérique(en bleu) D: Fusion des données avec le suivi du point (en brun). Notez que le point diffuse beaucoup et se rapproche de la périphérie en cours d'acquisition (trajectoire Rouge).

III.2.1.2 Stratégie de classification des trajectoires avec deux couleurs.

En plus des informations topologiques sur la position du gène obtenues en imagerie à un fluorophore, il est possible de localiser le gène par rapport à des structures nucléaires marquées à l'aide d'un autre fluorophore. Dans notre cas, une image du nucléole est prise à la fin de chaque film pour permettre de localiser le point par rapport à ce dernier. La durée des films étant relativement courte, le mouvement du nucléole dans le noyau de la cellule est considéré comme négligeable par rapport à celui du point.

La détection du nucléole est effectuée par la même méthode que pour le noyau, à savoir un filtrage de l'image, puis un filtre de Canny. Le programme mesure ensuite le périmètre du nucléole, sa surface, la distance entre le point et le centre du nucléole (D_{pnuc}), la distance entre le centre du noyau et le centre du nucléole (D_{nnuc}) et la distance minimale entre le point et le bord du nucléole (D_{pnuc_min}).

Un critère de régularité du nucléole est aussi appliqué, mais le seuil est réduit (0,4) car le nucléole n'a pas de forme régulière (croissant), néanmoins ce critère nous est apparu nécessaire pour écarter les fausses détection.

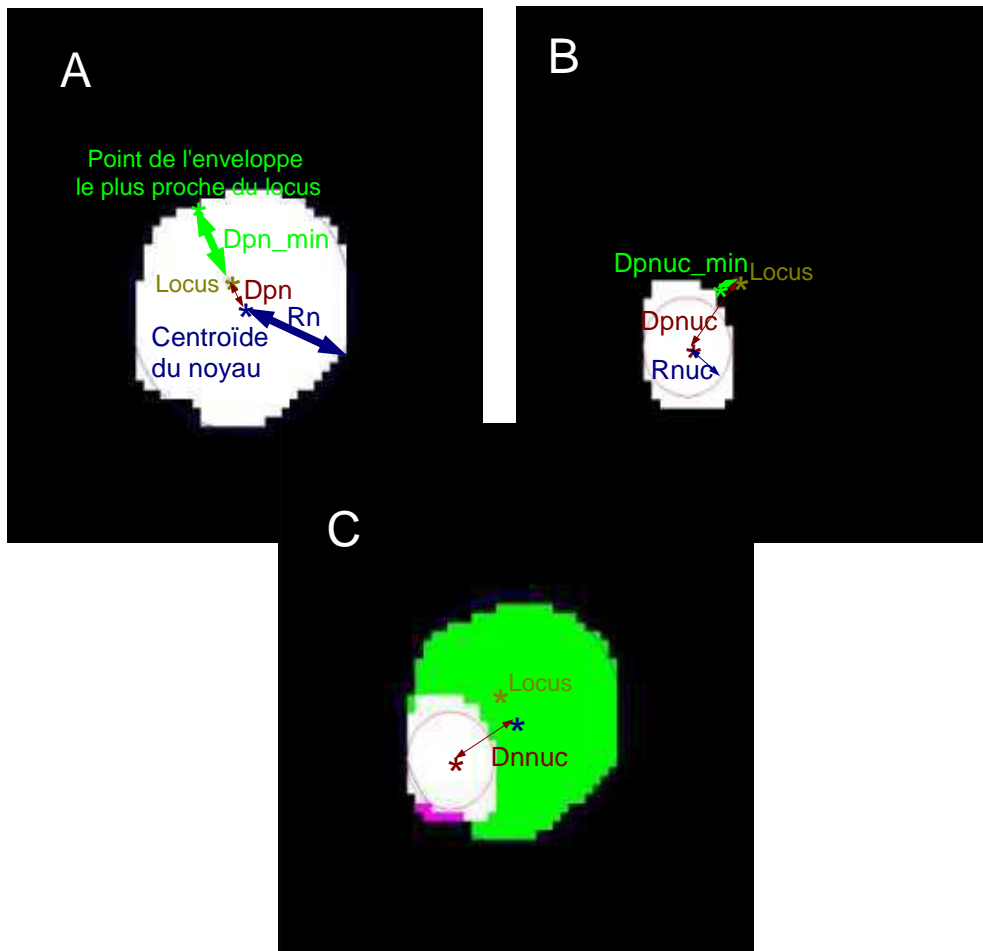


Figure 37: (A) Illustration des mesures faites sur le noyau : Distance minimale entre le point et le bord du noyau (Dpn_min), Distance au centroïde du noyau (Dpn), rayon du noyau (Rn) ainsi que le périmètre (nombre de pixels du contour) et l'aire (nombre de pixels de la surface) du noyau. (B) Illustration des mesures faites sur le nucléole Distance minimale entre le point et le bord du nucléole ($Dpnuc_min$), Distance au centre du nucléole ($Dpnuc$), Rayon du nucléole ($Dnuc$) ainsi que son aire et son périmètre. (C) Illustration des mesures faites sur les Images superposées : Distance Noyau Nucléole ($Dnnuc$)

Le nucléole est considéré comme valide si il répond aux critères (Figure 37) : Rayon dans les normes, critère de régularité supérieur à 0,4, $Dpnuc$ et $Dpnuc_min$ inférieurs a 150% du rayon du noyau et distance noyau/nucléole entre 10% et 100% du rayon du noyau pour éviter les erreurs de projections. En effet, si le nucléole est au centre du noyau, il n'est pas possible de déterminer si le point est effectivement situé dans le nucléole ou s'il est situé devant ou derrière.

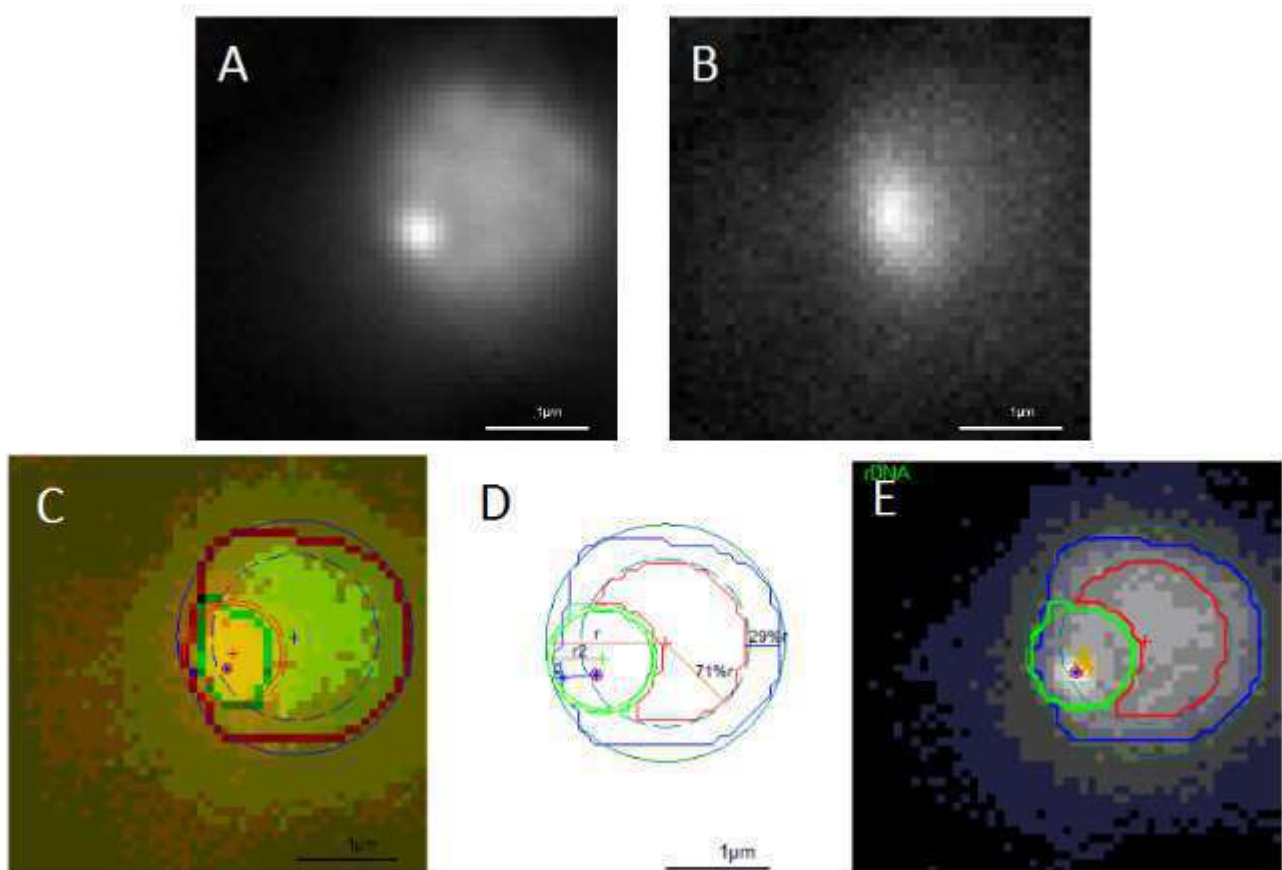


Figure 38: Exemple de détermination de zones de départ deux couleurs : A: Image *gfp* du point, B : image *mcherry* du nucléole, C : Image en sortie du détecteur de contours, D: Contrôle du noyau et détermination des zones centrale (en rouge), périphérique (en bleu) et nucléole(en vert), E: Fusion des données avec le suivi de particule(orange) et détermination de la zone de départ (nucléole dans ce cas)

Une fois que le nucléole est validé, le programme va découper le noyau en trois zones, en ajoutant aux deux cas précédant une zone proche du nucléole. Le point est considéré comme proche du nucléole si la distance au nucléole est inférieure à 110% du rayon du nucléole ou que la distance minimale au nucléole est inférieure à 10% du rayon du nucléole. Les zones centrale et périphérique sont privées de la zone nucléole mais le reste de leur définition ne change pas (figure 38). Les trois zones n'étant plus de même taille, une étude statistique a permis de mesurer leurs tailles respectives et de calculer des coefficients qui permettent de corriger les écarts de superficie lors du calcul statistique de localisation

des points. Sur un échantillon de 40 cellules les surface mesurées des zones centrales, périphériques et nucléole sont de 37%, 39% et 23% respectivement.

Les fichiers de sortie sont les mêmes que dans le cas une couleurs avec cette fois trois zones au lieux de deux.

III.2.1.3 Contrôle qualité

Le module de détection de contour est destiné à donner à l'utilisateur les informations essentielles pour permettre de déterminer la zone de départ, mais l'utilisateur reste seul juge. Le programme cherche les contours du noyau cellulaire dans une sous-région de taille paramétrable (typiquement 40 pixel) de côté autour du point détecté par le programme de suivi de trajectoires. Il arrive que lorsque les contours du noyau sont diffus le programme ne parvienne pas à interpréter correctement les images et aboutisse à un noyau déformé ou se trompe de cellule. Ces cellules sont alors le plus souvent écartés automatiquement par le programme. Dans ce cas, l'intervention de l'utilisateur est requise pour classer correctement la trajectoire (figure 39). De plus, il arrive fréquemment que des cellules contiennent plusieurs points fluorescents ou bougent pendant la durée du film, des utilitaires supplémentaires ont été implémentés. L'utilitaire Zproject permet de moyenniser les premières images du film pour repérer plus facilement les contours du noyau et le point le plus brillant de la cellule. L'utilitaire Trace permet d'afficher la trace de la trajectoire sur l'image et ainsi de repérer les trajectoires aberrantes (trajectoire sortant du noyau...).

Pour donner une idée des données récupérées sur un film de 300 images contenant une cinquantaine de levure, le programme de suivi de trajectoire va détecter 1000 – 2000 points dont ~300 correspondent à des trajectoire de plus de 5 images, ~40-100 vont passer les filtres automatiques donnés par l'utilisateur et être envoyés vers l'utilisateur et seule 10-20 seront finalement exploitables pour le reste des calculs.

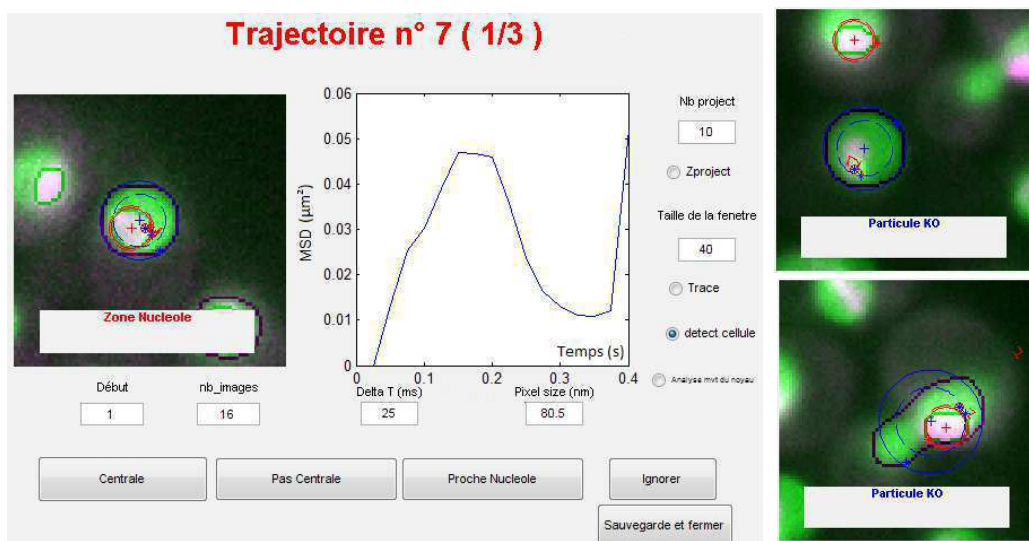


Figure 39: Exemple de détection de noyau et de nucléole cohérente, la trajectoire 7 répond aux critères de l'utilisateur en termes de longueur minimale et de nombre de disparitions maximales, et la détection de contour permet d'affecter la trajectoire à la zone nucléole. Notons que la particule explore une partie du noyau. La partie droite de l'interface permet de spécifier la zone où chercher le noyau et d'afficher les aides à l'utilisateur. A droite, deux exemples de détections aberrantes : en haut, le programme de détection de contour n'a pas repéré le nucléole de la cellule et s'est donc trompé de nucléole dans le calcul des distances ; en bas, une cellule en mitose a été détecté et écarté par le programme.

III.2.1.4 Données en sortie de l'algorithme

A ce stade, le programme passe en revue toutes les particules détectées dans le film et génère pour chaque zone (centrale, périphérique et nucléolaire) les fichiers de sorties suivant :

- Les trajectoires brutes affectées à chaque zone avec pour chaque trajectoires son numéro, ses coordonnées sur le film, les numéros des images correspondantes et un indicateur de détection. Ces fichiers sont directement lisibles par un utilisateur et facilement utilisables par un programme de traitement.

- Les déplacements quadratiques moyens (MSD) et les numéros des particules. Ces fichiers sont principalement destinés à l'utilisateur.

- Les principaux paramètres utilisés dans le calcul de la détection (notamment les paramètres de filtrage), utiles pour conserver la trace des paramètres.

- 1 fichiers textes contenant une matrice unique avec les numéros des particules et les déplacements quadratiques moyens. Ce fichier est avant tout utilisé dans la suite du calcul par les modules de traitement dédiés, mais ils est lui aussi facilement importables par l'utilisateur.

Le programme permet également d'afficher des courbes récapitulatives pour chaque zone et de générer une moyenne.

III.3 Calibration de la précision de pointé pour des films de levures

La précision du suivi de particule dépend directement de la qualité du signal. Le banc de simulation a donc été utilisé pour permettre d'avoir une mesure approximative de la précision de pointé en fonction des conditions d'imagerie.

Le programme simule un film avec une particules fixe en prenant en compte la taille de la particule, le rapport signal sur bruit et la niveau moyen de bruit. Ces films simulés sont ensuite envoyés dans le programme de suivi de particule pour évaluer le biais de mesure et sa variance. Une calibration à ensuite été effectué pour diverses conditions d'imagerie en faisant varier les conditions d'éclairage et le temps d'acquisition de la caméra. La précision attendue pour chaque condition d'imagerie est ensuite déterminée grâce à la mesure du rapport signal sur bruit et à la lecture de la courbe. Le but de l'expérience étant de déterminer le nombre de d'expériences nécessaires pour obtenir des données fiables pour l'ensemble de la gamme temporelle choisie (50 ms- >100 s) Cette méthode a permis de déterminer qu'un temps d'acquisition de 50 ms permet d'obtenir des données d'une précision satisfaisante pour les dynamiques de temps court. En deçà, la qualité du signal ce dégrade très rapidement et les données obtenues sont difficilement exploitables (figure 40).

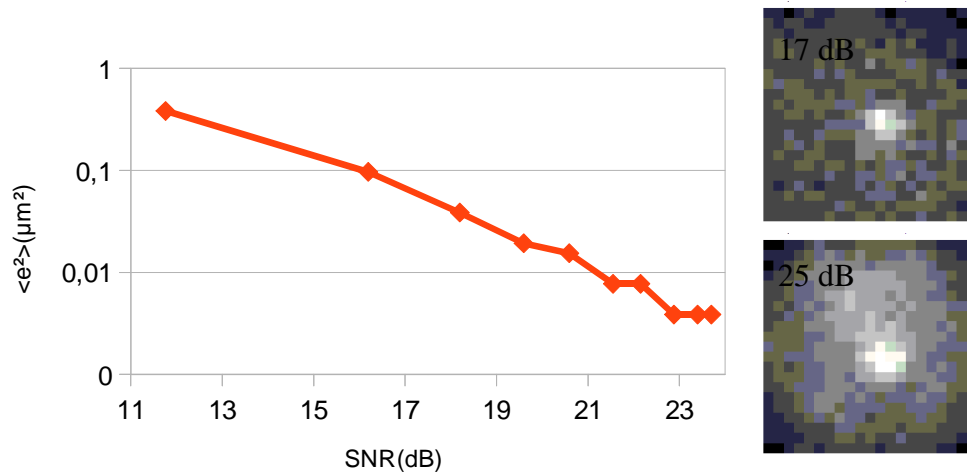


Figure 40: Courbe de l'erreur quadratique de mesure et exemples de films réels (il s'agit de la même figure que 33 avec des exemple de film)

Le banc de test a aussi permit de mettre la main sur un problème lors de la fusion des données de dynamique obtenues à partir de films réalisés avec des temps d'acquisition très différents. En effet l'indicateur choisit, le déplacement quadratique moyen est sensible à l'erreur de positionnement, or cette erreur est directement reliée aux conditions d'imagerie. Lors de la fusion des données, il convient donc d'ajouter un coefficient correcteur calculé en fonction des erreurs simulées, à partir des caractéristiques moyennes des particules, pour pouvoir aligner les données. Pour calculer ce coefficient, il faut dans un premier temps mesurer les caractéristiques de chacun des films (SNR). Ensuite, une série de simulation est effectué pour obtenir une erreur quadratique moyenne théorique pour chaque film ($\langle e^2 \rangle$).

$$\langle e^2 \rangle = \langle (x_{mesuré} - x_{réel})^2 \rangle$$

Le coefficient à ajouter aux données MSD du film de plus faible erreur est alors donné par la formule :

$$C = A * (\sqrt{\langle e_1^2 \rangle} - \sqrt{\langle e_2^2 \rangle})$$

Avec $\langle e^2 \rangle_i$ les erreurs quadratiques de position théoriques sur les films i , ($\langle e^2 \rangle_1$ $\langle e^2 \rangle_2$) et A coefficient de proportionnalité = 0,033 (déterminé expérimentalement). Ce coefficient reste très faible mais il permet d'améliorer la qualité des estimateurs lors de la phase de modélisation.

III.4 Détection de dérive

Un des principaux problèmes lors de l'étude des dynamiques aux temps longs est la dérive des noyaux qui s'ajoute aux dynamiques propres des segments chromatiniens, ce qui fausse le calcul de la MSD. Pour éviter ces phénomènes, plusieurs aides ont été implémentées dans le calcul.

Lors de l'acquisition des films avec une image du nucléole supplémentaire, l'image du nucléole est prise après l'acquisition des points. On obtient donc une image des noyaux en début de film qui est utilisée pour faire la détection de contour sur les noyaux et une image des nucléole postérieur au film qui est utilisé pour obtenir la localisation des nucléole. En cas de dérive importante de la levure, le nucléole et le noyau ne sont pas cohérent entre eux et la trajectoire est considéré par le programme de classification des noyaux comme incorrecte. Cette méthode permet de repérer facilement les dérives importantes mais n'est pas utilisable dans le cas de dérive de moins de 10 pixels.

Pour les dérives plus faibles, la visualisation de la trajectoire (directionnelle ou non) et du MSD peut être une indication de possible dérive. En cas de doute, l'utilisation du module de suivi des noyaux permet d'obtenir des informations supplémentaires pour permettre de confirmer une dérive.

Dans le cas de films sans informations sur la localisation du nucléole, où en cas de doute de la part de l'utilisateur, un programme de suivi des noyau et de compensation de la

dérive a été implémenté. Ce programme effectue une détection de contour sur toutes les images de la trajectoire à tester et mesure ainsi le déplacement du centre du noyau. Il affiche ensuite une représentation graphique de la trajectoire du noyau, la trajectoire du point ainsi que la trajectoire du point à laquelle on a soustrait la trajectoire du noyau. Le programme affiche aussi les MSD correspondantes. Si la MSD du point corrigé par la trajectoire du noyau est inférieure à la MSD du point non corrigé, on peut en conclure que la trajectoire mesurée par le programme de suivi de particule n'est pas utilisable car elle correspond en majorité à celle du noyau. La décision finale de conserver ou d'ignorer une trajectoire revient comme toujours à l'utilisateur (Figure 41).

Le programme effectuant une détection de contour sur chaque image de la trajectoire, il nécessite un contraste important, il est donc principalement utilisable dans le cas de temps d'acquisition long (2 à 3s). En cas d'erreurs de détections du noyau répétées, le module ne permet pas de conclure sur la présence de dérive.

Il est impossible d'utiliser ce programme de façon systématique pour compenser les dérives éventuelles car le programme de détection des contours à une précision très inférieure à celle du programme de suivi des particules. La précision des données corrigées serait alors déterminée par celle du programme de détection de contour (l'erreur dans la détermination du centre du noyau est de l'ordre du pixel).

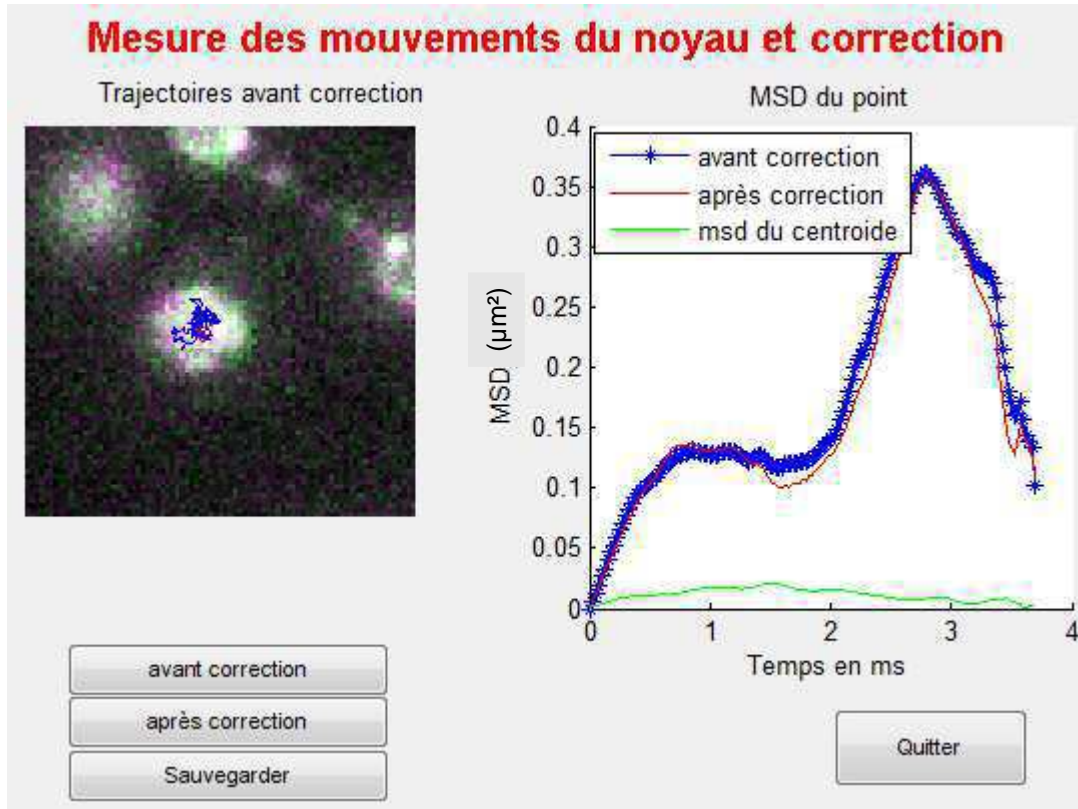


Figure 41: Exemple de mesure de dérive de noyau dans une levure. Dans ce cas, le mouvement du noyau n'intervient que très peu dans le mouvement du point car le mouvement du point corrigé suit exactement le même profil MSD. Cette trajectoire est considérée comme exploitable.

IV. Application à l'ensemble du génome

Ce chapitre s'appuie sur les travaux en cours de publication joints en annexe. Deux articles sont présentés, le premier traite des mouvements dans le noyau et décrit un modèle physique pour caractériser ces déplacements. Le second décrit pour la première fois la structure et la dynamique d'un chromosome entier de levure par microscopie optique.

IV.1 État des lieux de la recherche sur la dynamique des chromosomes

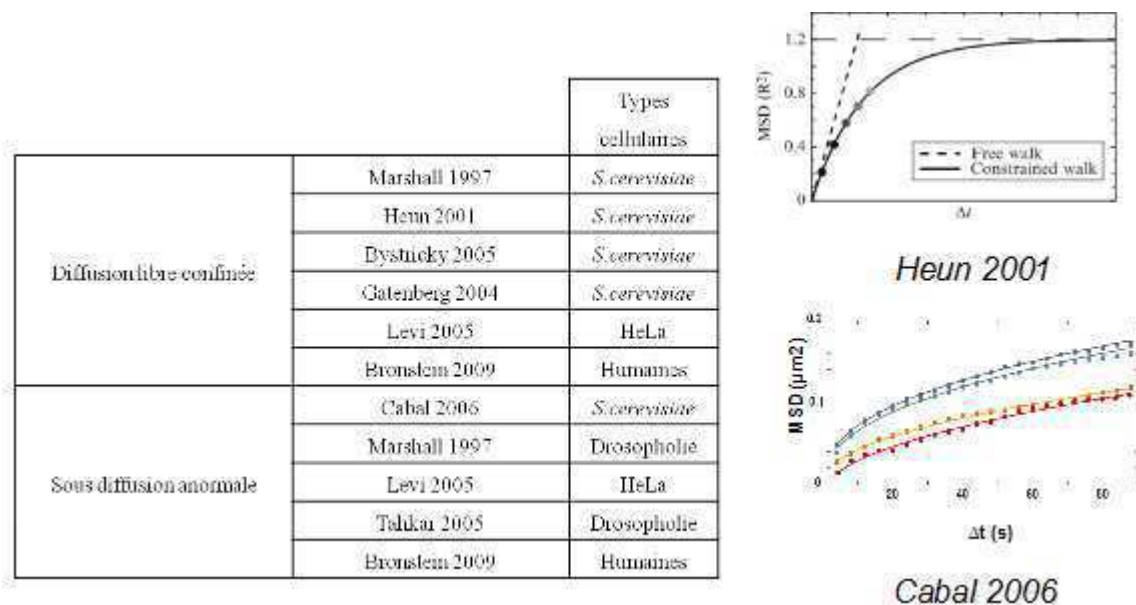


Figure 42: Exemples de modèles utilisés pour modéliser le mouvement de la chromatine : diffusion libre confinée vs Sous diffusion anormale.

Depuis de nombreuses années, l'étude de la dynamique du mouvement de la chromatine dans les cellules vivantes a été sujet à controverse quant au modèle de diffusion à appliquer pour expliquer ces mouvements (figure 42). Les deux principaux modèles sont la diffusion libre confinée dans lequel la particule est supposée diffuser librement à l'intérieur du noyau jusqu'à atteindre les « bords » qui contraignent son mouvement, et la sous diffusion anormale. Cette controverse montre une méconnaissance des mécanismes moléculaires en jeu.

IV.2 Stratégie expérimentale

Notre stratégie expérimentale a consisté à utiliser des souches marquées sur l'ensemble du génome de la levure *saccharomyces cerevisiae* (figure 43) et à effectuer un suivi des marqueurs grâce au programme de suivi automatisé. Les acquisitions sont effectuées sur une plage temporelle élargie de plus de 4 décades (10^{-2} à 10^3 s). Les dynamiques ainsi obtenues seront ensuite comparées et modélisées. Le but de cette expérience est d'obtenir un nombre important de trajectoires afin de déterminer précisément lequel des modèles est le plus à même d'expliquer les données et de déterminer si la dynamique du mouvement des chromosome est dépendante ou non de la longueur des chromosomes ou de la localisation des points dans le noyau. Les points imagés sont répartis le long des chromosomes 3, 4, 6, 12 et 14 en milieux de bras comme en position télomérique.

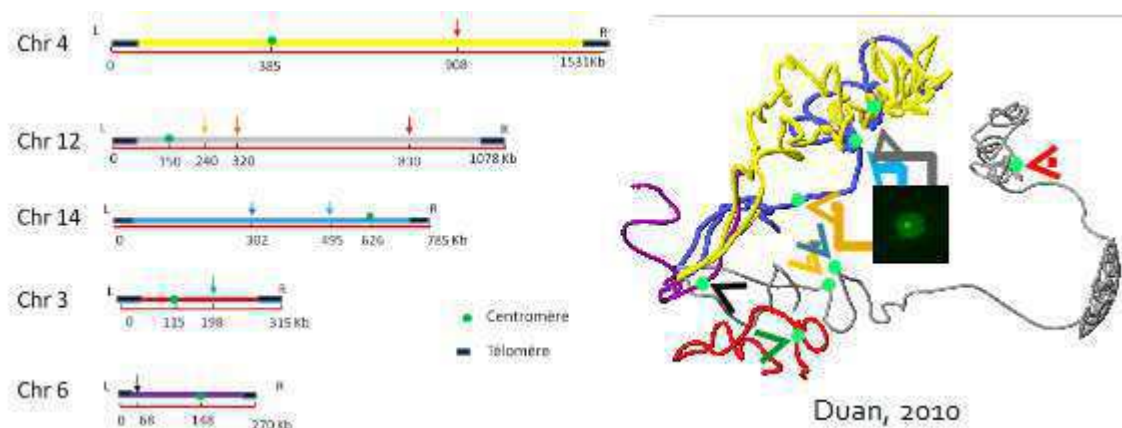


Figure 43: Stratégie de marquage employée : à gauche, la localisation des marqueurs sur le génome ; à droite un schéma de la localisation des marquage sur le modèle de la levure en 3D

Ces expériences ont permis de répondre à différentes questions. Ce travail est détaillé dans notre article «High throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome» présenté dans l'annexe.

IV.2.1 Dynamique indépendante de la taille du chromosome et de la position génomique du locus

Les expériences n'ont pas montré de dépendance de la dynamique du point vis à vis de la longueur du chromosome. La dynamique des loci montre un comportement en diffusion anormale de paramètre proche de 0,5 quelque soit la taille du chromosome ou sa localisation sur le bras chromosomique en dehors du télomère qui du fait de l'accroche à la paroi nucléaire montre une dynamique singulière, que l'on interprète comme un régime de ROUSE de diffusion de polymères (figure 44). Le régime correspond à la diffusion de segments élastiques en interaction avec leurs proches voisins, et flottant avec le liquide (voir notre article en annexe). Cette réponse indépendante de la longueur du chromosome est liée au fait que la dynamique ne dépend que des propriétés locales de la chromatine.

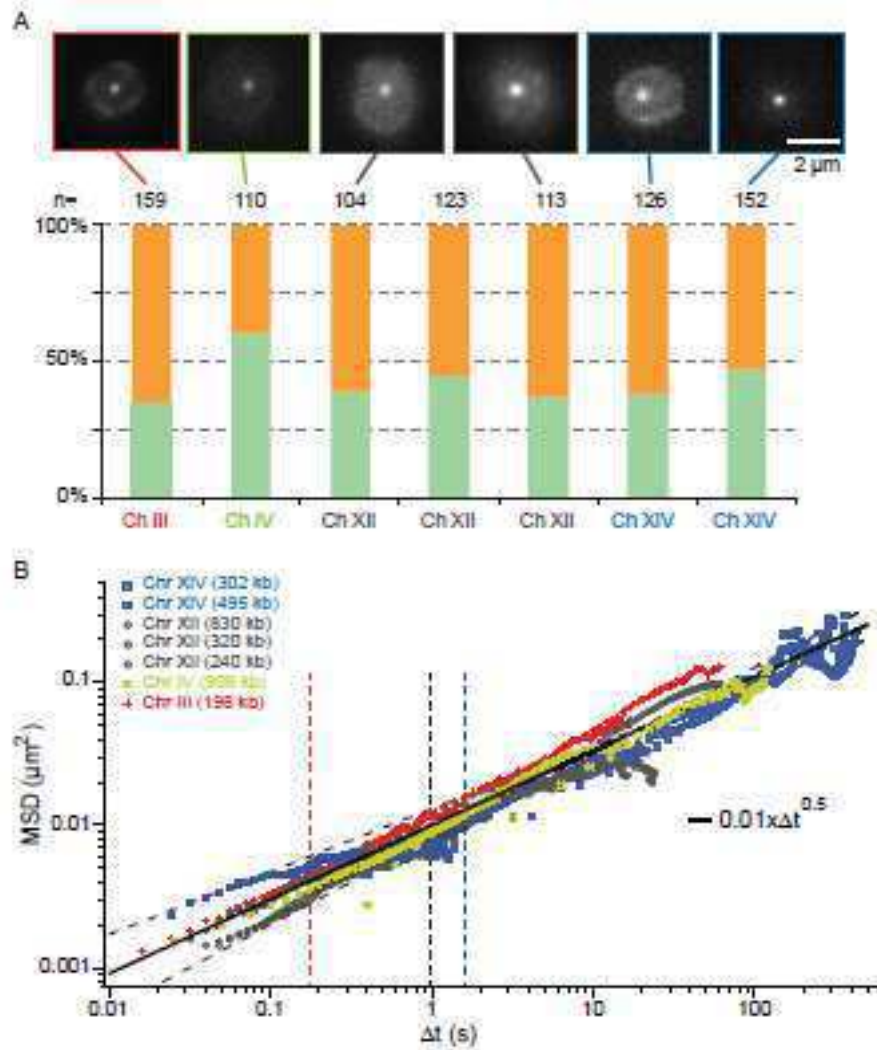


Figure 44: Dynamique de la chromatine dans la levure (A) exemples de films pour 200ms de temps d'acquisition et répartition suivant les zones pour chaque locus (B) MSD des loci suivant une large période temporelle (10^{-2} à 10^2 s). Les données montrent un même comportement quelque soit le chromosome et la position du locus.

IV.2.2 Dynamique indépendante de la position dans le noyau avec notre segmentation

Les données montrent que la position du point dans le noyau n'a pas d'influence déterminante dans la dynamique de la chromatine (figure 45). En effet la dynamique des loci situés en périphérie ou au centre du noyau présente un même paramètre de diffusion anormale (0,5) quelque soit le loci utilisé. Les résultats sont cohérents avec ceux des gene map et ne montrent pas d'effet d'ancrage au bord des loci en milieu de bras chromosomique. Les données ne montrent pas de différences fondamentales entre les zones centrale et périphérique contrairement aux résultats de Gasser, cela s'explique par un découpage différents du noyau suivant 3 zones chez Gasser.

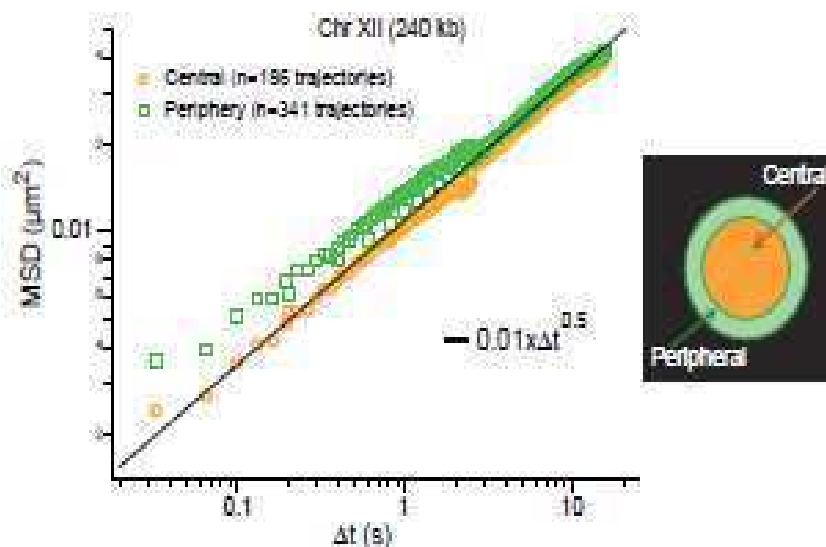


Figure 45: Comparaison du comportement MSD des loci suivant les zones. (voir article en annexe)

IV.2.3 Modèle de Rouse et validation par analyse de la distribution de pas

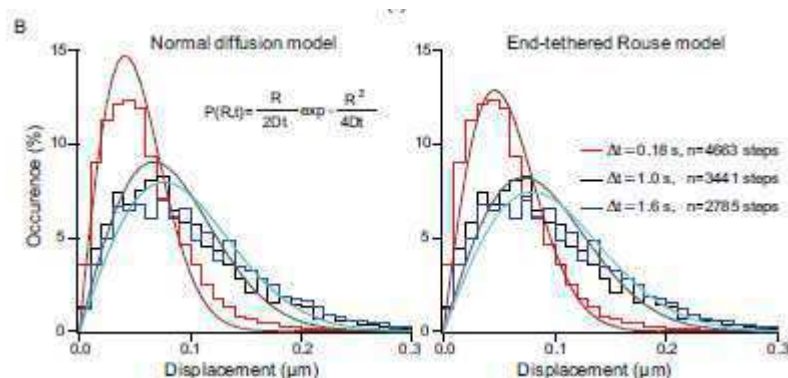


Figure 46 : Courbes de la distribution des pas de déplacement et modélisation par une diffusion normale et par un modèle de Rouse. Les courbes montrent une bien meilleure adéquation avec un modèle de Rouse quelque soit l'échelle de temps considéré.

Nous avons confirmé que la dynamique de Rouse était conforme à nos résultats en analysant la distribution de pas pour un pas de temps donné (Figure 46). La distribution de pas a l'avantage de ne pas être une moyenne ce qui permet de conserver les événements rares, elle consiste à calculer pour un pas de temps donné les occurrences de taille de pas de déplacement de points. Le programme de suivi de trajectoire a donc été modifié pour permettre de sortir des distributions de pas de déplacement et ainsi permettre de vérifier si l'estimateur de la dynamique à savoir le déplacement quadratique moyen biaise l'interprétation des données ou non. Les résultats montrent une bonne adéquation au modèle de Rouse avec extrémités fixes. La dynamique ne peut pas être reproduite avec un modèle de diffusion libre, mais elle est parfaitement ajustée avec la propagation dérivé de l'étude de Guérin et al [51].

V.Application à la structure et dynamique du chromosome XII

V.1 Stratégie expérimentale

Cette fois, nous allons nous intéresser à l'influence de la position du point dans le noyau sur sa dynamique. Pour cela, le chromosome XII est intéressant, en effet il comporte une large portion de rDNA qui est toujours contenue dans le nucléole (Figure 47). Le suivi de loci marqués le long du chromosome XII (Figure 47) permettra donc de déterminer si la zone (centrale, périphérique et nucléolaire) dans laquelle se trouve le gène influence sa dynamique. De plus, les données de gene map semblent indiquer des positions statistiques préférentielle en fonction des gènes et un accrochage de la chromatine au niveau des télomères, du centromère et du nucléole. Les données statistiques obtenues par notre algorithme de suivi de trajectoire peuvent donc être comparées à celles obtenues par microscopie 3D « statique » (pas de suivi de trajectoire).

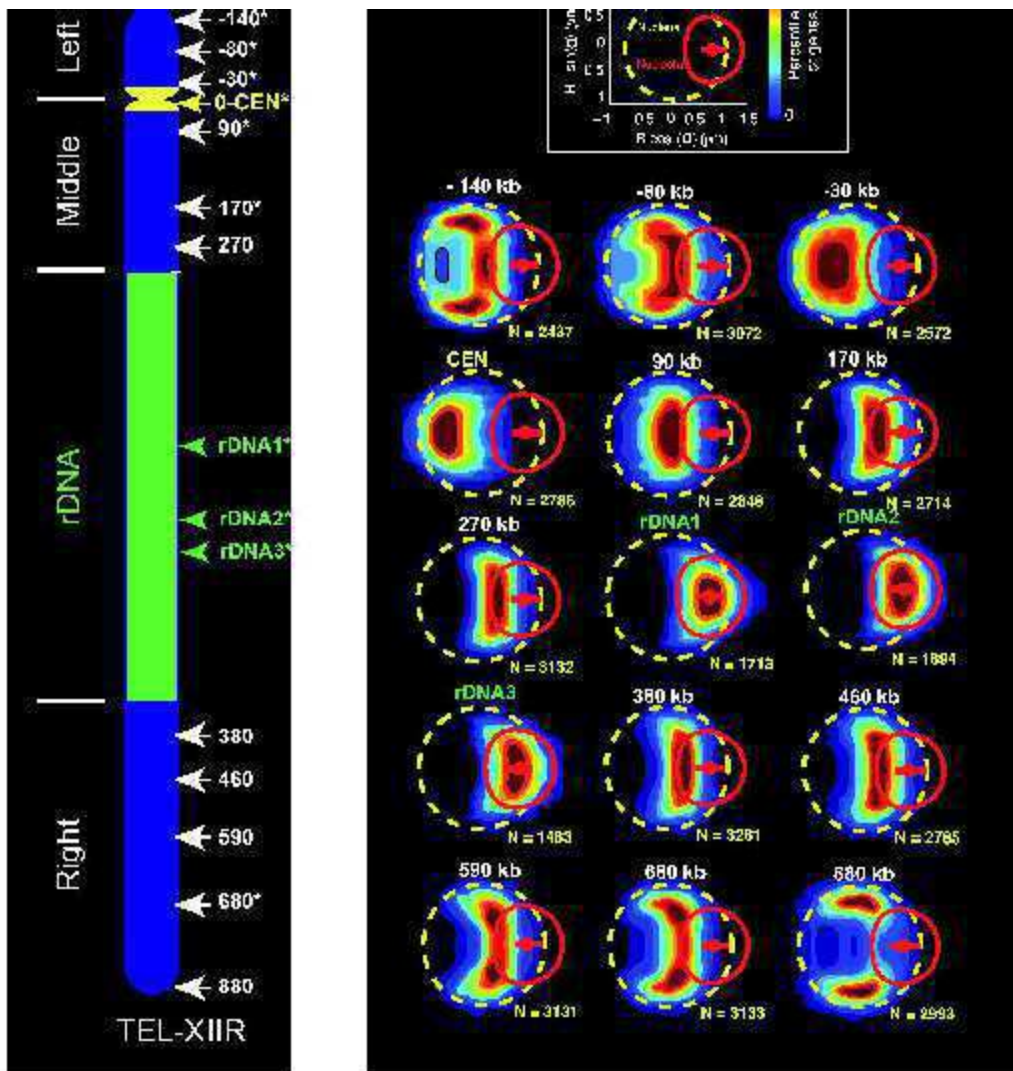


Figure 47 :Stratégie de marquage du chromosome XII avec en vert le nucléole, et gene map obtenues pour les différents marquage sur le chromosome XII. Ces résultats seront comparés avec ceux obtenus en 2D par ma méthode.

V.2 Résultats

V.2.1 Adéquation avec les gene map

Les résultats montrent une bonne adéquation entre les données gene map et les données obtenues grâce à mon algorithme de suivi de particules (figure 48). Cette adéquation montre que le choix de privilégier l'information 2D au dépend de la 3D n'a pas d'influence sur la détermination statistique de la position moyenne des loci dans le noyau de la cellule.

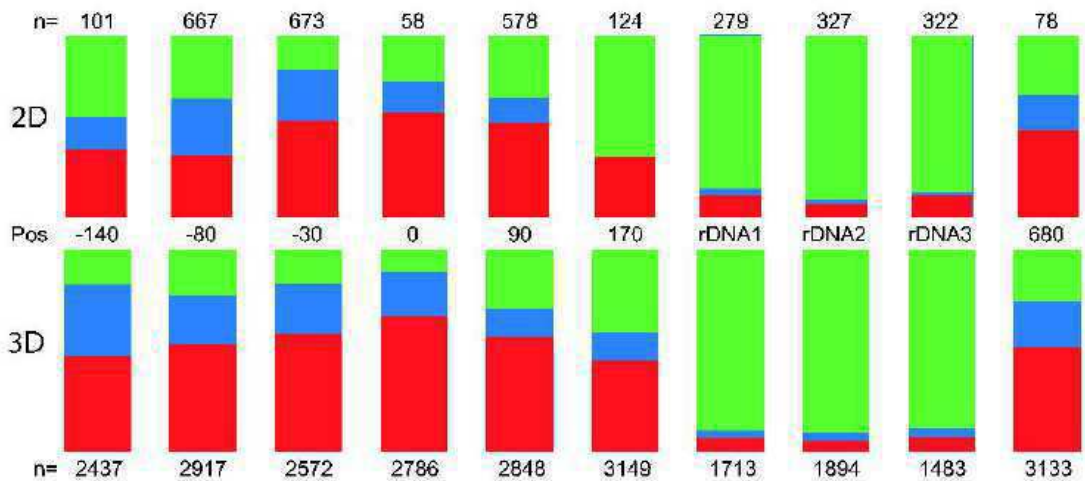


Figure 48: Répartition des loci suivant les différentes zones avec le nucléole en vert, la périphérie en bleu et le centre en rouge obtenue en 2D par ma méthode de suivi de points et en 3D. Les deux méthodes montrent une parfaite adéquation entre les résultats obtenus en 2D ou 3D

V.2.2 En fonction de la position le long du chromosome

Les données ne montrent pas d'influence significative de la position du gène sur sa dynamique (figure 49), en dehors d'un accrochage au niveau du centromère. Elles montrent par contre que les loci nucléolaires sont presque exclusivement situés dans le nucléole et ont une dynamique très différente, notamment un paramètre de diffusion anormale particulièrement élevé : 0,75 par rapport à 0,5 attendu (figure 50).

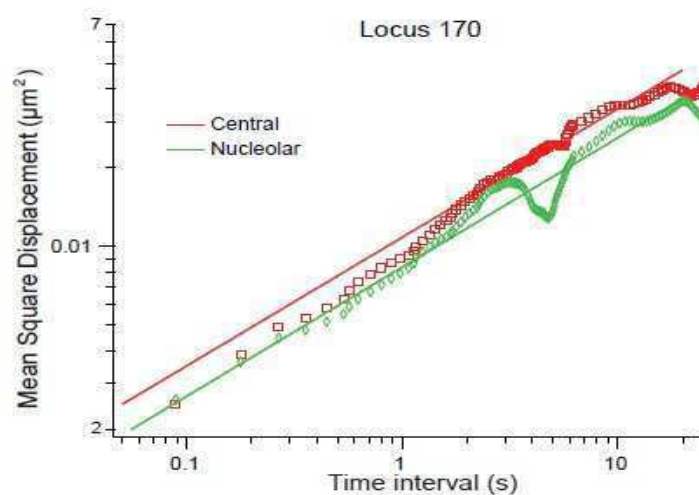


Figure 49: Courbe du déplacement quadratique moyen pour le locus 170 (gauche); cette courbe montre que la pente est exactement la même pour les zones centrale et nucléolaire. Courbe du déplacement quadratique moyen des loci 170 et des trois loci nucléolaires.

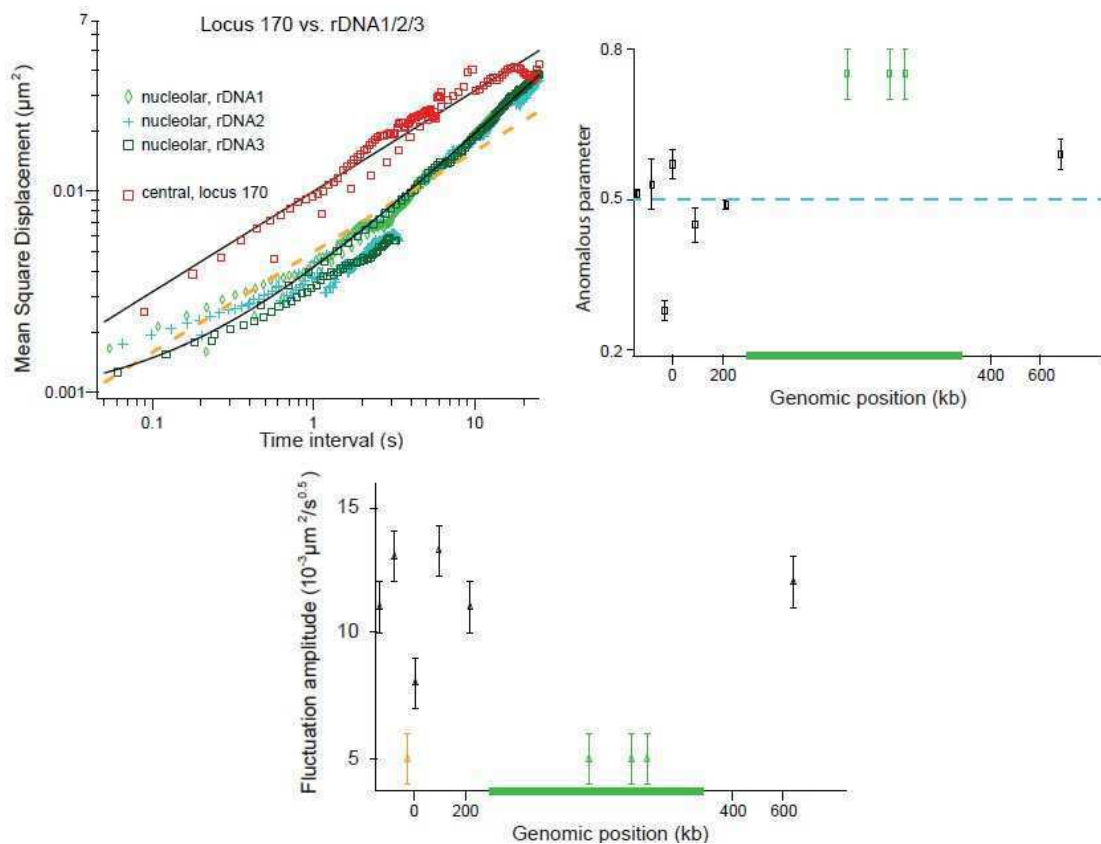


Figure 50: (en haut à gauche) Courbe du déplacement quadratique moyen des loci 170 et des 3 loci nucléolaires. (en haut à droite) Courbes du paramètre de diffusion anormale en fonction de la position génomique. (En bas) Courbe des fluctuations d'amplitudes en fonction de la position génomique. Ces courbes montrent clairement que les dynamiques des points nucléolaires sont différentes des autres, et montrent aussi l'influence de l'accrochage du centromère sur la dynamique du centromère.

VI. Conclusion générale :

L'objectif de mon travail de thèse était de mettre en place des outils dédiés au suivi des mouvements des chromosomes chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* à haut débit. Dans ce cadre j'ai mis en place une plateforme de microscopie optimisée pour l'imagerie dans des cellules vivantes assurant l'obtention d'un grand nombre de films exploitables. Associé à ce travail expérimental, j'ai développé des outils de traitement d'images algorithmiques qui permettent d'extraire rapidement des statistiques de dynamique et de position fiables et reproductibles. La réalisation de ce travail à la frontière entre l'expérience et le traitement du signal vidéo a nécessité un travail d'optimisation rigoureux afin de maximiser les performances de la chaîne d'acquisition vis à vis des caractéristiques propres à l'analyse des levures *in vivo* (faible intensité, blanchiment rapide, petite taille des objets, autofluorescence des milieux, cycles biologiques ...).

Concernant les outils algorithmique, nous avons été amenés à comparer les performance de plusieurs algorithmes de suivi, et nous avons fait l'effort d'intégrer un programme de traitement dédié à notre application diffusable largement, car développé comme un exécutable capable de traiter des informations à 1 ou 2 couleurs. Notons que ce travail s'est appuyé sur la définition de critères de segmentation aussi quantitatifs que possible. Le logiciel tourne aujourd'hui en quasi-autonomie : les suggestions du logiciel pour sélectionner les cellules pertinentes sont presque toujours validées par l'utilisateur. Cette remarque implique que la plage de variation des critères de segmentation a été très bien affinée.

Dans le prolongement de ce sujet, ces outils ont ensuite été utilisés pour construire un modèle biophysique décrivant les mouvements des chromosomes utilisé pour travailler sur

un chromosome en particulier : le chromosome XII car il contient les structures essentielles à l'architecture d'un noyau eucaryote, à savoir le centromère, les télomères et le nucléole. Nous avons construit la première carte optique détaillée d'un chromosome de levure présentant son repliement spatial, mais aussi sa dynamique. Nous avons en particulier déterminé l'influence du nucléole dans la dynamique de la chromatine, un résultat qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature.

Pour conclure sur ce travail interdisciplinaire, je tiens à remercier mes collaborateurs du LBME (Kerstin Bystricky et Olivier Gadal) avec qui nous avons construit ce projet de thèse en apportant de nouveaux outils capables d'enrichir le travail de recherche. Notre ambition de réaliser un logiciel diffusable au grand public a déjà connu un premier succès, puisqu'il a été envoyé à une équipe de l'Institut Pasteur (Emmanuelle Fabre). Cette piste de diffusion de mon travail est probablement la meilleure récompense de mes efforts, et espérons que d'autres équipes se montrent intéressées dans le futur!

Références

- [1] J. Watson and F. Crick, “The structure of DNA,” *Cold Spring Harbor*, 1953.
- [2] R. Jaenisch and A. Bird, “Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals,” *Nature Genetics*, vol. 33, pp. 245–254, Mar. 2003.
- [3] A. Kossel, “The protamines and histones,” *Longmans, Green*, 1928.
- [4] A. L. Olins and D. E. Olins, “Spheroid Chromatin Units (ngr Bodies),” *Science*, vol. 183, no. 4122, pp. 330–332, Jan. 1974.
- [5] Y. Lorch, J. W. LaPointe, and R. D. Kornberg, “Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones,” *Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 203–210, Apr. 1987.
- [6] C. Lavelle and A. Prunell, “Chromatin Polymorphism and the Nucleosome Superfamily: A Genealogy,” *Cell Cycle*, vol. 6, no. 17, pp. 2113–2119, Sep. 2007.
- [7] J. E. Germond, B. Hirt, P. Oudet, M. Gross-Bellark, and P. Chambon, “Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40,” *PNAS*, vol. 72, no. 5, pp. 1843–1847, May 1975.
- [8] F. Thoma, T. Koller, and A. Klug, “Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.,” *J Cell Biol*, vol. 83, no. 2, pp. 403–427, Nov. 1979.
- [9] J. Bednar, R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster, and C. L. Woodcock, “Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin,” *PNAS*, vol. 95, no. 24, pp. 14173–14178, Nov. 1998.
- [10] F. Thoma and R. T. Simpson, “Local protein–DNA interactions may determine nucleosome positions on yeast plasmids,” *Published online: 16 May 1985; | doi:10.1038/315250a0*, vol. 315, no. 6016, pp. 250–252, May 1985.
- [11] P. Lowary and J. Widom, “New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 276, no. 1, pp. 19–42, février 1998.
- [12] T. Schalch, S. Duda, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, “X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre,” *Nature*, vol. 436, no. 7047, pp. 138–141, Jul. 2005.
- [13] P. J. J. Robinson, L. Fairall, V. A. T. Huynh, and D. Rhodes, “EM measurements define the dimensions of the ‘30-nm’ chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure,” *PNAS*, vol. 103, no. 17, pp. 6506–6511, Apr. 2006.
- [14] S. J. McBryant, C. Krause, C. L. Woodcock, and J. C. Hansen, “The Silent Information Regulator 3 Protein, SIR3p, Binds to Chromatin Fibers and Assembles a Hypercondensed Chromatin Architecture in the Presence of Salt,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 3563–3572, Jun. 2008.
- [15] B. Dorigo, T. Schalch, K. Bystricky, and T. J. Richmond, “Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 327, no. 1, pp. 85–96, Mar. 2003.
- [16] K. Bystricky, P. Heun, L. Gehlen, J. Langowski, and S. M. Gasser, “Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques,” *PNAS*, vol. 101, no. 47, pp. 16495–16500, Nov. 2004.
- [17] J. Dekker, “Mapping in Vivo Chromatin Interactions in Yeast Suggests an Extended Chromatin Fiber with Regional Variation in Compaction,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 50, pp. 34532–34540, Dec. 2008.
- [18] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H.

- Tettelin, and S. G. Oliver, "Life with 6000 Genes," *Science*, vol. 274, no. 5287, pp. 546–567, Oct. 1996.
- [19] E. V. Howman, K. J. Fowler, A. J. Newson, S. Redward, A. C. MacDonald, P. Kalitsis, and K. H. A. Choo, "Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice," *PNAS*, vol. 97, no. 3, pp. 1148–1153, Feb. 2000.
- [20] A. M. Olovnikov, "Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory," *Experimental Gerontology*, vol. 31, no. 4, pp. 443–448, juillet 1996.
- [21] "The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*," *J Cell Biol*, vol. 134, no. 6, pp. 1349–1363, Sep. 1996.
- [22] F. Palladino, "SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres," *Cell*, pp. 543–555, 1993.
- [23] H. Schober, V. Kalck, M. A. Vega-Palas, G. V. Houwe, D. Sage, M. Unser, M. R. Gartenberg, and S. M. Gasser, "Controlled exchange of chromosomal arms reveals principles driving telomere interactions in yeast," *Genome Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 261–271, Feb. 2008.
- [24] P. Therizols, T. Duong, B. Dujon, C. Zimmer, and E. Fabre, "Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres," *PNAS*, vol. 107, no. 5, pp. 2025–2030, Feb. 2010.
- [25] A. B. Berger, "High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast," *Nature Methods*, no. 5, pp. 1031–1037, 2008.
- [26] Z. Duan, M. Andronescu, K. Schutz, S. McIlwain, Y. J. Kim, C. Lee, J. Shendure, S. Fields, C. A. Blau, and W. S. Noble, "A three-dimensional model of the yeast genome," *Nature*, vol. 465, no. 7296, pp. 363–367, May 2010.
- [27] E. Heitz, "Das heterochromatin der moose," *Bornträger*, 1928.
- [28] F. Hediger, F. R. Neumann, G. Van Houwe, K. Dubrana, and S. M. Gasser, "Live Imaging of Telomeres-yKu and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast," *Current biology*, 2002.
- [29] A. Taddei, F. Hediger, F. R. Neumann, C. Bauer, and S. M. Gasser, "Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins," *The EMBO Journal*, vol. 23, no. 6, pp. 1301–1312, Mar. 2004.
- [30] M. Bühler and S. M. Gasser, "Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts," *The EMBO Journal*, vol. 28, no. 15, pp. 2149–2161, Aug. 2009.
- [31] P. Meister, L. R. Gehlen, E. Varela, V. Kalck, and S. M. Gasser, "Chapter 21 - Visualizing Yeast Chromosomes and Nuclear Architecture," in *Methods in Enzymology*, vol. Volume 470, Jonathan Weissman; Christine Guthrie and Gerald R. Fink, Ed. Academic Press, 2010, pp. 535–567.
- [32] A. F. Straight, A. S. Belmont, C. C. Robinett, and A. W. Murray, "GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein–protein interactions can mediate sister chromatid cohesion," *Current Biology*, vol. 6, no. 12, pp. 1599–1608, 1996.
- [33] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, "Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes," *Biophysical Journal*, vol. 82, no. 5, pp. 2775–2783, mai 2002.
- [34] A. Pertsinidis, Y. Zhang, and S. Chu, "Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements," *Nature*, vol. 466, no. 7306, pp. 647–651, Jul. 2010.
- [35] R. J. Ober, S. Ram, and E. S. Ward, "Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 86, no. 2, p. 1185, Feb. 2004.
- [36] J. Enderlein, E. Toprak, and P. Selvin, "Polarization effect on position accuracy of fluorophore localization," *Optics Express*, pp. 14(18) :p. 8111–8120, 2006.
- [37] G. G. Cabal, A. Genovesio, S. Rodriguez-Navarro, C. Zimmer, O. Gadal, A. Lesne, H. Buc, F. Feuerbach-Fournier, J.-C. Olivo-Marin, E. C. Hurt, and U. Nehrbass, "SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope," *Nature*, vol. 441,

no. 7094, pp. 770–773, Jun. 2006.

- [38] K. Bystricky, T. Laroche, G. van Houwe, M. Blaszczyk, and S. M. Gasser, “Chromosome looping in yeast telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization,” *J Cell Biol*, vol. 168, no. 3, pp. 375–387, Jan. 2005.
- [39] M. R. Gartenberg, F. R. Neumann, T. Laroche, M. Blaszczyk, and S. M. Gasser, “Sir-Mediated Repression Can Occur Independently of Chromosomal and Subnuclear Contexts,” *Cell*, pp. 955–967, 2004.
- [40] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, “Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy,” *Science*, vol. 319, no. 5864, pp. 810–813, Feb. 2008.
- [41] Y. Sun, J. D. McKenna, J. M. Murray, E. M. Ostap, and Y. E. Goldman, “Parallax: High Accuracy Three-Dimensional Single Molecule Tracking Using Split Images,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 7, pp. 2676–2682, juillet 2009.
- [42] S. R. P. Pavani, M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. Liu, R. J. Twieg, R. Piestun, and W. E. Moerner, “Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function,” *PNAS*, vol. 106, no. 9, pp. 2995–2999, Mar. 2009.
- [43] E. Toprak, H. Balci, B. H. Blehm, and P. R. Selvin, “Three-Dimensional Particle Tracking via Bifocal Imaging,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 7, pp. 2043–2045, juillet 2007.
- [44] S. Ram, P. Prabhat, J. Chao, E. Sally Ward, and R. J. Ober, “High Accuracy 3D Quantum Dot Tracking with Multifocal Plane Microscopy for the Study of Fast Intracellular Dynamics in Live Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 12, pp. 6025–6043, décembre 2008.
- [45] H. Hajjoul, J. Mathon, Y. Viero, and A. Bancaud, “Optimized micromirrors for three-dimensional single-particle tracking in living cells,” *Applied Physics Letters*, vol. 98, no. 24, pp. 243701–243701–3, Jun. 2011.
- [46] A. Sergé, N. Bertaux, H. Rigneault, and D. Marguet, “Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes,” *Nature Methods*, vol. 5, no. 8, pp. 687–694, 2008.
- [47] M. K. Cheezum, W. F. Walker, and W. H. Guilford, “Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles,” *Biophys J*, vol. 81, no. 4, pp. 2378–2388, Oct. 2001.
- [48] I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos, “Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology,” *Journal of Structural Biology*, vol. 151, no. 2, pp. 182–195, août 2005.
- [49] P. Heun, T. Laroche, K. Shimada, P. Furrer, and S. M. Gasser, “Chromosome Dynamics in the Yeast Interphase Nucleus,” *Science*, vol. 294, no. 5549, pp. 2181–2186, Dec. 2001.
- [50] R. Deriche, “Using Canny’s criteria to derive a recursively implemented optimal edge detector,” *Int J Comput Vision*, vol. 1, no. 2, pp. 167–187, Jun. 1987.
- [51] T. Guérin, O. Bénichou, and R. Voituriez, “Non-Markovian polymer reaction kinetics,” *Nat Chem*, vol. 4, no. 7, pp. 568–573, print juillet 2012.
- [52] H. Hajjoul, S. Kocanova, I. Lassadi, K. Bystricky, and A. Bancaud, “Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3054–3058, Nov. 2009.

Annexe 1 :

«High throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome»

High throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome

Houssam Hajjoul^{1,3*}, Julien Mathon^{1,3*}, Hubert Ranchon^{1,3}, Isabelle Goiffon^{2,3}, Julien Mozziconacci,^{4,5} Benjamin Albert^{2,3}, Pascal Carrivain,^{4,5} Jean-Marc Victor,^{4,5} Olivier Gadal^{2,3}, Kerstin Bystricky^{2,3}, Aurélien Bancaud^{1,3}

Keywords: chromatin / live cell imaging / high-throughput particle tracking / nuclear architecture

1: LAAS, CNRS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

2: LBME, CNRS, 118 route de Narbonne, F-31000 Toulouse, France

3: University of Toulouse, F-31062 Toulouse, France

4: LPTMC UMR 7600, CNRS, University Pierre et Marie Curie-Paris 6, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

5: CNRS GDR 3536, University Pierre et Marie Curie-Paris 6, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

* These authors participated equally to this work.

Corresponding author:

Aurélien Bancaud

email: abancaud@laas.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 62 46; Fax: +33 (0)5 61 33 62 08 ;

ABSTRACT (209 words)

Chromosome dynamics are recognized to be intimately linked to genomic transactions, yet the physical principles governing spatial fluctuations of chromatin is still a matter of debate. Using high-throughput single particle tracking we record the movements of 9 fluorescently labeled chromosome loci located on chromosomes III, IV, XII, and XIV of *S. cerevisiae* over an extended temporal range spanning more than 4 orders of magnitude (10^{-2} to 10^3 s). Spatial fluctuations appear to be characterized by an anomalous diffusive behavior, which is homogeneous in the time domain, for all sites analyzed. We show that this response is consistent with the Rouse polymer model, and we confirm the relevance of the model with molecular dynamics simulations and the analysis of the statistical properties of the trajectories. Moreover the analysis of the amplitude of fluctuations by the Rouse model suggests an unexpectedly low persistence length of less than 30 nm for yeast chromatin. Finally we show that the Rouse model is also relevant to analyze chromosome motion in mutant cells depleted of proteins that bind to or assemble chromatin, and suggest that it provides a consistent framework to study chromatin dynamics. This study significantly advances our understanding of quantitative aspects of chromosome dynamics, and we discuss its implications for yeast genome architecture.

INTRODUCTION

Chromosome higher order architecture has been increasingly studied over the last decade thanks to technological breakthroughs in imaging and in molecular biology ranging from painting single chromosomes in fixed cells (Cremer and Cremer 2001) to mapping physical interactions between genomic elements at the genome-wide level (Hi-C) (Dekker 2008b). It is now established that chromosome large scale organization plays important roles in all aspects of genomic transactions, allowing contact between distant chromatin loci (Göndör and Ohlsson 2009) that trigger concomitant genomic processes in *cis* and in *trans*. Although several models have been proposed to describe the folding of chromosomes (Lieberman-Aiden et al. 2009; Bohn and Heermann 2010; Bancaud et al. 2012), the physical principles governing this organization are still largely debated.

Despite its small size, budding yeast has become a unique model that recapitulates some of the main features of higher eukaryotes, including heterochromatin-like regions, and an organization mediated by the nuclear envelope (NE), the nucleolus, and the spindle pole body (SPB). Structural data obtained by statistical positioning of a gene in a yeast cell population led to a surprisingly simple model to define yeast nuclear architecture (Zimmer and Fabre 2011): chromosome position can be predicted by few parameters such as genomic arm length, telomeres (TEL), and centromeres (CEN) tethered to the NE via nuclear-envelope-tethered proteins and to the SPB via microtubules, respectively (Bystricky et al. 2005; Therizols et al. 2010; Zimmer and Fabre 2011). This description was recently complemented by the first Hi-C comprehensive maps (Rodley et al. 2009; Duan et al. 2010; Gehlen et al. 2012), which confirmed an organization guided by nuclear landmarks, including TEL that congregate in foci (Gotta et al. 1996; Schober et al. 2008). Recent molecular dynamics simulations confirmed this structural model by recapitulating Hi-C and imaging

data, assuming that physical tethering at TEL and CEN and volume exclusion were driving chromosome conformations (Tjong et al. 2012; Wong et al. 2012).

The large spatial fluctuations of chromosome loci inferred from particle tracking in living yeast suggested a highly dynamic character of chromosome architecture at the molecular level (Marshall et al. 1997; Heun et al. 2001). Chromatin dynamics appeared to be determined by nuclear constraints, in particular the NE (Heun et al. 2001; Bystricky et al. 2004), and by the position along the chromosome, e.g. TEL (Bystricky et al. 2005) . Furthermore, a large body of data provides information on spatio-temporal dynamics in wild type vs. mutant cells (see e.g. (Bystricky et al. 2005)) and elucidates how chromatin properties are regulated by structural proteins. However the quantitative analysis of these movements remains controversial, and essentially two models have been used: (i) chromatin segments were suggested to undergo normal Brownian fluctuations at small time scales, and to be confined in regions of $\sim 0.3 \mu\text{m}^2$ at time scales longer than ~ 100 s (Marshall et al. 1997); or (ii) the movement of GAL genes on chromosome II appeared to follow an anomalous behavior characterized by a diffusion coefficient of ~ 0.4 (Cabal et al. 2006). This anomalous behavior was also detected in bacteria (Weber et al. 2010) and thoroughly studied using polymer models. In yeast the narrow temporal range of measurements within less than two decades were insufficient for a truly quantitative analysis of chromatin dynamics.

Here we develop high-speed live cell imaging and high-throughput image analysis techniques to monitor the spatio-temporal fluctuations over an extended temporal range spanning more than 4 decades (10^{-2} to 10^3 s) of 9 chromosome loci on chromosomes III, IV, XII, and XIV of the yeast *S. cerevisiae*. We show that chromatin segments move sub-diffusively, and that the characteristics of the anomalous response are largely conserved for every locus distant by more than ~ 50 kb from TEL and CEN. Similar dynamic behavior was also observed for two telomeric loci whenever they adopt a central localization in the nucleus,

thus leading to a consistent picture for chromosome movement within the entire nuclear volume. We then demonstrate that these dynamics are consistent with the Rouse model using molecular dynamics simulations and statistical analysis of the trajectories, and suggest that chromatin is a flexible polymer in yeast, characterized by a persistence length of less than 30 nm. Finally we show that the Rouse model is also relevant in mutants for proteins involved in chromatin structure, and propose that this model defines a consistent framework to study chromosome motion. Our findings significantly advance the quantitative understanding of chromosome dynamics and their implications for yeast genome architecture.

RESULTS AND DISCUSSION

The dynamics of chromosome loci are uniform throughout the nucleus and anomalous over a broad temporal range

We assayed the dynamics of chromatin in a collection of yeast strains each bearing a single fluorescently-labeled chromatin locus (see methods for details). The labels were inserted on chromosomes III, IV, XII, and XIV at loci distant from TEL and CEN (Fig. 1 and Fig. 2A). The chromosomes tested ranged in size from 300 kb to 1500 kb, which is well-suited to assess whether the dynamics are affected by chromosome length. Motion was analyzed over a temporal range spanning more than four decades (15 ms to 400 s, Fig. 2B). This broad temporal analysis is more than 2 orders of magnitude larger than in previous studies performed in living yeast (Heun et al. 2001; Bystricky et al. 2004; Cabal et al. 2006) or in bacteria (Weber et al. 2010), and investigations on similar time domains were only conducted in mammalian cells for telomere dynamics (Bronstein et al. 2009). The motion of chromosome loci was recorded using a bright field microscope, and analyzed using a

customized high-throughput tracking software based on the Multiple-Target Tracing algorithm ((Sergé et al. 2008); J.M. and A.B. in preparation and Supplementary Fig. S1). Because physical tethering of chromosomes may occur at the nuclear periphery (Heun et al. 2001; Hediger et al. 2002), the nucleus was divided into two regions of equal surfaces, and every tracked locus was automatically assigned to a central or peripheral localization based on the segmentation of the first image of the acquisitions (see image in Fig. 1).

We first focused on loci located in the nuclear center, far from constraints imposed by the nuclear membrane, and representing ~60 % of the observed positions (Fig. 2A). We then characterized their motion by plotting the temporal evolution of the mean square displacement (MSD), which describes the average displacement after a given time lag τ .

$$MSD(\tau) = \langle (\vec{r}(t + \tau) - \vec{r}(t))^2 \rangle \quad (1)$$

with \vec{r} the position vector, and $\langle - \rangle$ denoting the temporal average. We observed similar responses for every locus (data points in Fig. 2B), which appeared to fold onto a single master curve (solid line). This curve follows an anomalous diffusive behavior over a broad temporal range characterized by a power-law scaling response in t^α with $\alpha=0.52\pm 0.08$ ($\alpha=1$ for normal diffusion). This result is consonant with an earlier study describing the motion of GAL genes, which exhibited a non linear MSD response characterized by an exponent of ~0.4 in the temporal range of 4 to 80 s (Cabal et al. 2006), but it departs from other contributions showing normal diffusion and a plateau in the long time limit (see e.g. (Heun et al. 2001)). The anomalous sub-diffusion response is associated with a slow increase in MSD over time. Its persistence over a broad time domain indicates that chromatin loci explore a broad region of the nucleus of $\sqrt{0.2 \mu m^2} \sim 450$ nm in ~400 s. This estimate is consistent with the extent of “gene territories” of ~500 nm, which are obtained by statistical mapping of the position of loci in cell populations of ~2000 individuals (Berger et al. 2008).

Next we studied the motion of chromosome loci located at the periphery, and observed that they frequently roamed from the center to the periphery in the time course of the acquisition (Supplementary Fig. S1), suggesting that the localization classification based on a single image is somewhat artificial, as was also shown by others (Gasser 2002). We did not detect significant differences in the MSD response for peripheral or central localization for the three loci on chromosome XII (see e.g. position 240 kp in Fig. 2C) and on chromosome IV and XIV (not shown), so the anomalous diffusive response appears to be largely conserved and appropriate to describe chromosome segmental dynamics for loci distant by more than ~50 kb from TEL and CEN.

The dynamics of telomeres are anomalous in a central localization

In yeast, the 32 TEL tend to cluster near the NE, and the motion of tagged chromosome sites in the vicinity of a TEL is constrained (Heun et al. 2001; Sage et al. 2005). Using our reference behavior for chromosome loci located halfway between chromosome arms, we set out to perform an MSD analysis on TEL 3R and 14L (Fig. 1; hereafter denoted Tel3R and Tel14L). Though TEL predominantly accumulate near the periphery (Fig. 3A, right panel), their positioning in the nuclear center can be detected with an occurrence of ~30%, and we analyzed their dynamics in this central region. The amplitude of spatial fluctuations in the short time regime appeared to be relatively similar in comparison to the reference response (Fig. 3A), although Tel3R appeared to be slightly less mobile after ~10 s than Tel14L, presumably because telomeric interactions between the two ends of chromosome XIV are much less frequent than that of chromosome III (Bystricky et al. 2005; Duan et al. 2010).

In contrast to the bulk of chromosomes, telomere dynamics appeared to be reduced at the nuclear periphery (Fig. 3B), in agreement with the idea that telomere peripheral localization is mediated by protein interactions involving among others *SIR4* and *YKU70/YKU80* (Hediger et al. 2002; Taddei et al. 2004; Bupp et al. 2007; Schober et al. 2009). It has been shown that deletion of either *YKU70* or *SIR4* leads to delocalization of some TEL to the nuclear center (Laroche et al. 1998; Hediger et al. 2002), but it remains unclear whether this deletion affects TEL dynamics aside from chromosome III (Bystricky et al. 2009). We thus investigated the movements of Tel14L in wild-type and in *SIR4* mutant strains. Deletion of *SIR4* leads to a predominant localization of Tel14L in the center (62%), presumably associated with a loss of anchoring to the nuclear membrane. Moreover telomere mobility is increased in *SIR4* mutant strains when the tagged locus resides at the periphery and even more drastically at the nuclear center (Fig. 3B), confirming that physical interactions of the extremities of chromosomes are an essential player of their spatio-temporal dynamics. Overall this study tends to support the proposition of uniform fluctuations throughout the nucleus for chromatin loci provided that they are sufficiently distant from anchoring regions.

Chromosome segmental dynamics are consistent with the Rouse model

To interpret our results with a polymer model, we make the assumptions that chromosome conformation and dynamics are mainly determined by (i) the permanent tethering of CEN to the SPB and the more transient attachment of TEL to NE (Zimmer and Fabre 2011), and (ii) the level of crowding mediated by chromosomes and nuclear proteins. Crowding is expected to screen out hydrodynamic effects, which otherwise induce long range interactions in between chromosome segments (Doi and Edwards 1988), so that nearest-neighbor elastic interactions between consecutive chromosome segments dominate their local

dynamics. This approximation, which leads to the ‘‘Rouse’’ regime (Rouse 1953), has been extensively documented for concentrated solutions of synthetic polymers (see e.g. (Ewen and Richter 1997)), and was recently validated *in vivo* for the bacterial chromosome (Weber et al. 2010).

Chromosomes are modeled by a Rouse chain, which is composed of a series of N elastic segments of length b . The motion of each bond is determined by its elasticity defined by the stiffness $3k_B T/b^2$ with $k_B T$ the thermal energy, and its viscous drag ζ . Assuming that chromosomes are tethered at CEN and TEL, the MSD of monomers can be solved analytically in the short time regime (see Model section):

$$MSD(\tau) \sim \left[\frac{12b^2 k_B T}{\pi \zeta} \right]^{1/2} \tau^{1/2} \quad (2)$$

The Rouse segmental dynamics is characterized by an anomalous diffusive response uniform along the chain, in good agreement with our data. We wished to test the predictions of the Rouse model further by extracting the histogram of the displacement after a time lag of 0.18, 1.0 and 1.6 s from the trajectories of locus 240 on chromosome XII (Fig. 4A). The histograms were first fitted with a normal diffusion model (Fig. 4A, left panel and equation in inset), which relies on one fitting parameter, the diffusion coefficient D . The diffusion coefficient of 4.8, 2.2, 1.8 $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ was very different for $\tau=0.18, 1.0, \text{ and } 1.6$ s, respectively, showing the inconsistency of this model. We then used the formalism described in (Gu erin et al. 2012) to compute the histogram of the displacement for a Rouse chain tethered at its extremities (see expression in Model section). One single parameter was sufficient to reproduce the three distributions (Fig. 4A, right panel), and the quality of the fitting was significantly improved (note the departure of the red fit from the conventional

model), hence strongly supporting the relevance of the Rouse model to describe the segmental dynamics of yeast chromosomes.

We then performed molecular dynamics simulations (MD) of yeast chromosome dynamics in a nuclear geometry consistent with yeast size, and using the structure derived from Hi-C experiments as the initial state (Duan et al. 2010). We assumed that chromosomes were attached to the SPB at their CEN (*i.e.*, neglecting the contribution of microtubules connecting SPB to kinetochores), and freely diffusing at their TEL (chromosome III is represented in the left panel of Fig. 5B). The computed MSD for loci distant from CEN (>400 nm; blue dataset in the right panel of Fig. 5B) reproduced our the anomalous diffusive response associated to a power-law scaling of ~ 0.54 over a temporal domain of four orders of magnitude that we observed experimentally (dashed line in Fig. 5B, right panel). The motion is more restricted for segments located at 10-100 nm from the CEN (pink dataset) *vs.* at a distance comprised between 200-400 nm (red dataset). In addition, superposing the conformations of chromosome III during 10^6 time steps shows an elongated state of diameter ~ 300 nm. This conformation is associated with volume exclusion between chromosomes (see also Supplementary Fig. S4B), an effect that was recently shown to be a key parameter of yeast nuclear architecture (Tjong et al. 2012). We thus conclude that the dynamics of chromosome loci in living yeast are accurately described by the Rouse model.

MSD fluctuations suggest that chromatin is highly flexible

The level of flexibility of a chromatin fiber remains controversial. *In vitro* single molecule experiments have shown that the persistence length l_p of nucleosome arrays is 20-30 nm (Cui and Bustamante 2000; Bancaud et al. 2006; Celedon et al. 2009; Kruithof et al. 2009). Conversely, analyses based on polymer models of *in vivo* distance measurements or

Hi-C experiments (Bystricky et al. 2004; Dekker 2008a; Tjong et al. 2012) provided estimates of ~ 200 nm and 66-134 nm, respectively. Physical modeling of the mechanical properties nucleosome arrays predicts a persistence length smaller than 30 nm for chromatin (Ben-Haïm et al. 2001; Schiessel et al. 2001), except in the case of highly ordered arrays with strong nucleosome-nucleosome interactions (Wedemann and Langowski 2002), in which case l_p increases to ~ 250 nm.

The amplitude of spatial fluctuations can be qualitatively linked to the flexibility of chromatin using the Rouse model, given that the bond length b and the viscous drag coefficient ζ are equal to $2l_p$ and $6\pi\eta l_p$ with η the viscosity, respectively (de Gennes 1979). The viscosity of the nuclear space is assessed by e.g. measuring the diffusion coefficient of GFP, which is $\eta \sim 7 \pm 3 \cdot 10^{-2}$ P in living yeast (Kawai-Noma et al. 2006; Slaughter et al. 2007). The MSD response can then be predicted for a persistence length comprised between 50 and 200 nm. This conjecture exceeds our measurements by a factor of 10 to 20 (dashed lines in Fig. 5A). In contrast, fitting of our data with the Rouse model leads to an amplitude of the MSD of $1.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}^{-1/2}$ (solid line in Fig. 5A), suggesting that the persistence length of chromatin in living yeast is ~ 5 nm. This length scale corresponds to the typical dimension of a single nucleosome. Hence the analysis of chromosome motion suggests that chromatin is a flexible polymer *in vivo*.

Because the Rouse model is a simplified model that does not take volume exclusion between monomers into account, we wished to strengthen our conclusions by running molecular dynamics simulations (MD) of a single chain composed of self-avoiding segments (see model section). The extracted MSD shows an anomalous diffusive response, as well as the dependence on the persistence length and the viscous drag (Eq. (2)) expected from the Rouse model (Fig. 5B). This analysis showed that the numerical prefactor of Eq. (2) is underestimated by 1.4, suggesting that volume exclusion enhances the rate of spatial

exploration. This difference implies that the persistence length of ~5 nm is overestimated, and a correct estimate may be as small as ~3 nm. This length scale, which is comparable to the DNA diameter, is unrealistic and points to the existence of a parameter underappreciated in our model.

Each MSD curve represented in Fig. 2B is the average response over a population of ~100 cells. The clonal variability of the spatio-temporal dynamics is not shown in this graph, although this variability is large, as inferred from the distribution of average displacements after a time lag of 0.1, 0.6, and 4.0 s for ~70 loci on chromosome XII (position 830, Fig. 5C). Because the difference between the average and the maximal or minimal MSD is about three-fold, this variability is unlikely related to changes in persistence length, which should vary over two orders of magnitude from 0.3 to 30 nm. We rather suggest that this variability is associated with the existence of dynamic chromosomal contacts, as previously indicated in e.g. the dynamic random loop model derived to interpret distance measurements in human cells (Mateos-Langerak et al. 2009). Dynamic and random contacts should transiently restrict spatial exploration (Supplementary Fig. S5), reduce the effective diffusion of a genomic site over a population average, and hence lead to an apparent persistence length smaller than chromatin intrinsic properties. We also propose that chromosome loci with maximal mean square displacements in the short time regime represent the “interaction-free” limit, because their motion is not hindered by distant contacts. Given that the difference between the average and the maximal MSD is less than three-fold (Fig. 5C), we can calculate an upper limit for the persistence length of $3^2 \times 3 \text{ nm} < 30 \text{ nm}$. Consequently our study shows that nuclear exploration by chromosome loci is slow and presumably hindered by contacts between chromosomes. Nevertheless, chromatin appears to be a flexible polymer characterized by a persistence length smaller than 30 nm.

Chromatin structural proteins alter chromosome mobility

Finally we investigated whether the dynamics of chromosomes was altered in the absence of chromatin structural proteins or chromatin assembly proteins. We first considered the HMG-like protein Spt2 in *S. cerevisiae*, which interacts with the histones H3 and H4 (Horn et al. 2002). The statics and the dynamics of one locus on chromosome XIV were assayed in WT and mutant *spt2* cells, showing an accumulation at the periphery for the mutant and similar MSD responses in the short time regime (Fig. 6, right and left panels, respectively). We then performed the same analysis with Hho1p (Levy et al. 2008), which is considered as the linker histone analog in *S. cerevisiae*, though its structure differs from linker histone in other organisms because it bears two globular domains. So far it remains unclear whether and how this protein participates in chromatin condensation. The deletion of *hho1* increases the proportion of spots detected in the nuclear center compared to wild type, and increases ~1.5-fold the amplitude of chromatin loci displacements (Fig. 6). Given that the ratio Hho1p vs. nucleosome remains poorly estimated (comprised between 1:37 to 1:4 (Freidkin and Katcoff 2001; Downs et al. 2003)), this enhanced dynamics may be associated with the reduced frequency of chromosome interactions mediated by the two domains of Hho1 and/or with an onset in flexibility due to conformational changes at the nucleosome level. Finally, we probed the role of the nucleosome assembly chaperone Asf1, which is involved in replication-dependent and replication-independent chromatin assembly (Loyola and Almouzni 2004). As for *hho1*, the labeled locus appeared to be more frequently central than in wild type nuclei, and its mobility was 2.2-fold increased. The Rouse model therefore seems to account for the dynamics of chromosome loci in WT cells, as well as in *hho1*, *asf1* and *spt2* mutants, suggesting that this approach is sufficiently generic to perform systematic motion analyses.

CONCLUSION

The dynamics of 9 chromosome loci in living yeast were homogeneous over a broad spatial domain of more than 4 orders of magnitude. We show that our data are consistent with the Rouse model, in which the amplitude of spatial fluctuations increases with the square root of the polymer persistence length. This prediction may seem counter-intuitive, because the diffusion coefficient of an isolated tracer is inversely proportional to its diameter, so spatial exploration is accelerated as the size of the particle decreases. Conversely the persistence length is the characteristic dimension for the diffusive properties of a polymer locus, because thermal fluctuations induce random displacements for every segment of the chain. Fitting population averaged MSD data with the Rouse model suggests that the persistence length is overly small, and thus propose that dynamic interactions between chromosomes account for this data. Chromosome interaction properties can be studied by tracking multiple loci on the same chromosome arm and distant from TEL and CEN by monitoring differences in MSD response as a function of the genomic distance. MD simulations will further support this analysis, enabling to extract the frequency and the duration of contacts, and also providing insights that cannot be assessed by molecular biology techniques such as Hi-C.

Irrespective of the value of the persistence length, the Rouse dynamics imply that chromosome segments search for target sites by compact exploration (de Gennes 1982), meaning that they systematically visit neighboring sites as they look for targets during repair or transcription activation. This diffusive mechanism is expected to be particularly efficient for creating specific chromosomal interactions over distances smaller than ~300 nm, given that the corresponding volume is explored in ~1 minute (see Fig. 2B). At larger length scales it would be interesting to evaluate by MD whether and how compact exploration is related to chromosome territoriality in the yeast genome, whether it is absent as suggested by the

observation that broken ends of chromosomes are free to search the entire genome for appropriate partners (Haber and Leung 1996), or partial as telomere colocalisation and coordinated movement would indicate (Bystricky et al. 2005).

Our model of chromosome segmental dynamics determined for yeast chromosomes may be relevant for metazoan genomes. The folding of interphase chromosomes involves loops of variable sizes defining topological domains of 0.2 to 5 Mb (Nora et al.; Sexton et al. 2012). These loops can be described as end-tethered chromosome fragments, suggesting that our model can be applied to higher-order eukaryotes. This model was recently implemented in molecular dynamics simulations (Bohn and Heermann 2010), showing that the dynamics of loop formation may interfere with the segmental dynamics of human chromosomes, an hypothesis that remains to be tested quantitatively *in vivo*.

MODEL

Dynamics

The motion of an end-tethered Rouse chain can be studied analytically using normal mode decomposition (Vandoolaeghe and Terentjev 2007), and the MSD of the n^{th} -segment (MSD_n) reads:

$$MSD_n(\tau) = \frac{4Nb^2}{\pi^2} \sum_{p=1}^{\infty} \frac{1}{p^2} \left(1 - e^{-\tau/\tau_p}\right) \sin^2\left(\frac{p\pi n}{N}\right) \quad (3)$$

with τ_p the relaxation time of each mode $\tau_p = \tau_R/p^2$ and $\tau_R = L^2\zeta/3\pi^2k_B T$ the Rouse time identified as the longest relaxation time of the chain. Note that this equation is valid in 3D, and its 2D version is readily obtained with a multiplication by 2/3 assuming that the motion is

isotropic. The temporal evolution of the MSD is plotted in Supplementary Fig. S4As). In the short time limit ($\tau \ll \tau_R$), equation (3) is dominated by the terms with large p , and it can be simplified to obtain Equation (2) given in the main text. In addition, the formalism described in ((Guérin et al. 2012); see details in Supplementary Materials) enables to extract the distribution of the displacement R for the n^{th} segment after a time lag τ :

$$P_n(R, \tau) = \frac{R}{\Psi_n(\tau)} \exp - \left\{ \frac{R^2}{2\Psi_n(\tau)} \right\} \quad (4)$$

$$\Psi_n(\tau) = \frac{2b^2}{N} \sum_{p=1}^N \sin^2 \left(p \frac{n\pi}{N+1} \right) * \left\{ \frac{1 - \exp \left(-\frac{2\zeta b^2 \tau}{k_B T} [1 - \cos \left(p \frac{\pi}{N+1} \right)] \right)}{1 - \cos \left(p \frac{\pi}{N+1} \right)} \right\} \quad (5)$$

The movements of chromosomes, which were modeled by a series of bead linked by springs or ball-in-socket joints, was also analyzed by MD. The size of each bead was set to 15 nm in diameter, and it was assumed to contain ~ 3 nucleosomes, so that the full genome consists of 27,000 beads. Chromosomes were constrained in a sphere of 2 μm in diameter, and the CEN were fixed to the SPB using harmonic constraints. We used the Langevin dynamics algorithm implemented in the NAMD software (Phillips et al. 2005) with an appropriate in-house force field. The Langevin equation for the n^{th} monomer has the form:

$$m_n \frac{d^2 x_n}{dt^2}(t) = -\text{grad}_{x_n} E + f_n(t) - m_n b_n \frac{dx_n}{dt}(t) \quad (7)$$

where the random force $f_n(t)$ is derived from a Gaussian distribution with the properties:

$$\langle f_n(t) \rangle = 0 \quad (8)$$

$$\langle f_n(t) f_n(0) \rangle = 2k_B T \zeta m_n \delta(t) \quad (9)$$

with ζ the friction coefficient. The energy E of each bead is the sum of three contributions associated to the confinement in the nucleus, the elasticity of the chain, and the repulsive interactions between monomers, which are expressed as:

$$E = E_{conf} + E_{spring} + E_{VdW} \quad (10)$$

$$E_{conf}(r < r_1) = 0 \text{ and } E_{conf}(r > r_1) = E_1(r - r_1)^4 \quad (11)$$

with r the distance of the bead to the center of the nucleus, and r_1 the radius of the nucleus.

$$E_{spring}(n, n + 1) = k_s(r_n - r_{n+1})^2 \quad (12)$$

$$E_{VdW}(i, j) = U \left\{ \left(\frac{R_{min}}{|r_i - r_j|} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min}}{|r_i - r_j|} \right)^6 \right\} \quad (13)$$

The parameters of this model can be found in Table 1. MD were run during $3 \cdot 10^7$ time steps, starting from the conformation obtained by Hi-C (Duan et al. 2010) equilibrated during 10^6 time steps. We also performed MD to investigate whether spatio-temporal fluctuations were different for 1, 4, or 10 segments, or for one segment of large diameter along the chain. We did not detect differences on the MSD response (not shown), in agreement with our observation of similar dynamics with Lac or Tet labeling, which measure ~ 10 and 7 kb in length, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and strains:

All the strains we used are described in the Supplemental table 1.

Cell culture

Cells were grown in YPD or YNB at 30°C starting from a fresh overnight culture. They were diluted at 10^6 cells/ml, and harvested when OD600 reached $4 \cdot 10^6$ cells/ml and rinsed twice with the corresponding SC media. Cells were then spread on a SC media patch containing 2% agarose and 2% glucose coated slide. A coverslip was deposited over the cells, and the construction was finally sealed with “VaLaP” (1/3 vaseline, 1/3 lanoline, 1/3 paraffin). Live microscopy was limited to 20 minutes after mounting the coverslip. Extreme care was taken to ensure that cells are at approximately equal stages of growth based on their shapes, as inferred from a single image of transmission light microscopy, and based on the nucleus shape using the roundness parameter R that was defined as:

$$R = 4\pi \times \text{Surface} / \text{Perimeter}^2 \quad (14)$$

with *Surface* the number of pixels after segmentation of the nucleus, and *Perimeter* the outline in pixels (see Supplementary Fig. S2). We considered nuclei with $R > 0.8$ to avoid mitotic phenotypes.

Live cell imaging

Yeast cells were imaged at room temperature with a BX-51 upright microscope equipped with a laser diode (Lumencor), a 100X oil immersion objective (NA=1.4), and an EMCCD camera (Andor DU-897), as described in (Hajjoul et al. 2009). The excitation emission at 470 ± 10 nm was set to $7.53 \text{ W}/\mu\text{m}^2$, about 100 times less than the value which is necessary for normal cells growth (Carlton et al. 2010), and we observed consecutive rounds of divisions during ~2 hours (not shown). For slow acquisitions of inter-frame intervals of 1 s or more, we used a 100X oil immersion objective with a variable NA set to ~1.1-1.2. The acquisition was performed with a shutter synchronized with the camera to minimize photobleaching, and we checked for drifts by monitoring the position of the center of the nucleus in the first and last image of the recording. Optimal inter-frame intervals of ~20 ms

were reached by cropping regions of interest, and using a 2*2 binning with the Andor iQ imaging software. The loss in pixel size resolution was compensated with a 2X lens placed in the microscope light path.

We focused on 2D single particle tracking, and checked that similar information were retrieved with 3D tracking using micro-mirrors ((Hajjoul et al. 2009; Hajjoul et al. 2011), Supplementary Fig. S3). We note that 2D acquisitions may bias MSD responses for loci preferentially localized at the periphery, because in some cases central loci in the projected view may be peripheral in the 3D nucleus.

Data analysis

Video sequences consisted in 300 consecutive images, and we displayed MSD traces on 150 time intervals at most in order insure the statistical relevance of mean displacements. The movement of chromosome loci were systematically analyzed using a custom software that was developed in Matlab (Mathworks, Natick, MA; (Sergé et al. 2008). This software, which will be described in detail elsewhere, enabled us to extract (x,y) coordinates by Gaussian fitting, to reconstruct the trajectories, and to compute the MSD and the step distribution function. Note that the MSD in fixed cells was 20- to 30-fold lower than in living cells (not shown).

Acknowledgements: We thank the University Paul Sabatier for PhD fellowship funding (to JM). This work was partly supported by the ANR program JC08_341867, by the CNRS program PIR, and by the LAAS-CNRS technology platform, a member of the French Basic Technology Research Network. We are grateful to Nathalie Daigle for critical reading of the

manuscript. We are grateful to Charlotte Galimow for strain construction and initial characterization of gene position.

Author contributions: H.H., J.M. designed the study, performed data analysis; H.R. developed analytical models; I.G. provided new strains; J.M. performed molecular dynamics simulations; B.A. provided new strains; P.C., J.M.V. designed models; O.G., K.B. developed the manuscript; A.B. designed the study, developed models, and wrote the paper.

Figure 1: *Collection of loci used to monitor chromosome spatio-temporal dynamics.* Arrows indicate the genomic positions at which TetO or LacO repeats were inserted in 4 chromosomes. These loci are also represented by orange spheres on the yeast nuclear map obtained by Hi-C (Duan et al. 2010). The two purple circles represent the telomers that were tracked with the same labeling technique, and the green circles correspond to the centromere. The preferred localization of these loci was scored using a subdivision of the nucleus into two regions of equal surface (orange and green for central and peripheral localizations, respectively).

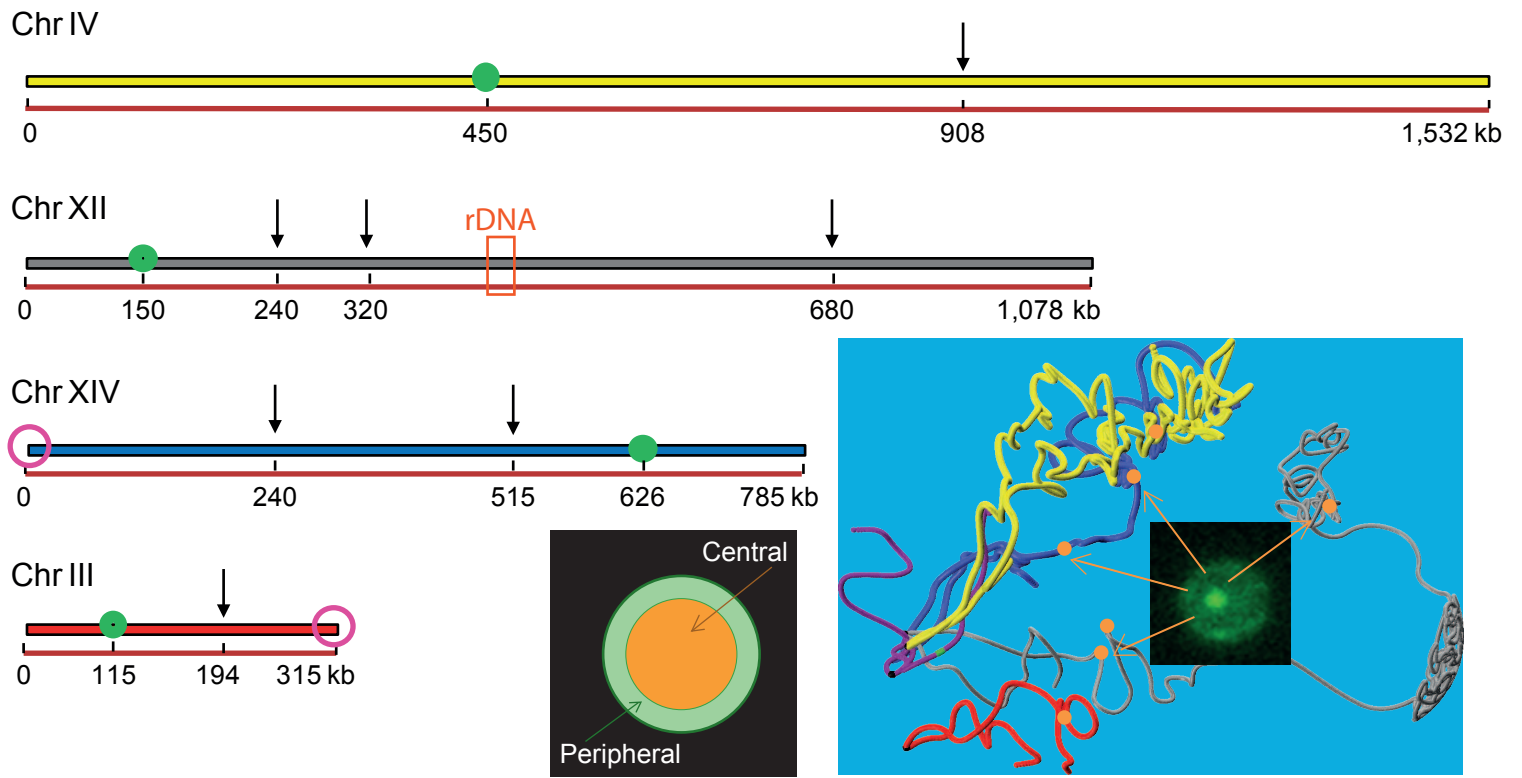
Figure 2: *Chromatin dynamics in living budding yeast.* (A) The upper panel shows fluorescence micrographs of different yeast strains for inter-frame intervals of 200 ms (for inter-frame intervals of 16 – 50 ms and mutants; see supplementary Fig. S2), and the lower plot represents the spatial distribution of these loci in the nuclear volume. (B) The temporal evolution of the MSD for 7 different chromatin loci with central localization is plotted over a broad temporal range covering more than 4 orders of magnitude. This data shows a universal behavior characterized by an anomalous diffusive response associated to power law scaling comprised between $t^{0.44}$ and $t^{0.6}$ (thin dashed lines). The black solid line corresponds to the Rouse regime, which is associated to an exponent of 0.5 (see details in Fig. 4). Note that each dataset is the average over 30-200 trajectories, and that we selected tracks with signal to noise ratios (SNR) larger than 30 dB. (C) The MSD response for loci with central or peripheral localization is compared (yellow and green datasets, respectively), showing similar dynamics. The black solid line represents the behavior measured in (B). The departure of the two curves in the short time regime is associated to the lower SNR of peripheral loci (not shown).

Figure 3: *Telomere dynamics in living budding yeasts.* (A) The left plot represents the MSD temporal evolution for telomere XIV-L and III-R with central localization (red and blue datasets). The black solid line represents the average response obtained in Fig. 2B. The plot on the right shows that telomere preferentially accumulate at the periphery (green and orange bars, respectively). (B) The left plot represents the comparison of the MSD response for telomere XIV-L at a central or peripheral localization in wild type cells (open yellow and green symbols, respectively), or in *sir4* mutant strains (crossed symbols) favoring a central localization of telomere XIV-L.

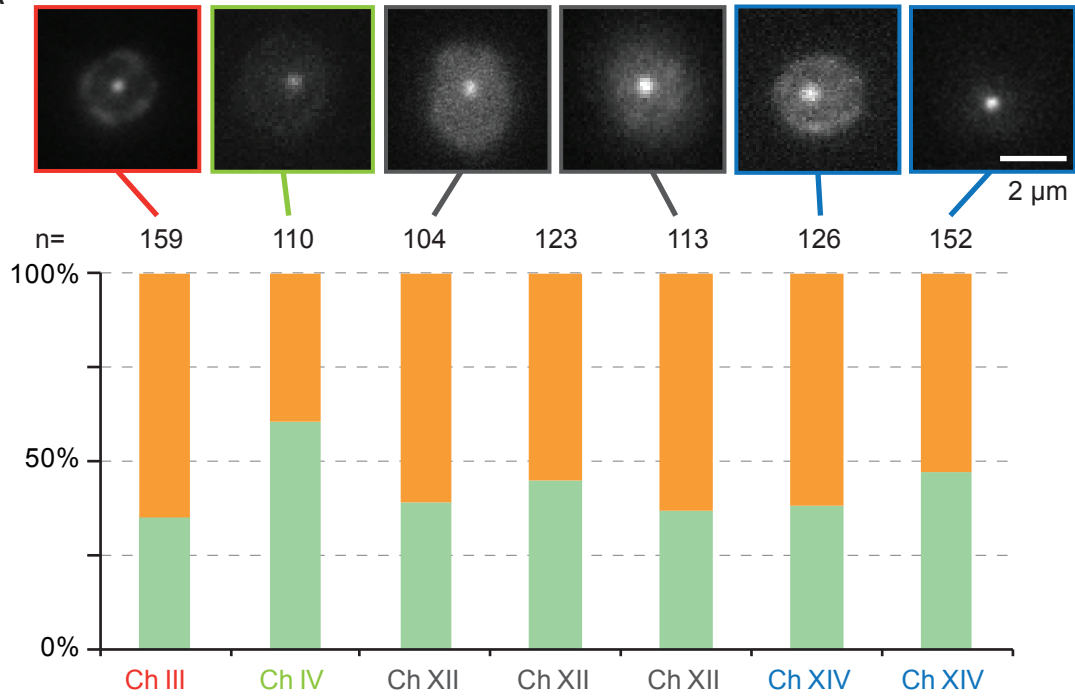
Figure 4: *Rouse model for chromosome segmental dynamics.* (A) The two graphs represent the step distribution functions measured for three different time intervals, which are represented by dashed lines in Fig. 2A. The genomic position of the locus on chromosome XII is 240 kb, and the inter-frame interval of the acquisition is 59 ms. Note the deviation of the distributions toward longer displacements for increasing time lags, which is consistent with the progressive exploration of the nuclear volume. The three curves are fitted to a normal diffusion model (equation in the inset), or an end-tethered Rouse model (Eq. 4-5) (left and right panels, respectively) (B) Molecular dynamics simulation was implemented with polymer chains and in a realistic yeast nucleus using the nuclear conformation obtained by Hi-C as initial state (Duan et al. 2010). Chromosomes are tethered at their centromeres (green spheres) and free at their telomeres. The figure in the left panel represents the orthographic projection of 100 conformations of chromosome III in the course of one simulation of 10^6 time points. The polymer is elongated, and its diameter is $\sim 300 \pm 50$ nm. The MSD is computed for loci localized near the SPB, or at 200-400 nm and more than 400 nm from this anchor (purple, red, and blue datasets, respectively), showing that the response follows Rouse dynamics (black dashed line) provided that the locus is sufficiently distant from CEN.

Figure 5: *Assaying chromatin flexibility from MSD analysis.* (A) The MSD response plotted in Fig. 2B is represented in gray, and analyzed with the Rouse model for different values of the persistence length of 200, 50, and 5 nm, as specified in the inset. The dynamics of chromosome loci are consistent with highly flexible of chromatin. (B) Molecular dynamics simulations of an isolated chain containing 100 segments have been performed to confirm the relevance of the Rouse model. Dimensionless variables are defined using l_p and $\eta l_p^3/k_B T$ as characteristic length and time scales, the MSD of a central monomer is plotted with different persistence lengths of 15, 30, 60, or 90 nm and for two different viscosities of 10^{-3} and 10^{-2} P (blue datasets). These datasets fall on a master curve, which follows the power law scaling of the analytical Rouse model: the black dashed line is derived from Equation (2) using the dimensionless variables (see exact expression in inset). (C) The histogram of the average square displacement after 0.1, 0.6, and 4.0 s is represented for ~ 70 loci on chromosome XII (position 680), with a broad cell to cell variability within a single clone. The lines are Gaussian fits and serve as guides to the eye.

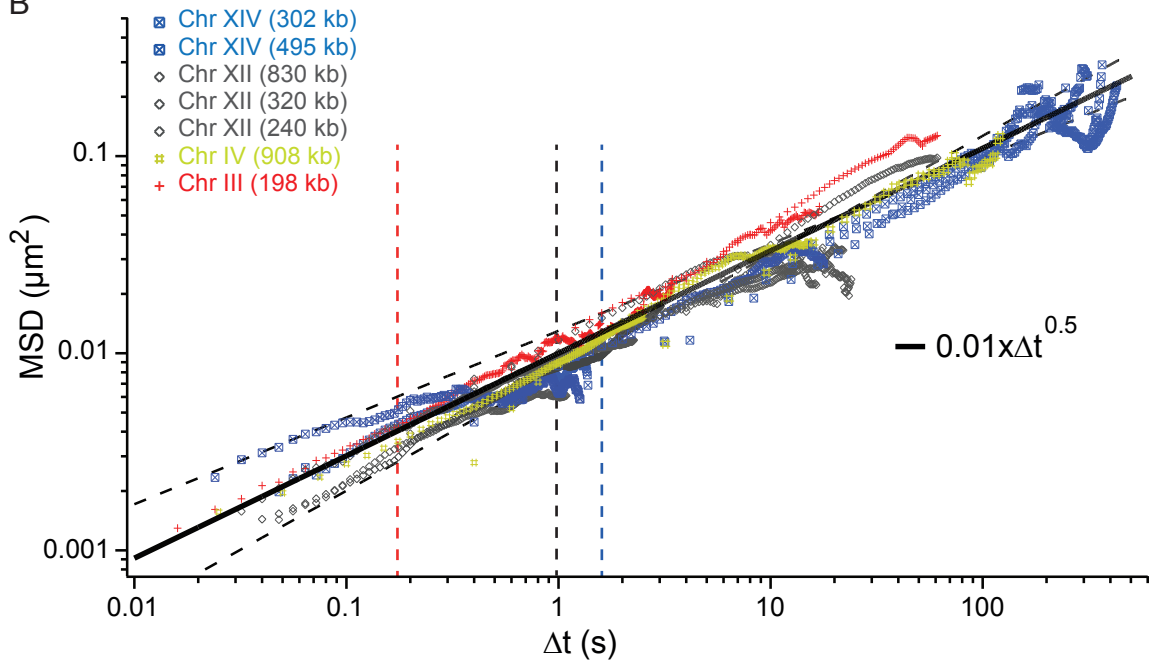
Figure 6: *Chromatin structural/modifying proteins and chromosome dynamics.* The left plot represents the MSD temporal evolution for a locus on chromosome XIV, genomic position 240 kb. The wild type situation was identical to the Rouse response described in Fig. 3A, and it is represented by the black solid line. The dynamic response obtained in *hho1*, *asf1* and *spt2* mutant yeast is represented by red, blue, and purple symbols, respectively. The two dashed lines represent fits to the data with the Rouse model. The plot in the right shows that *Asf1* and *Hho1* participate in the nuclear localization of the tagged locus (the yellow and green bars correspond to central and peripheral localizations, respectively).



A



B



C

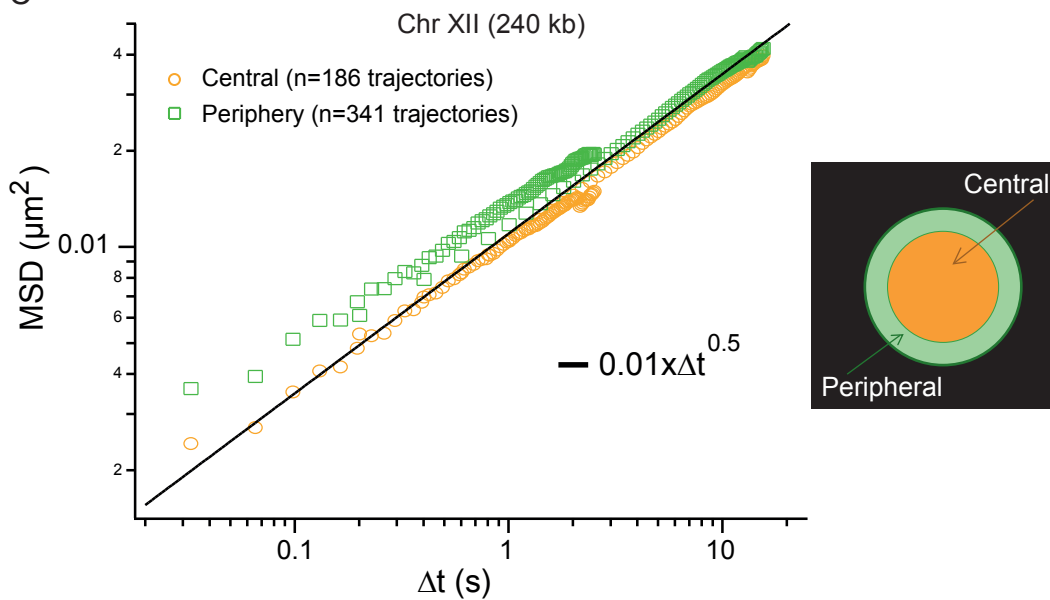


Figure 3

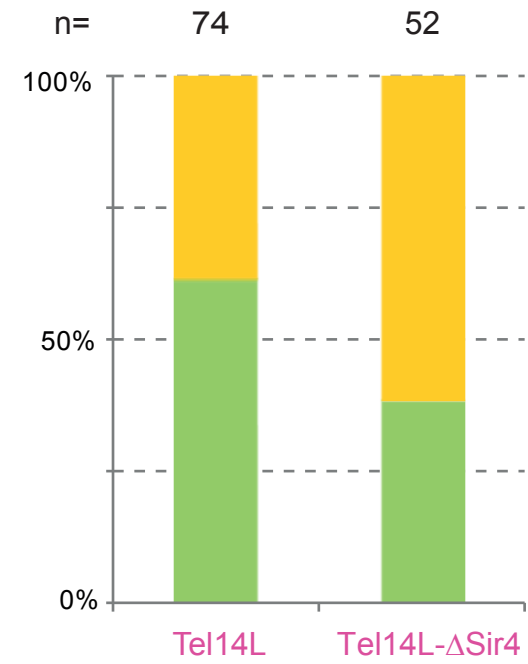
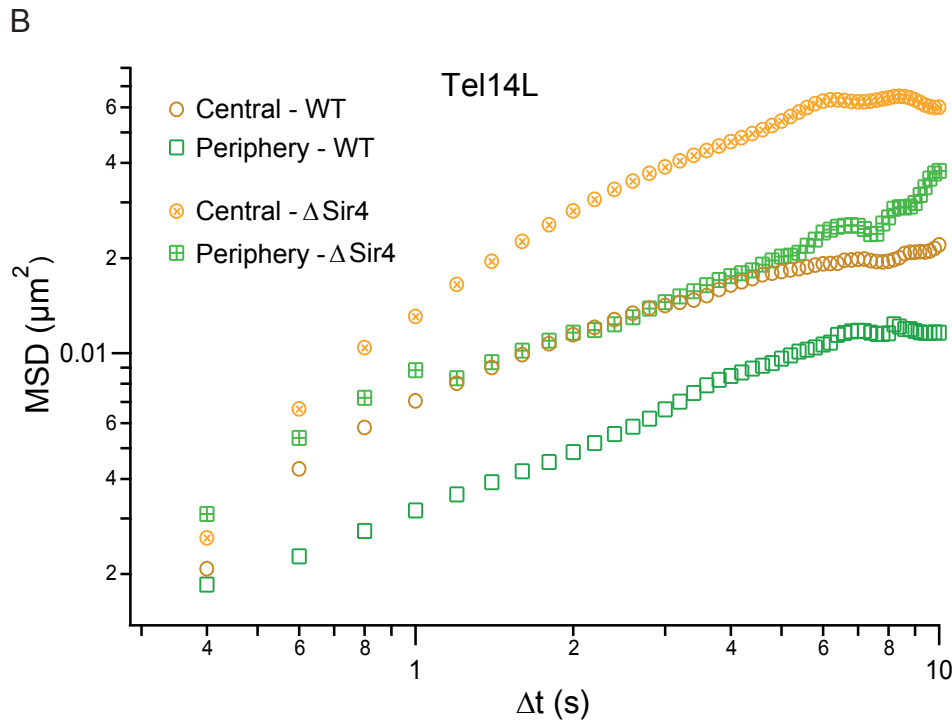
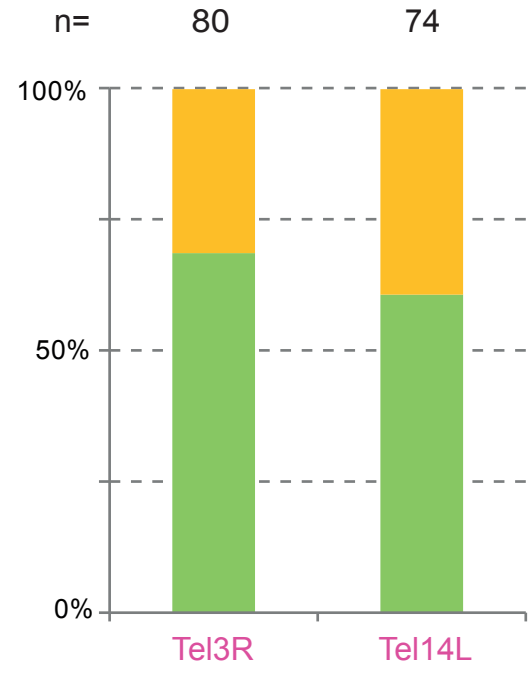
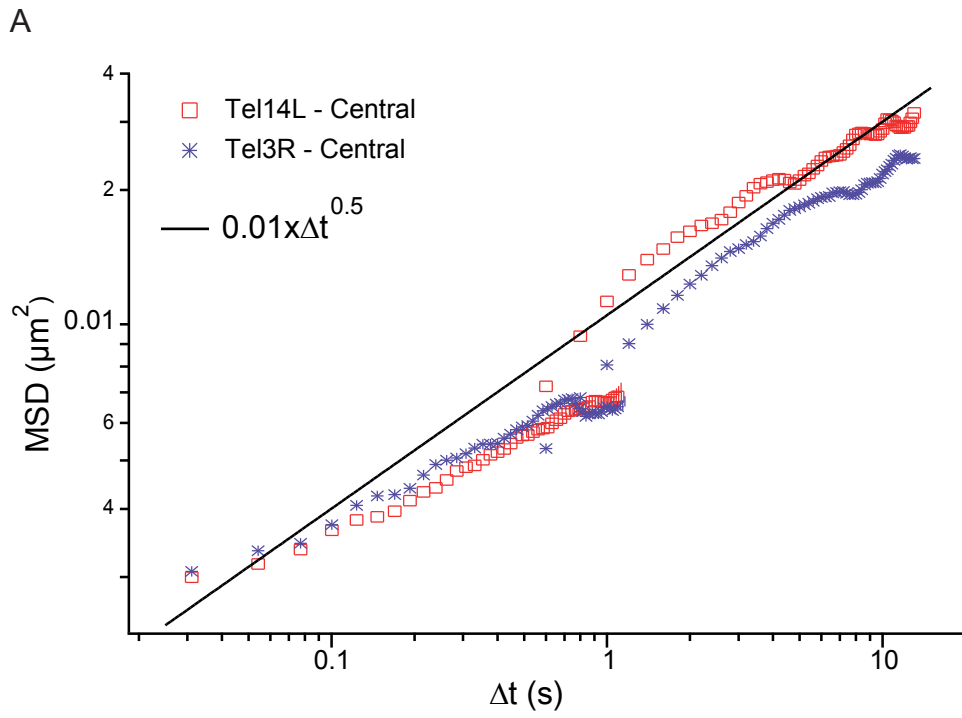
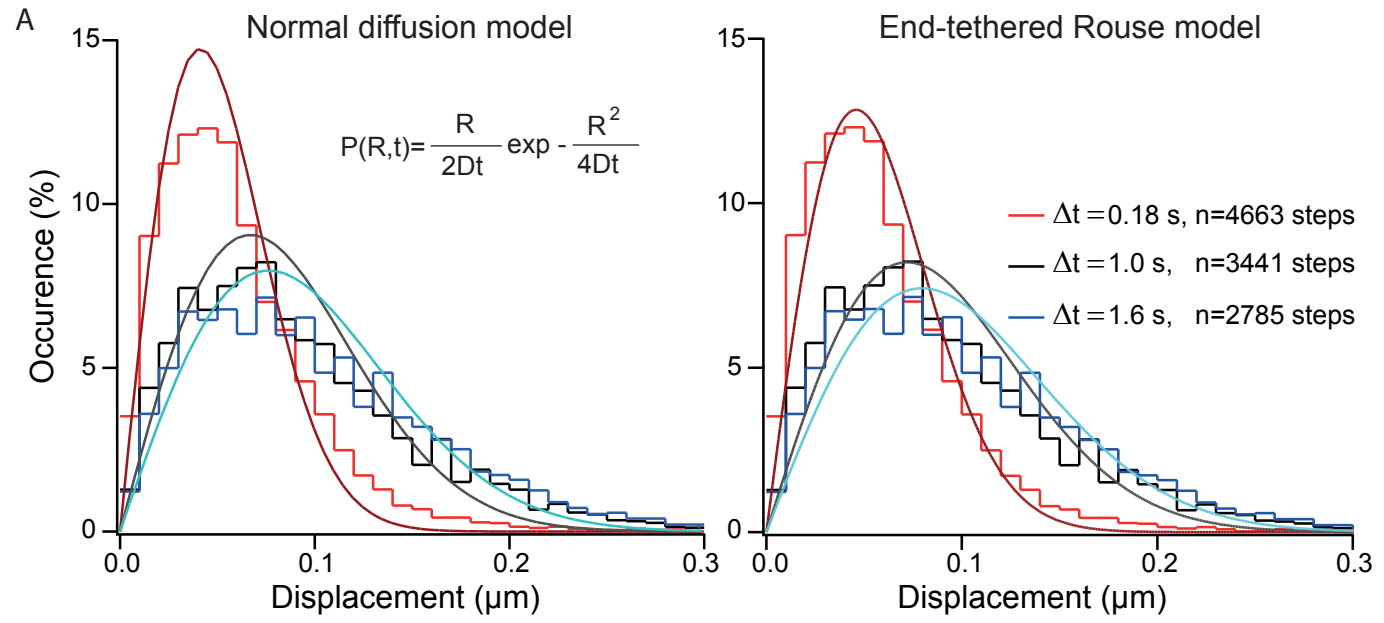


Figure 4



B

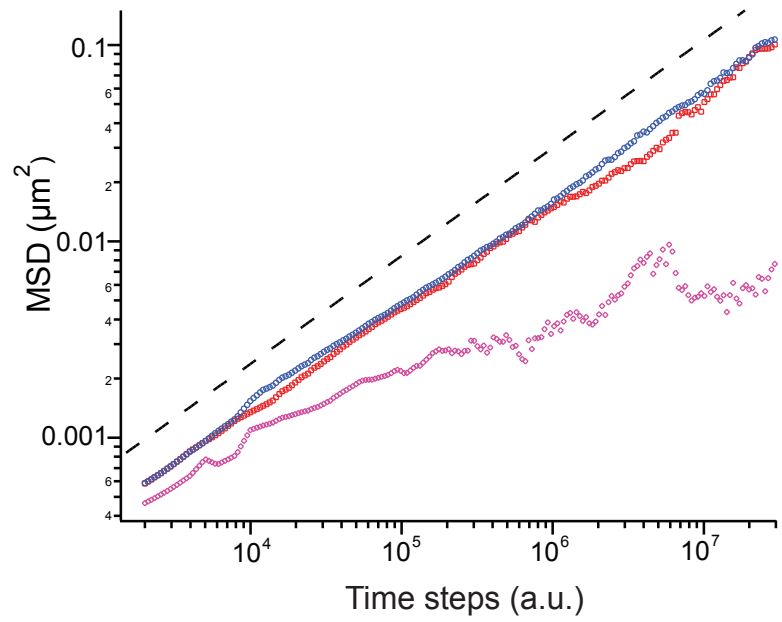
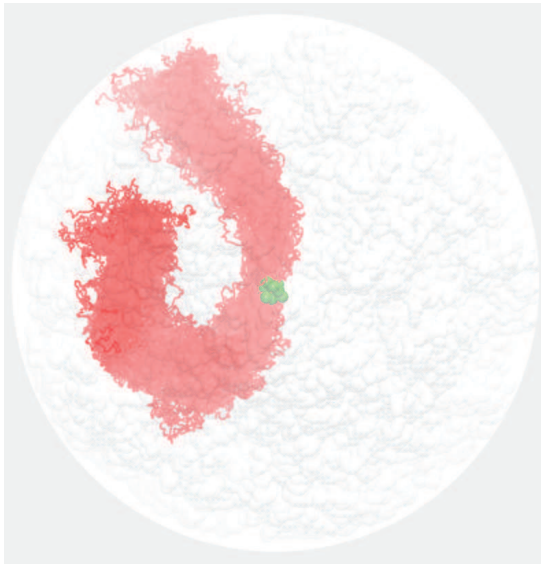


Figure 5

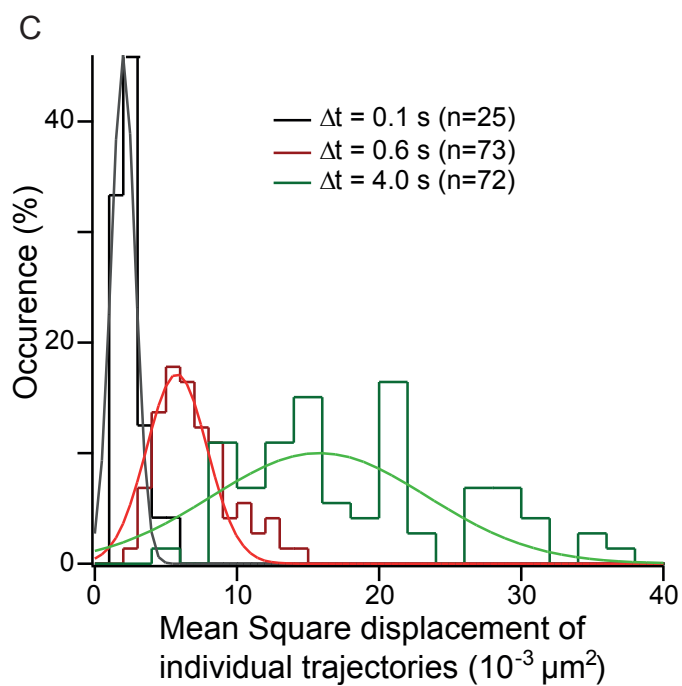
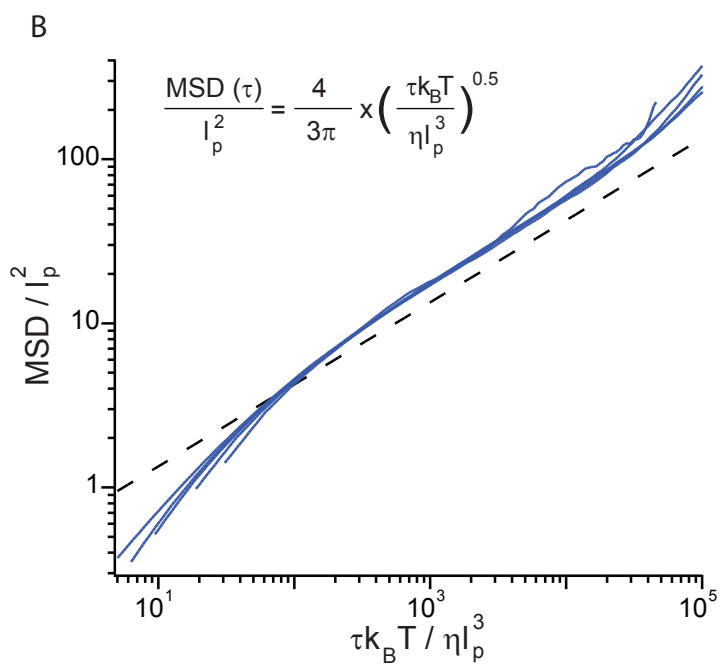
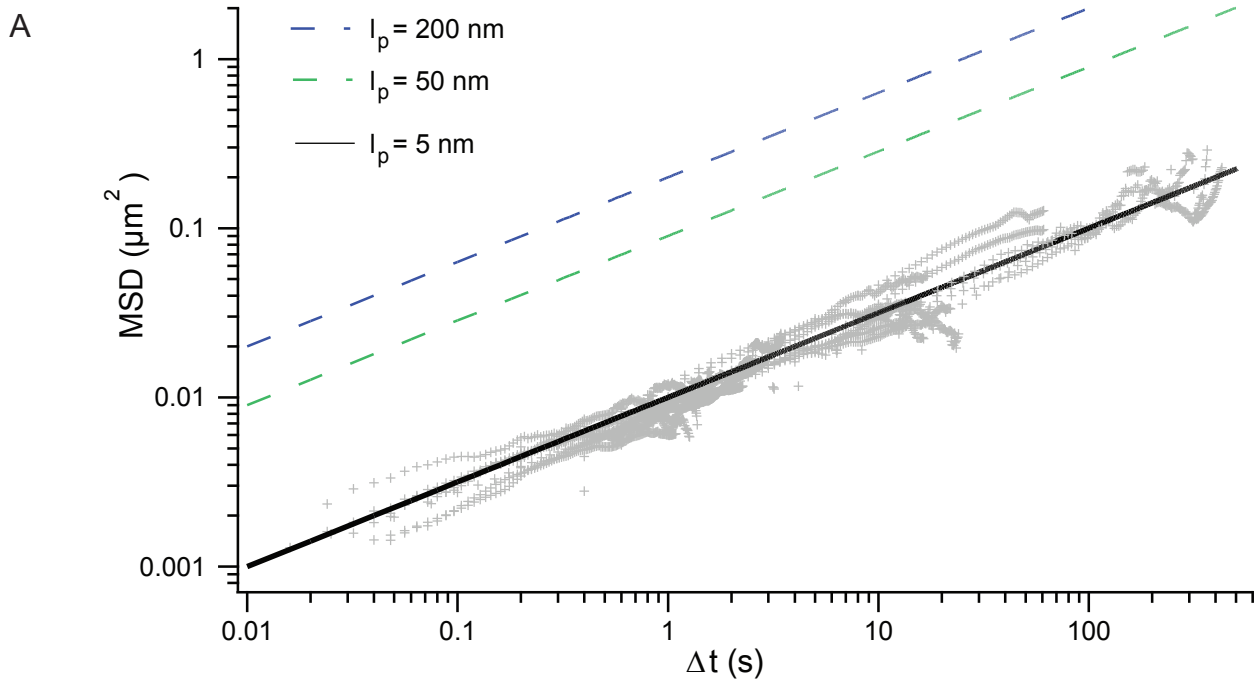
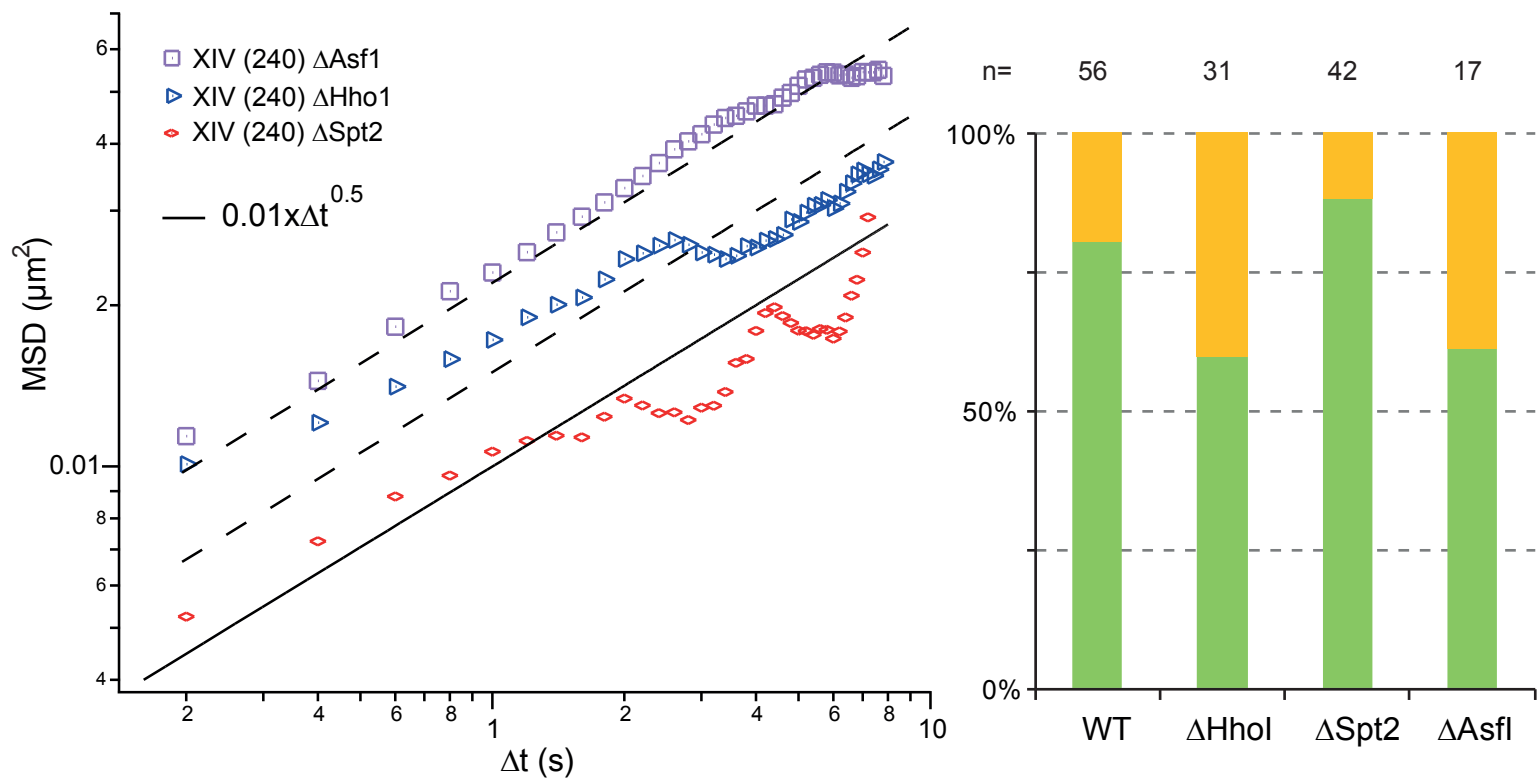


Figure 6



T	300 K
k_s	$1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$
R_{\min}	7 nm
U	$-0.01 \text{ kcal.mol}^{-1}$
m_n	10 a.u.
b_n	10 a.u.
E_1	$0.01 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{nm}^{-4}$

Table 1: Set of parameters to run molecular dynamics simulations.

REFERENCES

- Adkins MW, Tyler JK. 2004. The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *JBC* **279**: 52069-52074.
- Bancaud A, Conde e Silva N, Barbi M, Wagner G, Allemand JF, Mozziconacci J, Lavelle C, Croquette V, Victor JM, Prunell A et al. 2006. Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nat Struct Mol Biol* **13**(5): 444-450.
- Bancaud A, Lavelle C, Huet S, Ellenberg J. 2012. A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. *Nucl Acids Res* doi:**10.1093/nar/gks586**
- Ben-Haïm E, Lesne A, Victor JM. 2001. Chromatin: a tunable spring at work inside chromosomes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **64**: 051921.
- Berger A, Cabal G, Fabre E, Duong T, Buc H, Nehrbass U, Olivo-Marin J, Gadad O, Zimmer C. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Meth* **5**(12): 1031-1037.
- Bohn M, Heermann DW. 2010. Diffusion-Driven Looping Provides a Consistent Framework for Chromatin Organization. *PLoS One* **5**: e12218.
- Bronstein I, Israel Y, Kepten E, Mai S, Shav-Tal Y, Barkai E, Garini Y. 2009. Transient anomalous diffusion of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *Physical review letters* **103**(1): 18102.
- Bupp JM, Martin AES, E. S., Jaspersen SL. 2007. Telomere anchoring at the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3. *JCB* **179**: 845-854.

- Bystricky K, Heun P, Gehlen L, Langowski J, Gasser SM. 2004. Long range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analysed by high-resolution imaging techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16495-16500.
- Bystricky K, Laroche T, Van Houwe G, Blaszczyk M, Gasser S. 2005. Chromosome looping in yeast. *The Journal of Cell Biology* **168**(3): 375.
- Bystricky K, Van Attikum H, Montiel M, Dion V, Gehlen L, Gasser S. 2009. Regulation of nuclear positioning and dynamics of the silent mating type loci by the yeast Ku70/Ku80 complex. *Molecular and Cellular Biology* **29**(3): 835.
- Cabal G, Genovesio A, Rodriguez-Navarro S, Zimmer C, Gadad O, Lesne A, Buc H, Feuerbach-Fournier F, Olivo-Marin J, Hurt E. 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**(7094): 770-773.
- Carlton P, Boulanger J, Kervrann C, Sibarita J, Salamero J, Gordon-Messer S, Bressan D, Haber J, Haase S, Shao L. 2010. Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(37): 16016.
- Celedon A, Nodelman IM, Wildt B, Dewan R, Searson P, Wirtz D, Bowman GD, Sun SX. 2009. Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano Lett* **9**: 1720-1725.
- Cremer T, Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* **2**: 292-301.
- Cui Y, Bustamante C. 2000. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 127-132.
- de Gennes P-G. 1979. *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell university press, Ithaca.

- de Gennes PG. 1982. Kinetics of diffusion-controlled processes in dense polymer systems. I. Nonentangled regimes. *J Chem Phys* **76**: 3316-3321.
- Dekker J. 2008a. Mapping in vivo Chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional in compaction. *J Biol Chem* **283**: 34532.
- . 2008b. Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *Journal of Biological Chemistry* **283**(50): 34532.
- Doi M, Edwards S. 1988. *The theory of polymer dynamics*. Oxford University Press, USA.
- Downs JA, Kosmidou E, Morgan A, Jackson SP. 2003. Suppression of Homologous Recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* Linker Histone. *Molecular Cell* **11**(6): 1685-1692.
- Duan Z, Andronescu M, Schutz K, McIlwain S, Kim YJ, Lee C, Shendure J, Fields S, Blau CA, Noble WS. 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature* **465**(7296): 363-367.
- Ewen B, Richter D. 1997. Neutron Spin Echo Investigations on the Segmental Dynamics of Polymers in Melts, Networks and Solutions. In *Advances in Polymer Science*, Vol 134, pp. 1-129. Springer Berlin / Heidelberg.
- Freidkin I, Katcoff DJ. 2001. Specific distribution of the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone homolog HHO1p in the chromatin. *Nucl Acids Res* **29**(19): 4043-4051.
- Gasser SM. 2002. Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* **296**: 1412-1416.
- Gehlen LR, Gruenert G, Beatrix Jones M, Rodley CD, Langowski J, O'Sullivan JM. 2012. Chromosome positioning and the clustering of functionally related loci in yeast is driven by chromosomal interactions. *Nucleus* **3**: 1-14.

- Göndör A, Ohlsson R. 2009. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* **461**: 212-217.
- Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser S. 1996. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **134**(6): 1349-1363.
- Guérin T, Bénichou O, Voituriez R. 2012. Non-Markovian polymer reaction kinetics. *Nat Chem* **4**: 568-573.
- Haber JE, Leung W-Y. 1996. Lack of chromosome territoriality in yeast: Promiscuous rejoining of broken chromosome ends *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13949-13954.
- Hajjoul H, Kocanova S, Lassadi I, Bystricky K, Bancaud A. 2009. Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells. *Lab on a Chip* **9**: 3054-3058.
- Hajjoul H, Mathon J, Viero Y, Bancaud A. 2011. Optimized micromirrors for Three-dimensional single-particle tracking in living cells. *App Phys Lett* **98**: 243701.
- Hediger F, Neumann F, Van Houwe G, Dubrana K, Gasser S. 2002. Live Imaging of Telomeres:: yKu and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast. *Current Biology* **12**(24): 2076-2089.
- Heun P, Laroche T, Shimada K, Furrer P, Gasser S. 2001. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* **294**(5549): 2181.
- Horn PJ, Crowley KA, Carruthers LM, Hansen JC, Peterson CL. 2002. The SIN domain of the histone octamer is essential for intramolecular folding of nucleosomal arrays. *Nat Struct Biol* **9**: 167-171
- Kawai-Noma S, Ayano S, Pack C-G, Kinjo M, Yoshida M, Yasuda K, Taguchi H. 2006. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* **11**(9): 1085-1096.

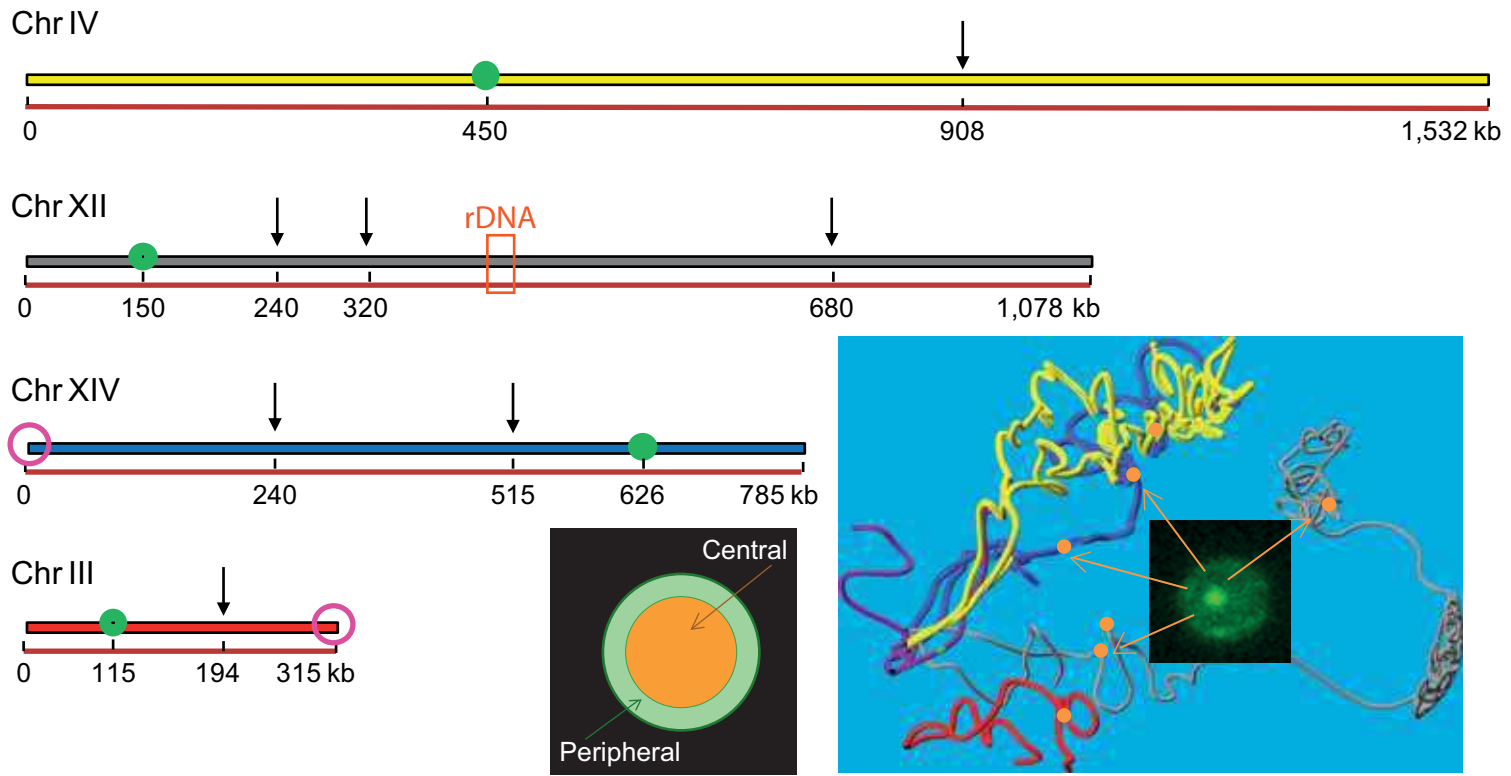
- Kruithof M, Chien F-T, Routh A, Logie C, Rhodes D, van Noort J. 2009. Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30 nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 534-540.
- Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, Gasser SM. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**: 653-657.
- Levy A, Eyal M, Hershkovits G, Salmon-Divon M, Klutstein M, Katcoff DJ. 2008. Yeast linker histone Hho1p is required for efficient RNA polymerase 1 processivity and transcriptional silencing at the ribosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11703-11708.
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO et al. 2009. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions reveals folding principles of the Human Chromosome. *Science* **326**: 289-293.
- Loyola A, Almouzni G. 2004. Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochimica et Biophysica Acta* **1977**: 3-11.
- Marshall W, Straight A, Marko J, Swedlow J, Dernburg A, Belmont A, Murray A, Agard D, Sedat J. 1997. Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Current Biology* **7**(12): 930-939.
- Mateos-Langerak J, Bohn M, de Leeuw W, Giromus O, Manders EM, Verschure PJ, Indemans MH, Gierman HJ, Heermann DW, van Driel R et al. 2009. Spatially confined folding of chromatin in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3812-3817.

- Nora EP, Lajoie BR, Schulz EG, Giorgetti L, Okamoto I, Servant N, Piolot T, van Berkum NL, Meisig J, Sedat J et al. 2012. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**(7398): 381-385.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **26**(16): 1781-1802.
- Prado F, Cortes-Ledesma F, Aguilera A. 2004. The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange. *EMBO Rep* **5**(5): 497-502.
- Rodley CDM, Bertels F, Jones B, O'Sullivan JM. 2009. Global identification of yeast chromosome interactions using genome conformation capture. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 879–886.
- Rouse PE. 1953. A Theory of the Linear Viscoelastic Properties of Dilute Solutions of Coiling Polymers *J Chem Phys* **21**: 1272-1280.
- Sage D, Neumann F, Hediger F, Gasser S, Unser M. 2005. Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. *Image Processing, IEEE Transactions on* **14**(9): 1372-1383.
- Schiessel H, Gelbart WM, Bruinsma R. 2001. DNA folding: structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys J* **80**: 1940-1956.
- Schober H, Kalck V, Vega-Palas M, Van Houwe G, Sage D, Unser M, Gartenberg M, Gasser S. 2008. Controlled exchange of chromosomal arms reveals principles driving telomere interactions in yeast. *Genome research* **18**(2): 261.
- Schober HF, H., Kalck V, Gehlen LR, Gasser SM. 2009. Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomers and repress subtelomeric recombination. *Genes & Dev* **23**: 928-938.

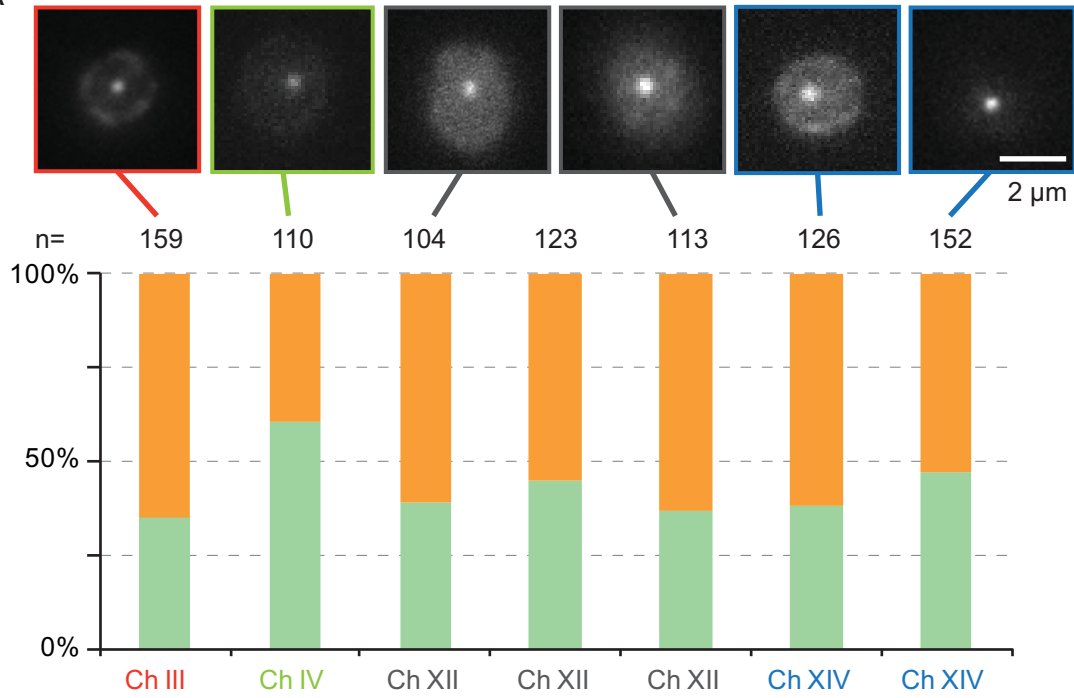
- Sergé A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D. 2008. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Meth* **5**: 687-694.
- Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies Fdr, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. 2012. Three-Dimensional Folding and Functional Organization Principles of the Drosophila Genome. *Cell* **148**(3): 458-472.
- Slaughter BD, Schwartz JW, Rong L. 2007. Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20320-20325.
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, Gasser SM. 2004. Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J* **23**(6): 1301-1312.
- Therizols P, Duong T, Dujon B, Zimmer C, Fabre E. 2010. Chromosome arm length and nuclear constraint determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2025-2030.
- Tjong H, Gong K, Chen L, Alber F. 2012. Physical tethering and volume exclusion determine higher-order genome organization in budding yeast. *Genome Res* **22**(7): 1295-1305.
- Vandoolaeghe WL, Terentjev EM. 2007. A Rouse-tube model of dynamic rubber viscoelasticity *J Phys A: Math Theor* **40**: 14725.
- Weber S, Spakowitz A, Theriot J. 2010. Bacterial Chromosomal Loci Move Subdiffusively through a Viscoelastic Cytoplasm. *Physical review letters* **104**(23): 238102.
- Wedemann G, Langowski J. 2002. Computer simulation of the 30-nanometer chromatin fiber. *Biophys J* **82**: 2847-2859.
- Wong H, Marie-Nelly H, Herbert SC, P., Blanc H, Koszul R, Fabre E, Zimmer C. 2012. A predictive computational model of the dynamic 3D interphase nucleus. *Curr Biol* **22**: 1881-1890.

Zimmer C, Fabre E. 2011. Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. *The Journal of cell biology* **192**(5): 723-733.

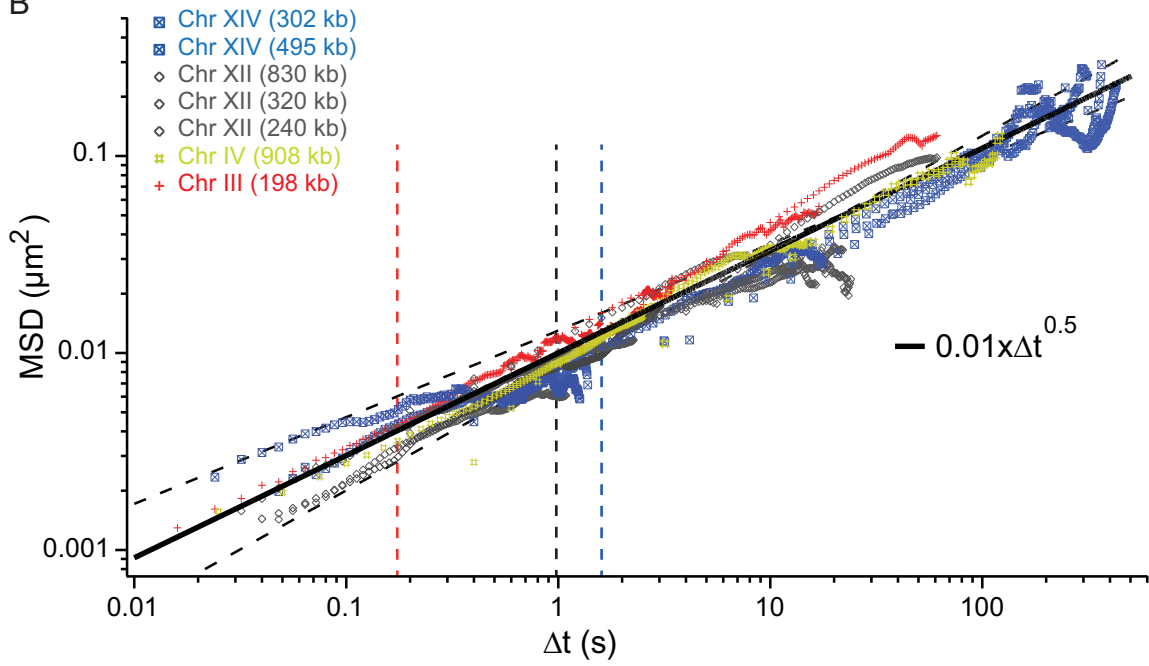
Figure 1



A



B



C

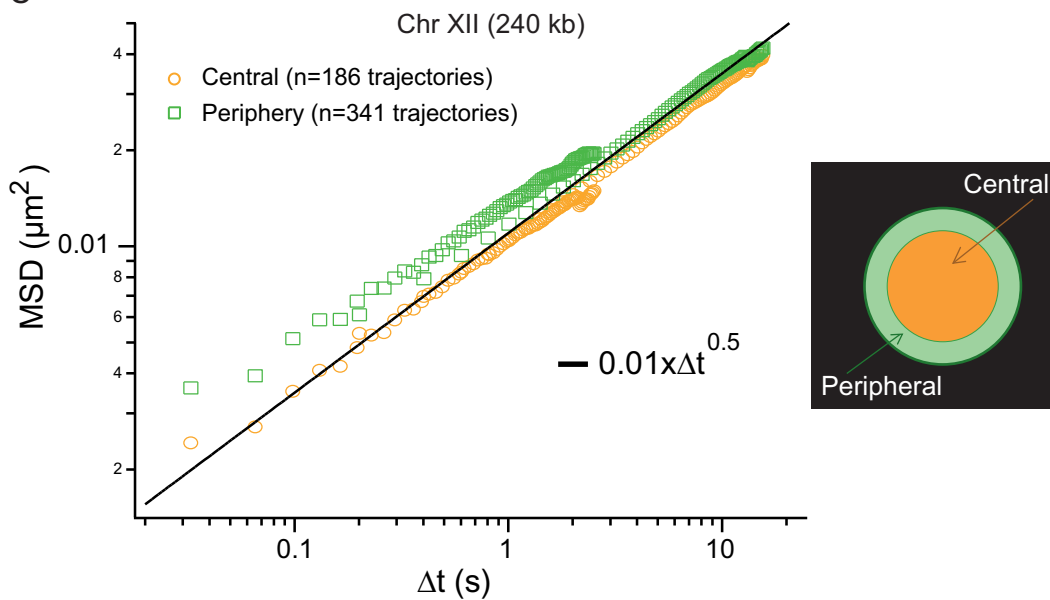
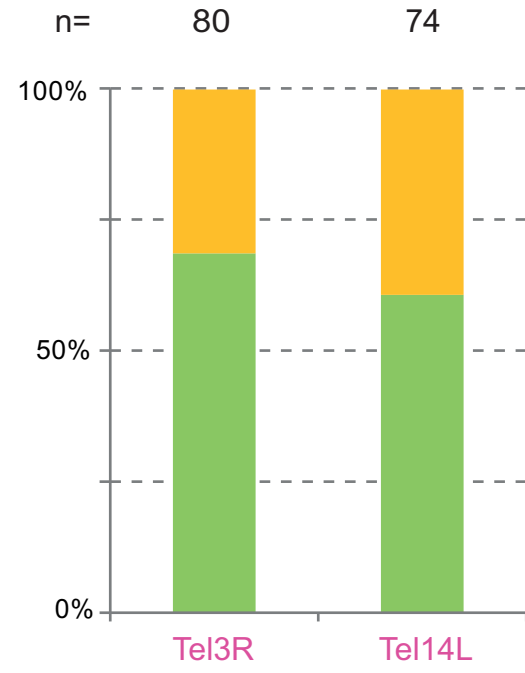
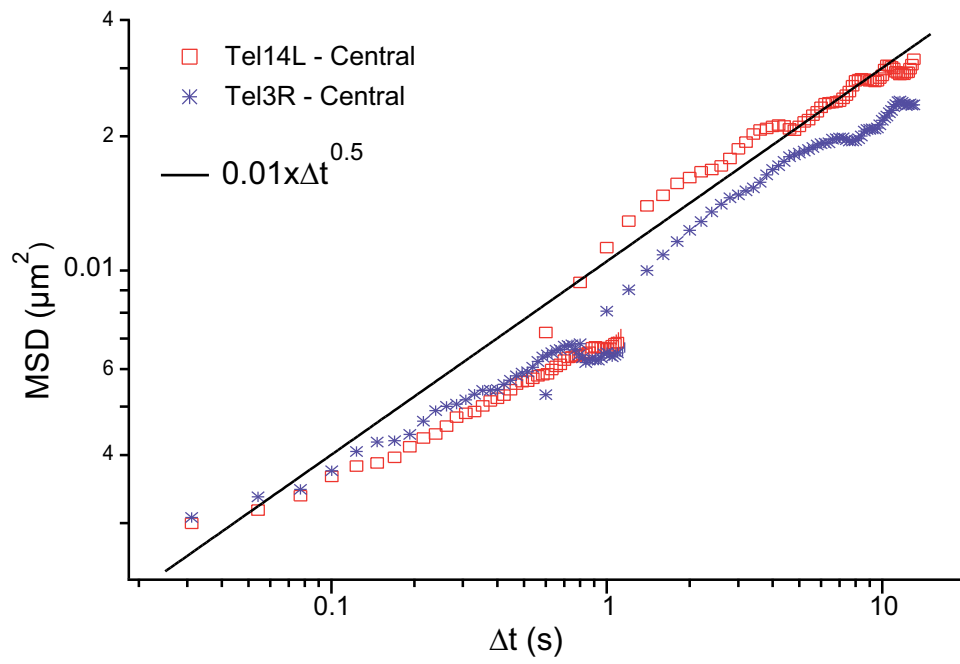


Figure 3

A



B

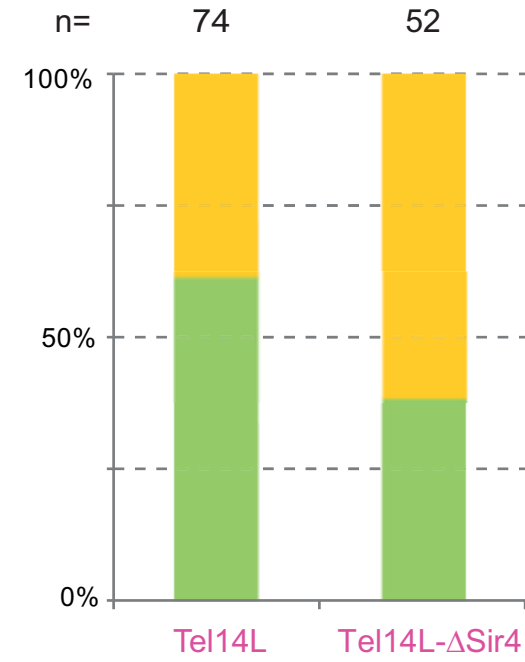
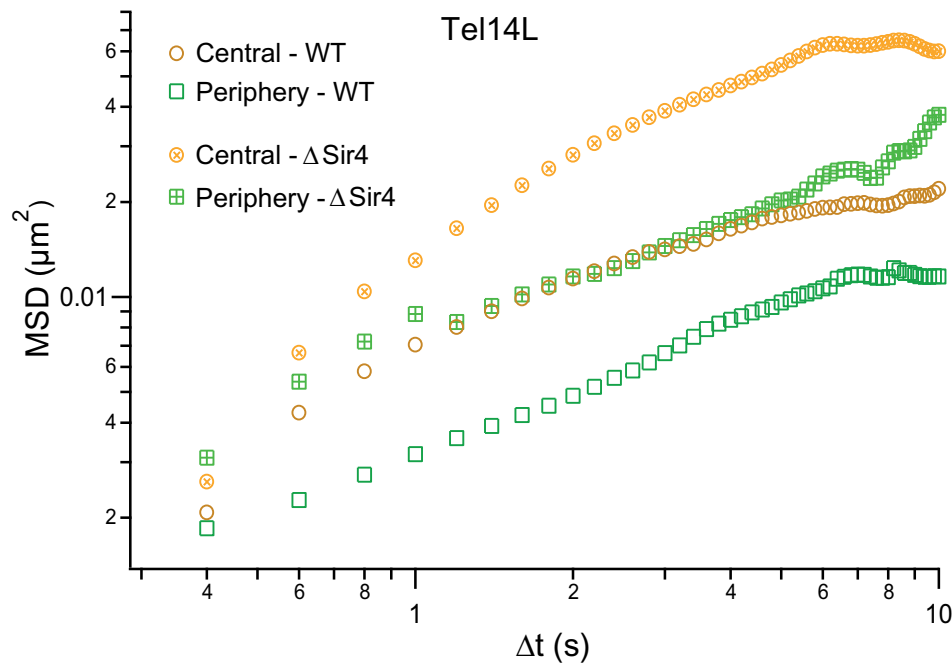
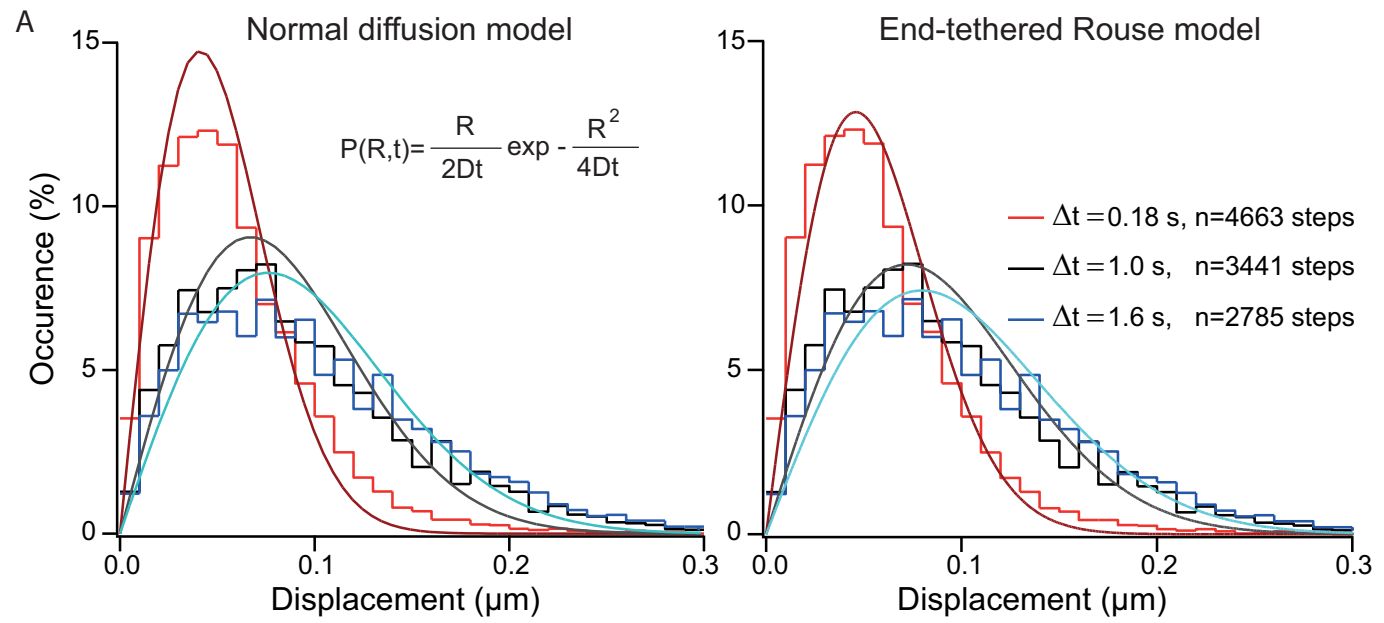


Figure 4



B

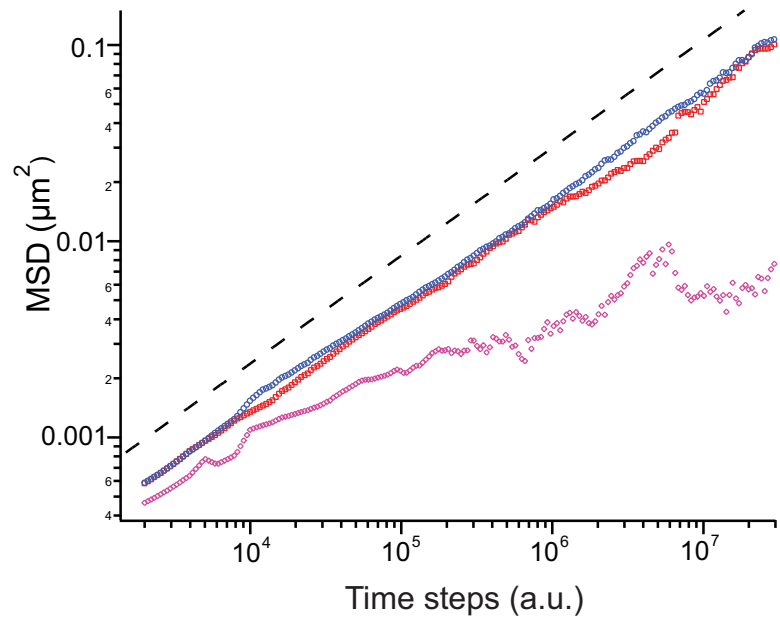
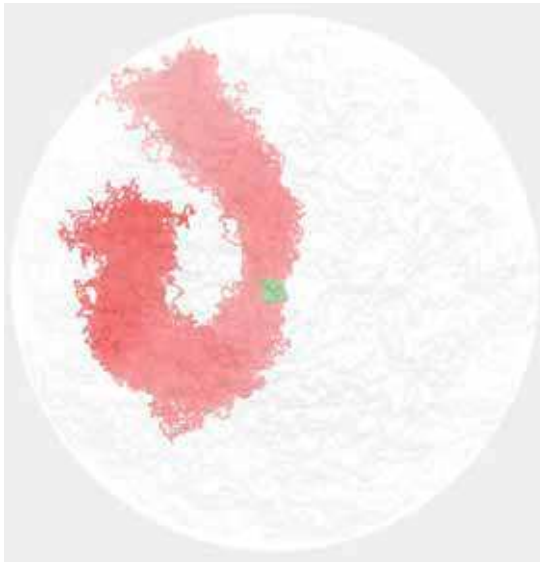


Figure 5

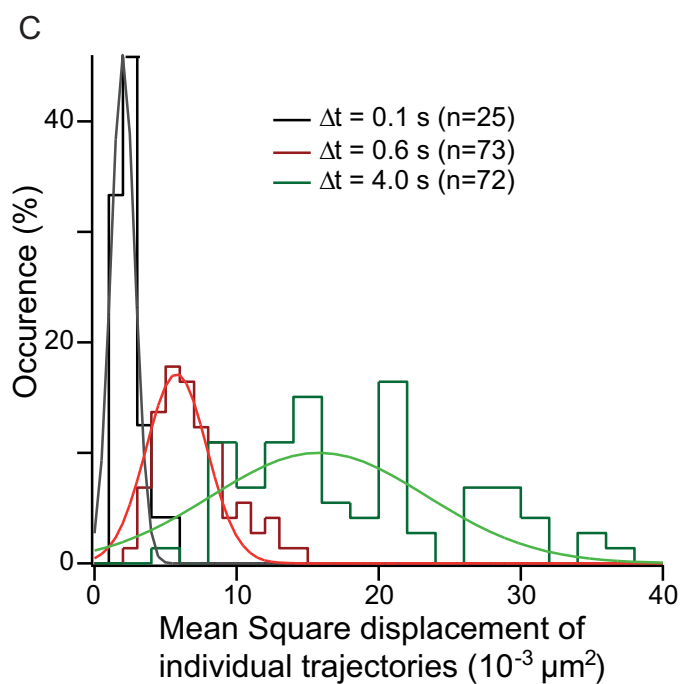
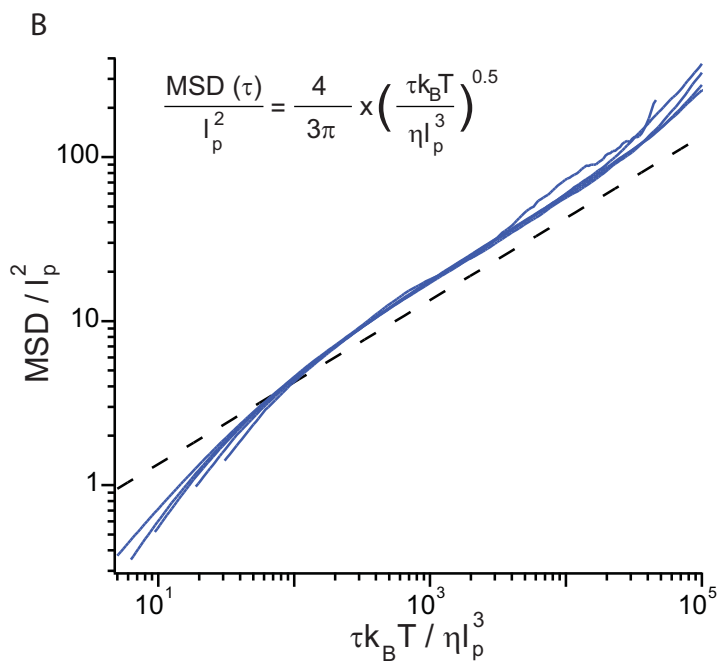
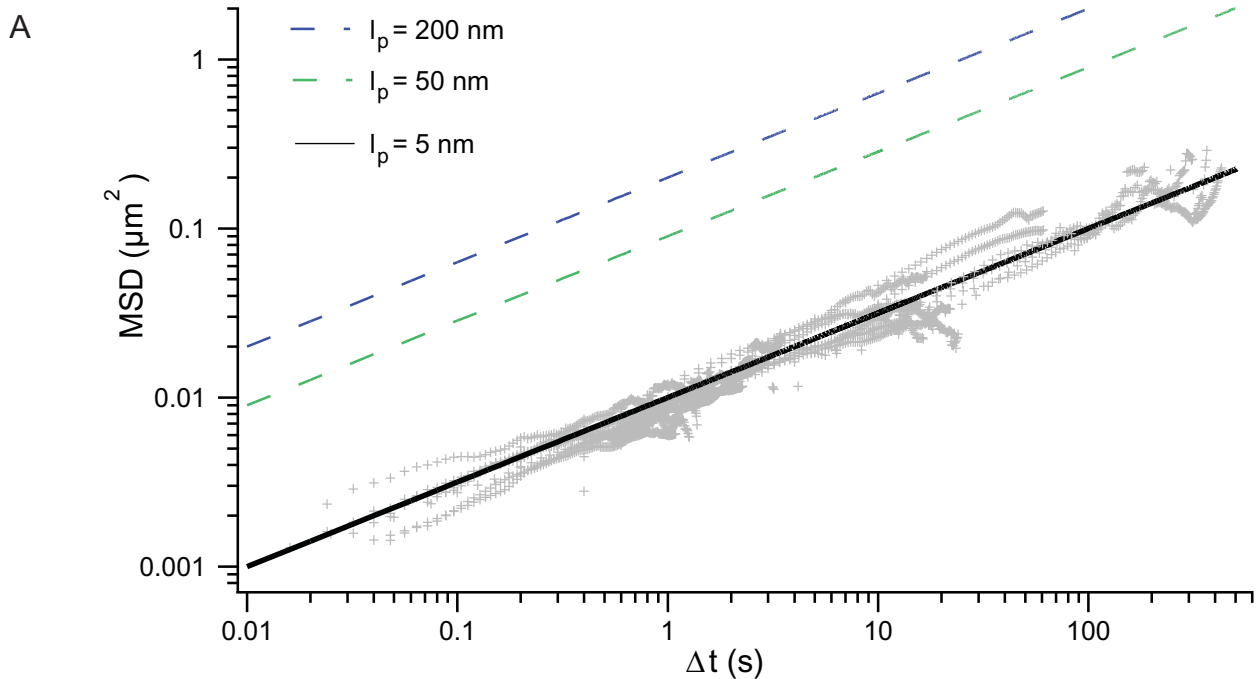
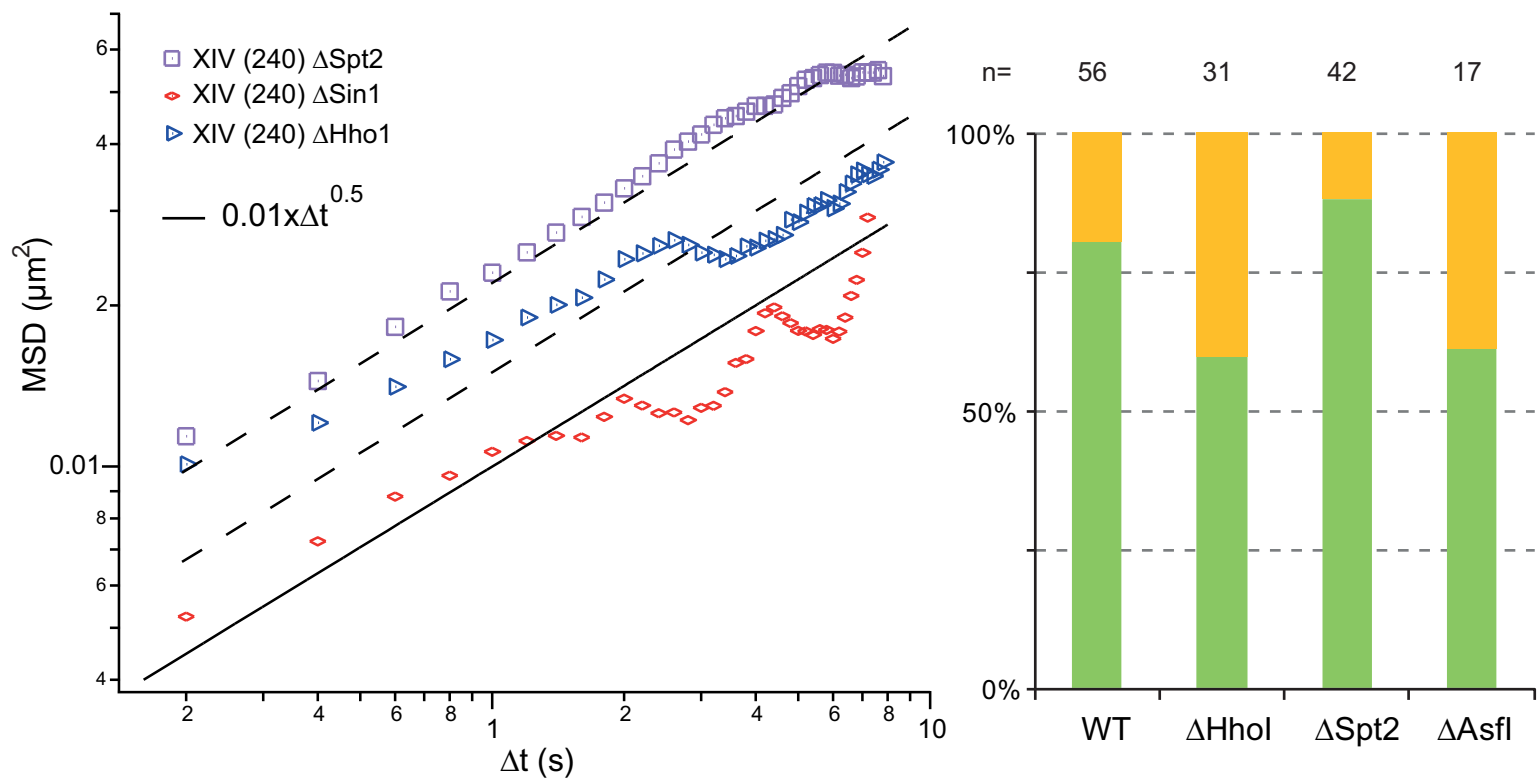
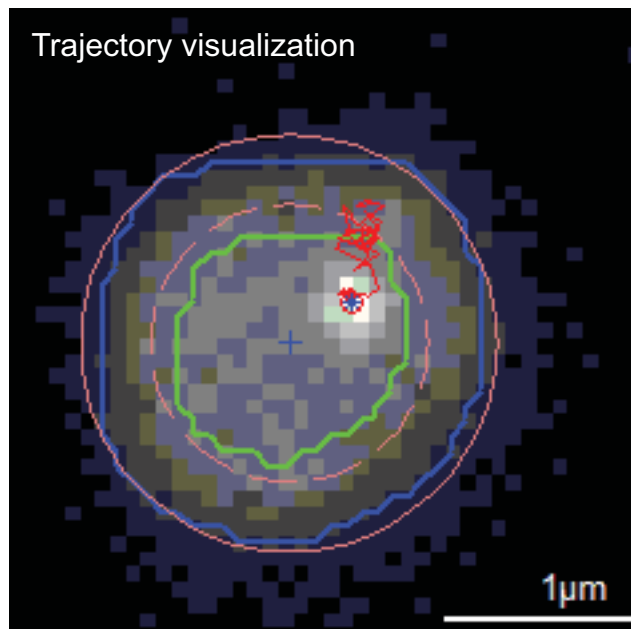
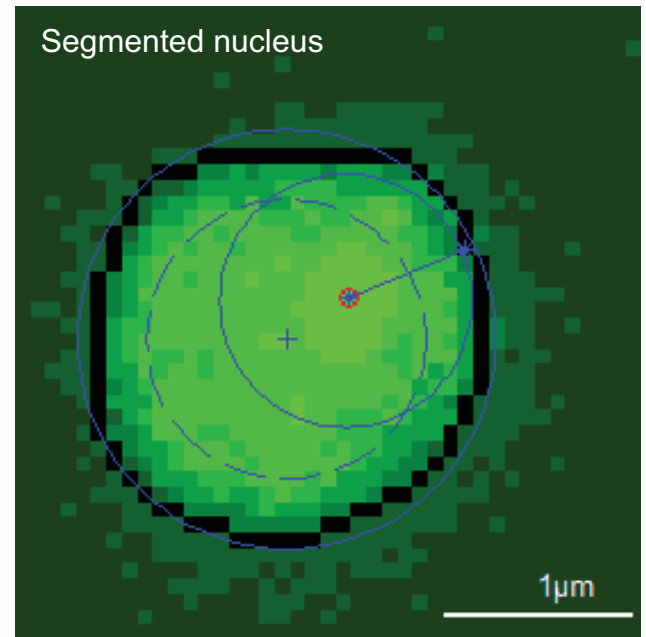
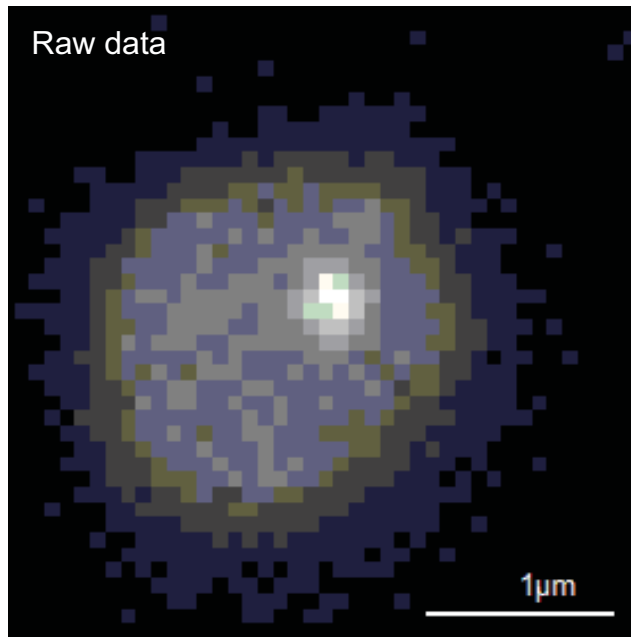
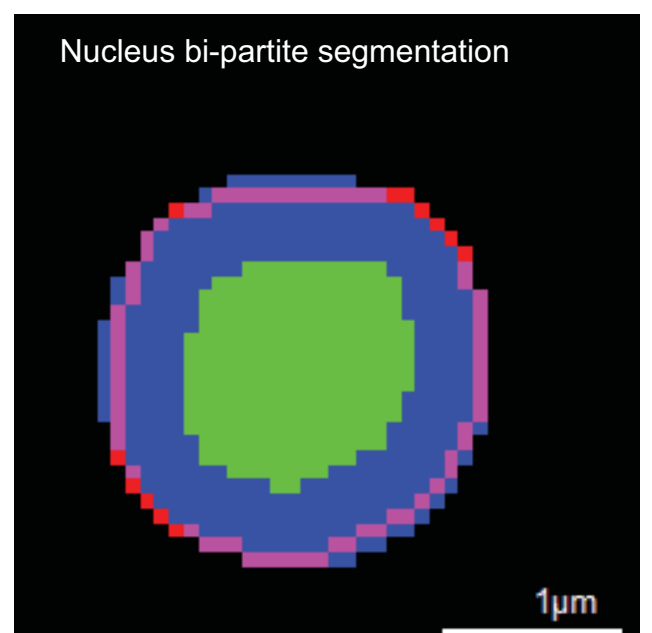
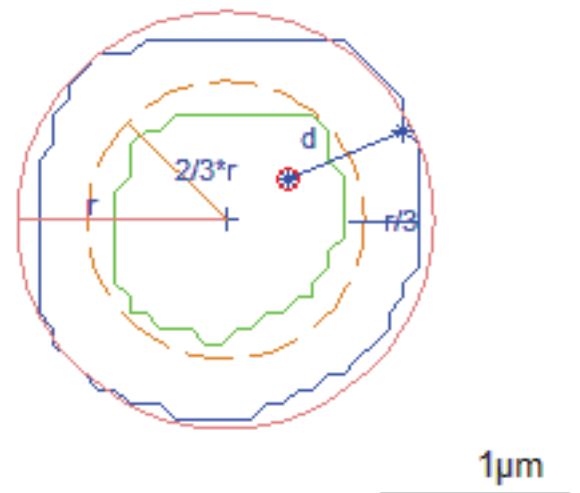


Figure 6

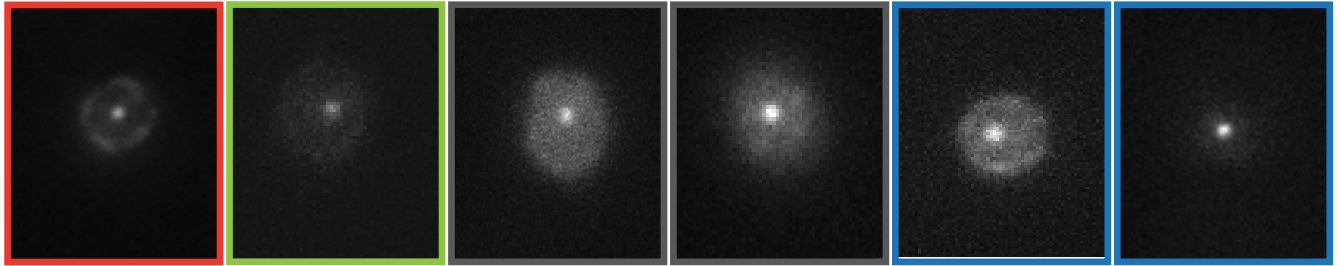




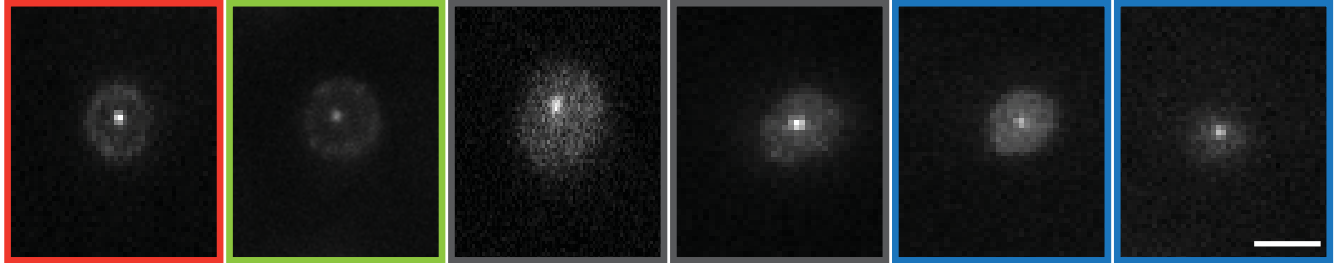
Geometrical representation after segmentation



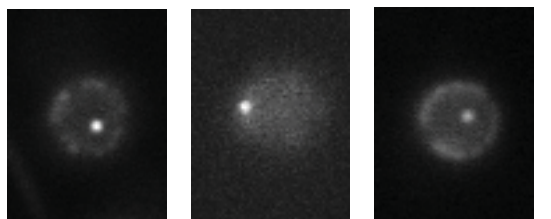
Inter-frame interval = 200 ms



Inter-frame interval = 16-50 ms

2 μ m

Other strains, inter-frame interval = 200 ms



Tel14-L

Tel3-R

Tel14-L Δ Sir4Chr14-495
 Δ Asf-1Chr14-495
 Δ Sin-1Chr14-495
 Δ Hho-12 μ m

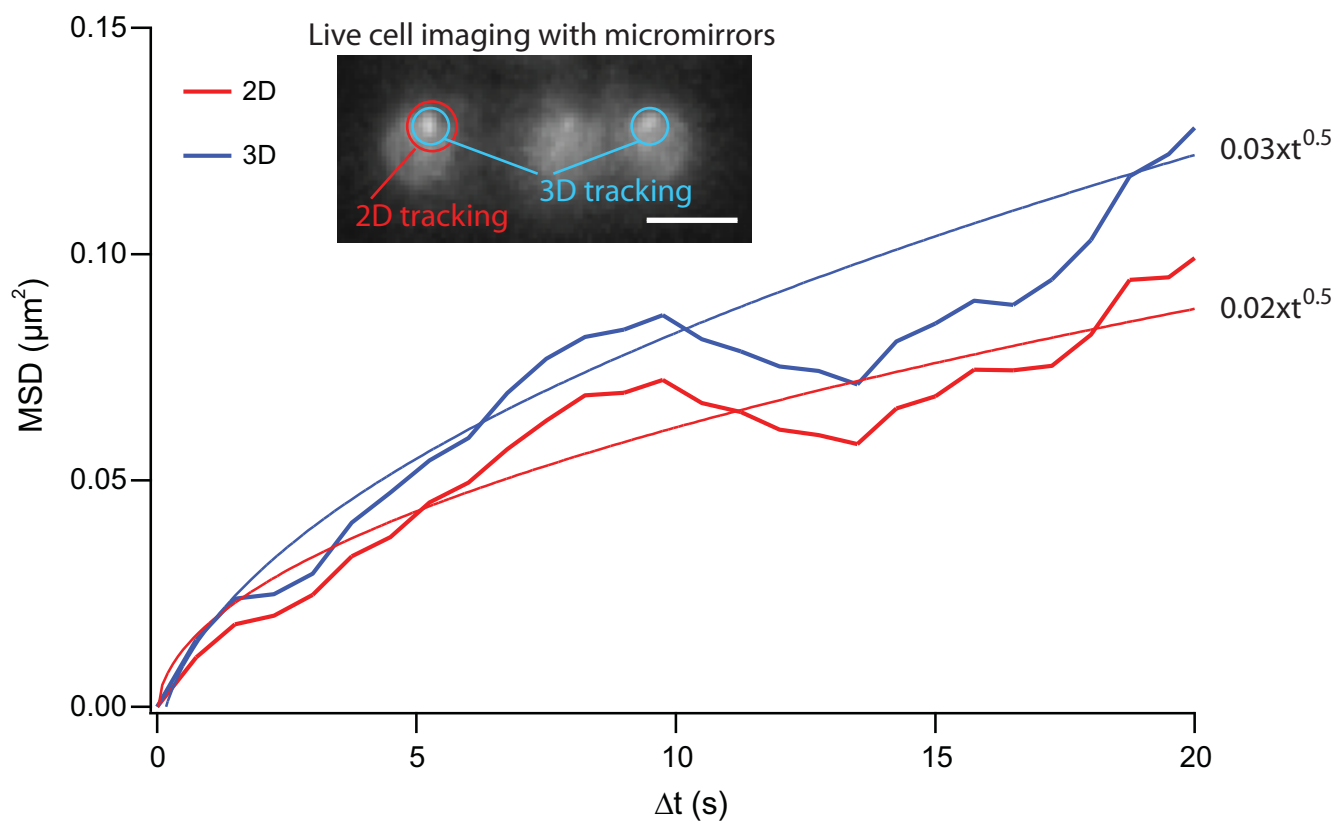
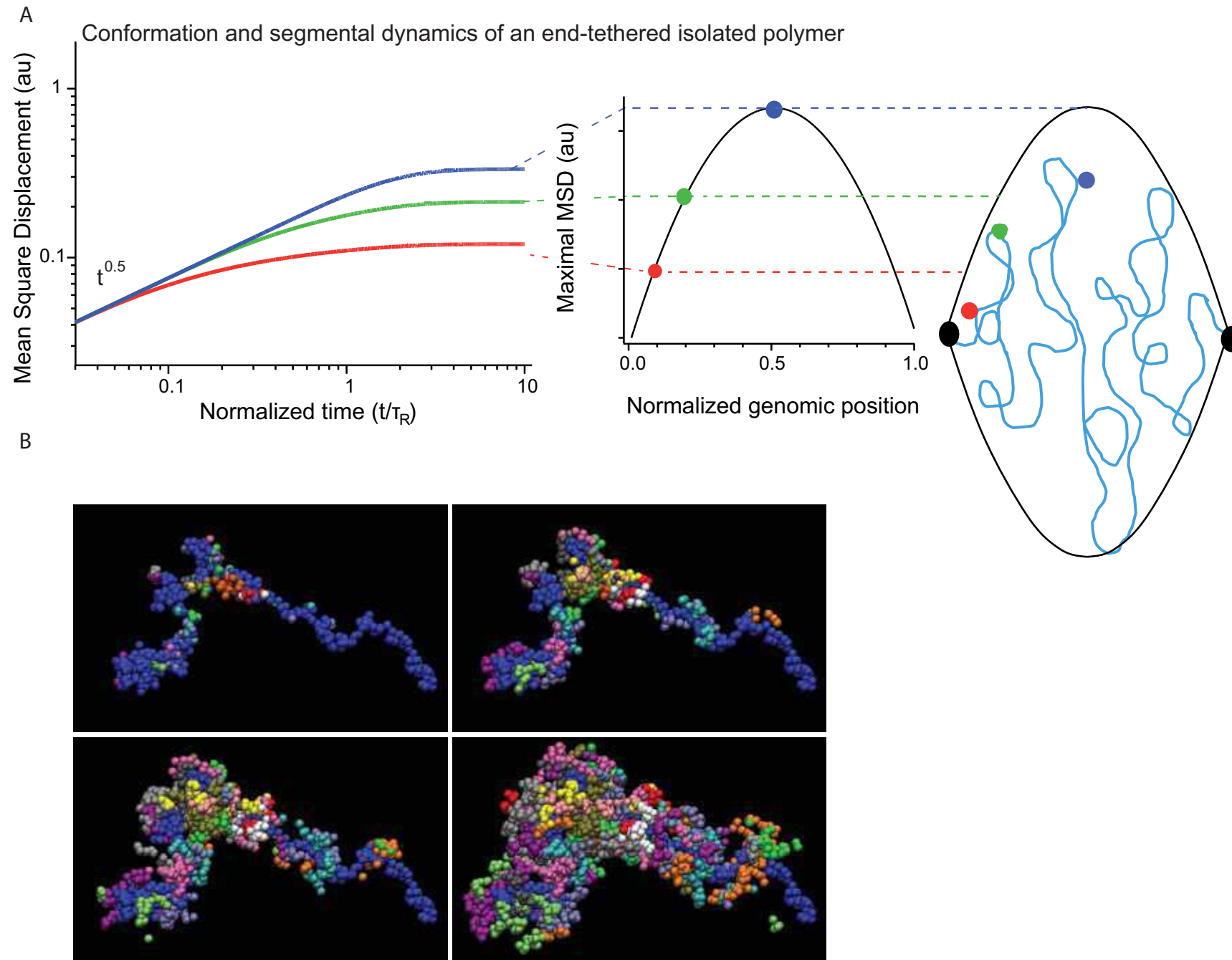
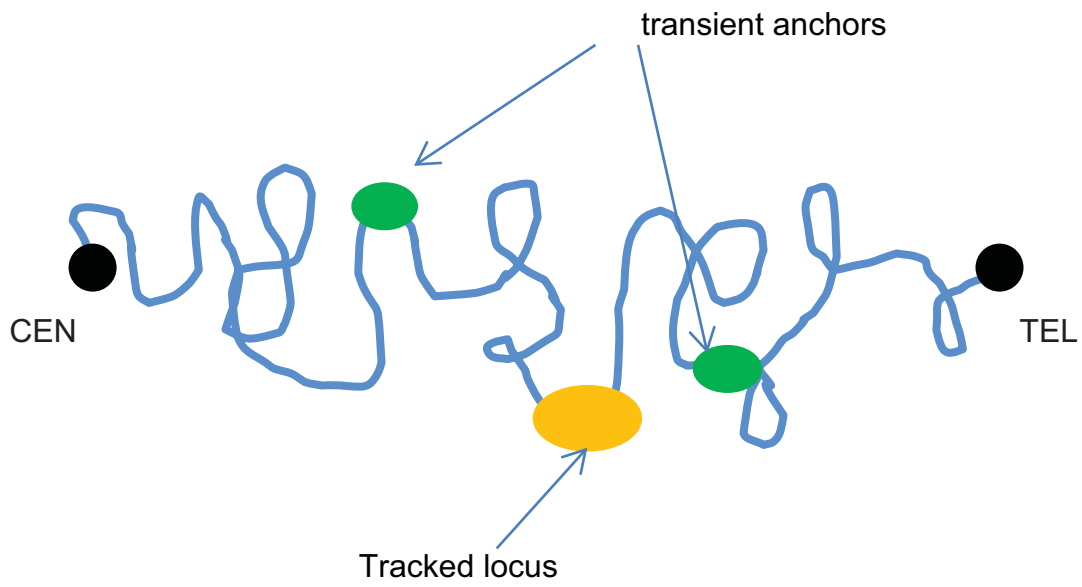


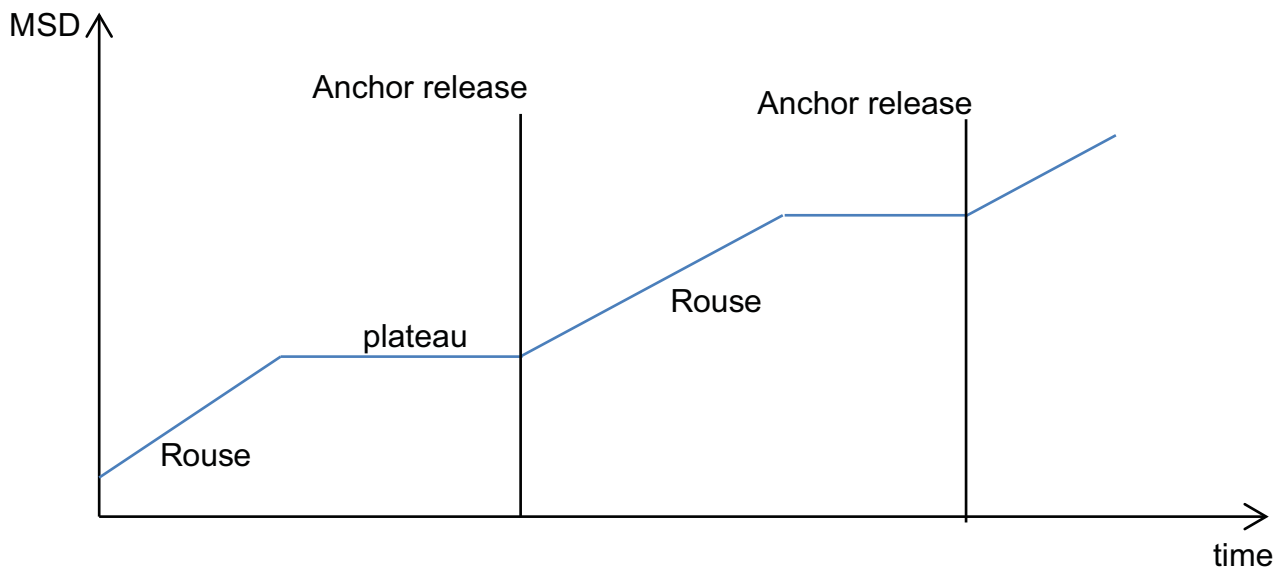
Figure S4



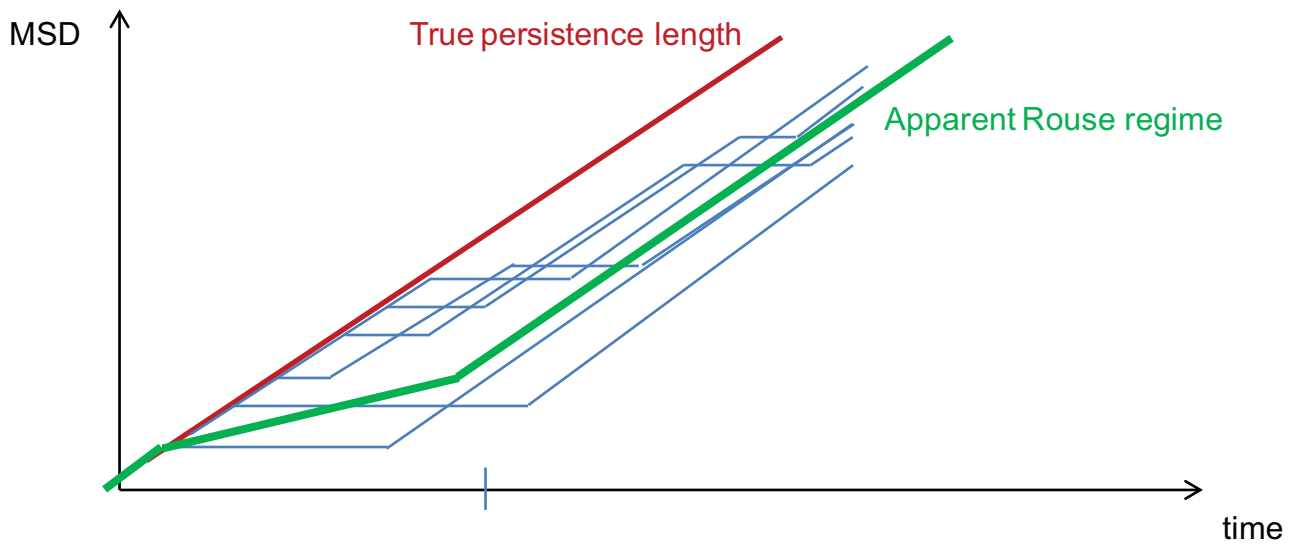
A



B



C



Annexe 2:

«Live cell imaging of chromatin reveals the folding principles of yeast chromosomes in interphase»

Live cell imaging of chromatin reveals the folding principles of yeast chromosomes in interphase

Benjamin Albert^{1,2#}, Julien Mathon^{3#}, Ashutosh Shukla⁴, Hicham Saad^{1,2}, Christophe Normand^{1,2}, Isabelle Leger-Silvestre^{1,2}, David Villa⁵, Alain Kamgoue^{1,2}, Julien Mozziconacci^{6,7}, Hua Wong⁸, Christophe Zimmer⁸, Purnima Bhargava^{4*}, Aurélien Bancaud^{3,7*}, and Olivier Gadal^{1,2,7*}

Running head: Yeast chromosome organization.

Keywords : chromatin / ribosomal DNA / Nucleolus / nuclear architecture

1: LBME du CNRS ; 2 : Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, F-31000 Toulouse, France.

3: CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

4 : Centre for Cellular and Molecular Biology, Council of Scientific and Industrial Research, Uppal Road, Hyderabad 500007, India

5: FRBT, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, F-31000 Toulouse, France.

6: Laboratory for Theoretical Physics of Condensed Matter, UPMC, 75005 Paris, France.

7: Groupement de recherche Architecture et Dynamique Nucléaire (GDR ADN)

8: Institut Pasteur, Unité d'Imagerie et Modélisation, 75015 Paris, France.

#these authors contributed equally to this work

* Corresponding author:

Purnima Bhargava

email: purnima@ccmb.res.in

Phone: +33 (0)5 61 33 62 46; Fax: +33 (0)5 61 33 62 08 ;

Aurélien Bancaud

email: abancaud@laas.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 62 46; Fax: +33 (0)5 61 33 62 08 ;

Olivier Gadal

email: gadal@biotoul.fr

Phone: +33(0)5 61 33 59 39; Fax: +33 (0)5 61 33 58 86;

Characters count: 19555

MS: 201208186, resubmission date 2013/02/28

Abstract (158 words)

Chromosome architecture is viewed as a key component of gene regulation, but the principles of chromosomal folding and their relation with transcription remain elusive. Chromosome 12 is the longest in the budding yeast genome and carries the ribosomal DNA (rDNA), which nucleates the nucleolar compartment, a major hallmark of nuclear organization. We used high-throughput live cell microscopy to systematically characterize the conformation and dynamics of chromosome 12. We determined intranuclear territories of 15 loci distributed every ~100 kilobases along the chromosome and analyzed their motion over broad time scales (0.2-400 s). The locus territory positions are consistent with a computational model of chromosomes based on physically tethered polymers. A massive transcriptional reprogramming of chromosome 12 only marginally affected its internal large-scale organization. Finally, measured subdiffusive motions are consistent with the Rouse model from polymer physics, except at the rDNA. Our results suggest that global chromosome architecture is mainly determined by physical principles of polymers with local transcription-dependent effect.

Introduction

The genome of eukaryotes is organized in three-dimensions according to principles that remain poorly understood even in the yeast *S. cerevisiae* which is among the simplest models to study the organization of the eukaryotic nucleus. The 16 chromosomes of a haploid yeast exhibit a nonrandom spatial distribution, and three structural elements, namely centromeres (CEN), telomeres (TEL), and the nucleolus (NUC) have been identified as key players of their organization (Taddei and Gasser, 2012). The CEN are clustered near the spindle-pole body (SPB) (Guacci et al., 1994; Guacci et al., 1997; Jin et al., 1998; Jin et al., 2000). TEL are also clustered in foci at the nuclear envelope (NE) (Gotta et al., 1996; Klein et al., 1992), so that chromosome arms extend outwards from CEN to the periphery, defining a Rab1-like conformation (Jin et al., 2000). Diametrically opposed to the SPB, the NUC physically separates the repetitive rDNA genes carried on chromosome XII in a crescent-shaped structure of about one third of the nuclear volume (Léger-Silvestre et al., 1999; Yang et al., 1989).

The conformation of yeast chromosomes was analyzed using Chromosome Capture Conformation (3C) techniques (Dekker et al., 2002; Duan et al., 2010; Tanizawa et al., 2010), but without elucidating the mechanisms driving their folding (Langowski, 2011). Transcription may be involved in genome large scale architecture, given that the spatial position of genes is correlated with their expression level (for review, see (Taddei and Gasser, 2012)). Actively transcribed genes could contact the NE, through nuclear pore complex interactions (Casolari et al., 2004; Schmid et al., 2006), and this interaction is driven by transcription in some cases (e.g. *GALI-10* or *INO1*; (Brickner and Walter, 2004; Cabal et al., 2006; Casolari et al., 2004)). tRNA genes, which are scattered throughout the genome, appear

to form foci at the nucleolar periphery (Thompson et al., 2003), as well as near the centromeres (Duan et al., 2010), but these results still remain the subject of discussions (Cournac et al., 2012; Witten and Noble, 2012). In fact it is still unclear whether and how the positioning of specific genes impacts the long-range organization of chromosomes.

In this report, we set out to study the conformation and the dynamics of yeast chromosomes using high-throughput live cell microscopy, and to confront our results to recent computational models. We focused on the largest yeast chromosome (XII) because it contains the three classes of genes: the ribosomal DNA (rDNA) locus transcribed by Pol I and Pol III (Petes, 1979), ~600 protein coding genes transcribed by Pol II, and 22 ncRNA genes transcribed by Pol III. The chromosome XII was fluorescently labeled every 100 kb to produce the first description of position of one single yeast chromosome, showing a polymer-like conformation in agreement with the prediction of computational model based on polymer physics and volume exclusion (Wong et al., 2012). Some RNA polymerase III transcribed genes along chromosome XII deviate slightly from this model, without affecting global organization. We also investigated the contribution of transcription to chromosome conformation by inducing a modulation of transcription by TOR inhibition. This analysis showed that such major transcription reprogramming had little effect on chromosome XII conformation. Our study of chromosome architecture was finally extended to the analysis of the motion of different loci, which match the predictions of polymer models, thus showing that the folding principles of yeast chromosomes are mainly dictated by polymer physics.

Results and discussion

Long range organization of chromosome XII between anchoring elements (TEL, CEN, NUC)

Global architecture of chromosome XII was first investigated in living yeast cells by monitoring the position of 15 loci distributed along the chromosome. Using targeted homologous recombination of fluorescent operator-repressor system (FROS), 12 independent insertions distributed every ~100 kb were generated along the non-rDNA region of chromosome XII (Fig. 1). We also labeled three individual loci within the rDNA region at known distances from the CEN, mapped by pulse-field electrophoresis of cleaved chromosome XII at FROS insertions (Fig. 1; see Material and Methods).

We chose to represent the position of a locus as a probability distribution relative to nuclear and nucleolar centers in living cells (Berger et al., 2008; Therizols et al., 2010). The spatial repartition of gene positions was assayed in a large number of cells in interphase (>1500), and the data were represented in a color-coded statistical map of gene positions in which the percentage in an enclosing contour represents the probability to find a locus inside (Fig. 1B). The radius of the nuclei and their morphology, as characterized by the distance between the nuclear and the nucleolar centers, were similar in all strains (see Fig. S1). We also selected FROS strains with comparable nuclear ($3.4 \pm 0.09 \mu\text{m}^3$) and nucleolar volumes ($1.37 \pm 0.08 \mu\text{m}^3$), so as to overlay the positions of loci in the same map (see Material and Methods and Movie 1).

The visual inspection of statistical maps shows that the position of loci along chromosome XII is consistent with a path dictated by the genomic coordinates of each locus and the segmentation of the chromosomes between three structuring elements CEN, TEL, and NUC (Fig. 1 B and Movie 1). We then wished to assess whether chromosome XII folding could be predicted by nuclear models based on polymer physics (Wong et al., 2012). The median

distance to the nuclear and nucleolar center was plotted as a function of the genomic coordinate of each locus (boxplots in Fig. 2A, B; see Material and Methods), and these data compared well with the model predictions (Wong et al., 2012) (Fig. 2A, B, black line). We noted that the fit to the model prediction was poorer for genomic positions 450-1050 kb, i.e. from NUC to the right TEL (see e.g. the anomalous dynamics of the rDNA in Fig. 4).

The smooth variations of the median positions between consecutive loci suggested that the statistical maps could be interpolated with a genomic resolution much finer than 100 kb. We thus computed statistical maps every kb along chromosome XII (movie 2; see Material and Methods), and we challenged their relevance by comparing them to the position of four RNA polymerase III transcribed genes along chromosome XII (tP(UGG), tA(UGC), tL(UAA) and SNR6); their genomic position corresponds to the green boxplots of Fig. 2A). Experimental and interpolated statistical maps are represented in the upper half and lower half of Fig. 2C, respectively. If SNR6 shows a good agreement with interpolation, mild (tA(UGC); tL(UAA)) or stronger (tP(UGG)) discrepancies are observed. Such data argues for a local effect of Pol III gene on chromosome structure. However, this analysis is different from co-localization assays, in which Pol III transcribed genes were organized in clusters close to CEN or NUC (Duan et al., 2010; Thompson et al., 2003), but it suggests that the distribution of genes is primarily influenced by their genomic position along the chromosome (Fig. 2 A, B), and only locally by sequence-specific physical interactions. Note that we checked that the FROS insertion did not affect chromatin structure by analyzing the inner structure of *SNR6* using *in situ* Indirect-End Labeling (IEL; Fig. 2D). Our results show that nucleosome positioning within the upstream and transcribed regions is similar in the control and the labeled strain (Fig. 2D). Moreover the transcription level of *SNR6* was not significantly modified by FROS labeling (Fig. 2D). In conclusion, experimental data and the prediction from computational

model are largely compatible, suggesting that the folding of chromosomes is mainly dictated by local attachments to three main nuclear structures NUC, TEL, and CEN.

Major transcriptional reprogramming has little effect on chromosome XII structure

In order to investigate further whether molecular interactions driven by transcription played a role in chromosome architecture, we probed the structure of chromosome XII by statistical mapping after a major transcriptional repression (Fig. 3) Cells were treated with rapamycin, an inhibitor of the conserved protein kinase complex TORC1 (Target of Rapamycin) (Loewith et al., 2002), which induces a global modification of transcription, mimicking nutrient deprivation, characterized by transcriptional repression of Pol II ribosomal protein genes, rRNA 5S genes transcribed by Pol III, and repression Pol I activity (Hardwick et al., 1999; Wullschleger et al., 2006). After 20 min of rapamycin treatment, the mean nucleolar volume decreased by 37%, but the nucleus remained nearly constant in size (4% increase in volume), in agreement with previous studies performed on yeast telomeres (Therizols et al., 2010). The statistical maps of 12 gene positions were determined in non-treated *vs.* treated cells, and are represented in the upper half and lower half of Fig. 3, respectively. Nucleolar size reduction generated a global shift of all loci toward the nucleolus. However, we did not detect major modifications of internal chromosome folding at the population level, thus supporting our model in which chromosome architecture is mainly determined by the biophysical properties of chromosomes and volume exclusion rather than by molecular interactions mediated by transcription.

Chromatin motion of chromosome XII

We then wished to investigate the dynamics of chromosome XII and confront these data to

the predictions of polymer models. The motion of 10 loci marked with stars in Fig. 1A was investigated by recording their trajectories in 2D (rather than in 3D in order to increase the acquisition speed and reduce photo-toxicity; normal cell growth was observed during up to 2 hours of acquisition, see movie 3). A broad temporal range (from 190 ms to 400 s) was probed using five distinct inter-frame intervals of 190, 400 ms for all loci, as well as 1.5, 4 and 10 s for three loci. A dedicated software was developed to perform systematic trajectory analysis, as well as determination of coordinate according to the position of the gene relative to NE and NUC (Fig. S2 A, B, C; See Material and Methods). This software allowed to extract the Mean Square Displacement (MSD), which is the average of the squared travel distance after a given time lag, for every locus, and to compare the dynamics in the case of central, peripheral, or nucleolar localization. Trajectories during which deformations of the nucleus occurred (*e.g.* during mitosis, see movie 3) were automatically disregarded by our software based on cell morphological analysis and/or detection of drifts of the nuclear center. Several studies suggested that chromatin motion was determined by a normal diffusive behavior in a restrained volume ($MSD \sim t$ in the small time limit, and $MSD \sim a$ in the long time limit with a the radius of constraint; (Heun et al., 2001; Marshall et al., 1997; Meister et al., 2010)). To display MSD in the short and long time regimes, we used linear and logarithmic representations (loci -30, 680 and rDNA; Fig. 4 and S3). We observed that MSD curves exhibited a power-law scaling response expressed as $MSD \sim \Gamma \cdot t^\alpha$ with the anomalous parameter α of $\sim 0.5 \pm 0.07$ (Fig. 4B) and the amplitude of the motion $\Gamma \sim 0.01 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-0.5}$. Interestingly, the anomalous diffusive response is consistent with the Rouse polymer model that describes the movements of polymer segments based on their elastic interactions and on viscous friction (De Gennes, 1979). This model is expected to apply to dense polymer solutions (De Gennes, 1979) and it was recently observed that the bacterial genome behaves as predicted from this model (Weber et al., 2010; Weber and Thierot, 2010). It also applies to the molecular

dynamics simulations of the yeast genome (Rosa and Everaers, 2008), thus strengthening our view that polymer models best describe chromosome properties in yeast.

We then wished to further develop our description of chromatin dynamics at short time interval along chromosome XII. We compared the amplitude of the MSD traces by plotting Γ for every locus (Fig. 4C and Fig. S3), showing that the chromatin movements are homogeneous for most of the loci with a value in the range $\sim 0.010\text{-}0.015 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-0.5}$. These results suggest a homogeneous behavior of chromatin throughout chromosome XII, except for rDNA. In addition chromatin dynamics were not different for a locus with a central or peripheral localization (Fig. S3), and the amplitude of fluctuations Γ was moderately reduced by $\sim 20\%$ for loci with nucleolar *vs.* central localization (Fig. S3), suggesting that nucleolar proximity tends to restrain chromatin motion of non-rDNA loci. The investigation of MSD in the long time limit, best viewed in linear representation, revealed a deviation from the Rouse regime $MSD \sim \Gamma \cdot t^{0.5}$. As previously suggested (Meister et al., 2010), the apparent confinement in the MSD is related to genes diffusing in a restrained volume. Space visited after 200s ($\sim 0.15 \mu\text{m}^2$, $\sim 0.25 \mu\text{m}^2$, and $\sim 0.3 \mu\text{m}^2$ for the rDNA, locus -30 kb, and locus - 680 kb, respectively), can be assigned to an explored volume of 0.57, 1.02, and $1.34 \mu\text{m}^3$ for the three loci (Meister et al., 2010). These values are in excellent agreement with the dimensions of gene territories, as defined by the volume in which 50% of the gene positions are detected in statistical maps (Fig. 4D; respectively 0.8, 1.1 and $1.3 \mu\text{m}^3$). This analysis shows that loci can explore the entire statistical maps within few minutes. However, loci confinement are best monitored by statistical positioning (Figure 1), which shows that loci at the vicinity of rDNA are more confined (Fig. 4D).

Finally the motility of these chromosomal loci in the rDNA was investigated, showing a MSD with two distinct slope: increasingly slowly for $t < 5 \text{ s}$ ($\alpha \sim 0.25$) and more abruptly after s

($\alpha \sim 0.7$). These dynamics are not consistent with the Rouse model, and are not expected from computational models of the yeast nucleus (not shown). In these polymer models several specific properties of the rDNA were disregarded, including among others the dynamics associated to transcriptional activity, the depletion of nucleosomes from actively transcribed rDNA (Conconi et al., 1989), or the possible local tethering of rDNA via CLIP proteins (Mekhail and Moazed, 2010; Mekhail et al., 2008). This problem should be considered in future molecular dynamics simulations.

To conclude, our systematic analysis of position and motion of loci along chromosome XII showed that its inner structure mainly consisted of constrained chromosome arms anchored to nuclear elements (SPB, NUC and NE), as expected from recent computational models (Tjong et al., 2012; Wong et al., 2012). We also demonstrated that the Rouse polymer model accurately described the motion of chromatin loci except for the rDNA (Rosa and Everaers, 2008), the biophysical properties of which remain to be investigated.

We may finally speculate on whether the properties of chromosomes observed in yeast are relevant to metazoans. Our results suggest that chromosomes should be viewed as anchored polymers in a dense environment. Lamin associated domains (LAD) and nucleolar tethering domains (NAD), which appear to be distributed in large regions of the metazoan genome (Guelen et al., 2008; Németh et al., 2010; van Koningsbruggen et al., 2010), may provide anchoring regions analogous to NUC, CEN, and TEL. We foresee that the relevance of the Rouse model between anchoring regions should be studied, and spatial references should be proposed to construct statistical maps to investigate chromosome folding properties.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by an ATIP-plus grant from CNRS, by Agence Nationale de la Recherche (Nucleopol, Ribeuc and jeune chercheur programme), Jeune equipe from FRM, and University Paul Sabatier (J.M. Fellowship). This work is a French-Indian collaborative effort funded by IFCPAR Project 4103 between Dr Bhargava and Dr Gadal laboratory. We are grateful to Mathieu Stouf, H  l  ne Badouin, Juliane Klehr and C  line Jeziorski for strain construction and initial characterization of gene position. This work also benefited of the assistance of the imaging platform from Toulouse TRI.

Material and methods

Yeast strains construction

Genotypes of the strains used in this study are described in supplementary Table S1. Oligonucleotides used for Polymerase Chain Reaction (PCR) are described in supplementary Table S2. Genomic tetO integrations in non-rDNA regions were performed in two steps, first by integrating the *HIS3* or *URA3* gene by homologous recombination at the indicated location along chromosome arms by transforming the PCR product amplified with appropriate oligonucleotides on pCR4-HIS3-M13 (Berger et al., 2008) or pSK-URA3-M13 (Berger et al., 2008) into TMS1-1a. pUC19-URA-iSCEI was constructed by cloning *Bam*HI-*Eco*RI fragment of the cut PCR product generated using oligonucleotide 1033-1034 and S288c genomic DNA into pUC19 at the same sites. After confirmation of the insertion site by PCR on genomic DNA, auxotrophic markers (*URA3* or *HIS3*) are used as target for insertion of *Eco*RI-linearized plasmids pTetO-NAT-his3 Δ or pTetO-NAT-ura3 Δ respectively, bearing an array of tetO, as previously described (Berger et al., 2008; Rohner et al., 2008). The proper targeting of TetO site was confirmed by inactivation the auxotrophic markers, by size determination of chromosome XII by pulse-field gel electrophoresis (CHEF-DR[®] III, BIORAD), followed by southern blotting to confirm tetO insertion in the chromosome XII (Albert et al., 2011). Large chromosomal rearrangements, observed for some FROS labeled strains, were discarded by PFGE analysis. Number of rDNA repeats can change within a cell population, potentially introducing heterogeneity amongst the FROS labeled clones (Pasero and Marilley, 1993), so we used PGFE to confirm that chromosome XII size was not altered in our labeled strains (data not shown).

Mapping FROS insertion in rDNA

Genomic *tetO* integrations in the rDNA region were performed in two steps, first by integrating the *URA3* gene bearing an adjacent *I-SceI* site, absent in the yeast nuclear genome, by homologous recombination in one of the rDNA repeat by transforming the PCR product amplified with oligonucleotides 1035 and 1036 on pUC19-URA-iSCEI into TMS1-1a. To map rDNA insertion, *I-SceI* genomic DNA was determined using pulse-field gel electrophoresis, followed by southern blotting to map *tetO* insertion. Following *I-SceI* cleavage, FROS labeled chromosome XII is separated into a fragment containing left telomere and centromere and a region containing right telomere, revealed by EtBr staining. Southern blot using *tetO* as probe identify the right arm of the cleaved chromosome XII. We estimated insertion within the rDNA, at 750, 1060 and 1170 kb from the centromere-proximal edge of rDNA in clones rDNA-1, 2 and 3 respectively. Note that migration of a repeated genomic region, such as rDNA, is not strictly proportional to DNA size and insertion site was extrapolated considering 1.8 Mb of rDNA (about 200 repeats).

Interpolation of color-coded statistical mapping of gene positions

Movie 1: Overlaid color-coded of gene positions, expressed in percentile of the population, was generated using Adobe® After Effects® CS6. Time delay between each statistical mapping is proportional to distances in kb separating each loci. Movie 2: Interpolation between color-coded map, generating one mapping of gene positions per kb, along the entire chromosome was achieved considering each level as a separated object using Adobe® After Effects® CS6 software.

Chromatin structure using indirect end-labeling (IEL) and transcript quantification

Chromatin structure analysis by the IEL method, RNA extraction and quantification were performed as described (Arimbasseri and Bhargava, 2008), and repeated at least three times for each experiment. Probes were amplified using oligonucleotides described in the supplementary table S2 and secondary digestion of DNA for IEL analysis was with a *HindIII*. RNAs extracted from FROS tagged and untagged strains were used for primer extension, products were resolved on 8 M urea–10% polyacrylamide gels and quantified as described earlier (Shivaswamy et al., 2004).

Fluorescence microscopy of living yeast cells

Yeast media were used as previously described (Rose et al., 1990). Cells were grown overnight at 30 °C in YPD. Cells were diluted at 10^6 cells/ml, and were harvested when OD600 reached 4.10^6 cells/ml and rinsed twice with the corresponding SC media. Cells were spread on slides coated with a SC media patch containing 2% agarose and 2% glucose. Cover slides were sealed with “VaLaP” (1/3 vaseline, 1/3 lanoline, 1/3 paraffin). For long time-lapse acquisition and confocal imaging, imaging chamber were thermostated at 30°C.

Microscope image acquisition

Confocal Microscopy was limited to 20 min after mounting and performed with an Andor Revolution Nipkow-disk confocal system installed on a Olympus IX-81, featuring a CSU22 confocal spinning disk unit (Yokogawa) and an EMCCD camera (DU 888, Andor). The system was controlled using the mode “Revolution FAST” of Andor Revolution IQ1 software (Andor). Images were acquired using an Olympus 100x objective (Plan APO, 1.4 NA, oil immersion). Single laser lines used for excitation were diode pumped solid state lasers

(DPSSL) exciting GFP fluorescence at 488 nm (50 mW, Coherent) and mCherry fluorescence at 561 nm (50 mW, Cobolt jive), a Semrock bi-bandpass emission filter (Em01-R488/568-15) allowed collection of green and red fluorescence. Pixel size was 65 nm. For 3D analysis, Z-stacks of 41 images with a 250-nm Z-step were used. Exposure time was 200 ms.

MSD analysis was carried out by recording the movements of chromosome loci by epifluorescence on two different microscope settings, depending on inter-frame interval. For long time intervals (1.5s, 4s and 10 s), image acquisition was performed on a Ti-E/B inverted microscope (Nikon) equipped with Perfect Focus System (PFS), suitable for long-range time-lapse experiments. The system was equipped with a 100 X oil immersion objective (CFI Plan fluor 100X, ON 1.30, Dt0.2), HG Intensilight illumination with low power (NDFilter=6.3 for GFP; 3.0 for mCherry), filter cubes TE/ZP FITC (FITC-3540C; semrock) for GFP signal and TE/ZP TEXAS RED (TxRed-4040C; Semrock) for mCherry imaging, 1.5 X lens and an EMCCD camera (Andor DU-897; EM gain 555 GFP; 40 for mCherry). Measured pixel size was 106.7 nm. Acquisition was set to 300 ms or 600 ms respectively for GFP and mCherry. For short time intervals (50 and 200 ms), imaging was performed using a BX-51 upright microscope (Olympus) equipped with a laser diode light source (Lumencor), a 100X oil immersion objective (NA=1.4), and an EMCCD camera (Andor DU-897), as described in (Hajjoul et al., 2009). The GFP excitation emission at 470 \pm 10 nm was set to 7.53 W/ μm^2 .

For short time intervals (200 and 400 ms), time-lapse sequences consisted in 300 consecutive images, and we displayed MSD traces on 150 time intervals in order to ensure the statistical relevance of mean displacements. mCherry signal was recorded at the end of GFP acquisition. For longer time intervals (1.5s; 4s and 10s interframe), time lapse images were acquired

respectively for 5, 15 and 120 min, and manually checked to discard drifting cells. For GFP exposure with inter-frame of 10s, mCherry and brightfield acquisition was performed every 100s (each 10 GFP frames) to limit phototoxicity.

Image processing for movie

Movie 3 file was generated by NIS image (Nikon), and was imported into final cut pro X (Apple). Color enhancement and dust attenuation was obtained by background correction. Timeline and scale bar were inserted in the movie file using Adobe Flash CS5 Professional (Adobe).

Image analysis for gene position

Confocal images were processed and analyzed with a Matlab script *nucloc*, available at <http://www.nucloc.org/> (Mathworks) (Berger et al., 2008). Boxplot of nuclear radius, nuclear-nucleolar center distances were generated using *boxplot* function (mathworks). Boxplot of median distances to nuclear center, nucleolar center were computed in two steps, by first calculating median distances for each 100 nuclei, and then plotting boxplot of the median values obtained.

Image analysis for gene trajectory

Automatic particle tracking and spatial registration in time lapse analysis was then performed with our custom-made software run in MatLab. Single particle tracking software built on the MTT platform (Serge et al., 2008) was developed to perform high-throughput 2D trajectory

analysis over a large temporal range. For trajectory analysis, we first evaluated the variations of the positioning error with the signal-to-noise ratio (SNR) in order to compensate for biases associated to the difference in brightness between the different strains (Fig. S2). Objects of controlled brightness and position were generated *in silico*, and tracked with our algorithm to retrieve the detection error, which was in the range $5 \cdot 10^{-4}$ - $10^{-5} \mu\text{m}^2$. Due to the very high accuracy of gene position determination, correcting nuclear motion from gene trajectory added noise to observed motion. Rather than a systematic correction for nuclear center, we then manually excluded gene trajectories with detectable motion of nuclear position, leading to exclusion of <10% of trajectories for short time lapse, and 30-50% of trajectories for long-time lapse. Gene movements were recorded at fast or slow acquisition rates, resulting in different SNR, hence in different tracking error SNR. Starting from raw data, we compensated for the difference in SNR by adding an error to the slow acquisition MSD dataset, which is determined by the difference in tracking precision. Datasets are then fused and filtered using a Gaussian filter (order 11) (see Fig. 2). The resulting dataset is adjusted with an anomalous diffusion model. MSD curves were ultimately extracted and analyzed using Igor Pro.

Online supplemental material:

Genotypes of the strains used in this study are described in supplementary Table S1. Oligonucleotides are described in supplementary Table S2, plasmids used are described in supplementary Table S3.

Video shows overlaid color-coded statistical mapping of gene positions (Movie 1), interpolation between color-coded statistical mapping of gene positions (Movie 2) and time-lapse series of -80kb loci labeled strain (Movie 3).

Supplementary figures depicts nuclear morphology of the 31 populations analyzed (Fig. S1), Methods used for tracking genes in living cells. (Fig. S2) and MSD responses for loci -136, -80, CEN, 90 and 170 kb along chromosome XII (Fig. S3).

References :

- Albert, B., I. Leger-Silvestre, C. Normand, M.K. Ostermaier, J. Perez-Fernandez, K.I. Panov, J.C. Zomerdijk, P. Schultz, and O. Gadal. 2011. RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J Cell Biol.* 192:277-293.
- Arimbasseri, A.G., and P. Bhargava. 2008. Chromatin structure and expression of a gene transcribed by RNA polymerase III are independent of H2A.Z deposition. *Mol Cell Biol.* 28:2598-2607.
- Berger, A.B., G.G. Cabal, E. Fabre, T. Duong, H. Buc, U. Nehrbass, J.C. Olivo-Marin, O. Gadal, and C. Zimmer. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods.* 5:1031-1037.
- Brickner, J.H., and P. Walter. 2004. Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol.* 2:e342.
- Cabal, G.G., A. Genovesio, S. Rodriguez-Navarro, C. Zimmer, O. Gadal, A. Lesne, H. Buc, F. Feuerbach, J. Olivo-Marin, E. Hurt, and U. Nehrbass. 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature.* 441:770-773.
- Casolari, J.M., C.R. Brown, S. Komili, J. West, H. Hieronymus, and P.A. Silver. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell.* 117:427-439.
- Conconi, A., R.M. Widmer, T. Koller, and J.M. Sogo. 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell.* 57:753-761.
- Cournac, A., H. Marie-Nelly, M. Marbouty, R. Koszul, and J. Mozziconacci. 2012. Normalization of a chromosomal contact map. *BMC Genomics.* 13:436.
- De Gennes, P.G. 1979. *Scaling Concepts in Polymer Physics* Cornell University Press.
- Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science.* 295:1306-1311.
- Duan, Z., M. Andronescu, K. Schutz, S. McIlwain, Y.J. Kim, C. Lee, J. Shendure, S. Fields, C.A. Blau, and W.S. Noble. 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature.* 465:363-367.
- Gotta, M., T. Laroche, A. Formenton, L. Maillet, H. Scherthan, and S.M. Gasser. 1996. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 134:1349-1363.
- Guacci, V., E. Hogan, and D. Koshland. 1994. Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol.* 125:517-530.
- Guacci, V., E. Hogan, and D. Koshland. 1997. Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A. *Mol Biol Cell.* 8:957-972.
- Guelen, L., L. Pagie, E. Brasset, W. Meuleman, M.B. Faza, W. Talhout, B.H. Eussen, A. de Klein, L. Wessels, W. de Laat, and B. van Steensel. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature.* 453:948-951.
- Hajjoul, H., S. Kocanova, I. Lassadi, K. Bystricky, and A. Bancaud. 2009. Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells. *Lab Chip.* 9:3054-3058.
- Hardwick, J.S., F.G. Kuruvilla, J.K. Tong, A.F. Shamji, and S.L. Schreiber. 1999. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling

- pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:14866-14870.
- Heun, P., T. Laroche, K. Shimada, P. Furrer, and S.M. Gasser. 2001. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science*. 294:2181-2186.
- Jin, Q., E. Trelles-Sticken, H. Scherthan, and J. Loidl. 1998. Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase. *J Cell Biol*. 141:21-29.
- Jin, Q.W., J. Fuchs, and J. Loidl. 2000. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci*. 113:1903-1912.
- Klein, F., T. Laroche, M.E. Cardenas, J.F. Hofmann, D. Schweizer, and S.M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol*. 117:935-948.
- Langowski, J. 2011. Chromosome conformation by crosslinking: Polymer physics matters. *Nucleus*. 1:37-39.
- Léger-Silvestre, I., S. Trumtel, J. Noaillic-Depeyre, and N. Gas. 1999. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*. 108:103-113.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J.L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, and M.N. Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 10:457-468.
- Marshall, W.F., A. Straight, J.F. Marko, J. Swedlow, A. Dernburg, A. Belmont, A.W. Murray, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1997. Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol*. 7:930-939.
- Meister, P., L.R. Gehlen, E. Varela, V. Kalck, and S.M. Gasser. 2010. Visualizing yeast chromosomes and nuclear architecture. *Methods Enzymol*. 470:535-567.
- Mekhail, K., and D. Moazed. 2010. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:317-328.
- Mekhail, K., J. Seebacher, S.P. Gygi, and D. Moazed. 2008. Role for perinuclear chromosome tethering in maintenance of genome stability. *Nature*. 456:667-670.
- Németh, A., A. Conesa, J. Santoyo-Lopez, I. Medina, D. Montaner, B. Péterfia, I. Solovei, T. Cremer, J. Dopazo, and G. Längst. 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet*. In press.
- Pasero, P., and M. Marilley. 1993. Size variation of rDNA clusters in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 236:448-452.
- Petes, T.D. 1979. Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:410-414.
- Rohner, S., S.M. Gasser, and P. Meister. 2008. Modules for cloning-free chromatin tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 25:235-239.
- Rosa, A., and R. Everaers. 2008. Structure and dynamics of interphase chromosomes. *PLoS Comput Biol*. 4:e1000153.
- Rose, M.D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Schmid, M., G. Arib, C. Laemmli, J. Nishikawa, T. Durussel, and U.K. Laemmli. 2006. Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell*. 21:379-391.
- Serge, A., N. Bertaux, H. Rigneault, and D. Marguet. 2008. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Methods*. 5:687-694.

- Shivaswamy, S., G.A. Kassavetis, and P. Bhargava. 2004. High-level activation of transcription of the yeast U6 snRNA gene in chromatin by the basal RNA polymerase III transcription factor TFIIC. *Mol Cell Biol.* 24:3596-3606.
- Taddei, A., and S.M. Gasser. 2012. Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics.* 192:107-129.
- Tanizawa, H., O. Iwasaki, A. Tanaka, J.R. Capizzi, P. Wickramasinghe, M. Lee, Z. Fu, and K. Noma. 2010. Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 38:8164-8177.
- Therizols, P., T. Duong, B. Dujon, C. Zimmer, and E. Fabre. 2010. Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:2025-2030.
- Thompson, M., R.A. Haeusler, P.D. Good, and D.R. Engelke. 2003. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science.* 302:1399-1401.
- Tjong, H., K. Gong, L. Chen, and F. Alber. 2012. Physical tethering and volume exclusion determine higher-order genome organization in budding yeast. *Genome research.*
- van Koningsbruggen, S., M. Gierlinski, P. Schofield, D. Martin, G.J. Barton, Y. Ariyurek, J.T. den Dunnen, and A.I. Lamond. 2010. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell.* 21:3735-3748.
- Weber, S.C., A.J. Spakowitz, and J.A. Theriot. 2010. Bacterial chromosomal loci move subdiffusively through a viscoelastic cytoplasm. *Phys Rev Lett.* 104:238102.
- Weber, S.C., and J.A.S. Thierot, A. J. 2010. Subdiffusive motion of a polymer composed of subdiffusive monomers. *Phys Rev E.* 82:011913.
- Witten, D.M., and W.S. Noble. 2012. On the assessment of statistical significance of three-dimensional colocalization of sets of genomic elements. *Nucleic Acids Res.* 40:3849-3855.
- Wong, H., H. Marie-Nelly, S. Herbert, P. Carrivain, H. Blanc, R. Koszul, E. Fabre, and C. Zimmer. 2012. A predictive computational model of the dynamic 3D interphase yeast nucleus. *Curr Biol.* 22:1881-1890.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124:471-484.
- Yang, C.H., E.J. Lambie, J. Hardin, J. Craft, and M. Snyder. 1989. Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma.* 98:123-128.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Color-coded statistical mapping of gene positions of fifteen genes along chromosome XII. **A** Schematic representation of chromosome XII with the 15 FROS labeled genes using the centromere as reference. The rDNA of 1.8 Mb is depicted as a 1 Mb segment for visualization. Sites studied by particle tracking are marked with a star. **B** The spatial distributions of each locus are represented using “Genemaps” and a color-coded heat map determined by the percentile of the distribution (Berger et al., 2008; Therizols et al., 2010). In the upper panel the dashed yellow circle, the red curve, and small red circle depict the median nuclear envelope, the median nucleolus, and the median location of the nucleolar center, respectively. In the lower panel the Genemaps are represented with the genomic position shown on top (N represents the number of nuclei analyzed). Note that the position of the 3 rDNA loci has been determined by *I-SceI* cleavage.

Figure 2. The position of loci along chromosome XII relative to the nucleolus (NUC) and the nuclear envelope (NE) are predicted by computational modellings. Distance of the gene to the nuclear center (**A**) and to the nucleolar center (**B**) is plotted vs. the genomic position. Schematic representation of distances, with yellow and red ellipsoids depict nuclear envelope and nucleolus, respectively (left panel). The median distance is shown with boxplots for the 15 genes of Fig. 1 and for four RNA polymerase III genes (white and green datasets). Median distance of chromosome XII from loci to nuclear center and to centroid of rDNA segment from a computational model of chromosome XII (Wong et al., 2012) is shown in plain black line. **C** Genemap of loci t(P(UGG)L, tA(UGC)L, SNR6 and t(L(UAA)L relative to interpolated position -58, 65, 216 and 647 kb reveals global agreement between model and measurements (see movie 2). Genemap experimentally determined (upper panel) is compared

to interpolated position (lower panel). **D** The yeast U6 snRNA gene *SNR6* is unaffected by FROS insertion. Locations of important elements are indicated relative to the transcriptional start site (bent arrow) as +1 (upper part). Indirect end-labeling analysis of the chromatin structure on *SNR6* is shown in the lower-right panel. Ellipses on the right-hand side mark the positioned nucleosomes in the corresponding lanes with wild-type unmodified (U) or FROS tagged (T) strains. Note the apparent hyper-sensitive site (*) detected upon FROS insertion correspond to an *HindIII* site introduced along with *tetO* repeat. *SNR6* expression is not affected by FROS insertion. Transcript levels in untagged and FROS tagged strains were normalized against the U4 transcript used as an internal control. Average and scatter of RNA levels estimated from three independent experiments are plotted (lower-left panel).

Figure 3. Color-coded statistical mapping of gene positions of twelve genes along chromosome XII after rapamycin treatment. **A** Schematic representation of chromosome XII with the 12 FROS labeled genes using the centromere as reference **B** The spatial distributions of each locus depicted in figure 1 (lower panel) is compared loci position in rapamycin treated cells (upper panel).

Figure 4. Gene spatio-temporal dynamics are slowed down at NUC, and homogeneous elsewhere. **A** The temporal evolution of the MSD is plotted at position 680 kb, -30kb (for central localization) and at rDNA (nucleolar localization) in log-log (upper panel) or linear (lower panel) scale. MSD extracted from time lapse of 0.19, 0.36, 1, 1.5 and 10s interframe are depicted in different color. The curves are fitted with an anomalous diffusion model (solid lines), showing that the anomaly parameter is 0.48 ± 0.02 . Note that the movements of rDNA are slow in comparison to that of the locus at 680 or 30 kb (red dataset). The orange line

represents the fit to the dataset with a power-law scaling of 0.5. **B** The plot represents the anomaly parameter vs. the genomic position, and shows the different dynamics in NUC. **C** Spatial fluctuations are compared by measuring the amplitude of the power law scaling response using a model with $\Gamma t^{0.5}$, also showing that the movements are slowed down at NUC and CEN. **D** The gene territory, defined by the volume occupied by 50 percent of the gene population (the green isocontour in genemaps) expressed in μm^3 , is measured as a function of the genomic position.

A



B

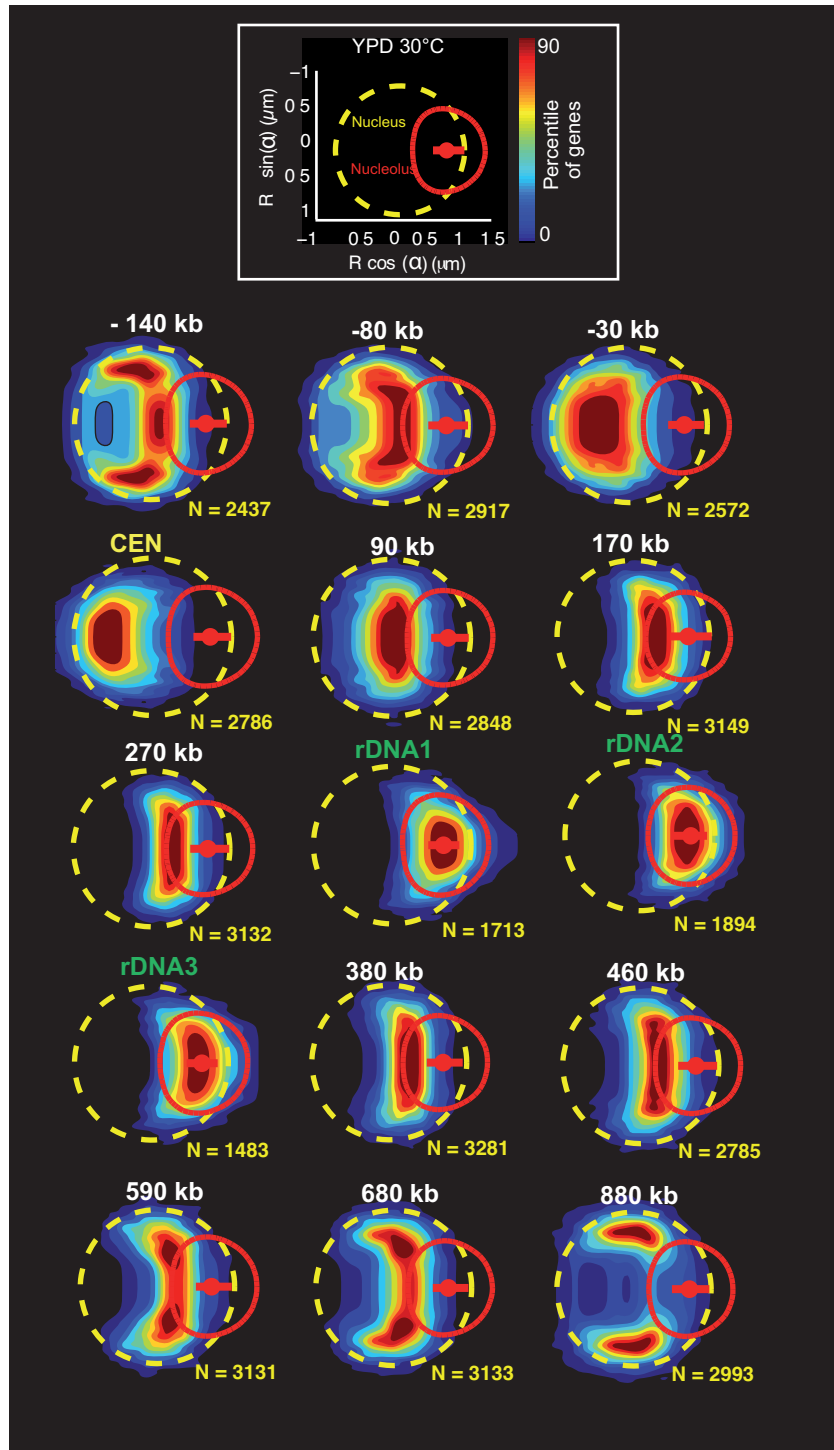
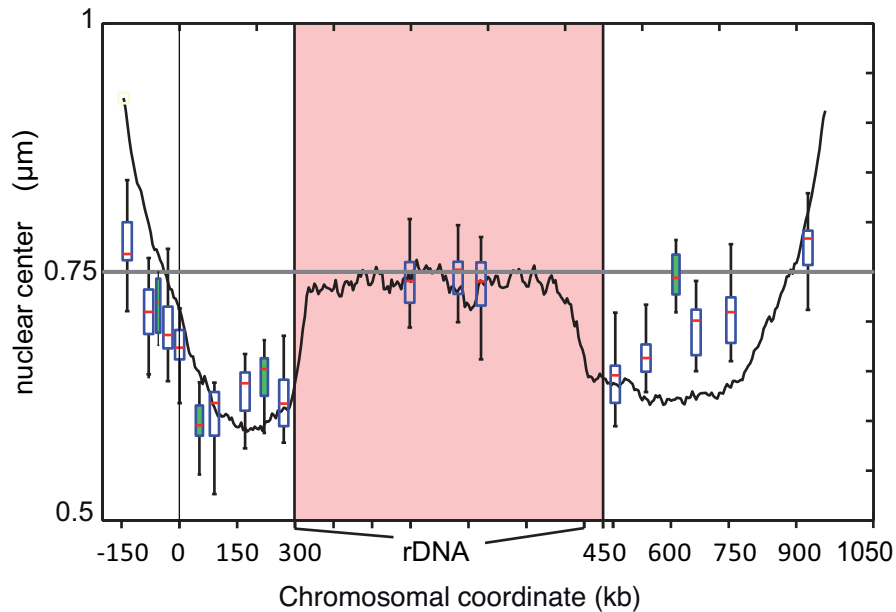
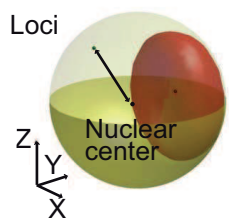
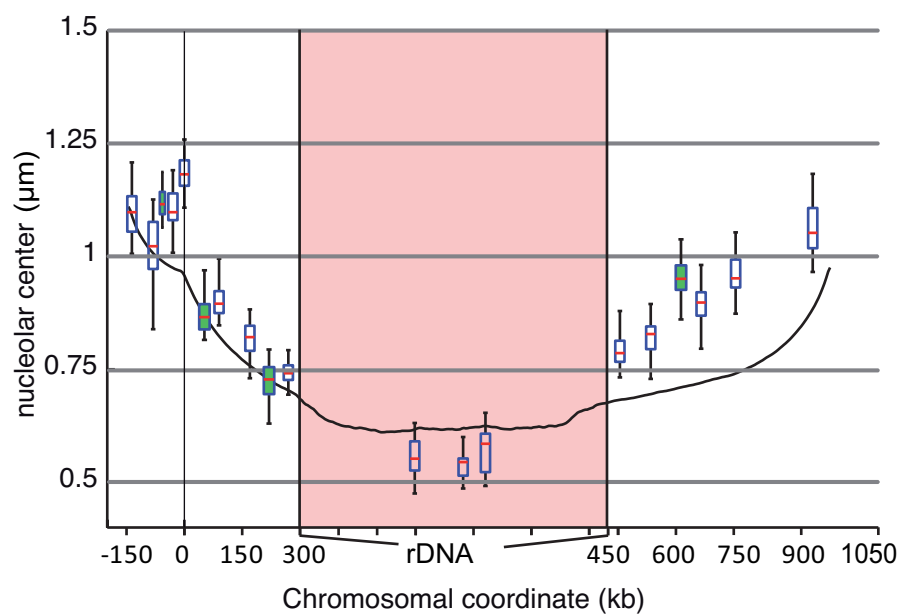
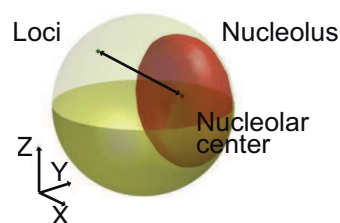


Figure 1- Albert et al.,

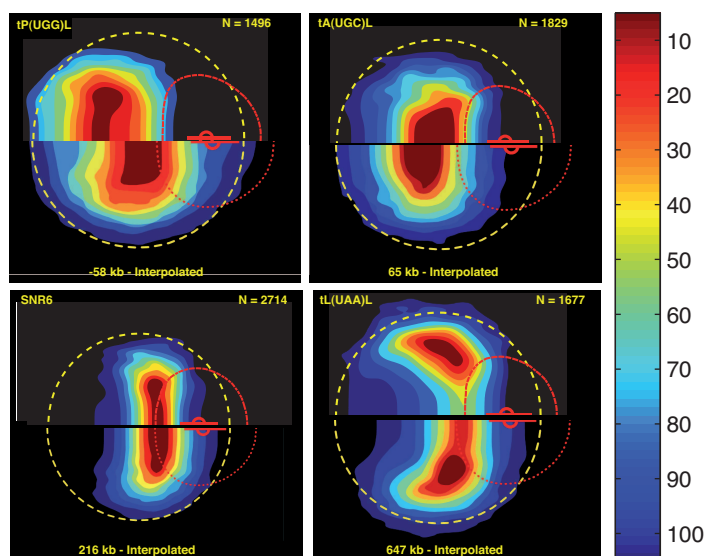
A



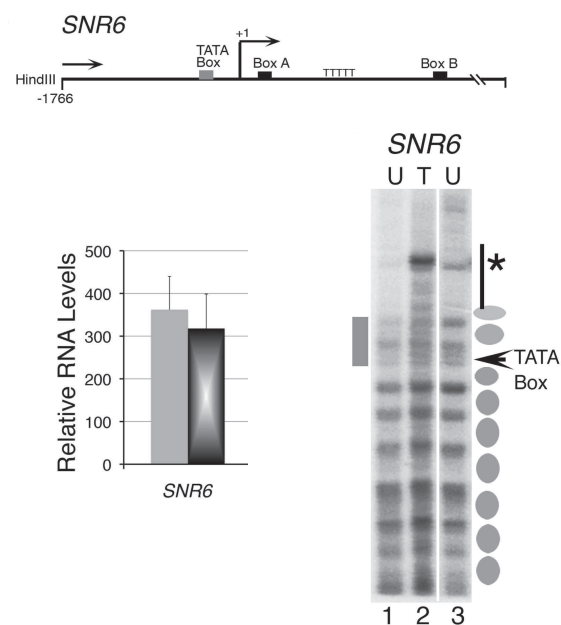
B



C



D



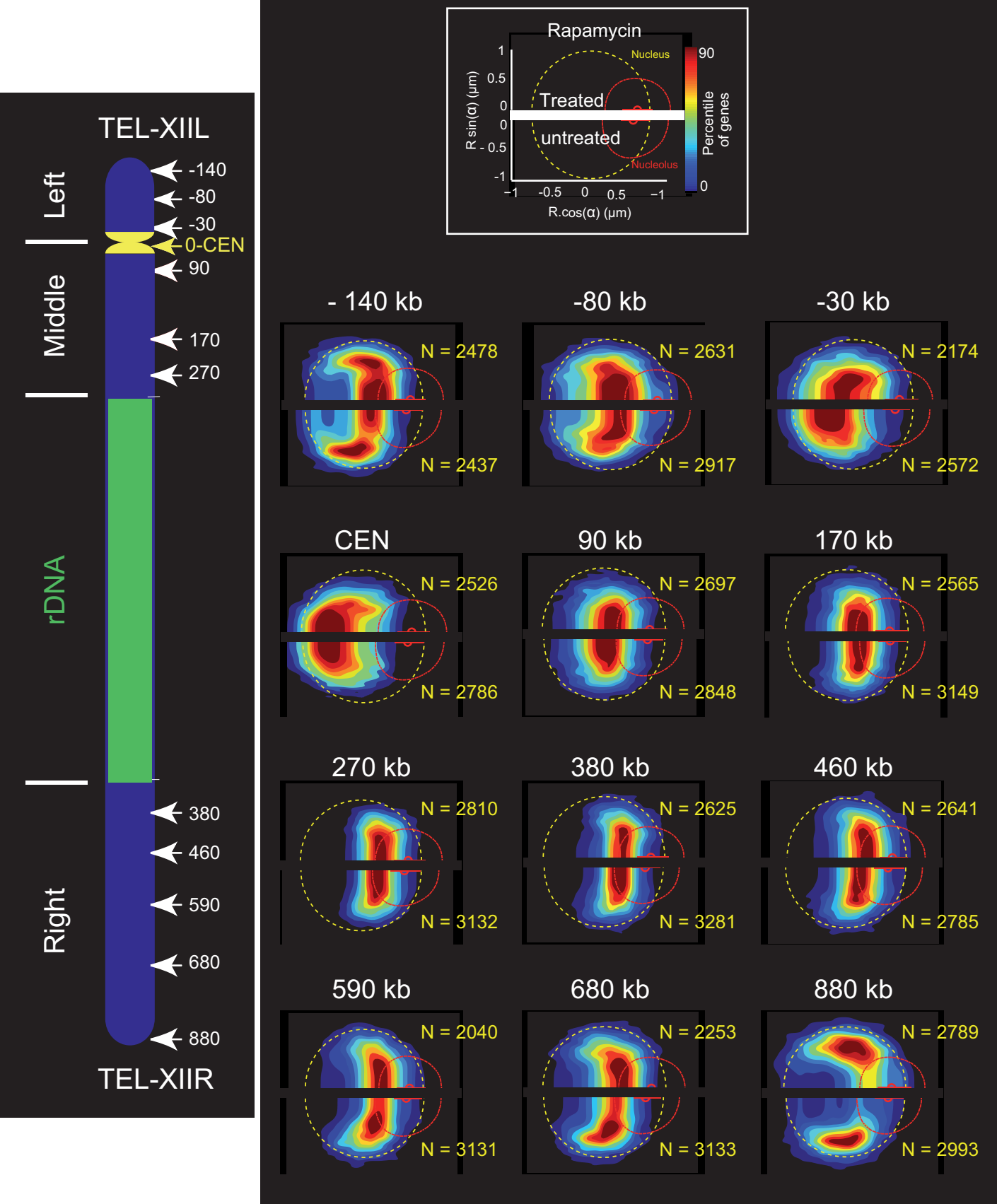


Figure 3- Albert et al.,

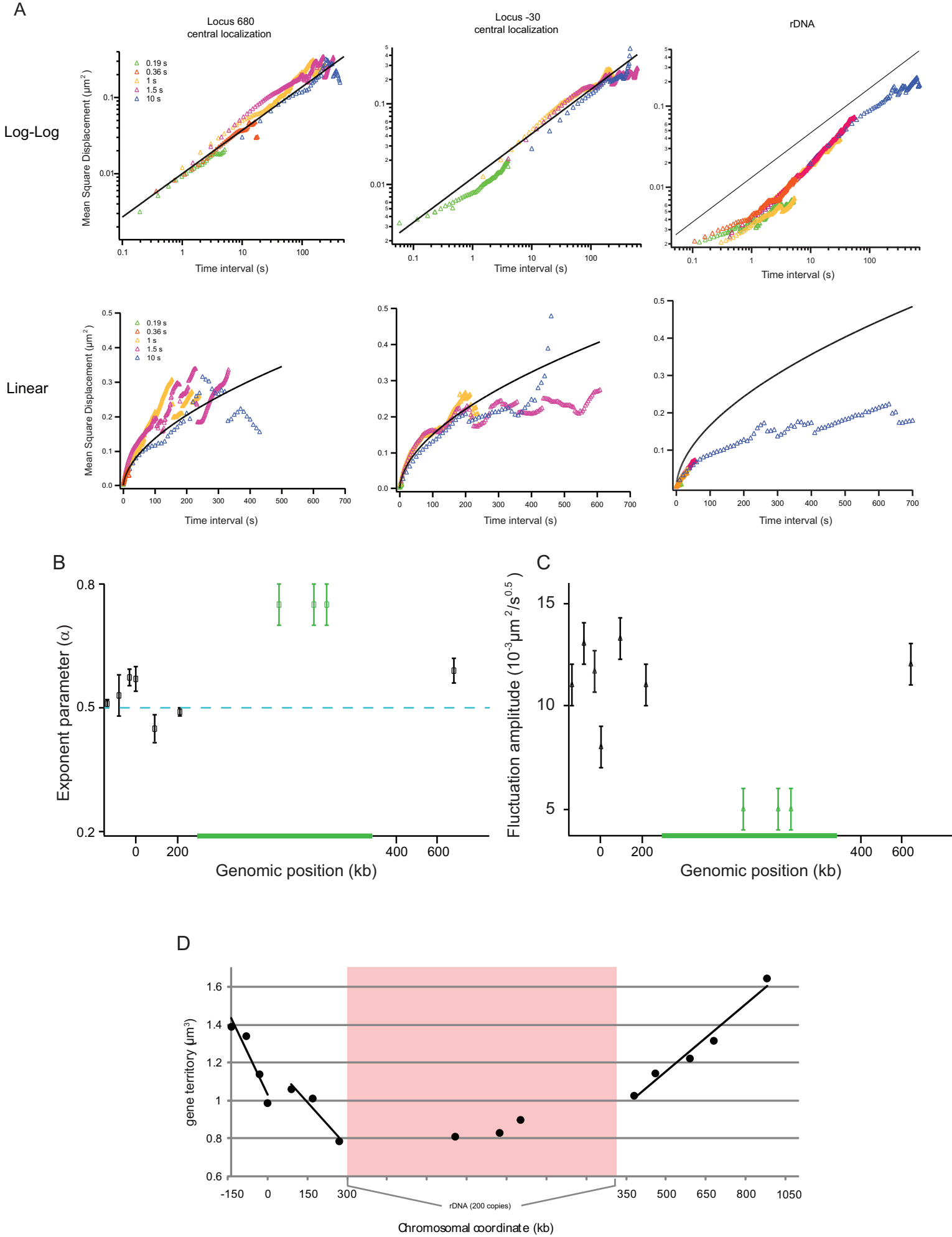
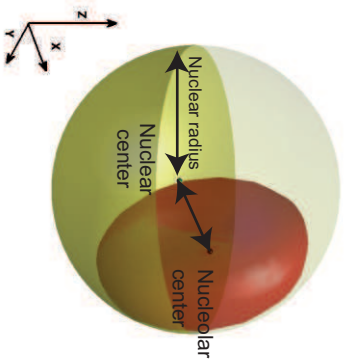
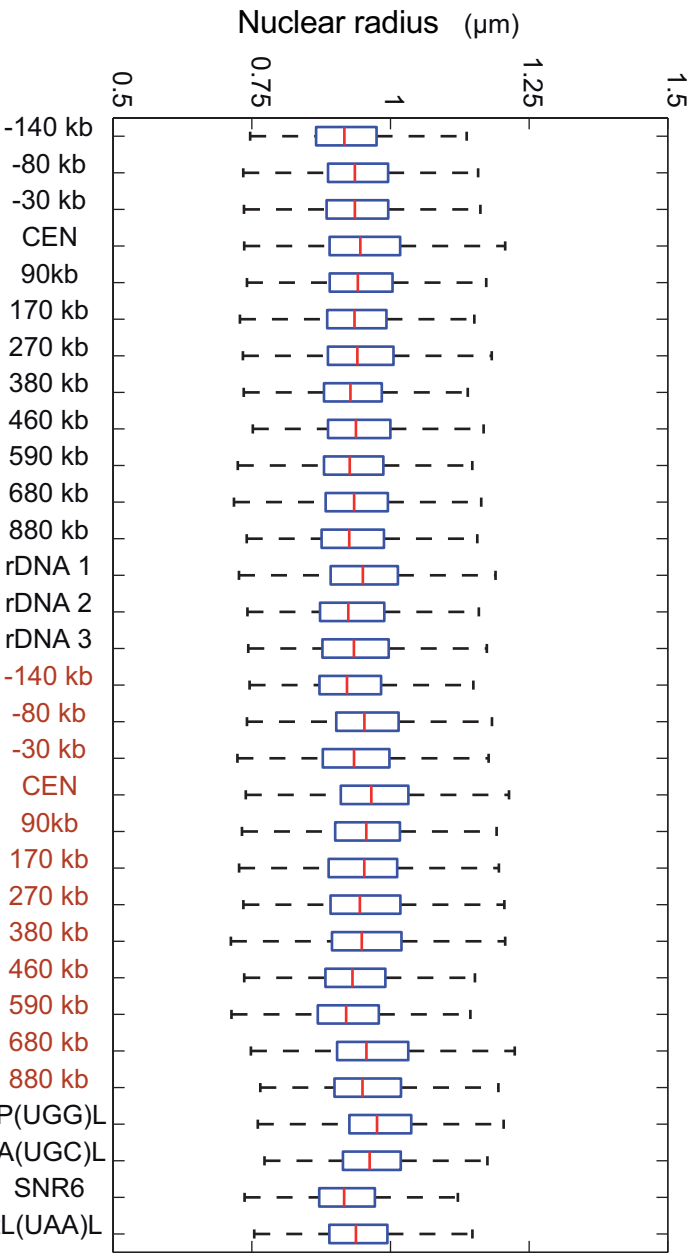


Figure 4- Albert et al.,

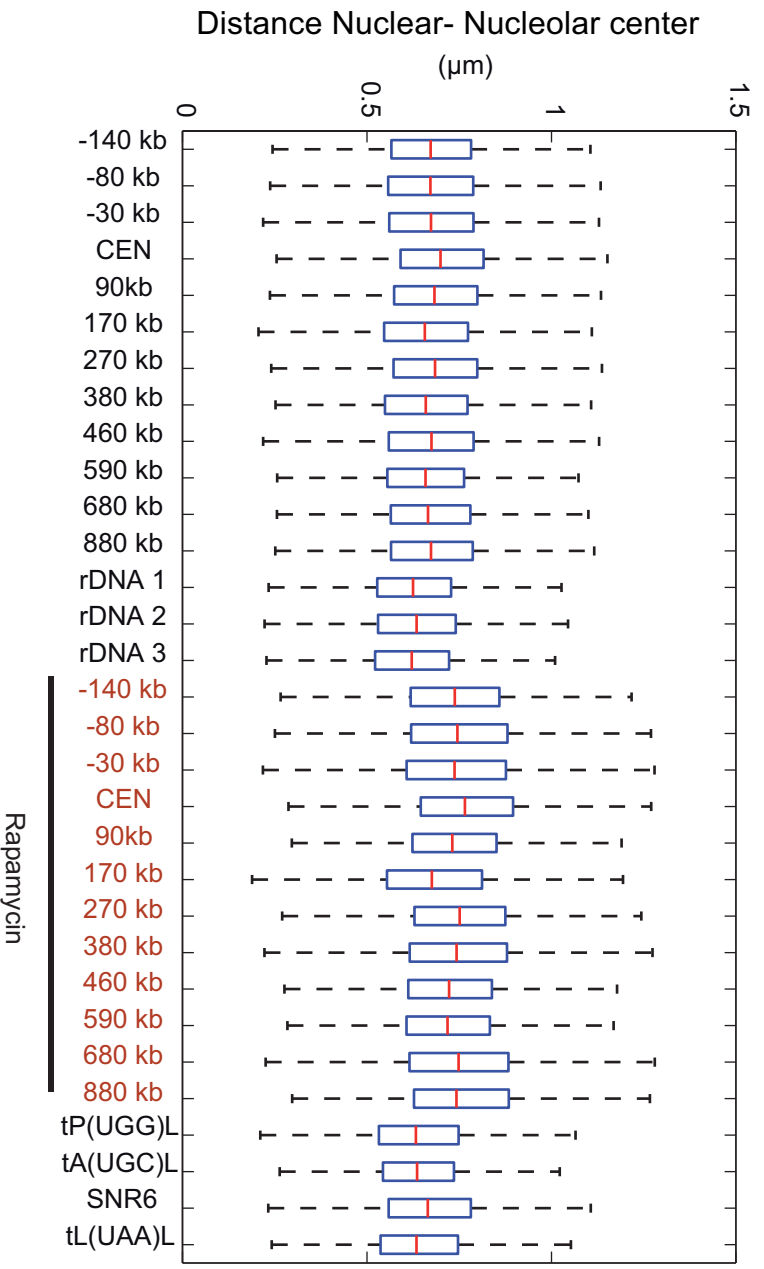


A

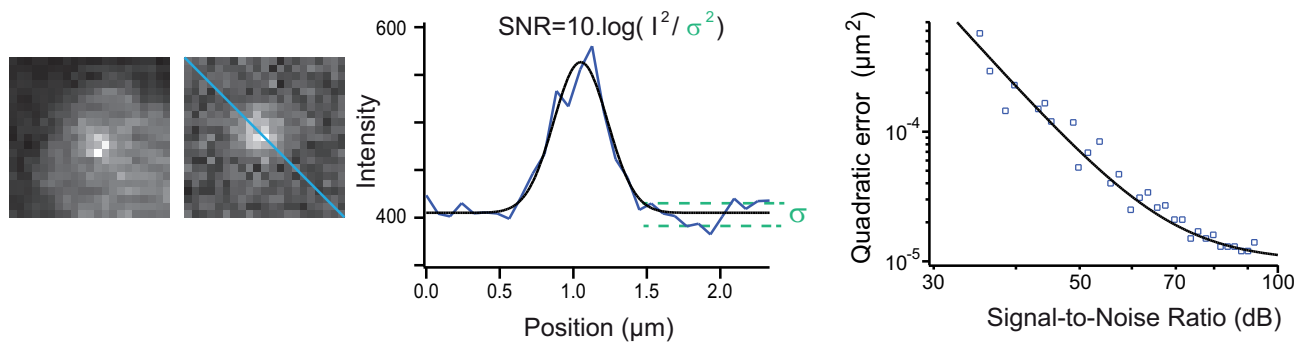
B



C



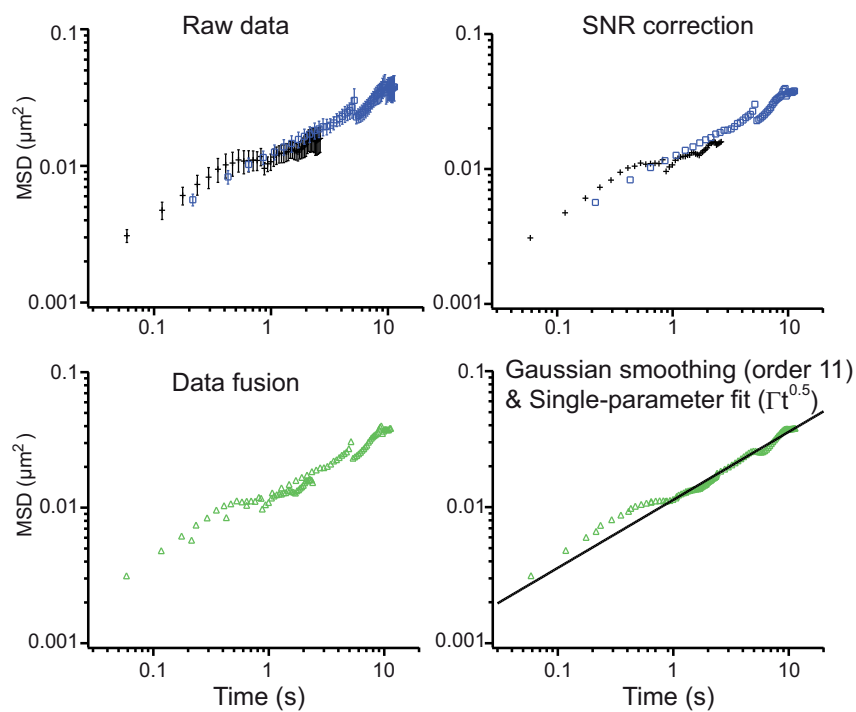
A



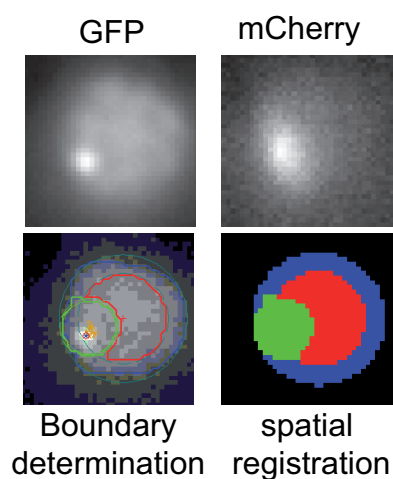
B

Position	SNR (dB) 60 ms	SNR (dB) 200 ms
-136	46 +/- 2	58 +/- 7
-80	65 +/- 3	72 +/- 6
-30	60 +/- 2	72 +/- 5
0	40 +/- 2	68 +/- 15
90	41 +/- 2	59 +/- 5
170	45 +/- 2	49 +/- 3
rDNA1	83 +/- 9	80 +/- 8
rDNA2	83 +/- 7	79 +/- 6
rDNA3	83 +/- 9	80 +/- 9
680	33 +/- 2	53 +/- 6

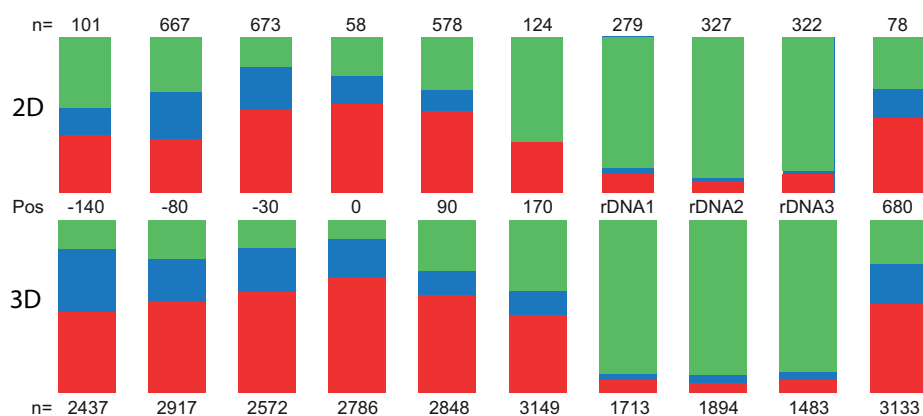
C

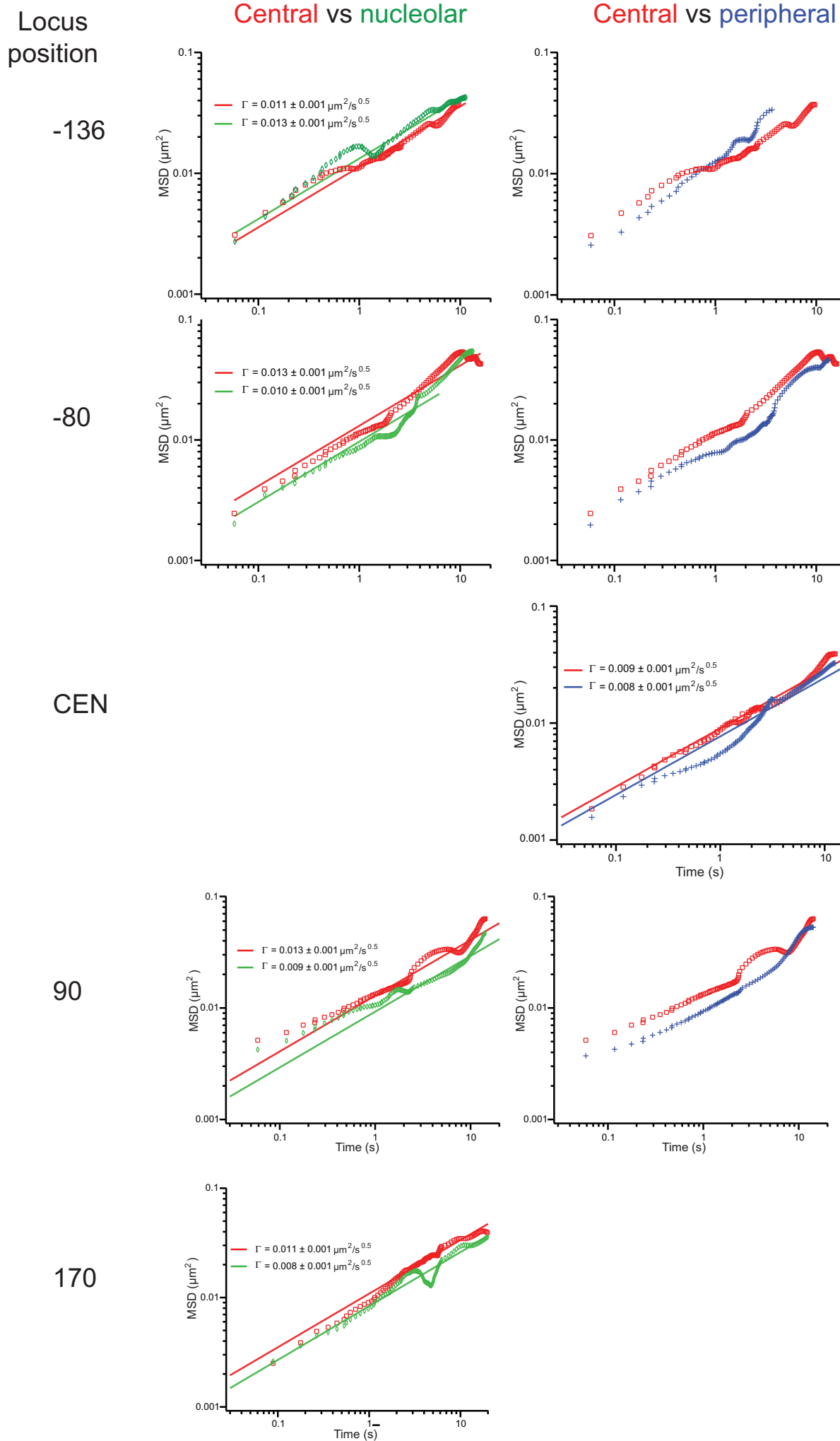


D



E





Legends for supplementary figures:

Movies 1-2: Genemaps of twelve genes along chromosome XII excluding rDNA, without (movie 1) or with linear interpolation (movie 2) generating a complete map of chromosome XII with a resolution of ~1 kb.

Movie 3: Time-lapse series of FROS labeled strain. Time-lapse acquisition of yeast nucleus with locus (-80kb; TetR-GFP) and nuclear pores stained in green (GFP-Nup49p; 10s time-intervals). The nucleolus in red (mCherry-Nop1; 100s time intervals) and brightfield imaging was performed every 100s, and overlaid with GFP signal. For visualization purposes, red and bright field images were refreshed every 10 GFP frames. Movie was set to 24 image per second, resulting in an apparent 240-times speed increase. Note that nuclear size increases with cell cycle progression, and nuclei move rapidly during mitosis. Images were processed for visualization (see material and methods).

Figure S1: Nuclear morphology of the 31 populations analyzed encompassing 15 FROS tagged strains in exponentially growing cells, 10 FROS strains rapamycin treated for 20 min, and four Pol III transcribed genes in exponential growth along yeast chromosome XII. **A** Schematic representation of nuclear radius and distances separating nuclear and nucleolar center in the cell population measured in 3D extracted using the genemap method (Berger et al., 2008). Boxplot of nuclear radius (**B**) and distance between nuclear-nucleolar center (**C**) in each of the 31 populations analyzed are shown. Nuclear morphology is comparable in each cell population, except for an increase in nuclear-nucleolar center distances when rapamycin treatment is applied

Figure S2: Tracking genes in living cells. **(A-C)** Signal-to-noise (SNR) ratio determination allows correction of measured mean square displacements (MSD). **(A)** We measured the tracking error in our custom-made software by generating particles with controlled SNR. Point-like structures of defined positions were generated *in silico* (simulated image; left part). The middle panel shows the intensity signal along the blue line represented on left image (blue curve, the pixel size is 80.5 nm), and the solid curve is a Gaussian fit. The quadratic localization error is plotted as a function of the SNR in the right panel (the line is a guide to the eye). **(B)** In the table, the measured SNR from time-lapse acquisition is reported for each locus, and for fast (60 ms) or slow (200 ms) interframe acquisitions. **(C)** We show for locus - 136 the process flow for mean square displacement (MSD) analysis, starting from raw data (upper left graph). We then compensate for the difference in SNR by adding an error to the slow acquisition MSD dataset (as measured in A, right graph), which is determined by the difference in tracking precision. Datasets are then fused (lower left panel), and filtered using a Gaussian smoothing (order 11; lower right panel). The resulting dataset is adjusted with an anomalous diffusion model (black line). **D** Spatial registration of cell nucleus. For time lapse acquisition of each nuclei (upper left panel), the nucleus is automatically segmented to define central, peripheral, and nucleolar regions, respectively red, blue, green. Two-color imaging of GFP signals at the left, and the mCherry-Nop1 signal at the right, are used for segmentation (upper panel). These signals were segmented using an automatic contour detection based on thresholding, and the resulting shapes were fitting with a circle (green, red and blue outlines). We then defined three nuclear regions: the nucleolus, which consisted in the region delimited by a circle of $1.1 \times (\text{nucleolus radius})$; the nuclear periphery, which consisted in the region located beyond 31% of the nuclear radius and the nuclear center, which was the region located at a distance to the periphery smaller than 31% of the nuclear radius (right panel). We also added a number of constraints to determine the gene position and to disregard cells with

anomalous shapes. (E) Spatial registration allows an unbiased sampling of gene trajectory in each nuclear region. Proportion of trajectory found in nucleolar, central or peripheral nuclear sub-compartment is compared with gene position determined in 3D. The distribution of genes in each region is represented for 10 loci using the tracking software (upper panel, 2D). The lower panel depict 3D gene localization in each cell population using Genemap method (Berger et al., 2008). When using Genemap (Berger et al., 2008), coordinates of a gene, the nucleolus (NUC) and the nuclear envelop (NE) are determined. Genes are considered nucleolar when at less than 100 nm from segmented NUC, peripheral if at less than 100 nm from the NE, otherwise central. This tool allowed us to collect robust statistics over 50-500 cells.

Figure S3: MSD responses for loci -136, -80, CEN, 90 and 170 kb along chromosome XII.

In the left panel, we plotted the MSD response for a central or a nucleolar localization (red and green datasets, respectively). The same plot for a central and a peripheral localization is shown in the right panel (red and blue dataset, respectively). These data were adjusted with an anomalous diffusion model with one adjustable parameter in $\Gamma t^{0.5}$. Note that the MSD datasets for genes located at -30, 680 kb and in the rDNA are represented in Figure 4. Nucleolar and peripheral trajectories were not obtained for respectively loci CEN and 170.

Supplementary references :

Berger, A.B., G.G. Cabal, E. Fabre, T. Duong, H. Buc, U. Nehrbass, J.C. Olivo-Marin, O. Gadal, and C. Zimmer. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods*. 5:1031-1037.

Supplementary table 1 : Yeast strains				
FROS position/ Gen. position	FROS position/ CEN as origin	Name	genotype	Origine
WT	WT	ODN1-1a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trp1Δ0</i>	This study
		Nucloc2	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ1 ura3-Δ851 ade2-801 lys2-Δ202::GFP::TETR-LYS2 nup49Δ::HPHMX3 + pASZ11-NupNop</i>	(Berger et al., 2008)
untagged	untagged	TMS1_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6 + pASZ11-NupNop</i>	Offspring of ODN1-1a x Nucloc2
untagged	untagged	yJUK10-1a	<i>MATa his3-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6 + pASZ11-NupNop</i>	Derivative of TMS1-1a
Chr XII -014 kb	Chr XII -136 kb	Ben1_2a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interPAU18-AYT1::his3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 070 kb	Chr XII – 80 kb	Jez15_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interGRC3-RIX7::ura3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 120 kb	Chr XII – 30 kb	ICH5_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLL014w-YLL013c::tetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 150 kb	Chr XII – 0 kb	Jez11_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interDNM1-cen::his3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 240 kb	Chr XII - 90 kb	HBT24_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR048W-YLR049C::HIS3::TetO-Nat + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 320 kb	Chr XII - 170 kb	Ben3_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR092w-YLR093c::HIS3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 420 kb	Chr XII 270 kb	HBT27_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR143w-YLR144c::URA3::TetO-Nat + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 530 kb	Chr XII 380 kb	Jez14_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR188w-YLR189c::ura3::TetO-NAT+ pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 610 kb	Chr XII 460kb	HBT28_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR238W-YLR239C::HIS3::TetO-Nat + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 740 kb	Chr XII 590 kb	Ben5_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR307w-YLR307c-a::HIS3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 830 kb	Chr XII 680 kb	Jez1_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR353w-YLR354c::his3::TetO-NAT + pASZ11-NupNop</i>	This study
Chr XII 1030 kb	Chr XII 880 kb	HBT30_1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ1, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR451w-YLR452c::HIS3::TetO-Nat + pASZ11-NupNop</i>	This study
SUP4	ChrX – 90 kb	yCNOD72-1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ0, C, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interSUP4::HIS3::TetO-Nat+ pASZ11-NupNop</i>	This study
SUP53	Chr III -24 kb	yJUK03-1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2::ura3::TetO-Nat, C, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6, interYLR451W-YLR452C::his3::TetO-Nat + pASZ11-NupNop</i>	This study
SNR6	Chr XII 210 kb	yCNOD15-1c	<i>his3-Δ1, leu2-Δ0, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801,LYS2::TETR-GFP, nup49-Δ::HPH-MX6 interSNR6-YLR108c::his3::tetO-NATMX6 + pASZ11-NupNop</i>	This study

Supplementary table 2 : Oligonucleotides

number	Name	Geomic position	séquence
558	chrXII-014K-M13F	interPAU18-AYT1	AATTCATCGTCTTATATTTTCGATAATAAAACAATACAGTGAGCGTTGTTATTAAGTAAAT CATAGGCACTTGGTATCATGTAAAACGACGGCCAGT
559	chrXII-014K-M13R	interPAU18-AYT1	TCAATAAGGAGATGAACTAGGCCATCAACAATTACTAACACGCACACACGCACTACTAC AACTACTTGATTTTGAATTATGGAAACAGCTATGACCATG
610	o-chrXII-70k-M13F	interGRC3-RIX7	CGTCATGAGACGTGGCCAATTTCATGAAAAGATAGAAAGAAAAGGTAATCGTACATTTTT TAATAGTGAAGATAGAGGATACAGTAAAACGACGGCCAGT
611	o-chrXII-70k-M13R	interGRC3-RIX7	GTCCCTAGAAGTTAGTATGACTTAGATATTGAAGGAATATGAGTATACATAACAAATATA TAAAACCTTGCATGATTTTTGGAAACAGCTATGACCATG
560	o-chrXII120k	interYLL014W-YLL013C	ACATGACAACAGTATTCTCAGTCAAATGATTTCAAATACACAATGTTAAATTTCTCTATCT GTTGCAGAAAATAAGAAGAGCGTAAAACGACGGCCAGT
561	o-chrXII120k-rev	interYLL014W-YLL013C	ATATTCATTATTTGCTTTTTTCCATTACCTACTTTTTGTACCTCATCTCTATTTTTCTGCAA AAATCTTTGCGCTCTTACGAAACAGCTATGACCATG
606	o-chrXII150k-M13F	interDNM1-cen	TTATAGGTCAGTGTATTCTTTACTCAGTTGATGATTTCAAATGTGCTCTCCTCTCCA TTCTTTTTCTTGTAAATAAAAATGTAACGACGGCCAGT
607	o-chrXII150k-M13R	interDNM1-cen	GGTAGAGCTTCTCTAGTGAAGGTTCTCTAGCTTAGTTAATACTTTTGGCATTGCTAATAT TTGTTATTTATTTAGTTATGGGAAACAGCTATGACCATG
562	o-chrXII24k	interYLR048W-YLR049C	TTTTTATTAGGTAAGTGGTTTCAATAATTAATTTTACGCGGAAGGCTGACTATCTA TAGTATTGAAGATAAGTTAAGTAAAACGACGGCCAGT
563	o-chrXII24krev	interYLR048W-YLR049C	AATACTCGGGTGAACCCGTGATGGCGAATAGTGCAAATTTAATTAATAATAAAAATGAA ATATCAGAACTAAACATTAATGGAAACAGCTATGACCATG
564	o-chrXII32k	interYLR092W-YLR093C	TCATAATGAGATAGACACTGTTTATAATAAGAATAATAGGTAGGATGGTGCCATCG TGAGCATATACATACCTATAAGTAAAACGACGGCCAGT
565	o-chrXII32krev	interYLR092W-YLR093C	ACGACAATAACATTAATAACGGTTGATTTCTTTTGTCTGAGAGGAAGAGAAAAATAA AATAAAAATAAGGTAATATGAAACAGCTATGACCATG
566	o-chrXII42k	interYLR143W-YLR144C	ATACGCTGTCCACGCTCCTGGCGGTGTAATGATAGACAGATCCCAATATGTTAGCA AATCATAGGAACAACACCATATGTAACGACGGCCAGT
567	o-chrXII42krev	interYLR143W-YLR144C	TCCTAAACCATCATCAATAATCAAATTTACAGAACACACCTTAATTGTGCGGCGTATT CTAAATTTTACGTGTTACAGGAAACAGCTATGACCATG
568	o-chrXII53k	interYLR188W-YLR189C	TCCTGTACGCCTTTATACACATTAATTAATATTAGATGCACAACATACGGTACGTTTA GGAAACTCAAATTAAGCTTTAGTAAAACGACGGCCAGT
569	o-chrXII53krev	interYLR188W-YLR189C	AAGTTTCAGTCATATTTGACTCAGGAAGATATGAAAACGATAATGTTGATAATAAGAA TAATAGTAAACAATAATGAAACAGCTATGACCATG
570	o-chrXII61k	interYLR238W-YLR239C	TTTCCCCCACTAGCATCGTAAATACAAGACACACGATCCGCTTTTACGTCAGAGA TTATTATACGTACGTATATGTAACGACGGCCAGT
571	o-chrXII61krev	interYLR238W-YLR239C	TCCGTGAGACGGATGACTCCCCCATACTTTCTTAAATGAAAGGATGCTTACCTTTTT TACATGTGAATATCTATTACATGGAAACAGCTATGACCATG
572	o-chrXII74k	interYLR307W-YLR307C-A	AGTATGTATTAGAATAGAGGACATATATAAAAATCATATATATCGATGCTTGAATGTATA AGGAAAAGCGTCAAATATGTTAAACGACGGCCAGT
573	o-chrXII74krev	interYLR307W-YLR307C-A	CTAAAAGATTCTAAAAAATTACTTTTTAAAGTTATACCCTGACTTTATGTGACATCAGC ATCCTAAGTACCTACCGTTGAAACAGCTATGACCATG
574	o-chrXII83k	interYLR353W-YLR354C	AAACTGTTCTGTCTCGTTAAAGTCATATATATAAATAGGGATTTTCATTAATTTATATAT ATAGATATACTTGTGTACAGTAAAACGACGGCCAGT
575	o-chrXII83krev	interYLR353W-YLR354C	TTACCGCTTAAGGAAGTATCTCGGAAATTAATTTAGGCCATGTCTTATGCACGTTTC TTTTGATACTTACGGGTACAGGAAACAGCTATGACCATG
576	o-chrXII1030k	interYLR451W-YLR452C	CAGACGGACTTAAACCGCCAACAGCCTTGGCCACAGGTGTATGATGCGAAGATTCGT AAGCGCTCAGTTAGTACATCGTAAAACGACGGCCAGT
577	o-chrXII1030krev	interYLR451W-YLR452C	AGCGGAGGTGTGATTTGTTATCAACTATAATATGATTAATAAAGCCATTTATTATCT AGTATAATTTCCAATCCTGAGGAAACAGCTATGACCATG
1033		Construction of SI-Scel-URA3.	aaaaaggatccggtatcgataagctgatGATTACCTGTTATCCCTAGCGTATGTGGCTGTGGTT TCAGGTCCAT
1034		Construction of SI-Scel-URA3.	ttttgtcgaccgggctgcaggaatcgatTGT
1035	Tagging of rDNA.	rDNA	AGCAGTTTTTCCGCACCATCAGAGCGGCAACATGAGTGCTTGTATAAGTTTAGAGAA TTGAGAAAAGCTCATTTCTATAGGTAACGACGGCCAGT
1036	Tagging of rDNA.	rDNA	TCACTGTTCACTTGTCTTACATCTTTCTGGTAAAATCGTAGTTCGTAGTATTTTTTTT CATATCAAAGGCATGTCTGGGAAACAGCTATGACCATG
	SNR6_HindIII_F	Probe for IEL	AGCTTTAAAGGCTCTGATTTTGGATTCTG
	SNR6_HindIII_R	Probe for IEL	CACAGCATGGATACTGATGGTTCTTGGT
	SNR6	Oligo For RT (98 pb product)	TCTCTTTGTAACGGTTCATCCT
	SNR14 (U4 control)	Oligo For RT (115 pb product)	GCGAACACCGAATTGACCATG
	SUP4_Sall_F	Probe for IEL	TCGACATCTTGAGTGCTTAAAAATAATGTC
	SUP4_Sall_R	Probe for IEL	GAACATTGTCATGGACAGATATGTTTATTCT
	SUP4_intron	Oligo For RT (63 pb product)	ATCTCAAGATTTCTGATGTA
	Sup53_DraI_F	Probe for IEL	AAACTATTAACAAATGGAATTCAT
	Sup53_DraI_R	Probe for IEL	CGTTTCAGCTTCCACTAATTTA
	SUP53_intron	Oligo For RT (98 pb product)	TCGAACCTTGCATCTTAC
528	o-M13F_SNR6	SNR6	TGAATGTGAATATTGTTACAGCTATGCAATGGTACGATCATACTCTGAACGATCCATTTA AATTATATATGTAACGACGGCCAGT
529	o-M13R_SNR6	SNR6	GAAGGAATTTGCAAAATGATTTCTGTGAAATCTTCAATAAAAAACCTTTCTCT TCTGTTTGACGGAAACAGCTATGACCATG
578	SUP4	SUP4	TGAGGAACAACGTAAGTATTTTCAACGGAATTAGAATAGCGACATCATGACGAGCTT ATTCGCAATGTGATTTTGGGTAACGACGGCCAGT

579	SUP4	SUP4	AGGTTTCTCTTCAAAGGTATCCTCCAGAAAAGTTATGAAGTATTTTCATATGATGAT GCTGACTTAATACTTCCCAAGGAAACAGCTATGACCATG
1017	SUP53		TCCAGATGAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGGCTGATGCCGTTTTGTTAGGTGCTGTG GGGTAAAACGACGGCCAGT
1018	SUP53		TTACGGATTTTAGTAAACCTTGTTCAAGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACC AGGAAACAGCTATGACCATG

Supplementary table 3

Nom	Référence
pTetO-Nat-HIS3Δ	(Berger et al., 2008)
pTetO-Nat-URA3Δ	(Berger et al., 2008)
pCR4-HIS3-M13	(Berger et al., 2008)
pSK-URA3-M13	(Berger et al., 2008)
pASZ11-GFPNUP49NOP1-Cherry	(Berger et al., 2008)
pSK-URA3-Scel-M13	This study

Berger, A.B., G.G. Cabal, E. Fabre, T. Duong, H. Buc, U. Nehrbass, J.C. Olivo-Marin, O. Gadal, and C. Zimmer. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods*. 5:1031-1037.

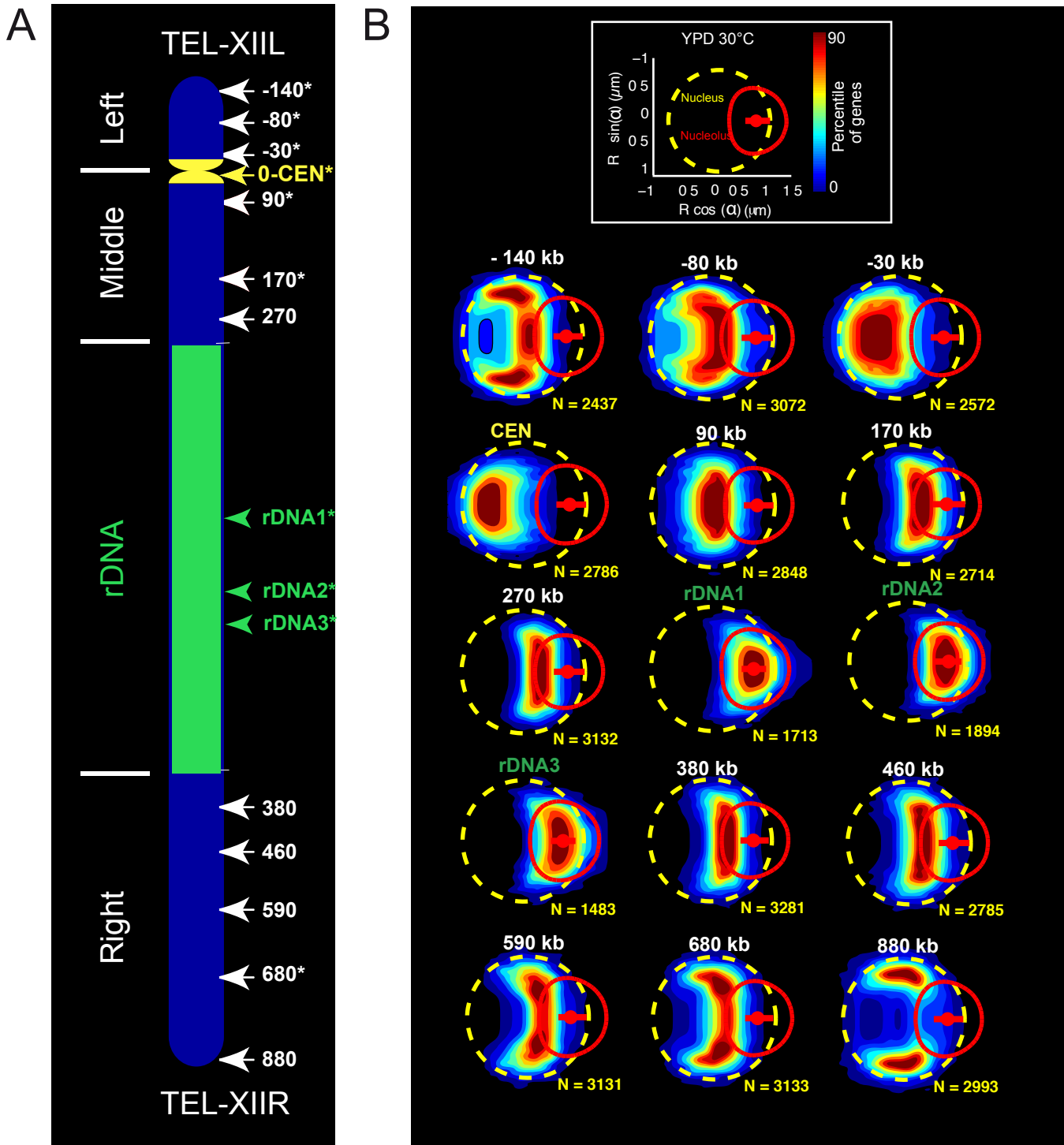
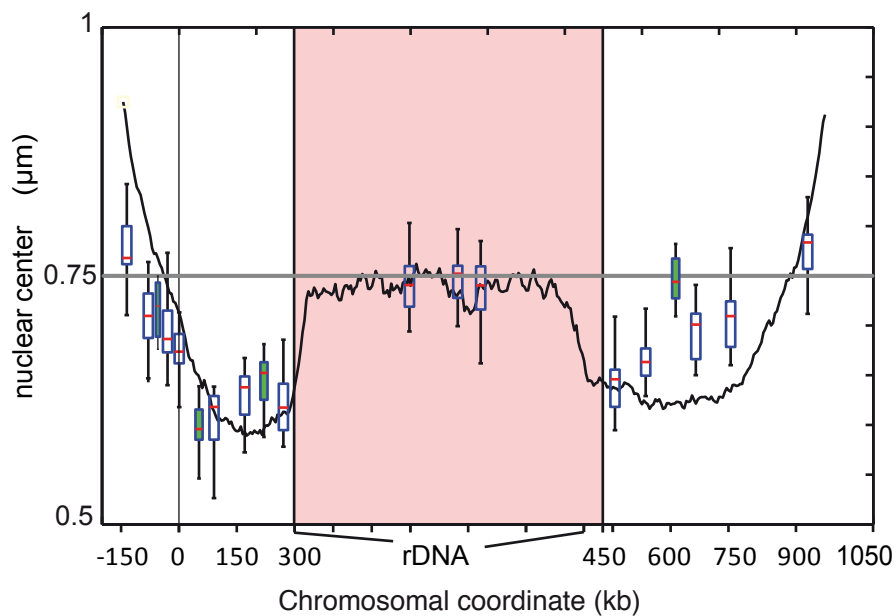
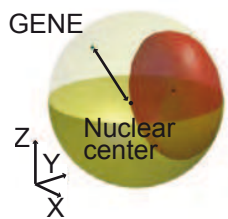
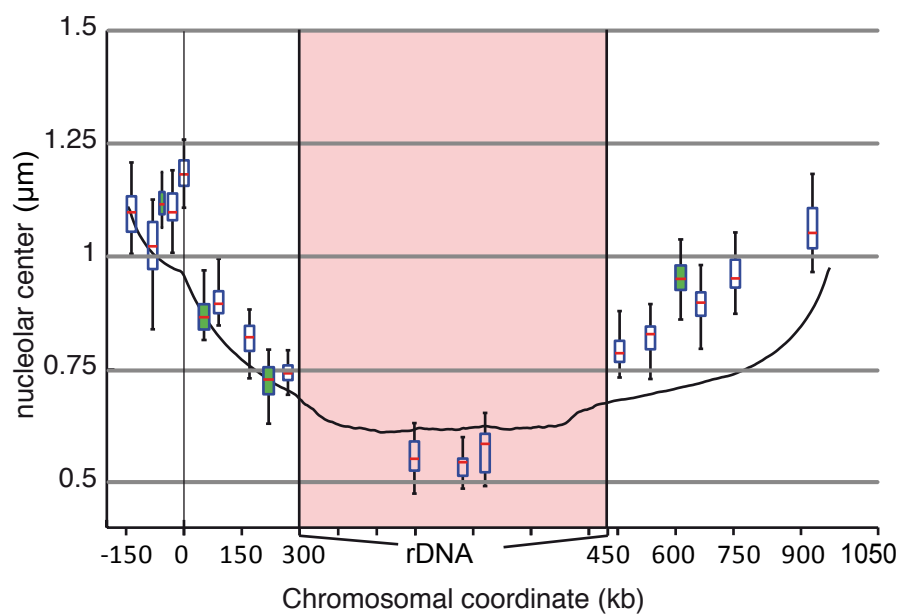
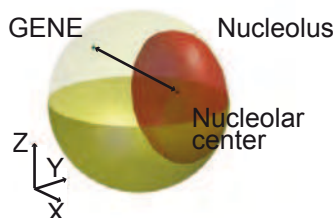


Figure 1- Albert

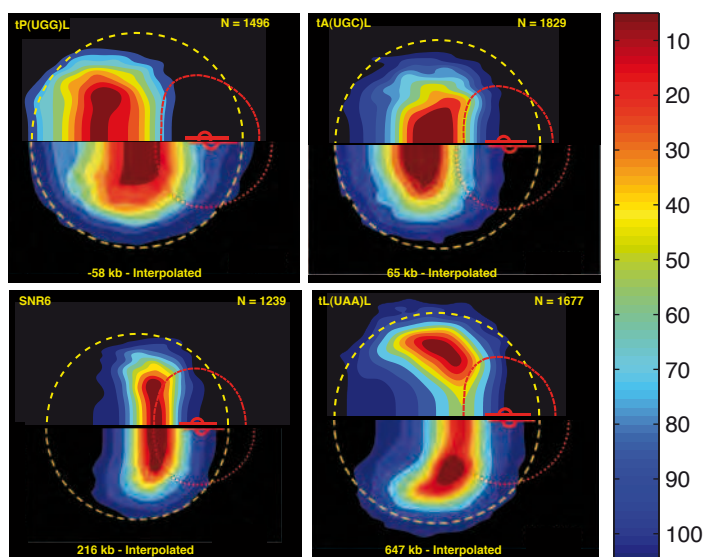
A



B



C



D

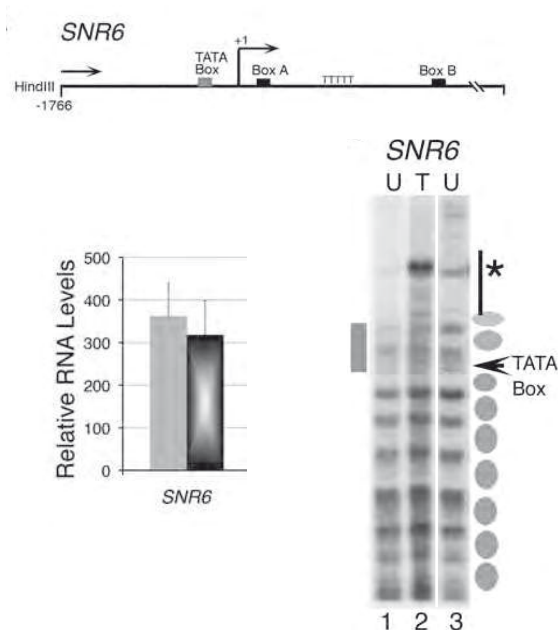
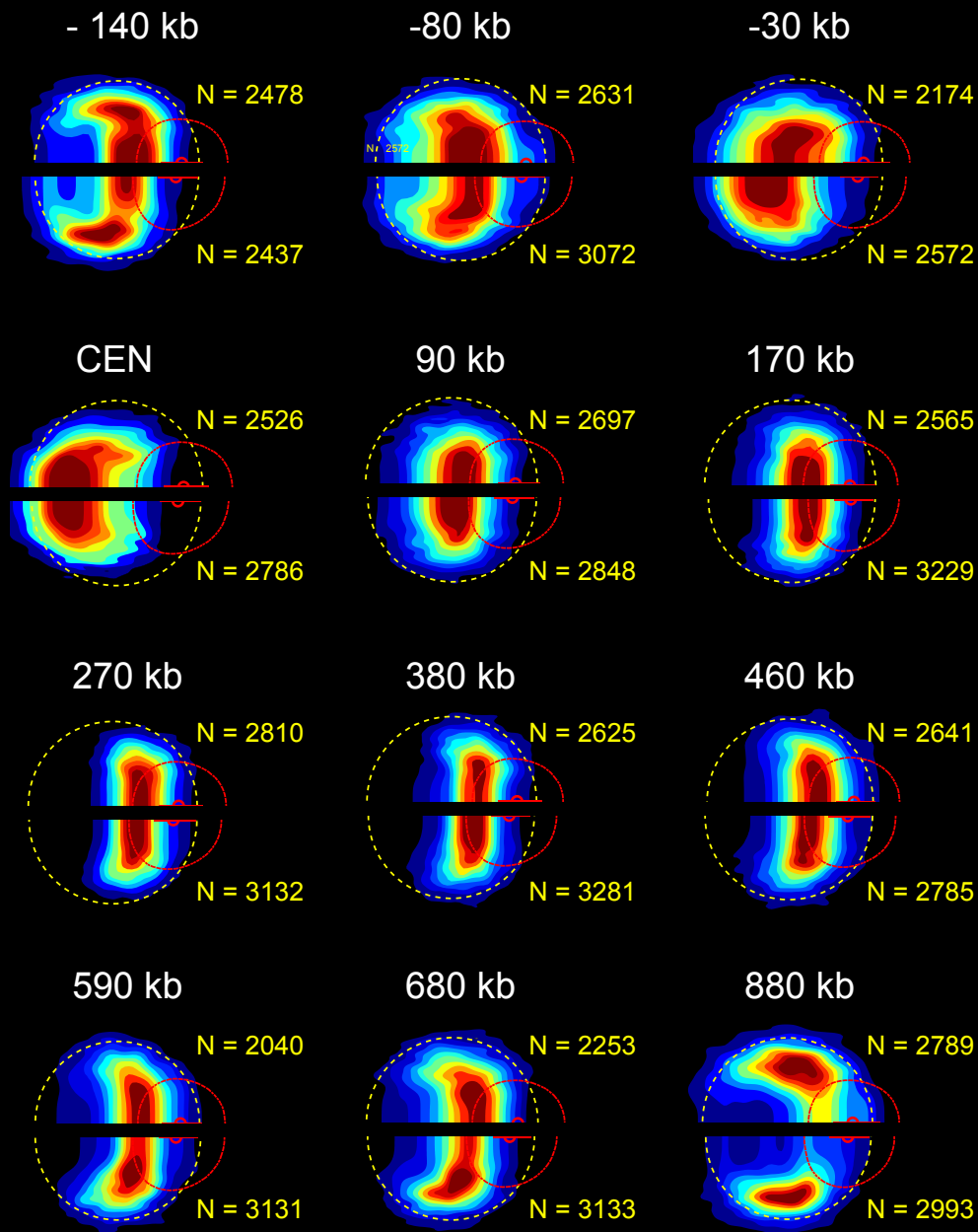
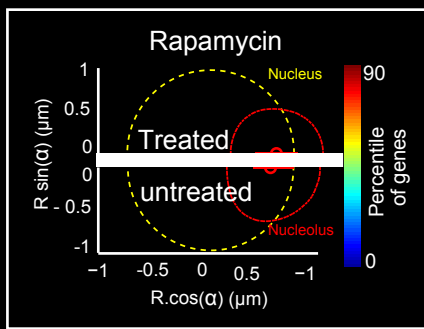
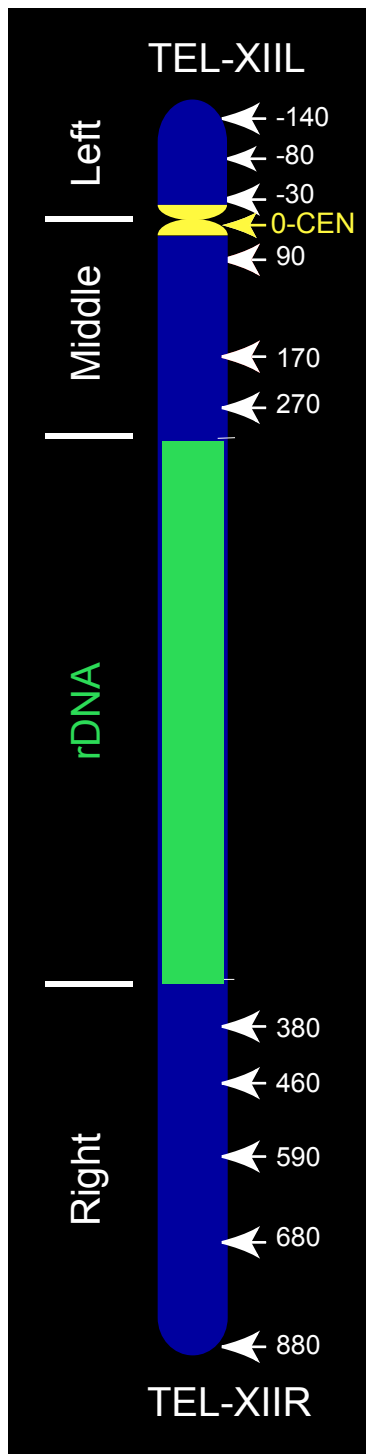
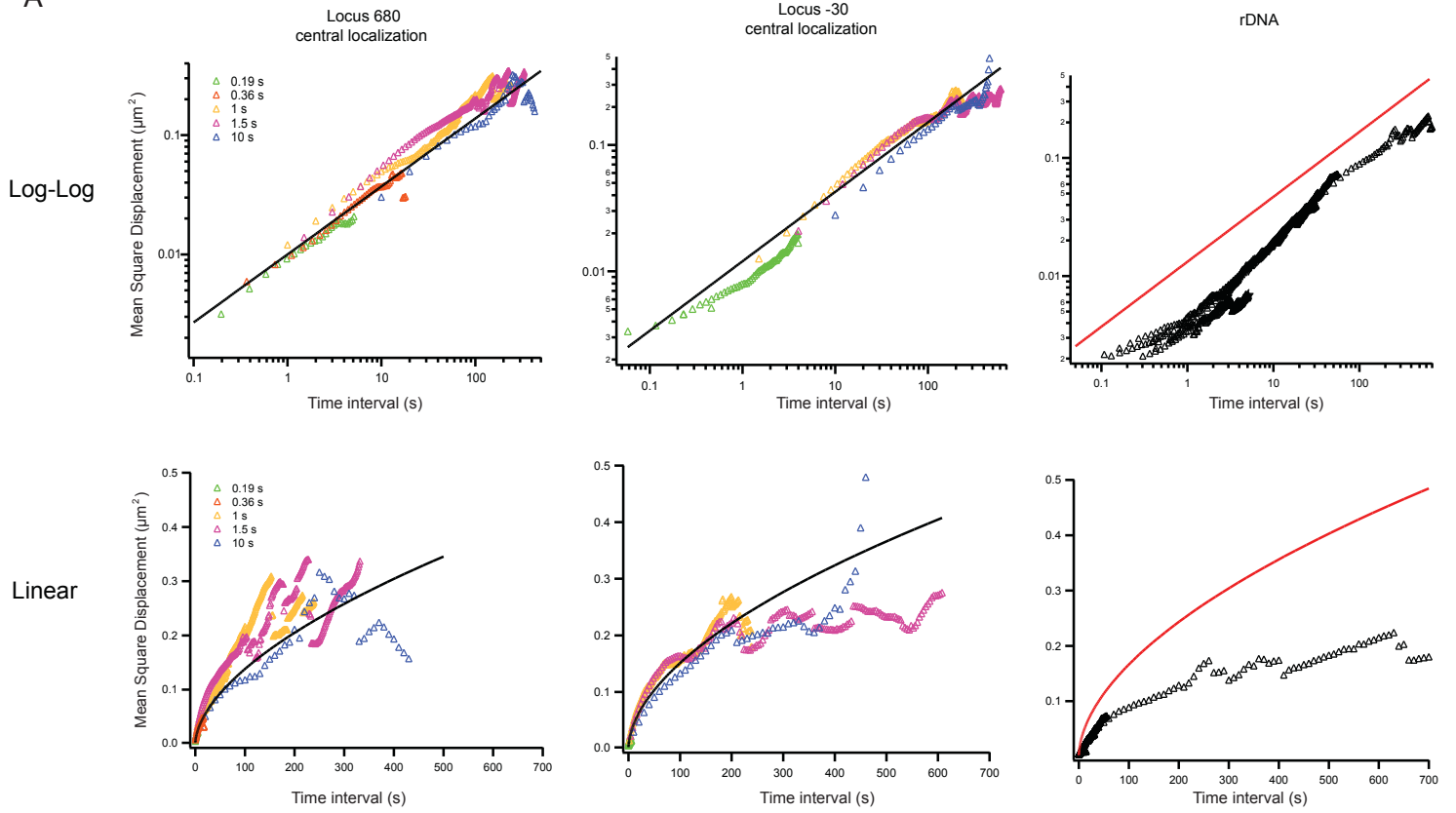


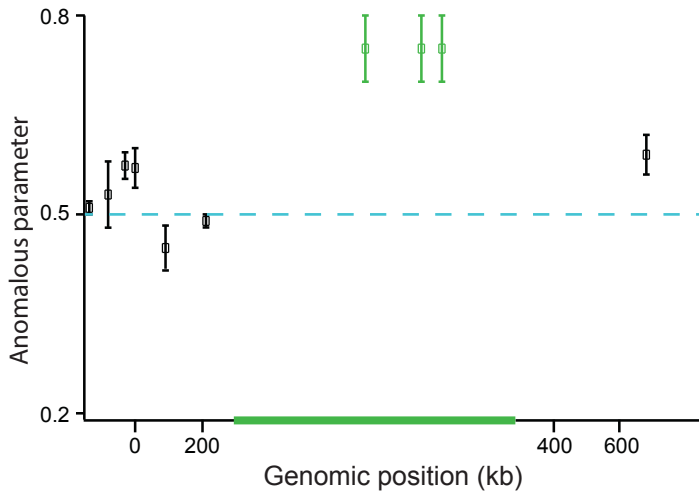
Figure 2 - Albert et al.,



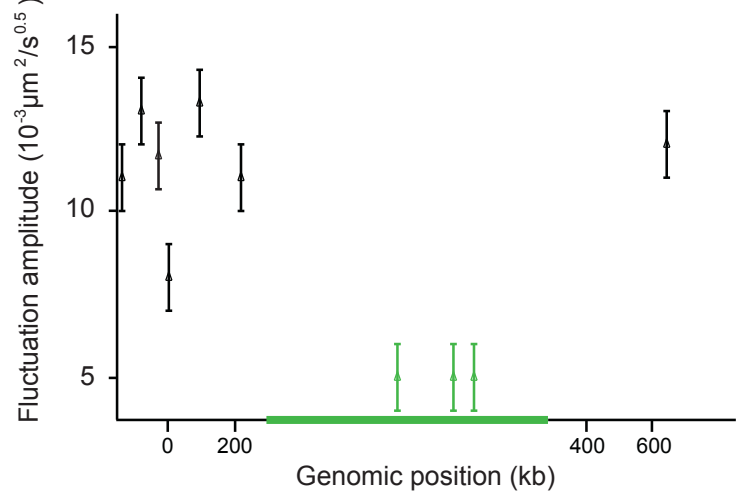
A



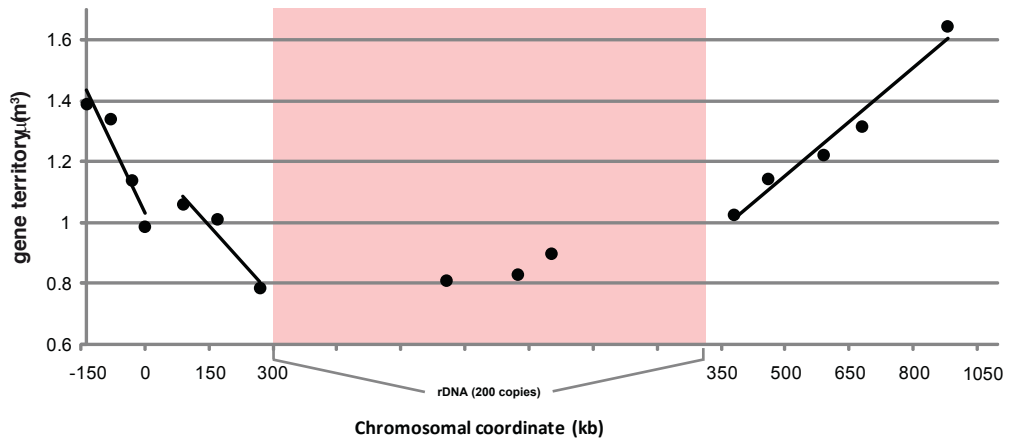
B



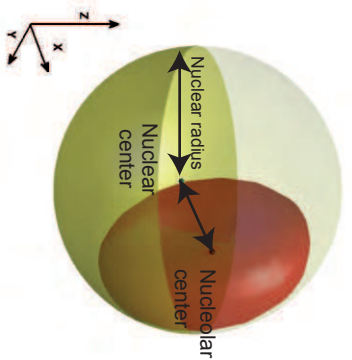
C



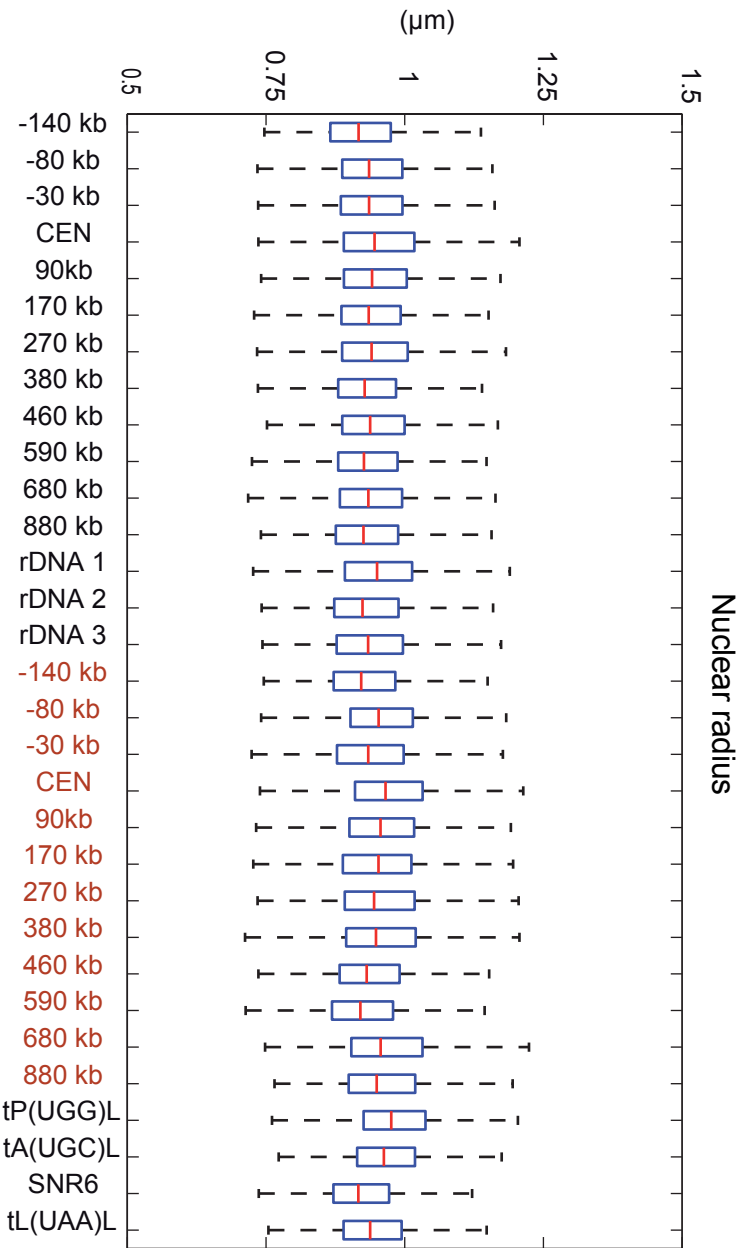
D



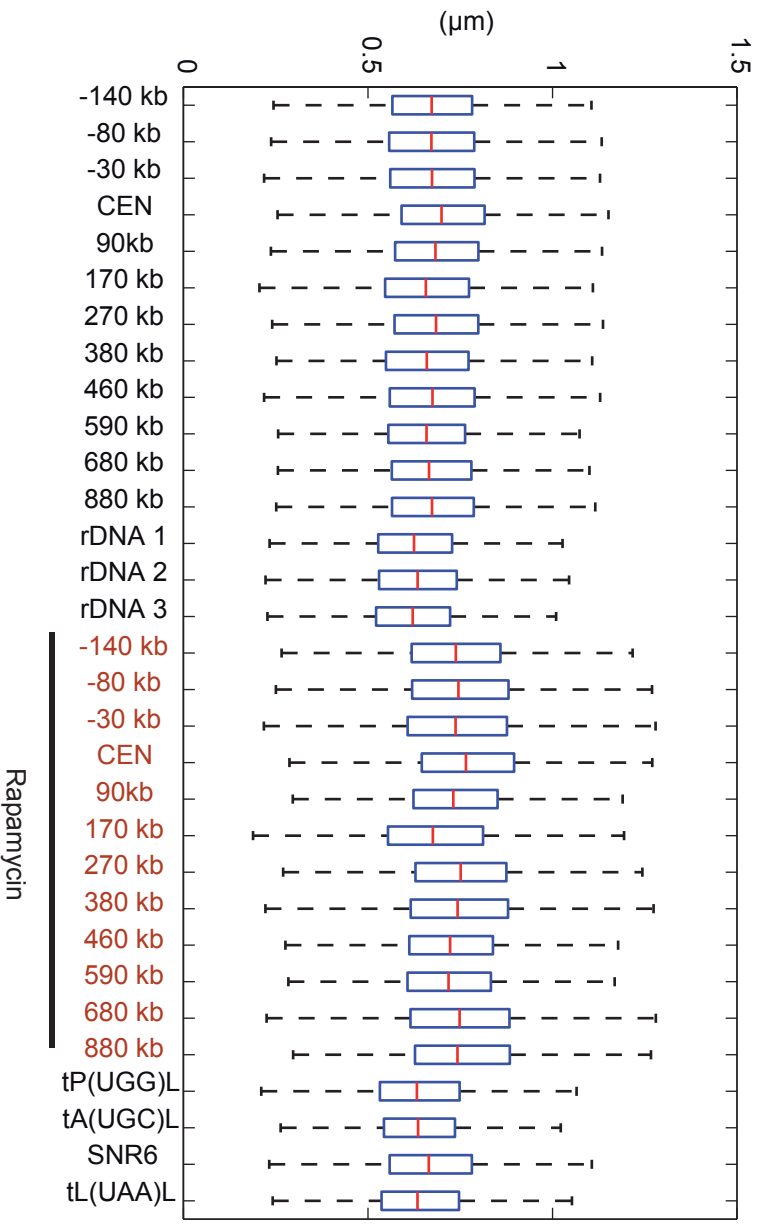
A



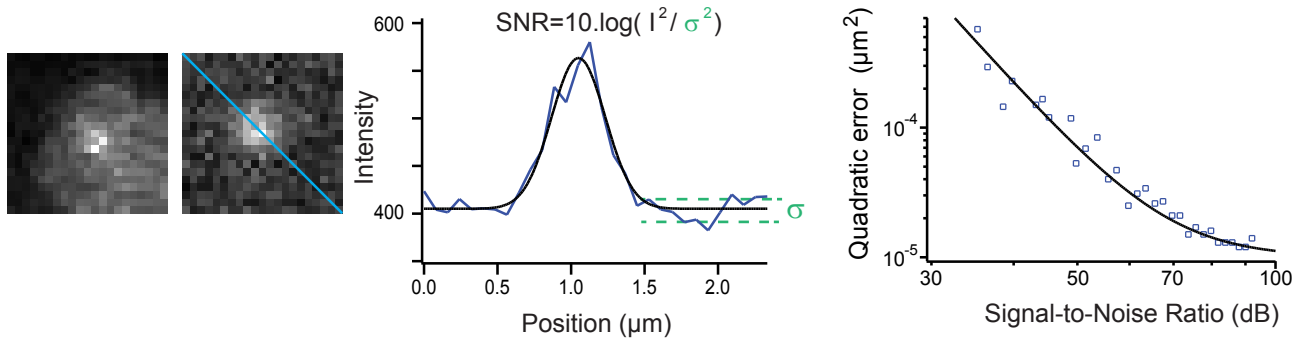
B



C



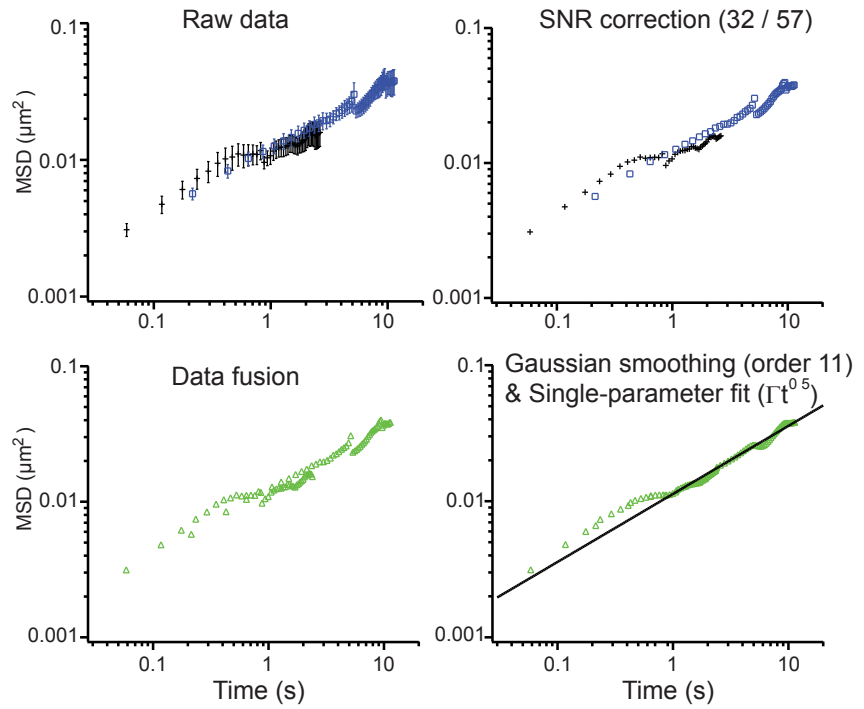
A



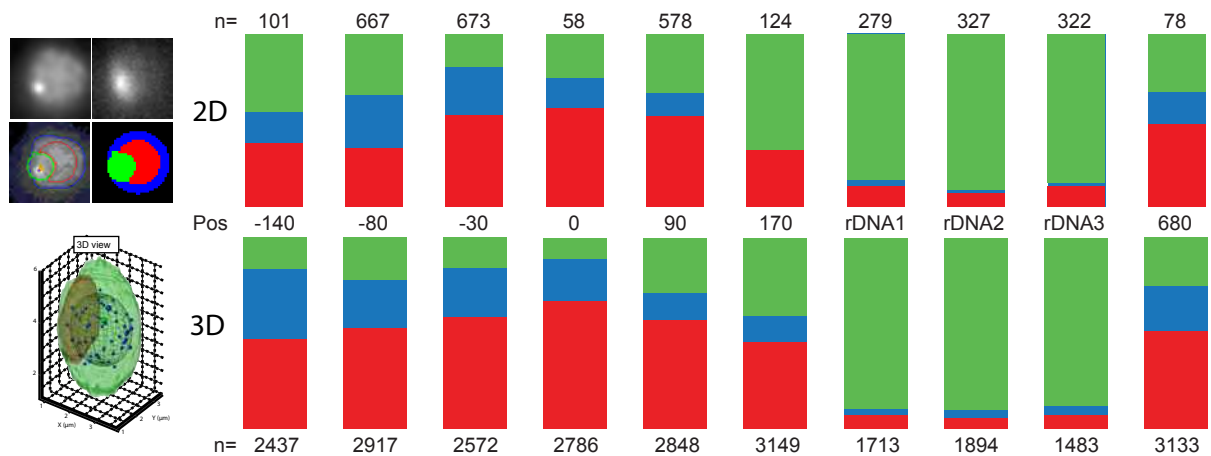
B

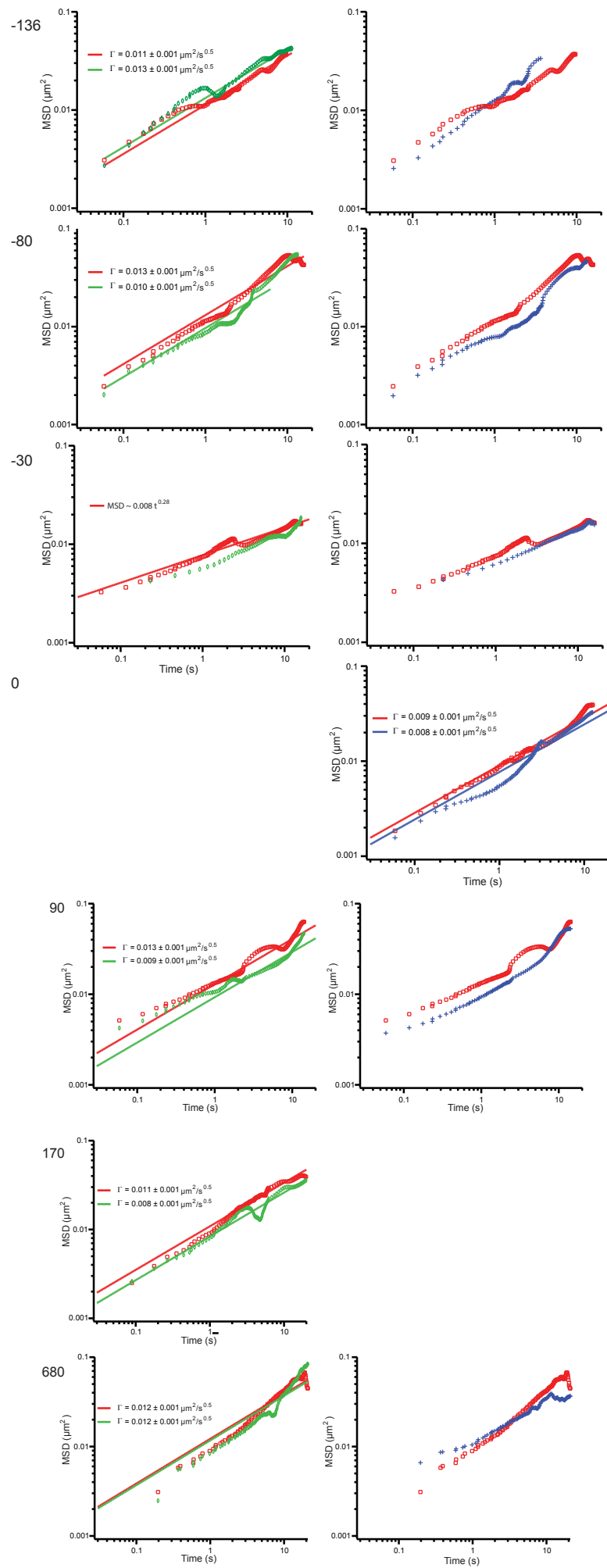
Position	SNR (dB) fast	SNR (dB) slow
-136	46 +/- 2	58 +/- 7
-80	65 +/- 3	72 +/- 6
-30	60 +/- 2	72 +/- 5
0	40 +/- 2	68 +/- 15
90	41 +/- 2	59 +/- 5
170	45 +/- 2	49 +/- 3
rDNA1	83 +/- 9	80 +/- 8
rDNA2	83 +/- 7	79 +/- 6
rDNA3	83 +/- 9	80 +/- 9
680	33 +/- 2	53 +/- 6

C



D





Supplementary Figure S3 - Albert