



**HAL**  
open science

# Mise en évidence d'un nouveau mécanisme permettant le rajeunissement des microtubules : l'effet des moteurs moléculaires

Sarah Triclin

## ► To cite this version:

Sarah Triclin. Mise en évidence d'un nouveau mécanisme permettant le rajeunissement des microtubules : l'effet des moteurs moléculaires. Matière Molle [cond-mat.soft]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALY037 . tel-03555818

**HAL Id: tel-03555818**

**<https://theses.hal.science/tel-03555818>**

Submitted on 3 Feb 2022

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

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



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**SARAH TRICLIN**

Thèse dirigée par **Laurent BLANCHOIN**, Université Grenoble Alpes  
et codirigée par **Manuel THERY**

préparée au sein du **Laboratoire Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale**  
dans l'**École Doctorale Physique**

**Mise en évidence d'un nouveau mécanisme permettant le rajeunissement des microtubules : l'effet des moteurs moléculaires**

**Evidence of a new mechanism allowing microtubule self-renewal and rejuvenation : effect of molecular motors.**

Thèse soutenue publiquement le **14 juin 2021**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur CHRISTIAN POUS**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
Rapporteur

**Monsieur NICOLAS MINC**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS ILE-DE-FRANCE VILLEJUIF,  
Rapporteur

**Madame STEPHANIE MISEREY-LENKEI**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PARIS CENTRE,  
Examinatrice

**Madame ISABELLE ARNAL**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES,  
Présidente



Introduction Générale .....	4
1. Chapitre 1 : Introduction, le microtubule et sa dynamique aux extrémités .....	7
1.1. Le cytosquelette .....	7
1.2. Le Microtubule .....	9
1.2.1. La structure du microtubule .....	9
1.2.2. L'hétérodimère de tubulines .....	11
1.2.3. Le microtubule dans la cellule .....	16
1.3. La vue classique de la dynamique des microtubules : La dynamique aux extrémités .....	16
1.3.1. Nucléation .....	16
1.3.2. Elongation .....	18
1.3.3. Catastrophe et désassemblage ou instabilité dynamique .....	20
1.3.4. Le treadmilling .....	23
1.3.5. Régulations et protéines associé aux microtubules (MAPs) .....	24
1.4. Organisation et propriétés mécaniques des microtubules .....	27
1.4.1. Organisation .....	27
1.4.2. Propriétés .....	29
Objectifs de ma thèse .....	33
2. Chapitre 2 : Le renouvellement le long du microtubule. ....	35
2.1. Introduction : Pourquoi et comment étudier le long du microtubule ? .....	35
2.2. Défauts et réparations .....	35
2.3. Article : Les défauts le long du microtubule induisent son auto-renouvellement. Schaedel et al., Nature Physics, 2019 .....	44
2.3.1. Introduction .....	44
2.3.2. Manuscrit .....	49
2.3.3. Conclusions et perspectives .....	51
3. Chapitre 3 : Les moteurs moléculaires et leurs rôles dans la régulation de la dynamique des microtubules .....	53
3.1. Introduction : pourquoi étudier l'effets des moteurs moléculaires sur la paroi du microtubule ?	53
3.2. Le transport cellulaire .....	55
3.3. Les moteurs moléculaires .....	57
3.3.1. La super famille des kinésines. ....	57
3.3.2. Les moteurs qui se dirigent vers l'extrémité moins du microtubule .....	68
3.3.2.1. Klp2 (Kinesin-like protein 2) .....	68

3.3.2.2. Les dynéines .....	69
3.4. Effet des moteurs moléculaires sur la dynamique des microtubules .....	74
3.5. Article : L'auto-réparation du microtubule le protège de la destruction par les moteurs moléculaires. Triclin et al., Nature Material, janvier 2021 .....	76
3.5.1. Introduction.....	76
3.5.2. Manuscrit.....	80
.....	81
.....	81
3.5.3. Conclusions et perspectives .....	82
4. Conclusions et perspectives générale .....	85
Références.....	90
Résumé.....	100



## Introduction Générale

*« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme »*

Antoine-Laurent Lavoisier (1743-1794).

(Traité élémentaire de chimie. *Tome 1 / présenté dans un ordre nouveau, et d'après les découvertes modernes ; avec figures : par M. Lavoisier... Seconde édition, 1793.*

<https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5524956g>)

Cette citation issue du « Traité élémentaire de chimie » de Lavoisier reflète en partie l'état d'esprit dans lequel nous avons raisonné pour conduire cette étude. En effet, plus que de la science dure, les grandes questions sur le fonctionnement du vivant, du monde, la régénération, le recyclage, le renouvellement de la matière ont guidé et bercé nos questionnements, mes raisonnements... et m'ont permis d'avoir une vision plus ouverte, plus globale sur mon sujet de thèse. Voire même de philosopher à mes heures perdues.

Les travaux de Lavoisier concernant la conservation de masse lui ont permis de mettre en évidence que dans toute expérience, dans toute transformation chimique, la masse se conserve. Par exemple, lors de la respiration, nous consommons du dioxygène, qui subit une combustion, mais il en résulte du dioxyde de carbone, et les masses sont conservées.

*« ...car rien ne se crée, ni dans les opérations de l'art, ni dans celles de la nature, et l'on peut poser en principe que, dans toute opération, il y a une égale quantité de matière avant et après l'opération ; que la qualité et la quantité des principes est la même, et qu'il n'y a que des changements, des modifications. »* - issu du Traité Élémentaire de Chimie, 1789.

Ainsi la matière change, se transforme mais ne disparaît pas. Ce principe introduit la notion de recyclage de la matière, en effet dans notre monde moderne nous sommes dans une démarche où nous essayons de recycler au maximum pour des raisons climatiques mais aussi financières. En effet le recyclage ou la réparation sont beaucoup plus intéressants financièrement mais aussi énergétiquement parlant, par exemple la fabrication de papier à partir de papiers usagés requiert

20 fois moins d'eau et deux fois moins d'énergie, 2500 kWh au lieu de 5000 kWh pour une fabrication *de novo* ! Mais ce procédé n'a pas été inventé par l'Homme ! La nature et particulièrement le corps humain utilise le recyclage ou encore la réparation en permanence.

Notre corps est composé de milliers de milliards de cellules, et chaque jour des millions de cellules meurent et des millions sont créées grâce à la division cellulaire et à nos cellules souches (A. Bergmann and Steller 2010). Ainsi la plupart des organes sont totalement régénérés progressivement, en changeant les « vieilles » cellules défaillantes par des cellules jeunes et efficaces. Par exemple, les cellules de notre estomac sont renouvelées en 2 à 9 jours, les alvéoles pulmonaires en 8 jours, les tissus adipeux en quelques années (Spalding et al. 2008), le squelette se renouvelle de 10% par an (Manolagas 2000) et le tissu cardiaque, considéré pendant longtemps comme non renouvelable, se régénère à hauteur de 50% à l'échelle d'une vie (O. Bergmann et al. 2009).

Il y a en effet une régulation très contrôlée de la population cellulaire. En plus d'un renouvellement permanent, les cellules souches peuvent être activées en cas de blessures par exemple (A. Bergmann and Steller 2010). Mais ce renouvellement permanent ne concerne pas que l'échelle des organes et des cellules mais les composants cellulaires eux-mêmes. Chaque cellule est une mini usine où sont fabriqués des dizaines de milliers de produits différents en permanence, de la molécule la plus simple à la plus complexe, grâce à un nombre incalculable de réactions chimiques. Toutes ces réactions permettent à notre corps de fonctionner, de s'autoréguler (température stable par exemple) ou encore de s'auto régénérer. Les composants fabriqués par la cellule, tels que les sucres, les acides aminés, les lipides ou en encore les nucléotides sont recyclés. Par exemple, le phagocyte chargé de faire disparaître les cellules trop « vieilles » va récupérer ses composants pour son usage personnel. Il va par exemple recycler l'actine pour restructurer son propre cytosquelette, pour former le phagosome et ainsi pouvoir phagocyter d'autres cellules mortes (Boada-Romero et al. 2020). Ce système de recyclage existe aussi au sein même de la cellule, les récepteurs membranaires par exemple, qui sont en constant remaniement en fonction des besoins cellulaires peuvent être internalisés dans des vésicules, envoyés aux lysosomes pour y être dégradés. Les acides aminés les composant vont ainsi être utilisés comme matière première pour la fabrication de nouvelles protéines (Cullen and Steinberg



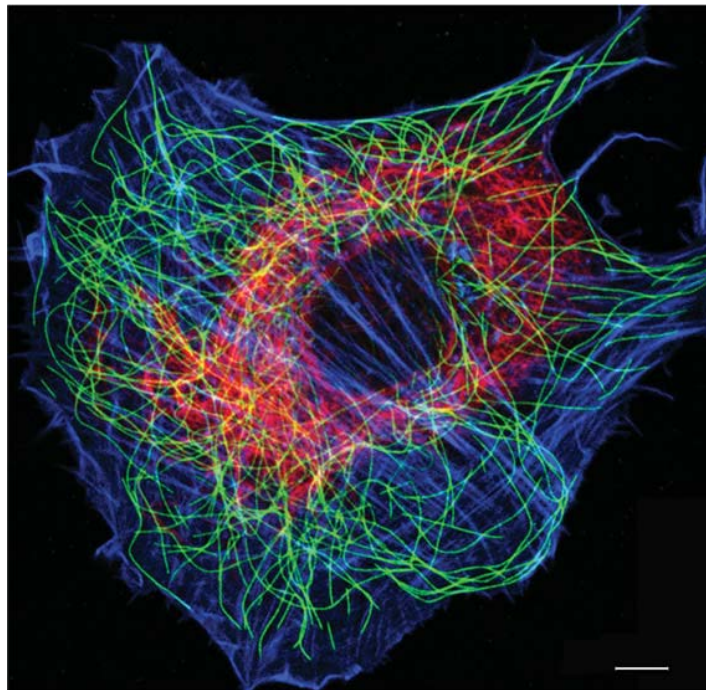
2018). Un autre exemple très intéressant est la cellule en privation, qui ne peut synthétiser des protéines cruciales à son bon fonctionnement, ainsi elle va dégrader par autophagie certaines protéines voire des organelles intracellulaires pour en récupérer son unité de base, les acides aminés et synthétiser les nouvelles protéines nécessaires (Lindqvist et al. 2018).

Ainsi, la nature, le vivant, aura toujours tendance à dépenser le moins d'énergie, à être le plus efficace et rentable possible. Ceci passe par le recyclage mais aussi par la réparation. Pourquoi changer ou racheter quelque chose qui peut être réparé ? Il est en effet communément admis que la cellule recycle et se répare en remplaçant des éléments, mais il serait intéressant de savoir si les composants eux-mêmes sont réparés. Pendant ma thèse je me suis intéressée au devenir du microtubule et à sa capacité à se réparer. Ma thèse se compose de trois parties, tout d'abord une introduction générale au microtubule, suivie d'un chapitre exposant mes premiers travaux sur l'étude du microtubule sur toute sa longueur et la mise en évidence d'un nouveau mécanisme de régulation spontanée de celui-ci. Enfin un chapitre sur mes derniers résultats, sur l'effet des moteurs moléculaires sur la dynamique interne du microtubule.

# 1. Chapitre 1 : Introduction, le microtubule et sa dynamique aux extrémités

## 1.1. Le cytosquelette

Les cellules eucaryotes ont un squelette, appelé cytosquelette, qui est composé de trois éléments essentiels, correspondant à des bio polymères hautement dynamiques organisés en réseaux : les filaments d'actines, les filaments intermédiaires et les microtubules (figure 1) (Pollard and Goldman 2018). Ces éléments du cytosquelette ont plusieurs fonctions primordiales : les filaments d'actines vont avoir un rôle par exemple dans la locomotion cellulaire, les filaments intermédiaires fournissent en particulier une force mécanique permettant la résistance au cisaillement appliquée aux organites cellulaires (forces mécaniques parallèles ou tangentielles) et les microtubules jouent un rôle dans la division cellulaire, le positionnement des organites et le transport intracellulaire.



*Figure 1 : Image d'un fibroblaste où les trois composants du cytosquelette sont marqués. En bleue les filaments d'actines, en vert les microtubules et en rouge les filaments intermédiaires (Pollard and Goldman 2018).*

Ces trois types de filaments sont dynamiques et vont s'organiser, se lier à d'autres protéines, s'adapter, en fonction des besoins de la cellule. En effet, certaines protéines, dites protéines accessoires sont capables de se lier aux différents filaments du cytosquelette et ainsi modifier leur dynamique et leurs propriétés mécaniques. La dynamique du cytosquelette est en partie possible grâce à la composition même des filaments. En effet les filaments sont constitués par l'assemblage d'unités de base de petite taille capable de diffuser très rapidement dans le cytoplasme, permettant ainsi une réorganisation rapide du cytosquelette, qui, va pouvoir rapidement se désassembler à un endroit et se réassembler à autre endroit (figure 2).

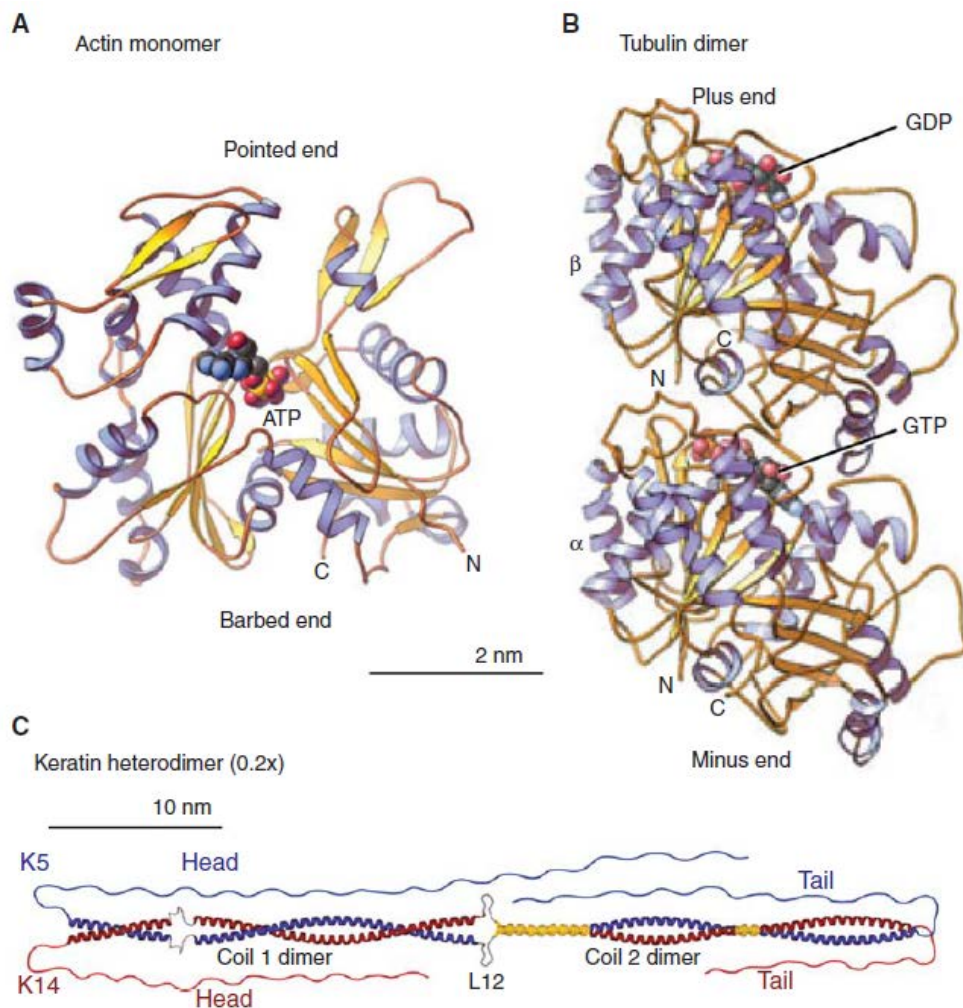


Figure 2 : Structure des unités de base du cytosquelette. (A) Structure du monomère d'actine. (B) Structure du dimère de tubuline. (C) Structure d'un hétérodimère de kératine (Pollard and Goldman 2018).

Durant ma thèse je me suis particulièrement intéressée aux microtubules, à leur dynamique intrinsèque mais aussi à l'effet de certaines protéines associées sur cette dynamique. Pour cela, j'ai étudié le microtubule dans un système biomimétique, c'est-à-dire dans un système biochimique contrôlé, permettant de reconstituer *in vitro* des microtubules dynamiques. Ainsi j'ai pu étudier leur dynamique et leur durée de vie en fonction de certains paramètres (vitesse de polymérisation, mise en présence de protéines associées, etc....).

Le terme microtubules a été donné pour la première fois par David B. Slautterback (Slautterback 1963) en 1963 pour désigner des petits tubes cytoplasmiques dont le rôle est de transporter des éléments du cytosol. En effet cette hypothèse a été posée à la suite d'observations de la proximité physique des microtubules et des vésicules de Golgi dans la cellule. Ils ont aussi fait le rapprochement des microtubules avec le centriole et ils ont observé que certains microtubules sont communicants d'une cellule à l'autre par le biais de ponts intercellulaires. La suite de l'étude des microtubules a révélé leur importance capitale pour la vie. Ils ont un rôle dans le positionnement des organites, le transport intracellulaire ainsi que la division cellulaire. Il est particulièrement intéressant dans l'étude du microtubule, de voir la complexité de sa régulation. Aussi il n'est pas possible de trouver deux cellules avec le même réseau de microtubules. En effet celui-ci diffère en fonction de l'espèce étudiée mais aussi du type cellulaire, par exemple, certains microtubules de cellules neuronales sont beaucoup plus stables que des microtubules de cellules en division (Baas et al. 2016).

## 1.2. Le Microtubule

### 1.2.1. La structure du microtubule

Les microtubules sont des bio polymères ayant une forme de tube dont le diamètre externe est de 25 nm et le diamètre interne 17 nm. Leur longueur est variable, de quelques microns à plusieurs centaines de microns. Ils sont composés d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'assemblent longitudinalement les uns à la suite des autres pour former des protofilaments et forment des liens avec les dimères latéraux pour former un feuillet et enfin le tube final (figure

3). Le microtubule voit ses extrémités se rallonger ou se raccourcir par l'ajout ou la perte de dimères respectivement.

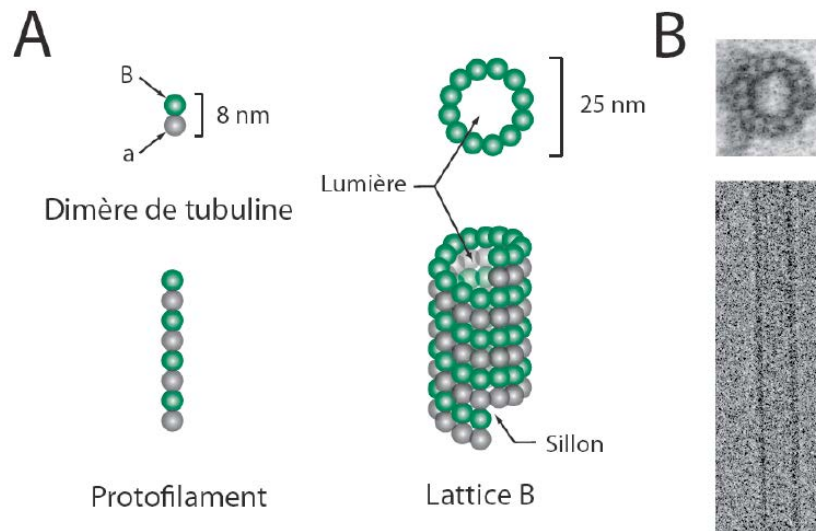


Figure 3 : Structure d'un microtubule. (A) Représentation d'un dimère de tubuline constitué d'un monomère de tubuline  $\beta$  et d'un monomère de tubuline  $\alpha$ . Un dimère de tubuline mesure 8 nm de long. Ces dimères s'associent en formant des liaisons longitudinales pour former des protofilaments. Protofilaments qui, en s'associant latéralement entre eux vont former un feuillet qui va se refermer pour former un tube de 25 nm de diamètre (D. Chrétien, Fuller, and Karsenti 1995). A droite, représentation d'un microtubule dont la « lattice » (ou paroi) est dans une conformation B. On peut observer une ligne de suture, site où le feuillet se referme, appelé « sillon ». (B) Image de microscopie électronique d'un microtubule en vue transversale (haut) et en vue longitudinale (bas). (Adapté de Alberts et al., 1994).

*In vivo* la conformation préférentielle des microtubules est un tube formé de 13 protofilaments (Tilney et al. 1973) mais *in vitro* on peut observer un nombre variable de protofilaments, de 12 à 17 (Denis Chrétien and Wade 1991; Mandelkow et al. 1986) et ce nombre peut varier le long d'un microtubule (D. Chrétien et al. 1992a). Le mécanisme précis expliquant une telle différence entre les microtubules *in vitro* et *in vivo* est mal connu. Plusieurs paramètres pourraient rentrer en jeu, tels que la température, la composition du milieu, le pH, les protéines associées aux microtubules (MAPs) ou encore les techniques de purification des protéines ou leurs origines.

Les dimères de tubuline peuvent s'assembler de deux manières différentes et ainsi former une « lattice » dite « A » ou une « lattice » dite « B ». Dans la configuration « A » un monomère  $\alpha$  d'un protofilament sera lié à un monomère  $\beta$  du protofilament adjacent. Dans la « lattice B » un monomère  $\alpha$  d'un protofilament sera lié à un monomère  $\alpha$  du protofilament adjacent, le microtubule ayant une forme d'hélice, il existe alors une discontinuité, formant un sillon où les interactions latérales sont entre 2 sous-unités différentes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (McIntosh et al. 2009; Hawkins et al. 2010)(Figure 2). *In vitro* la conformation préférentielle est la conformation B (figure 4).

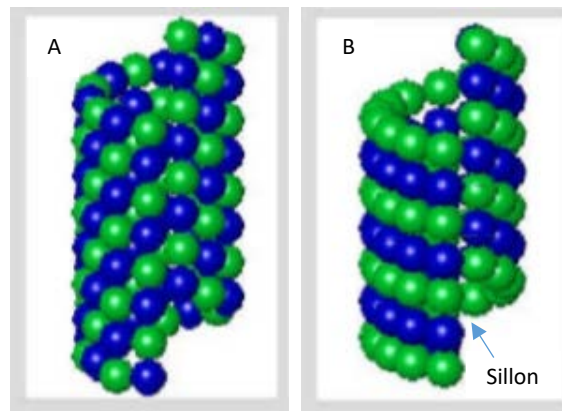


Figure 4 : (A) Hélice A. Les interactions latérales sont formées entre deux sous-unités différentes, une  $\alpha$  et une  $\beta$ , il n'y a pas de discontinuité, pas de sillon. (B) Hélice B. Les interactions latérales sont formées entre deux sous-unités identiques, une  $\alpha$  avec une  $\alpha$  ou une  $\beta$  avec une  $\beta$ , la forme elliptique du microtubule entraîne une discontinuité visible, le sillon. (Adapté de McIntosh et al. 2009).

### 1.2.2. L'hétérodimère de tubulines

La structure cristallographique de l'hétérodimère de tubuline a été résolue par Nogales et al. (figure 5). Cette structure hétérodimérique donne une polarité aux microtubules. Le bout présentant les sous-unités  $\beta$  est appelé l'extrémité (+) et le bout présentant les sous-unités  $\alpha$  est appelé l'extrémité (-) (Fan et al. 1996). Cette polarité structurale induit une cinétique

d'assemblage différente entre les extrémités (+) et (-) du microtubule, cinétique plus rapide pour l'extrémité (+) (Mitchison and Kirschner 1984).

Les deux sous-unités de tubuline sont des GTPases, c'est-à-dire qu'elles sont capables de lier une molécule de GTP. Mais seulement la molécule de GTP de la sous-unité  $\beta$  est capable d'être hydrolysée car celle de la sous-unité  $\alpha$  est piégée à l'interface du dimère et est donc non hydrolysable (figure 5) (Nogales, Wolf, and Downing 1998). Lorsqu'un dimère est incorporé dans un microtubule, le contact avec les dimères voisins (sous-unité  $\alpha$  plus précisément) enterre le GTP de la tubuline  $\beta$ , ce qui induit son hydrolyse. À la suite de cette hydrolyse le phosphate va être dissocié, ce qui affecte la stabilité de la paroi du microtubule. Cette conformation le rend moins stable.

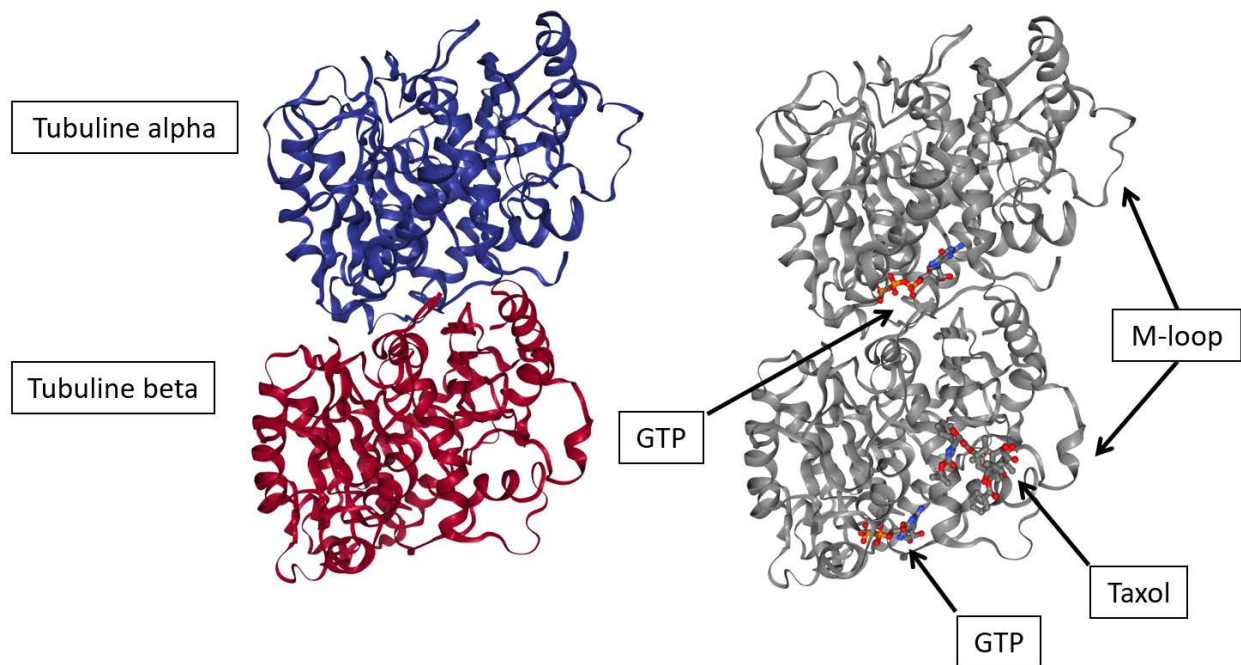


Figure 5 : Représentation tridimensionnelle de la structure du dimère de tubuline. A gauche, visualisation des deux sous-unités, en bleue la sous-unité alpha et en rouge la sous-unité bêta. A droite, visualisation de la localisation des deux poches nucléotidiques où se trouvent les molécules de GTP, le site de fixation du taxol sur la sous-unité  $\beta$ , ainsi que les deux M-loop permettant l'interaction latérale entre les dimères. Extraite du logiciel Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/> et adapté de Nogales et al. 1998.

Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  possèdent des homologies structurales et partagent environ 40% de leur séquence. Chaque monomère possède une paire de domaines globulaires et est composé d'hélices. Ces hélices présentent des structures désordonnées chargées négativement en condition physiologique et pourraient être impliquées dans les interactions avec d'autres protéines (MAPs) (figure 5).

Les monomères de tubulines peuvent être divisés en trois parties ou trois domaines fonctionnels : le domaine N-terminal contenant le site de liaison au nucléotide, une région intermédiaire contenant un site de liaison au taxol et enfin un domaine C-terminal qui est certainement la partie de la protéine capable de se lier aux moteurs moléculaires (Nogales, Wolf, and Downing 1998). Le modèle de Nogales et al. a permis de dresser l'hypothèse selon laquelle les domaines d'un monomère interagissent fortement. Ce qui implique que la modification de l'un des domaines pourrait induire des modifications sur les domaines adjacents, par exemple la liaison à une drogue ou à une MAP ; mais aussi l'état du nucléotide lié aux sous-unités le long du microtubule. En effet la microscopie électronique a permis de mettre en évidence que l'hydrolyse de la molécule de GTP affecte la structure des microtubules (cf chapitre 1.3.3. Catastrophe et désassemblage ou instabilité dynamique).

Il existe plusieurs isoformes à chacun des monomères de tubulines. Chez l'humain, 9 gènes codent pour la tubuline  $\alpha$  et 9 gènes codent pour la  $\beta$ . En plus de cette variabilité génétique, tous deux subissent des modifications post-traductionnelles comme par exemple l'acétylation, la tyrosination, la glutamylation, etc... (Ludueña 1997; Magiera and Janke 2014; Song and Brady 2015; Wloga, Joachimiak, and Fabczak 2017; Roll-Mecak 2020; Janke and Magiera 2020) (figure 6).



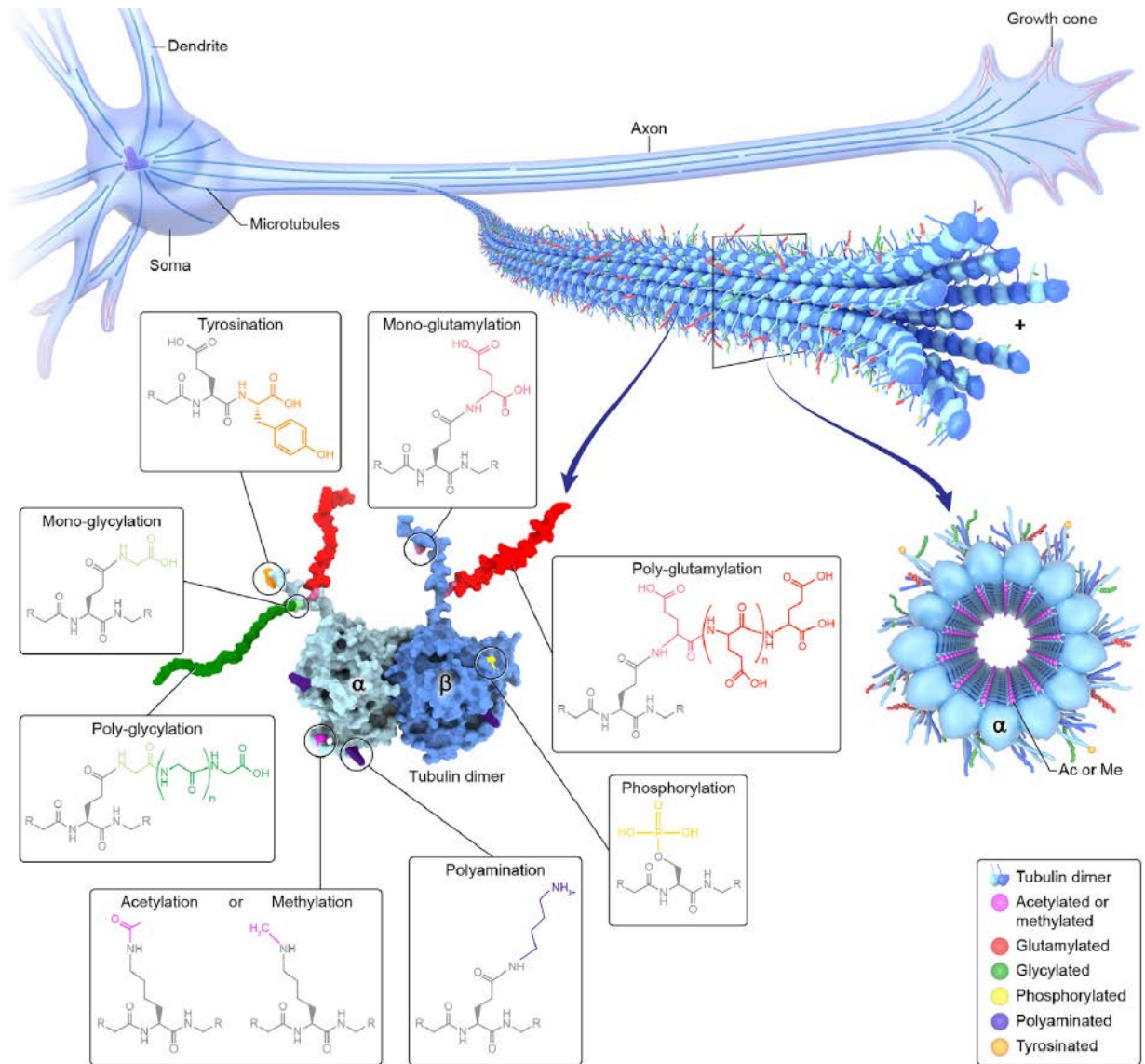


Figure 6 : Diversité des modifications post-traductionnelles de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Schéma d'un neurone (en haut) puis zoom sur un microtubule décoré par des modifications post-traductionnelles puis zoom sur un dimère  $\alpha\beta$  tubuline avec la localisation et la structure chimique de certaines modifications post-traductionnelles. (Adapté de Roll-Mecak 2020).

Ces modifications post-traductionnelles sont extrêmement importantes car elles induisent une régulation (recrutement ou inhibition) des protéines associées aux microtubules et ainsi régulent le fonctionnement cellulaire (figure 7). La combinaison de la variabilité génétique de la tubuline et de la variation des modifications post-traductionnelles modulent ainsi la composition des microtubules, c'est ce que l'on appelle le code de la tubuline.

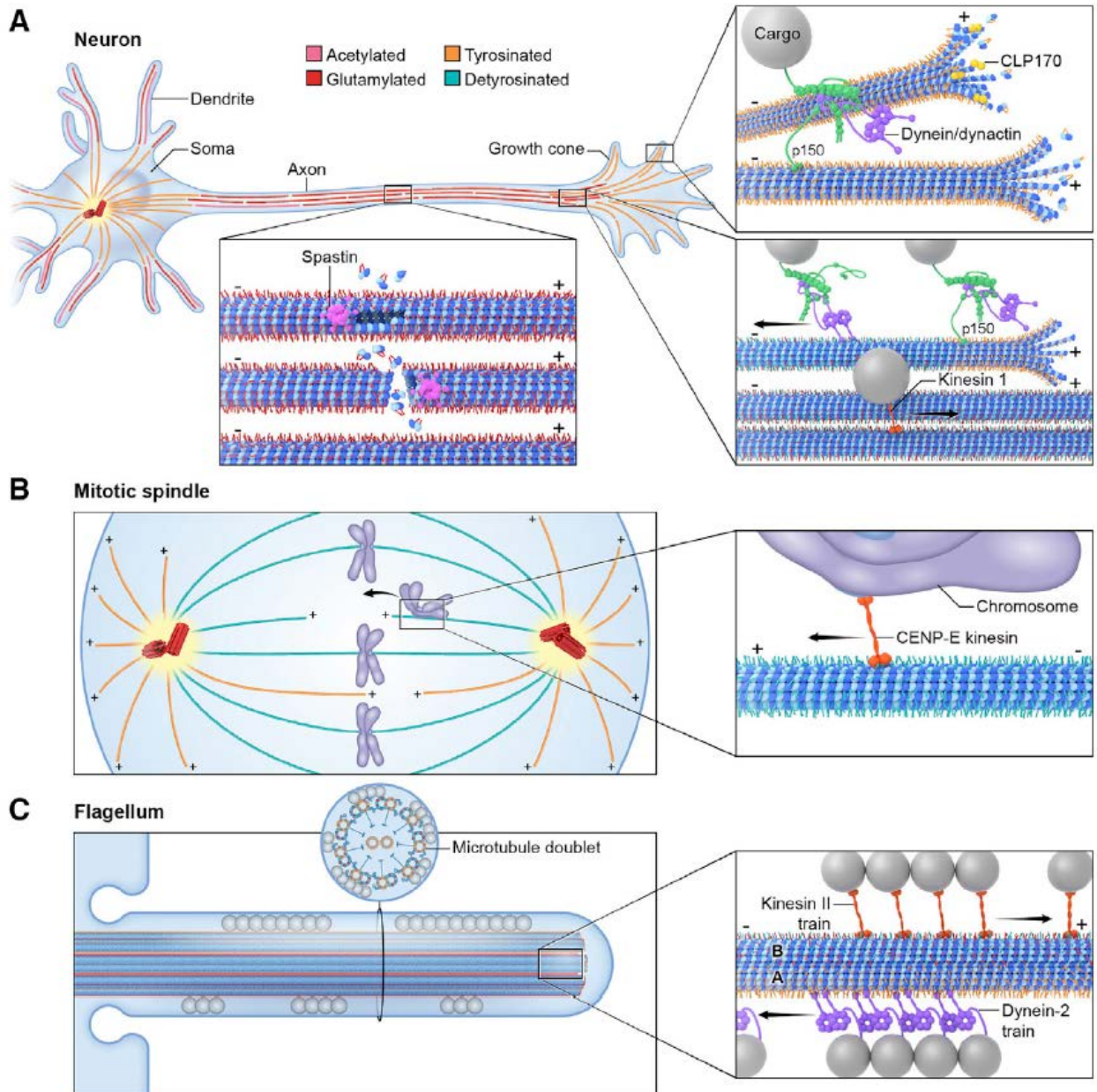


Figure 7 : Le code de la tubuline régule les interactions du microtubule et de ses MAPs. Trois exemples de microtubules (bleue) avec leurs modifications post-traductionnelles, qui recrutent préférentiellement différentes MAPs. (A) Par exemple dans le neurone, la glutamylation recrute préférentiellement les spastines ou encore la tyrosination à l'extrémité plus du microtubule qui recrute préférentiellement CLIP170 ou des dynéines/dynactine. (B) Lors de la division cellulaire, la kinésine associée aux chromosomes CENP-E est recrutée préférentiellement sur des microtubules detyrosinés. (C) Dans le flagelle, les kinésines ont une affinité avec les microtubules glutamylés, glycylysés et detyrosinés alors que les dynéines vont plutôt se fixer sur des microtubules tyrosinés. (Adapté de Roll-Mecak 2020).

Ainsi, le type d'isoforme composant le microtubule influe sur la nature des modifications post-traductionnelles, mais aussi sur le nombre de protofilaments qui le compose et ainsi régule le devenir du microtubule, que ce soit ses fonctions dans la cellule ou encore la stabilité de celui-ci (Ti, Alushin, and Kapoor 2018; Orbach and Howard 2019). Par exemple, l'acétylation de la lysine 40 de l'alpha-tubuline va stabiliser le microtubule (Pilon and Poüs 2013).

### 1.2.3. Le microtubule dans la cellule

*In vivo*, les microtubules sont organisés de manière à être ancrés par leur extrémité (-) au niveau de centres que l'on appelle les Centres Organiseurs des Microtubules (ou MicroTubule Organizing Centers, MTOCs). Ils constituent des sites de nucléation pour les microtubules (Lüders and Stearns 2007). Le centrosome constitue le MTOC principale des cellules animales, il est composé de deux centrioles entourés de matériel péricentriolaire (ou PeriCentriolar Material ou PCM). Ce matériel péricentriolaire est le principal site de nucléation des microtubules dû à la présence de  $\gamma$ -tubuline (cf paragraphe Nucléation). Dans la cellule, le microtubule est impliqué dans la division, le trafic ou encore la polarisation cellulaire (Minc et al. 2009). Les rôles des microtubules dépendant du cycle cellulaire, ainsi, lors de la division cellulaire, les microtubules vont être très dynamiques et participer à la ségrégation des chromosomes (Salmon et al. 1984). Alors que les microtubules interphasiques vont être plus stables dans le temps et vont participer à l'organisation des organites cellulaires ou encore au transport cellulaire grâce aux moteurs.

## 1.3. La vue classique de la dynamique des microtubules : La dynamique aux extrémités

### 1.3.1. Nucléation

La nucléation des microtubules est différente suivant qu'elle a lieu dans des conditions *in vitro* ou en condition physiologique dans une cellule. Elle sera aussi différente selon le type cellulaire, mammifère, levure ou encore cellule de plante. *In vitro*, la nucléation passe par une étape d'oligomérisation de la tubuline (figure 8) (Kollman et al. 2011). Cette étape est énergiquement

défavorable et est donc très lente. Une fois que l'oligomère de tubuline est suffisamment grand, l'élongation est alors plus rapide. La nucléation est dépendante de la concentration en tubuline et en nucléotides libres. En l'absence de cofacteurs, la concentration critique en tubuline pour une nucléation spontanée est de 20 à 40  $\mu\text{M}$  (Kollman et al. 2011; Wieczorek et al. 2015).

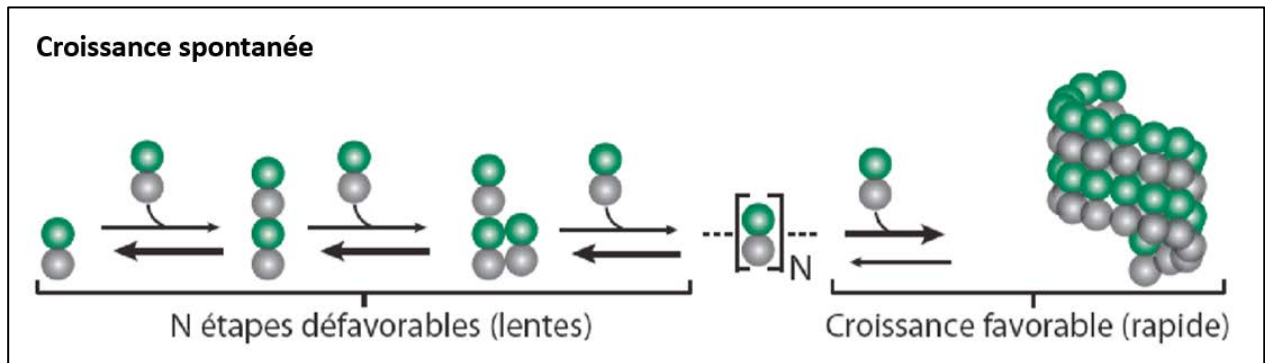


Figure 8 : Nucléation spontanée des microtubules in vitro. Elle est divisée en deux étapes : une première étape lente, d'oligomérisation des dimères de tubuline, produisant des intermédiaires instables qui ont une tendance au désassemblage plutôt qu'à l'assemblage et l'élongation. La deuxième phase commence quand l'oligomère est suffisamment long et stable. Cette étape favorise l'élongation du microtubule et est plus rapide. Les flèches en gras indiquent le sens favorable de la réaction (Adapter de Kollmann et al. 2011).

Dans la cellule, différents mécanismes sont mis en place pour permettre la nucléation de nouveaux microtubules. Le mieux décrit est lié à l'activité de la  $\gamma$ -tubuline et de ses protéines associées, le  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex). Ce complexe permet la croissance de l'extrémité (+) des microtubules (Zheng et al. 1995; Wiese and Zheng 2000). Il est localisé au centrosome, au spindle pole body ou encore le long des microtubules selon les types cellulaires. Ce complexe est composé d'un ensemble de protéines : GCP2 (pour Gamma Complex Protein), GCP3, GCP4, GCP5, NEDD1 et de 12 molécules de  $\gamma$ -tubulines, qui sont capables de prendre la forme d'un anneau de 25 nm de diamètre similaire à la section transversale d'un microtubule (figure 9).

Dans les cellules animales le complexe  $\gamma$ -TuRC est essentiellement localisé au niveau du centrosome.

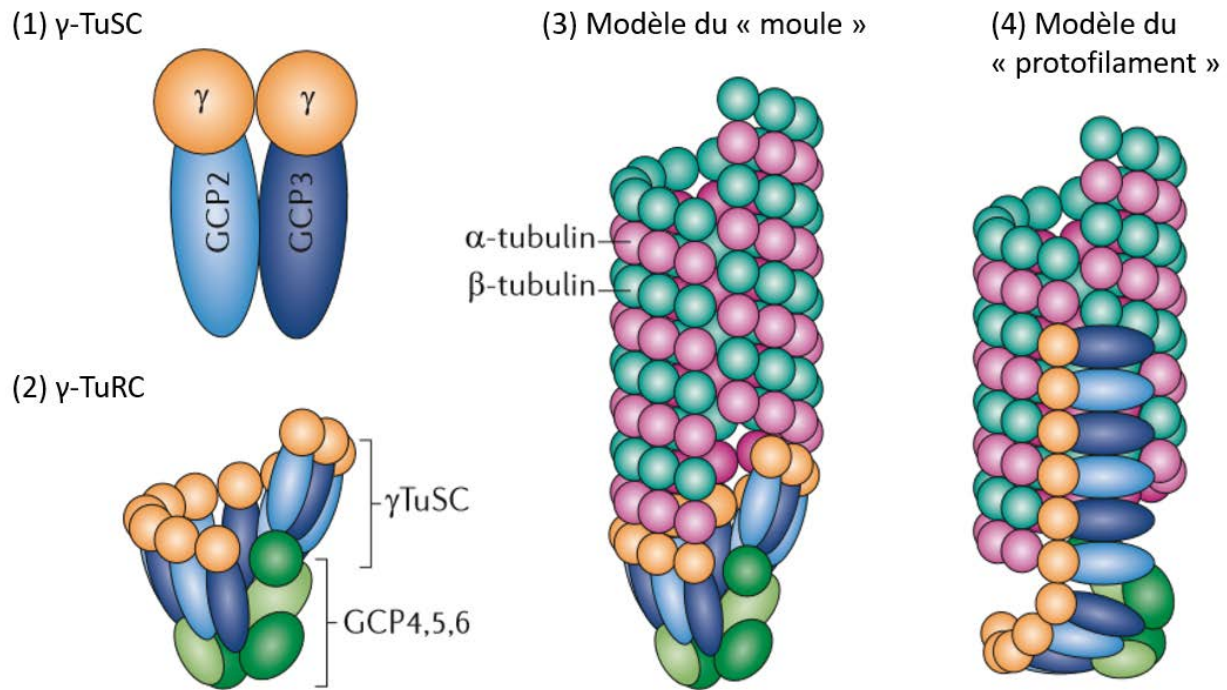


Figure 9 : Nucléation à partir de complexe  $\gamma$ -tubuline in vivo. (1) Schéma représentant le  $\gamma$ -TuSC ( $\gamma$ -Tubulin Small Complex). Il est composé de deux  $\gamma$ -tubulines, d'une protéine GCP2 et d'une protéine GCP3. Il constitue un sous complexe ou noyau conservé de la machinerie nucléatrice des microtubules. Plusieurs de ces complexes vont pouvoir se lier aux protéines GCP pour former le  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex). (2) Schéma représentant le  $\gamma$ -TuRC. Il est composé de 6  $\gamma$ -TuSC qui forment un anneau en se liant avec les protéines GCP 4,5 et 6. (3) Représentation du modèle du « moule » avec un nucléateur tel qu'il est décrit en (2), les sous-unités de  $\gamma$ -tubuline sont adjacentes les unes des autres et font des contacts latéraux. Il est le modèle le plus largement accepté. (4) Représentation du modèle du « protofilament » où les unités de  $\gamma$ -tubuline font des contacts en tête à queue.

### 1.3.2. Elongation

Lorsque les amorces de microtubules sont formées et que les concentrations en tubuline et en nucléotide (GTP) le permettent, la tubuline est capable de s'assembler, par ajout de dimères libres aux extrémités pour former des microtubules plus longs (figure 10). La vitesse de polymérisation est plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-) (Walker et al. 1988).

Dans les conditions généralement utilisées dans la communauté scientifique, *in vitro*, la concentration critique d'assemblage des microtubules est d'environ 10  $\mu\text{M}$  de neurotubuline dans un tampon BRB80 (Brinkley Reassembly Buffer), à une température optimale de 37°C. Mais cette concentration varie en fonction de la nature de la tubuline, la composition du tampon utilisé, la température, etc...

Lorsque la concentration en tubuline soluble atteint la concentration critique d'assemblage, un équilibre transitoire s'installe entre la tubuline libre et sous forme de polymère, c'est ce que l'on appelle la phase stationnaire (figure 14).

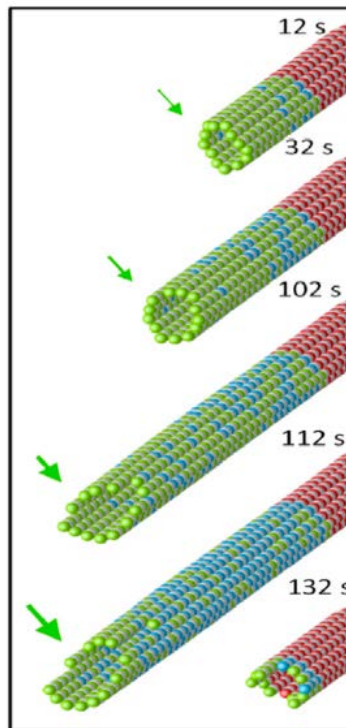


Figure 10 : Simulation 3D de la polymérisation du microtubule. La longueur du microtubule augmente de 12 sec à 112 sec, grâce à l'ajout de dimères de tubuline GTP (vert). Avec le temps, les dimères GTP deviennent GDP (bleue), lorsque la quantité de dimères GTP n'est plus suffisante à l'extrémité du microtubule, il se désassemble (à 132 sec). (Adapté de C. E. Coombes et al. 2013).

### 1.3.3. Catastrophe et désassemblage ou instabilité dynamique

Le microtubule alterne entre des phases de croissance et de raccourcissement, c'est ce que l'on appelle l'instabilité dynamique. En effet il y a un équilibre entre l'ajout et la perte de dimères aux extrémités du microtubule (figure 11). Cet équilibre détermine si le microtubule croît (élongation) ou s'il se raccourcit (désassemblage) (C. E. Coombes et al. 2013) (figure 11 et 12 B). Cet équilibre instable dépend du cycle de l'hydrolyse du nucléotide associé au dimère de tubuline (figure 11 A et 13).

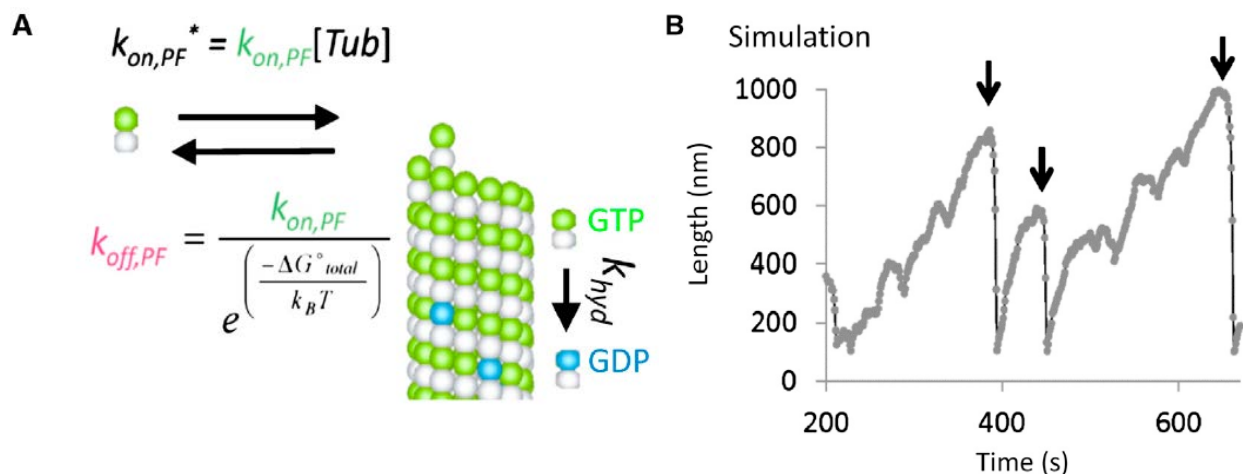


Figure 11 : Instabilité dynamique du microtubule. (A) Modèle 3D expliquant les mécanismes régissant la catastrophe. Sont pris en compte : de l'ajout de nouveaux dimères de tubuline à l'extrémités du microtubule ( $k_{on}$ ) le départ de certains dimères ( $k_{off}$ ) et l'hydrolyse aléatoire de sous-unités au sein du microtubule ( $k_{hyd}$ ). (B) Graphe représentant l'évolution de la longueur d'un microtubule en fonction du temps, avec l'alternance de phases de croissance et de catastrophe (flèches noires) menant à un total désassemblage du microtubule. (Adapté de C. E. Coombes et al. 2013).

Suite à l'hydrolyse de la molécule de GTP, il y a un changement de conformation de la structure du microtubule. En effet, Il existe deux hypothèses quant au rôle du GTP dans le changement de conformation du dimère de tubuline. La première est le modèle dit « allostérique », où la liaison du nucléotide GTP à un dimère soluble, change sa conformation, le rendant plus « droit », ce qui le rend compétent pour être inclus pendant la polymérisation du microtubule (figure 12 A). La

deuxième hypothèse repose sur un modèle dit de « lattice » et repose sur le fait que le changement de conformation n'a lieu qu'une fois le dimère GTP incorporé à l'extrémité croissante du microtubule (figure 12 B). Howard et al. ont proposé un modèle combinant les deux hypothèses sur le rôle du GTP dans le changement de conformation du dimère  $\alpha\beta$  tubuline (figure 13).

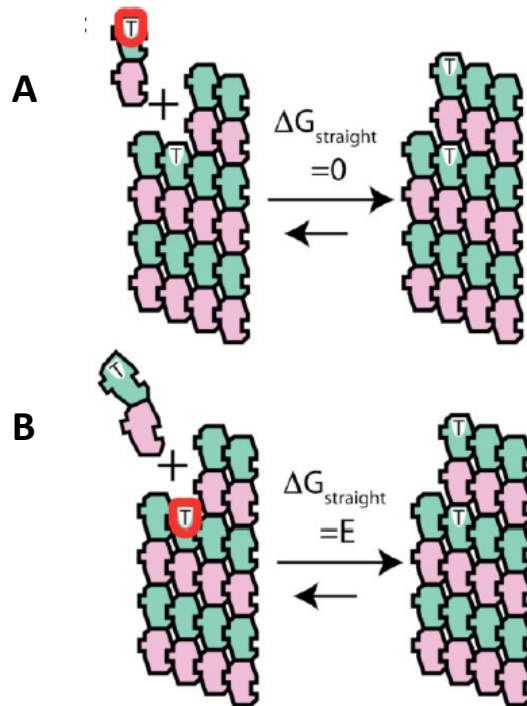


Figure 12 : Modèles représentant les deux hypothèses concernant le rôle du GTP dans la conformation du dimère de tubuline. (A) Dans ce premier modèle, le GTP (cercle rouge) stimule l'assemblage du microtubule en induisant un changement de conformation du dimère soluble, qui passe de courbé à droit, compatible avec la polymérisation. Le dimère étant déjà dans la conformation favorable, aucune énergie n'est nécessaire à sa liaison ( $\Delta G_{\text{straight}} = 0$ ). (B) Dans ce second modèle, le dimère soluble reste dans une conformation courbée malgré son association à un GTP et est incorporé à la paroi du microtubule. Le GTP du dimère précédent induit une liaison plus forte avec le nouveau dimère incorporé, ce qui provoque son changement de conformation et stabilise le microtubule. L'incorporation de ce dimère est non favorable car il faut le réarranger, ainsi une énergie est nécessaire ( $\Delta G_{\text{straight}} = E$ ). (Adapté de Rice, Montabana, and Agard 2008).



Il résulte de l'hydrolyse du GTP une tension au sein du microtubule qui est stockée sous forme d'énergie conformationnelle. Cette énergie est libérée lors du désassemblage du microtubule, désassemblage qui fait suite à la « catastrophe » (Rice, Montabana, and Agard 2008).

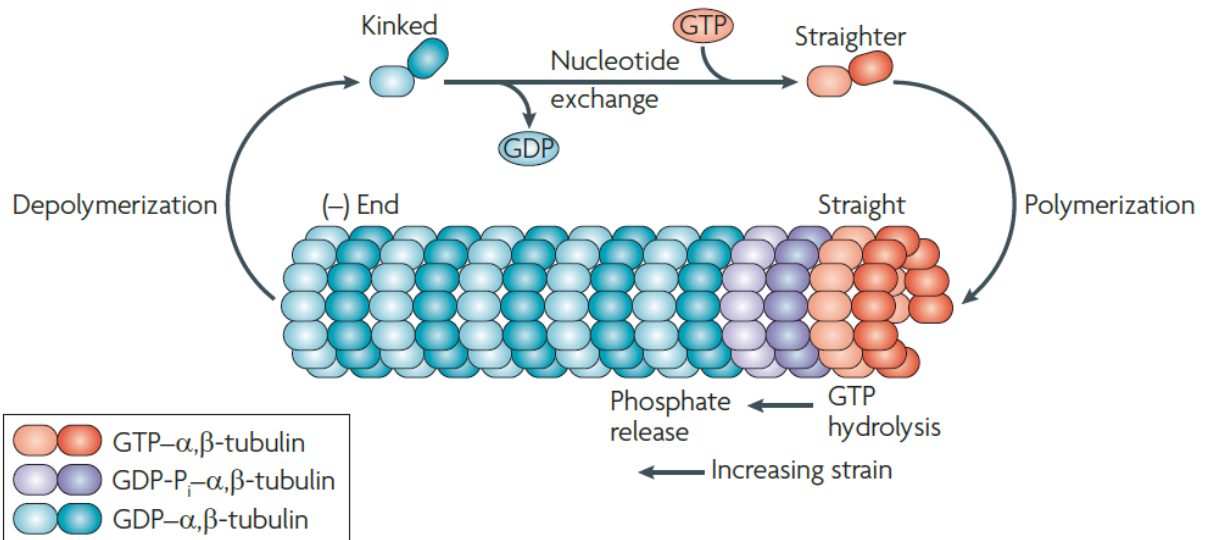


Figure 13 : Cycle GTPase de la tubuline. Schéma de l'équilibre entre croissance et désassemblage en fonction de l'état nucléotidique des dimères de tubuline. Le nucléotide change de conformation en fonction de sa position dans le cycle. Ce modèle prend en compte l'association des deux hypothèses sur le rôle du GTP dans le changement de conformation du dimère  $\alpha\beta$  tubuline. Dans le cytoplasme, le dimère GDP est courbé, l'échange de GDP pour un GTP au sein d'un dimère va changer la conformation de celui-ci, il va se redresser partiellement. Il deviendra totalement droit lorsqu'il sera incorporé au microtubule. Son hydrolyse au sein du microtubule va le solliciter d'autant plus, entraînant ainsi une conformation favorable au désassemblage. (Adapté de Howard and Hyman 2009).

Précèdent le désassemblage du microtubule, les protofilaments se détachent latéralement et s'enroulent pour former des anneaux avant de se détacher du microtubule (Howard and Hyman 2009; Driver et al. 2017; Atherton et al. 2018) (figure14).

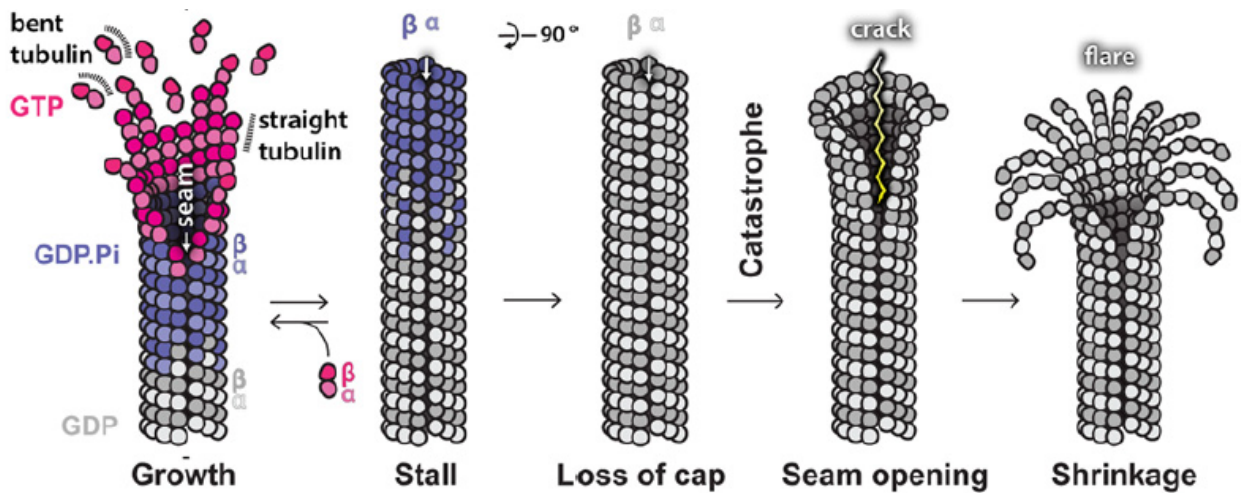
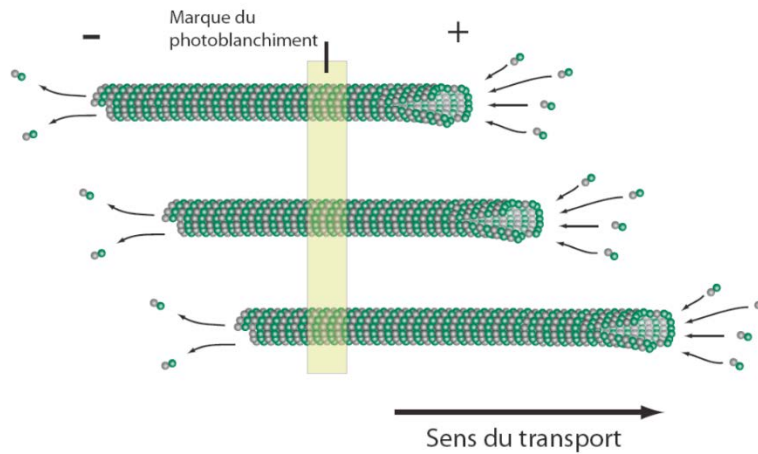


Figure 14 : Modèle de l'instabilité dynamique. De gauche à droite : Elongation du microtubule, phase stationnaire, perte de la protection (tubuline GTP), catastrophe et désassemblage du microtubule. (Adapté de Manka and Moores 2018).

#### 1.3.4. Le treadmilling

Le treadmilling fait référence à l'une des propriétés dynamiques du microtubule, qui consiste en l'équilibre entre la perte de dimères de tubulines à l'extrémité (-) du microtubule et l'addition de dimères à l'extrémité (+). Il y'a ici une compensation qui mène à un équilibre, permettant au microtubule de conserver la même longueur tout en donnant l'illusion d'un mouvement (figure 15). Ce mécanisme permet aux microtubules d'être transportés dans la cellule, particulièrement dans la cellule végétale. En effet, ce transport est plus rare dans la cellule animale car il est d'avantage assuré par des moteurs moléculaires car l'extrémité (-) des microtubules est le plus souvent « ancrée » au centre organisateur des microtubules ou « coiffée », stabilisée par des MAPs de l'extrémités (-). Récemment une étude a pu reconstituer *in vitro*, grâce à ces protéines associées aux microtubules, cet aspect de la dynamique des microtubules jusque-là observable uniquement *in vivo* (Arpağ et al. 2020).



*Figure 15 : Schéma représentant le treadmilling (phénomène du tapis roulant) des microtubules. Le microtubule se déplace vers l'extrémité (+), soit vers la droite, grâce à l'ajout de dimères de tubuline à l'extrémité (+) et à la perte de dimères lente à l'extrémité (-). Ce phénomène est visible lorsque l'on marque une zone du microtubule (ici par photoblanchiment) et que l'on constate que cette zone ne bouge pas malgré le mouvement apparent du microtubule, qui est en réalité un mouvement des extrémités (schéma adapté de Lloyd and Chan 2004).*

### 1.3.5. Régulations et protéines associées aux microtubules (MAPs)

Les MAPs (Microtubule Associated Proteins) sont des protéines associées aux microtubules, elles se lient à eux et en changent les propriétés. Les MAPs, ainsi que plusieurs autres paramètres, tels que la composition du cytosol et les modifications post-traductionnelles vont finement réguler la dynamique des microtubules. Cette régulation est particulièrement importante car les microtubules jouent un rôle essentiel dans plusieurs mécanismes cellulaires, ils sont par exemple indispensables à la division cellulaire, aux mouvements des cils mais aussi au trafic intra-cellulaire. Même s'ils sont présents dans quasiment toutes les cellules eucaryotes, le réseau qu'ils forment n'est jamais identique d'un type cellulaire à un autre, ou d'une espèce à une autre. L'expression différente des MAPs au sein des différentes espèces et types cellulaires est l'une des raisons expliquant des réseaux de microtubules différents d'une cellule à une autre (Goodson and Jonasson 2018).

Il existe différents types de MAPs en fonction de leur site d'interaction avec le microtubule et en fonction de leurs actions sur celui-ci. Ainsi on distingue 1) les MAPs qui se fixent le long du microtubule et qui peuvent être stabilisatrices ou déstabilisatrices ; 2) les MAPs qui se fixent aux extrémités des microtubules, soit l'extrémité moins, soit l'extrémité plus ; 3) les moteurs moléculaires.

Les MAPs capables de se lier sur toute la longueur du microtubule sont dites structurales. Elles affectent la stabilité des microtubules. Cet effet peut être positif, comme par exemple pour Tau ou TPX (Kellogg et al. 2018; R. Zhang et al. n.d.; Atherton et al. 2017) ou négatif, comme par exemple pour les protéines de coupure telles que les spastines ou katanines (Roll-Mecak and Vale 2008).

Une grande partie des MAPs ont un effet sur la stabilité et la dynamique des extrémités des microtubules. Elles peuvent agir sur l'extrémité moins du microtubule, comme CAMSAP2, qui va stabiliser celle-ci (Jiang et al. 2014; Akhmanova and Hoogenraad 2015; Atherton et al. 2017). Mais également sur les extrémités plus, ou elles peuvent être stabilisatrices, comme la polymérase XMAP215, CLIP170 (Slep and Vale 2007) ou encore EB1 (Zanic et al. 2009; Maurer et al. 2012; Seetapun et al. 2012; Duellberg et al. 2016) ou déstabilisatrices, comme les dépolymérase de la famille des kinésine-8 et kinésine-13 (Bugiel et al. 2020).

Il faut noter qu'une même MAP peut avoir des fonctions différentes, en fonction du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées, du moment du cycle cellulaire ou encore de sa concentration. Par exemple, EB1, qui reconnaît les régions de tubuline GTP des microtubules vient d'être caractérisée de manière plus approfondie et il a été démontré que lorsqu'elle est extraite de cellules de mammifère, EB1 augmente la dynamique des microtubules. Alors qu'une protéine extraite de cellules de plante va plutôt stabiliser le microtubule (Molines et al. 2020).

Certaines MAPs vont réguler la dynamique du microtubule dès la nucléation. Par exemple CopN, une protéine de chlamydia, va moduler la nucléation *in vivo* en retardant celle-ci, probablement via l'extrémité plus de deux protofilaments. Alors que des protéines ne se fixant qu'à un seul protofilament ou des protéines si fixant à deux protofilaments mais au bout moins du microtubule, n'inhibent pas la nucléation (Campanacci et al. 2019).

Parmi les moteurs moléculaires connus comme modulant l'activité des microtubules, les kinésines-1, comme par exemple KIF5A, KIF5B et KIF5C ont été démontrées comme stimulant l'élongation des microtubules, ainsi que la fréquence des sauvetages lorsque associées à d'autres protéines kinases comme JNK (c-Jun N-terminal kinase) et CRMP2 (Marceiller et al. 2005; Daire et al. 2009; Daire and Poüs 2011). Les kinésines de type 2, notamment KIF3A/2 et KIF17 stabilisent les microtubules dans le but de permettre la polarité des cellules épithéliales (Jaulin and Kreitzer 2010, 17). Les kinésines  $\gamma$  transportent des acteurs moléculaires comme APC (suppresseurs de tumeur) et pVHL (protéine von-Hippel Lindau, suppresseurs de tumeur aussi) pour stabiliser les extrémités des microtubules (Hergovich et al. 2003). D'autres moteurs, comme HSET/KIFC1 de la famille des kinésines-14, vont être responsables d'une stabilisation de l'extrémité moins du microtubule (Strothman et al. 2019).

Certaines MAPs, comme MAP7 régulent l'activité de moteurs moléculaires (Hooikaas et al. 2019), en effet ils vont être capables d'activer des kinésines mais aussi d'augmenter leur processivité en la gardant à proximité du microtubule lors de son détachement.

La régulation des microtubules est primordiale pour un fonctionnement cellulaire correct. Certains microtubules devront être particulièrement dynamique, ceux impliqués dans la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes par exemple. D'autres vont devoir être particulièrement stables pour permettre la signalisation cellulaire et le transport vésiculaire. Parmi les mécanismes mis en jeu par la cellule pour réguler la stabilité des microtubules, les modifications post-traductionnelles, les MAPs, la concentration en tubuline, le milieu environnant, ... sont autant de paramètres qui jouent un rôle primordial.

Ainsi la quantité des paramètres mis en jeu, ainsi que leur combinaison quasi infinie font de la régulation des microtubules un mécanisme difficile à appréhender dans son ensemble. Dans ce domaine, l'étude « décortiquée » de l'effet de chacune de ces protéines, ou de la combinaison définie de plusieurs de ses protéines, *in vitro*, est importante.

## 1.4. Organisation et propriétés mécaniques des microtubules

### 1.4.1. Organisation

*In vivo*, les microtubules des cellules eucaryotes sont organisés différemment en fonction du type cellulaire, de leur état de différenciation ou encore des étapes du cycle cellulaire dans lequel elles se trouvent. Pendant la division cellulaire, les microtubules sont très dynamiques, il y'a les microtubules astraux et les microtubules du spindle (Wittmann, Hyman, and Desai 2001). Pour les deux types de microtubules, plus la division avance dans le temps et plus la fréquence de catastrophes augmente puis se stabilise (figure 16)(Lacroix et al. 2018).

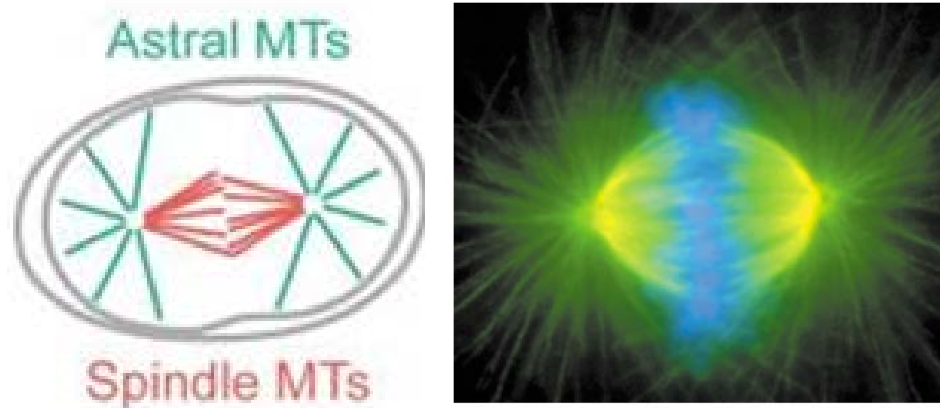
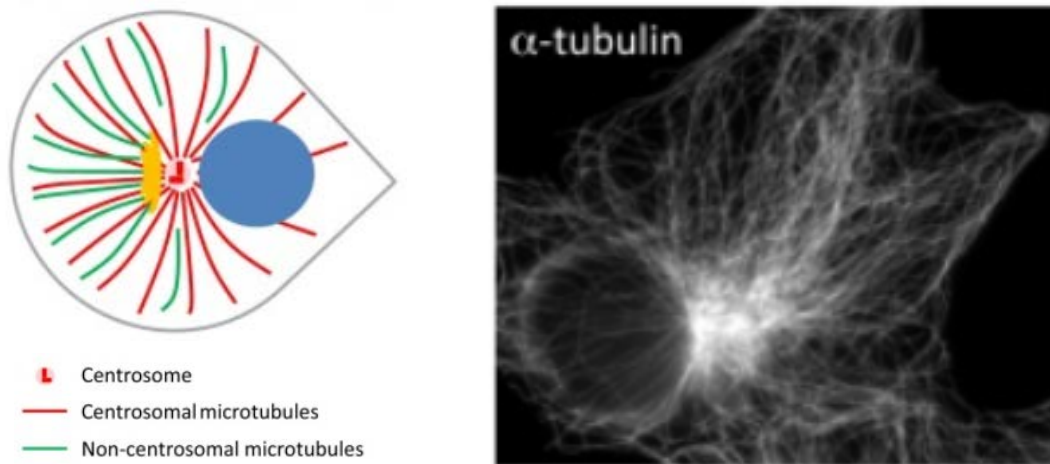


Figure 16 : (A) Schéma représentant les microtubules pendant la division cellulaire. Où l'on distingue les microtubules astraux (vert) et les microtubules du spindle (rouge). (Lacroix et al. 2018) (B) Image en immunofluorescence d'un spindle pendant la mitose. Où l'on distingue les microtubules (vert) et les chromosomes (bleue). (Adapté de Wittmann, Hyman, and Desai 2001).

Pendant l'interphase, les microtubules forment différentes configurations de réseaux, dont les deux types majeurs sont : le réseau centrosomale et le réseau acentrosomale. Le réseau centrosomale est issu du centrosome et irradie dans toute la cellule. Ce réseau est impliqué dans

de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration cellulaire (Wakida et al. 2010), le positionnement des organelles (Cole and Lippincott-Schwartz 1995) et le transport cellulaire en général. Le réseau acentrosomale, rassemble les microtubules non connectés au centrosome et permet à la cellule de développer une plus grande diversité d'architecture et par conséquent d'acquérir de nouvelles formes ou fonctions.



*Figure 17 : (A) Schéma représentant les microtubules en interphase. Où l'on distingue le centrosome, les microtubules centrosomaux (rouge), les microtubules acentrosomaux (vert) et le noyau (bleu). (B) Image en immunofluorescence du réseau de microtubule pendant l'interphase. (Adapté de Martin and Akhmanova 2018)*

*In vitro*, il est maintenant facile de restreindre les microtubules à une certaine conformation, grâce à un environnement biochimique contrôlé et au micropatterning (Didier Portran et al. 2013; Vignaud, Blanchoin, and Théry 2012) (Figure 18).

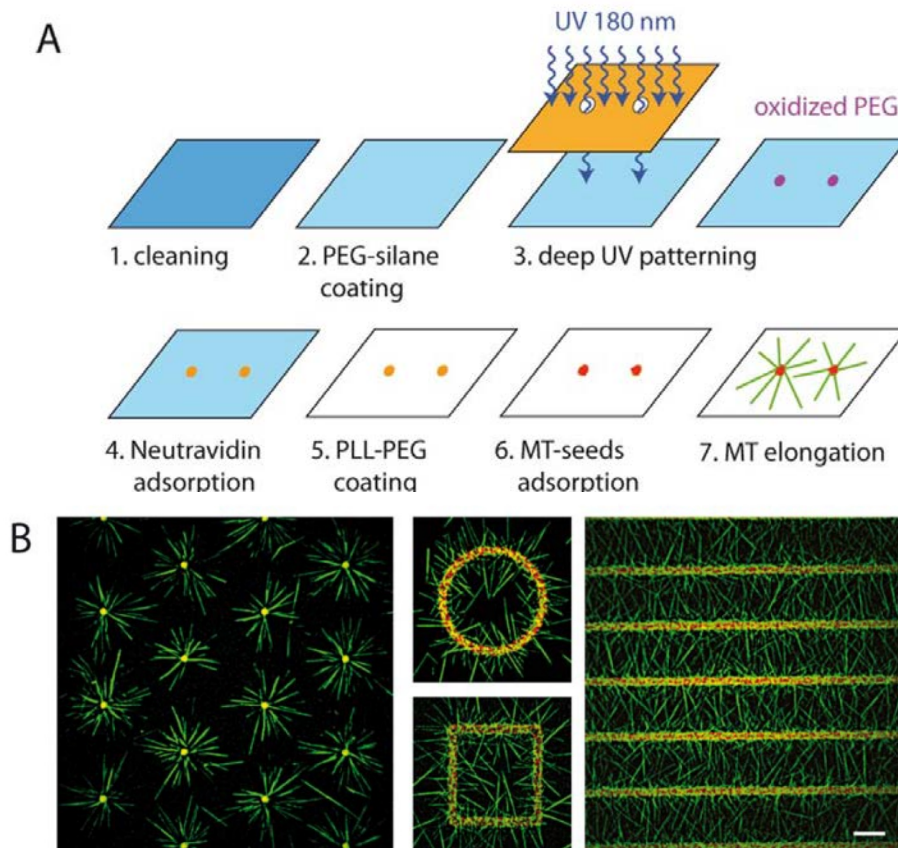


Figure 18 : Contrôle géométrique de la croissance des microtubules. (A) Schéma représentant le protocole de micropatterning (B) Image de microtubules marqués au fluorophore ATTO-488 (vert) qui poussent à partir d'amorces (rouge) attachées sur des micropatterns en forme de point ou de ligne (Didier Portran et al. 2013).

#### 1.4.2. Propriétés

Les microtubules sont des filaments dits rigides, en effet ils peuvent avoir une longueur de persistance de plusieurs millimètres. Ce qui veut dire que les microtubules, contrairement aux autres filaments constituant le cytosquelette, ont une forme droite et rectiligne sur plusieurs millimètres (figure 19)(Liverpool 2006). *In vitro*, c'est effectivement ce que l'on peut observer. Cette caractéristique des microtubules est due à leur construction cylindrique qui leur assure une résistance contre les déformations. *In vivo*, cet aspect permet aux microtubules de résister aux forces de compression exercées par la membrane, donnant ainsi à la cellule des propriétés mécaniques et élastiques.



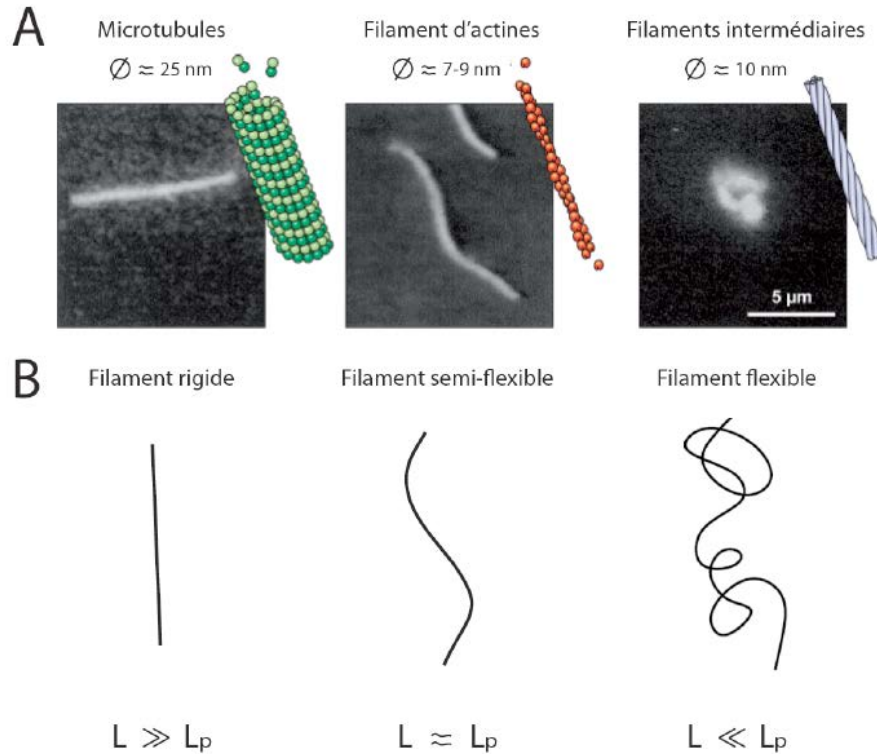


Figure 19 : (A) Image de microscopie et schéma représentant chacun des trois constituants du cytosquelette. De gauche à droite : les microtubules, les filaments d'actines et les filaments intermédiaires. (B) Schéma représentant la rigidité ou la flexibilité des filaments. Avec  $L$  = longueur du filament et  $L_p$  = longueur de persistance. Cette figure montre que les microtubules sont des filaments rigides avec  $L \gg L_p$  ; les filaments d'actines sont semi-flexible avec  $L \approx L_p$  ; et que les filaments intermédiaires sont flexibles avec  $L \ll L_p$ . (Adapté de Liverpool 2006).

Mais dans la cellule les microtubules n'ont pas tous la même forme, certains sont tortueux et semblent beaucoup plus flexibles et non rigides (figure 20). Cette différence de forme des microtubules, de « spaghetti cru » *in vitro* à « spaghetti cuits » *in vivo*, peut être expliquée par de nombreux mécanismes et acteurs pouvant être responsables du contrôle de la flexibilité des microtubules *in vivo*. Comme par exemple 1) les protéines associées aux microtubules ; 2) les modifications post-traductionnelle de la tubuline ; 3) la densité et l'interaction entre microtubules ; 4) la densité et l'interaction avec les autres filaments du cytosquelette ; 5) les forces générées par la polymérisation même des microtubules ; 6) une combinaison de ses facteurs.

Malgré tout, l'étude des propriétés mécaniques et donc de la flexibilité des microtubules *in vivo* reste très difficile à quantifier, et la plupart des études portent sur l'études des propriétés mécaniques du microtubule *in vitro*.

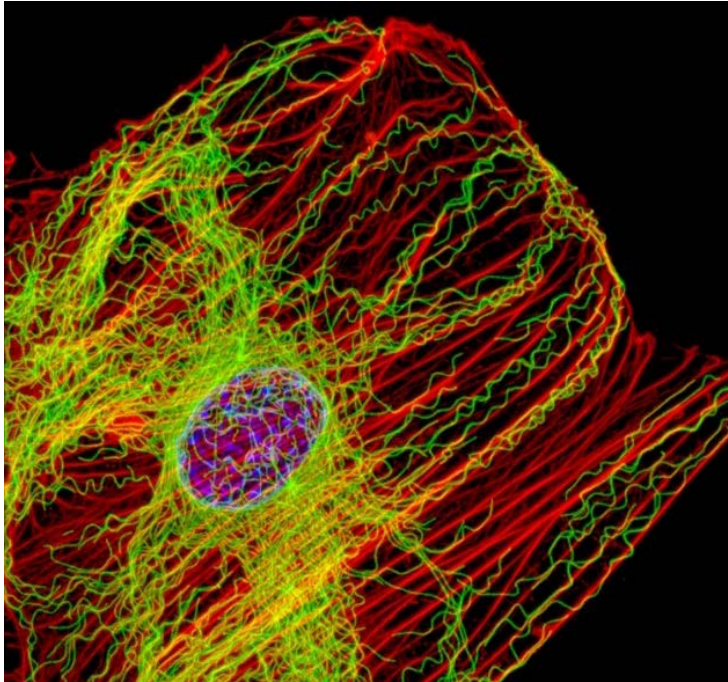


Figure 20 : Image d'un fibroblaste où l'on peut observer le cytosquelette, les filaments d'actine en rouge et les microtubules en vert. Les filaments d'actine, ici sous forme de fibre de stress, font provoquer une tension cellulaire, comme le ferait un muscle. Cet effet est contrebalancé par les microtubules qui aident la cellule à résister à la compression. (James J. Faust and David G. Capco, Université de l'Arizona).

*In vitro*, il y a aussi beaucoup de facteurs qui peuvent moduler la flexibilité et ainsi les propriétés mécaniques du microtubule, tels que : 1) l'utilisation de drogue comme le taxol qui rendent le microtubule plus flexible (Kikumoto et al. 2006) ; 2) l'état nucléotidique de la tubuline, où la conformation incurvée des dimères GTP réduisent la flexibilité du microtubule (Elie-Caille et al. 2007) ; 3) la température, qui en augmentant, augmente la flexibilité des microtubules (Kawaguchi and Yamaguchi 2010) ; 4) la dynamique du microtubule ; 5) la longueur des microtubules ; 6) les protéines associées ; 7) une combinaison de ces facteurs.

Certains de ces paramètres sont communs à la régulation des propriétés mécaniques des microtubules *in vitro* et *in vivo*, mais il est certain que la complexité *in vivo* est largement supérieure. En effet des modifications post-traductionnelles peuvent être mises en cause, comme par exemple l'acétylation, qui va augmenter la résistance des microtubules et ainsi leur durée de vie (Xu et al. 2017). Mais aussi des MAPs qui peuvent changer la rigidité et les propriétés du microtubule. Par exemple la protéine MAP65 va réduire la rigidité du microtubule (D. Portran et al. 2013) alors que TAU ou encore MAP2 l'augmente ("Rigidity of Microtubules Is Increased by Stabilizing Agents" 1995; Harald Felgner et al. 1997; Holger Felgner, Frank, and Schliwa 1996).

Aussi dans la cellule, il est souvent question de balance et de synergie entre ces acteurs, aboutissant sur une régulation pointue. Ceci dit, une autre explication à la différence de propriétés mécaniques des microtubules émerge de nos travaux et ouvre de nouvelles hypothèses de travail. En effet, la présence de défauts et le rajeunissement du microtubule le long de ses parois semblent jouer un rôle important dans ses propriétés mécaniques. Nous verrons dans le chapitre suivant comment le rajeunissement du microtubule en change les propriétés mécaniques.

# Objectifs de ma thèse

Dans la cellule, de nombreuses réactions ont lieu de manière simultanée et aucune ne fonctionne de manière isolée. Cependant, pour disséquer la complexité des processus cellulaires, il est aussi important d'étudier le rôle de molécules individuellement dans un premier temps puis collectivement. Mon travail s'inscrit dans cette démarche, d'études de mécanismes cellulaires dans un environnement biochimique contrôlé, *in vitro*, qui me semble être une étape importante à la compréhension du vivant (bottom up). Là où la majorité des études portent sur les extrémités du microtubule, il était nécessaire de se pencher sur le devenir du microtubule sur toute sa longueur. Il est facile de comprendre pourquoi les extrémités du microtubule ont attirés l'attention de la plupart des études sur la dynamique des microtubules. Le domaine des microtubules a largement été influencé par le modèle de l'instabilité dynamique qui se déroule aux extrémités de celui-ci. Ce phénomène qui est assez facilement observable avec des techniques classiques de vidéo-microscopie a sans doute involontairement limité l'intérêt de la communauté sur la dynamique le long du microtubule. En effet, la visualisation de la dynamique le long du microtubule nécessite des approches expérimentales plus difficiles à mettre en place.

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, mes collègues travaillaient sur l'étude de la dynamique et des propriétés mécaniques du microtubule sur sa longueur. Il était déjà connu que le microtubule n'était pas un tube parfait et qu'il existait des défauts le long de celui-ci (D. Chrétien et al. 1992b; Dye et al. 1992). L'originalité du travail de Schaedel et al. dans la revue *Nature Materials* en 2015 a été de montrer que l'on pouvait amplifier ces défauts en appliquant une contrainte mécanique aux microtubules et que cette amplification était d'autant plus importante à mesure que l'on appliquait rapidement un grand nombre de répétitions de contraintes mécaniques sur le microtubule. Ceci a pu être observé par le changement de propriétés mécaniques du microtubule, qui devenait plus flexible à chaque cycle d'application de la contrainte (flux) qui permettait de le courber. L'autre observation important de ce travail a été de voir que suite à l'arrêt des contraintes mécaniques (pause), le microtubule retrouvait ses propriétés mécaniques initiales.

Une des conclusions fortes de cette étude était que le microtubule était capable de se régénérer en présence de tubuline libre ; les notions de réparation et de renouvellement du microtubule sur sa longueur ont été alors introduites. Ainsi quand je suis arrivée au laboratoire, je savais que les microtubules étaient dynamiques sur toute leur longueur, qu'il pouvait y avoir une fragilité au niveau des parois de celui-ci et que les défauts de la paroi du microtubule pouvaient se réparer en présence de tubuline. Les questions que nous nous sommes alors posé étaient : 1) En quoi la fragilité de la paroi des microtubules peut être due à la vitesse de croissance de ces derniers ? 2) Sachant que la paroi des microtubules est fragile et quelle est parcourue par des moteurs moléculaires, est-il possible que ces moteurs moléculaires fragilisent encore plus la paroi ?

## 2. Chapitre 2 : Le renouvellement le long du microtubule.

### 2.1. Introduction : Pourquoi et comment étudier le long du microtubule ?

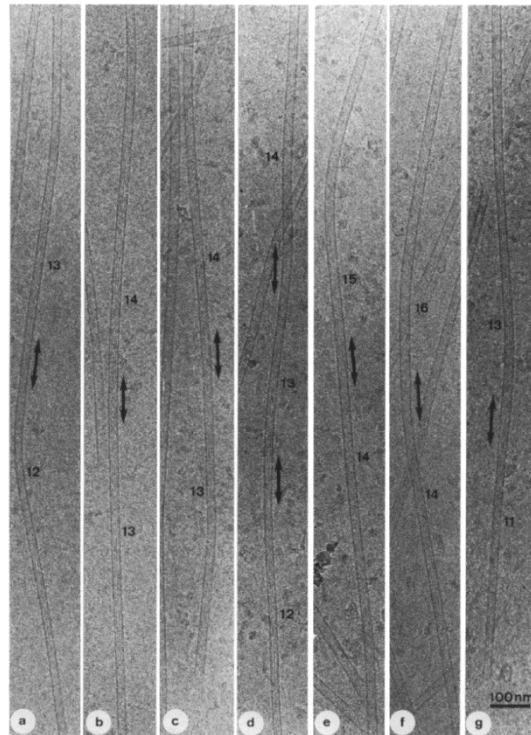
Pourquoi étudier la paroi du microtubule ? Énergétiquement parlant, il est plus avantageux de réparer un élément que de repartir de zéro. De plus, dans certains cas, il est important de garder les structures fonctionnelles. Par exemple, un microtubule qui va être emprunté par des moteurs chargés de leurs cargos devra rester intègre suffisamment longtemps pour que le transport ne soit pas perturbé et que les éléments cytoplasmiques arrivent bien à destination.

Comment pouvons-nous étudier la paroi du microtubule ? Pour cela, il faut s'affranchir de la dynamique des extrémités, qui masque la dynamique interne. Il faut donc assembler des microtubules dont les extrémités sont stabilisées.

### 2.2. Défauts et réparations

L'étude du microtubule sur tout sa longueur a d'abord porté sur la composition de celui-ci, c'est-à-dire le nombre de protofilaments qui le composent. Ainsi il a été montré, grâce à des techniques de microscopie électronique qu'il existait un polymorphisme dans le nombre de protofilaments, qu'il s'agisse de microtubules assemblés *in vitro* ou à partir d'extraits d'œufs de xénope. *In vitro*, la majorité des microtubules sont composés de 14 protofilaments alors que dans les extraits de cellules de xénope la majorité des microtubules est composée de 13 protofilaments (D. Chrétien et al. 1992b). Il a aussi été démontré que ce nombre de protofilaments pouvait changer abruptement le long d'un même microtubule, par incrémentation d'un ou deux protofilaments (D. Chrétien et al. 1992b; D. Chrétien and Fuller 2000). Ces discontinuités le long du microtubule ont été identifiées comme étant des dislocations, correspondant à des défauts à la surface du microtubule (figure 21). Ces défauts se sont très certainement formés pendant l'assemblage du microtubule.

Reid et al. ont aussi montré qu'il était possible de créer des défauts en changeant les conditions de manipulations (variation de température, concentration en sel, utilisation de différents nucléotides, etc...) (figure22) (Reid, Coombes, and Gardner 2017).



*Figure 21 : Image (micrographie) montrant des microtubules et le nombre de protofilaments associés. Les doubles flèches indiquent les régions de transition dans le nombre de protofilaments au sein du même microtubule. (Adapté de D. Chrétien et al. 1992a).*

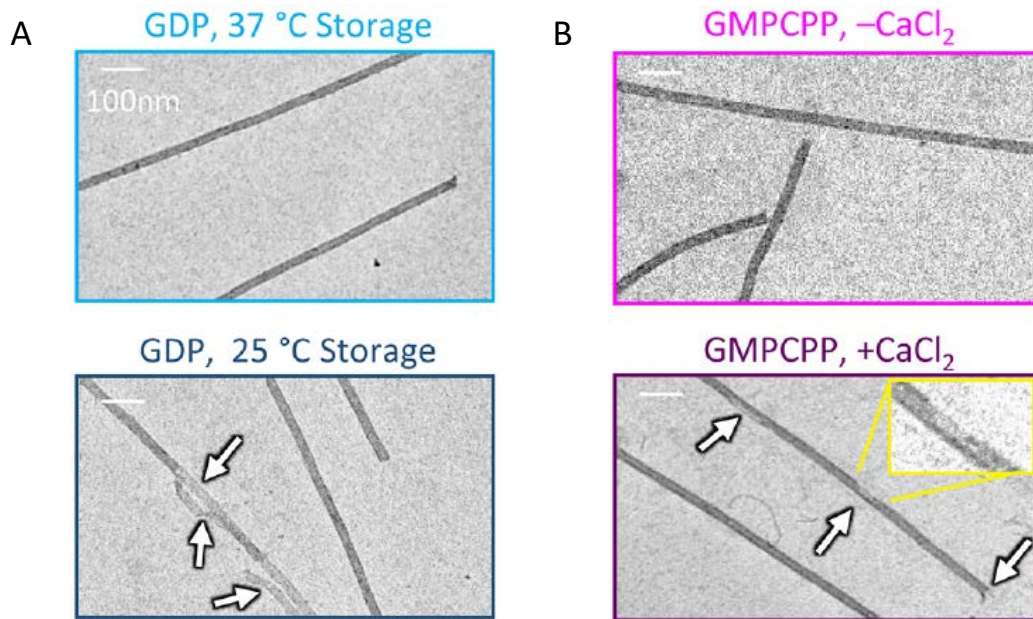


Figure 22 : Exemple de microtubules présentant des défauts le long de leur paroi, en fonction de différentes conditions, vu en microscopie électronique. (A) échantillons de microtubules GDP stockés à 37°C (en haut) ou 25°C (en bas). Les microtubules à 25°C ont des défauts (flèches blanches) le long de leur paroi. (B) échantillon de microtubules GMPCPP traité (bas) ou non (haut) avec du CaCl<sub>2</sub>. Les microtubules traités ont des défauts structuraux (flèches blanches). (Adapté de Reid, Coombes, and Gardner 2017).

Le microtubule n'est donc pas un tube parfait, il existe des défauts le long de celui-ci. Mais qu'en est-il du devenir de ses défauts ? sont-ils dynamiques ? sont-ils réversibles ?

Dans la cellule les microtubules sont soumis à différentes forces externes, telles que les flux, particulièrement dans le cas des cils ou des flagelles ; l'effet de MAPs ou encore de l'interaction avec les autres constituants du cytosquelette qui vont entraîner des déformations (Schaedel et al. 2020). Mon laboratoire s'est tout particulièrement intéressé à l'effet de ces forces sur la longueur du microtubule sur lesquels des défauts sont présents. Ainsi des contraintes mécaniques (flux perpendiculaire aux microtubules, figure 23) ont été appliquées afin d'étudier le devenir des propriétés mécaniques de ces microtubules.



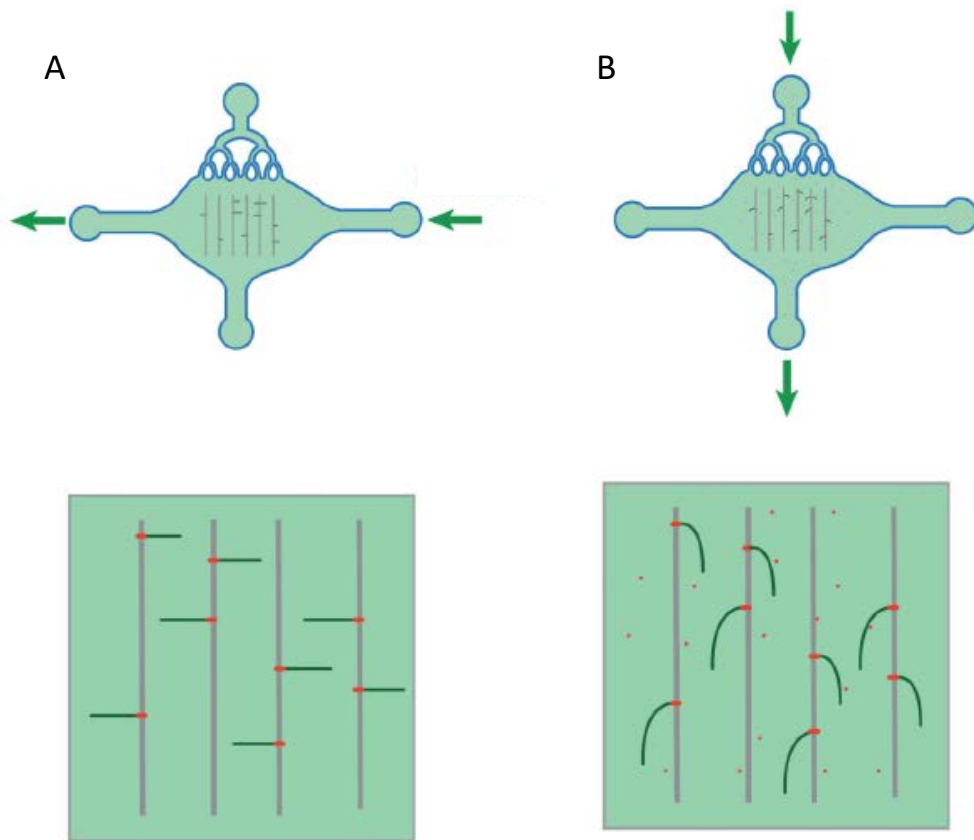


Figure 23 : Illustration du système de microfluidique permettant de contrôler la direction du flux. (A) étape de croissance des microtubules, le flux est horizontal (flèches vertes) et perpendiculaire au sens des micropatterns, ainsi les microtubules s'allongent parallèlement au sens du flux. (B) une fois que les microtubules sont suffisamment long, le flux est appliqué verticalement (flèches vertes), soit perpendiculairement aux microtubules. Ce qui agit en tant que contrainte mécanique (hydrodynamique) sur le microtubule. (Adapté de Schaedel et al. 2015b).

Ainsi Schaedel et al. ont pu montrer que si l'on applique une contrainte mécanique à un microtubule de manière répétée et rapide (10 secondes entre chaque répétition), celui-ci devient de plus en plus souple et voit sa longueur de persistance diminuer (figure 24).

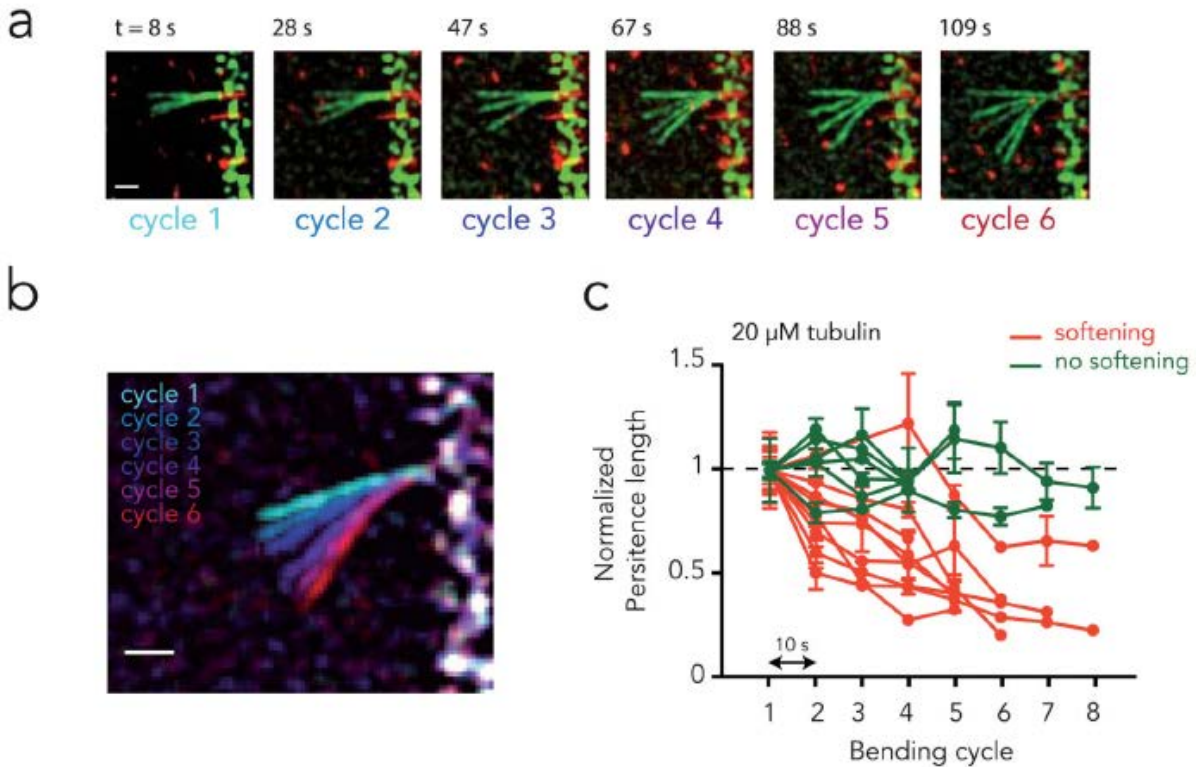


Figure 24 : Le microtubule devient de plus en plus flexible à mesure qu'une contrainte mécanique lui est appliquée. (A) Image d'un microtubule pendant 6 cycles de courbures (10 secondes entre chaque). On voit que la déformation du microtubule augmente à mesure que le nombre de répétitions augmente. (B) Image superposant la déformation maximale observée à chaque cycle. (C) Graphe représentant la longueur de persistance de différents microtubules en fonction du cycle de courbure. Certains microtubules ne sont pas affectés par la contrainte mécanique répétée (courbes vertes) alors que la majorité des microtubules voient leur longueur de persistance diminuer à mesure que l'on répète la contrainte mécanique (courbes rouges). (Adapté de Schaedel et al. 2015a).

Cette observation rappelle celle de Dye et al. (Dye et al. 1992) qui avait montré que certains microtubules présentaient des zones particulièrement flexibles et que ces zones corrèlent avec les zones d'où commence le désassemblage du microtubule. L'hypothèse étant qu'un défaut était présent à cette région du microtubule (figure 25).

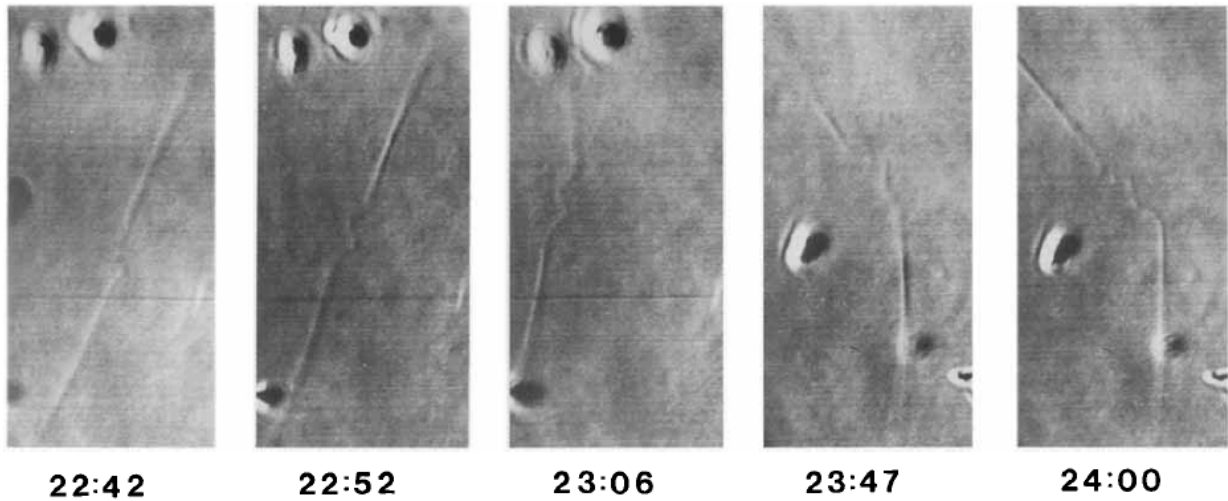


Figure 25 : Exemple de zone hyper flexible le long d'un microtubule. Cette zone parait se propager avec le temps. Pas de tubuline libre dans le milieu. (Adapté de Dye et al. 1992).

Ainsi l'hypothèse de mon laboratoire était qu'il y a des défauts ponctuels le long du microtubule et que ces défauts s'élargissent/se propagent lors d'une contrainte mécanique (figure 26) et qu'en présence de tubuline libre, ces défauts, pourraient être réparés et ainsi le microtubule retrouverait ses propriétés mécaniques initiales (figure 27 et 28).

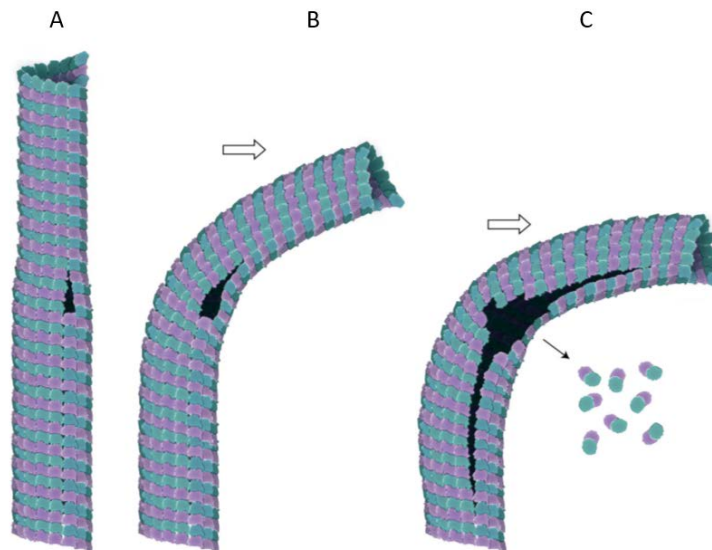


Figure 26 : Hypothèse proposé d'un microtubule ayant un défaut au niveau d'une transition dans le nombre de protofilaments (A), sur lequel on applique une contrainte mécanique (flux) qui va le déformer à proximité du défaut (B), ce qui va amplifier ce défaut, rendant ainsi le microtubule de plus en plus souple (C). (Adapté de Schaedel et al. 2015).

Afin de répondre à cette hypothèse, et voir si ce changement des propriétés mécaniques du microtubule suite à une contrainte mécanique répétée est dû à l'amplification de défauts préexistants le long de ses parois, Schaedel et al. ont eu l'idée d'inclure un temps de repos (100 secondes) entre deux répétitions et ce en présence de tubuline libre. Et en effet, le fait de mettre les microtubules en contact avec de la tubuline libre et de laisser des pauses entre chaque cycle de contraintes mécaniques, ont montré qu'il n'y avait pas de changement de la flexibilité des microtubules (figure 27).

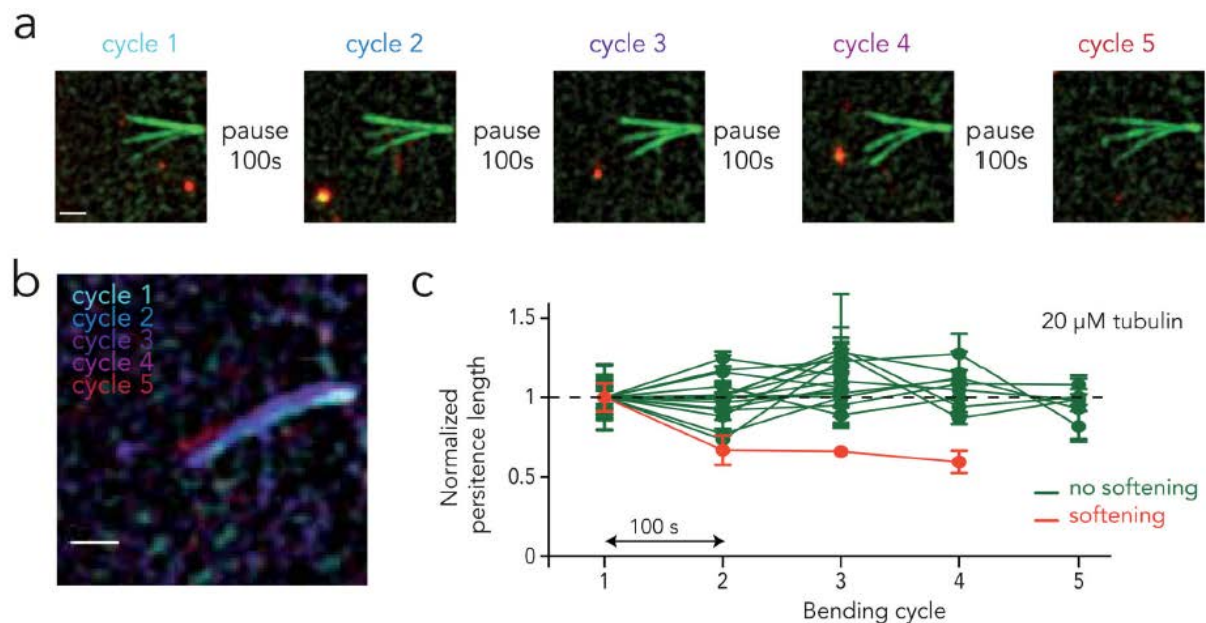
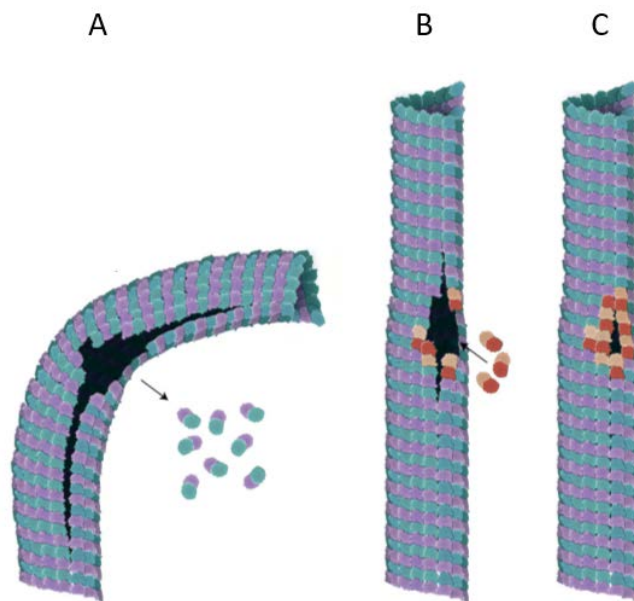
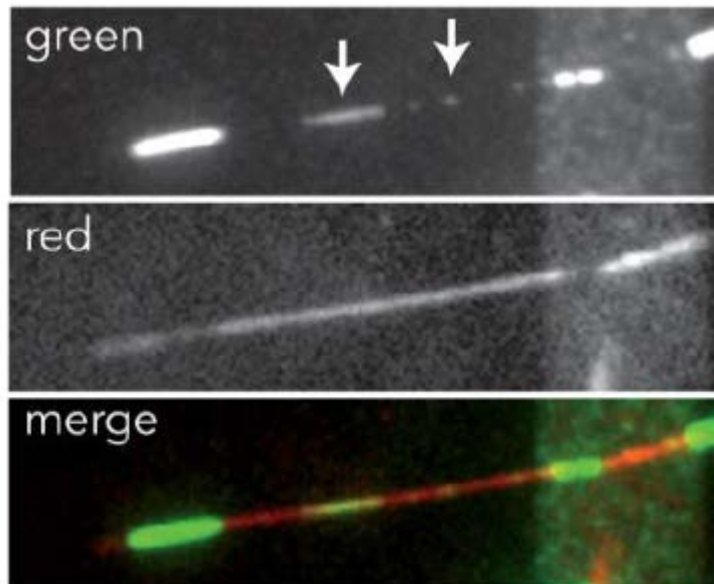


Figure 27 : Le microtubule est capable de récupérer ses propriétés mécaniques. (A) Image d'un microtubule pendant 5 cycles de courbures, mais cette fois avec une pause entre chaque cycle (100 secondes). On voit que la déformation du microtubule reste la même à mesure que le nombre de répétitions augmente. (B) Image superposant la déformation maximale observée à chaque cycle. (C) Graphe représentant la longueur de persistance de différents microtubules en fonction du cycle de courbure. La majorité des microtubules voient leur longueur de persistance constante à mesure que l'on répète la contrainte mécanique (courbes vertes). Un seul microtubule (courbe rouge) voit sa longueur de persistance diminuer à mesure que l'on applique une contrainte mécanique répétée. (Adapté de Schaedel et al. 2015a).

Pour expliquer ces observations, il a été proposé que les microtubules voyaient donc ces défauts se réparer pendant les périodes de pause (figure 28). La mise en présence d'une tubuline marquée différemment que la tubuline constituant le microtubule préexistant a permis de mettre en évidence l'existence de zone d'incorporation de nouveaux dimères de tubuline (figure 29). Particulièrement localisés sur les zones de courbures. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle il y avait un « trou », un défaut, qui peut être amplifié par l'application d'une contrainte mécanique et qui peut être réparé par la mise en présence de tubuline libre.



*Figure 28 : Hypothèse proposée d'un microtubule ayant un défaut amplifié par des contraintes mécaniques (A) et qui a été réparé par l'addition de nouveaux dimères de tubuline (B). Visualisable grâce à l'incorporation de dimères de tubuline d'une couleur différente de ceux composant le microtubule préexistant. Une fois réparé le microtubule retrouve ses propriétés mécaniques initiales (C). (Adapté de Schaedel et al. 2015).*



*Figure 29 : Image d'un microtubule (rouge) ayant été réparé grâce à l'incorporation de dimères de tubuline (vert). Les sites de réparation sont mis en évidence par des flèches. (Adapté de Schaedel et al. 2015).*

2.3. Article : Les défauts le long du microtubule induisent son auto-renouvellement.  
Schaedel et al., Nature Physics, 2019

### 2.3.1. Introduction

*In vitro*, l'étude des microtubules montre qu'il s'agit de polymères hautement dynamiques, qui s'allongent et se raccourcissent en permanence à leurs extrémités, c'est ce que l'on appelle l'instabilité dynamique. Dans la cellule, nous pouvons observer cette instabilité dynamique cependant elle est moins fréquente du fait d'une plus grande stabilité des microtubules. En effet, *in vivo*, il a été montré il y a plusieurs décennies déjà que, 80% des microtubules sont renouvelés, par dépolymérisation puis repoussent en environ 15 min. Cependant certains microtubules voient leur durée de vie considérablement augmentée jusqu'à plusieurs heures ("Microtubule Dynamics in Interphase Cells" 1986) (figure 30).

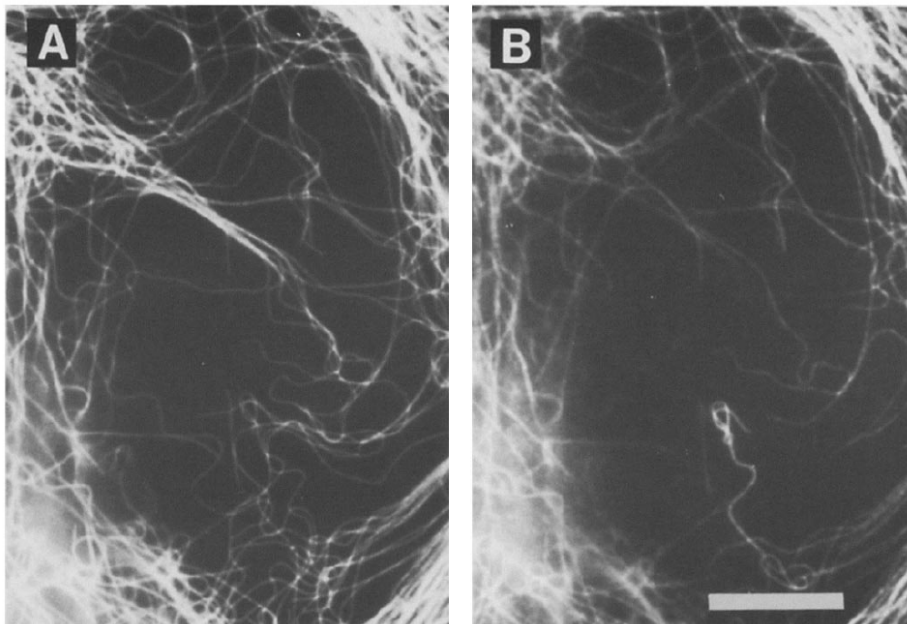


Figure 30 : Double marquage en immunofluorescence montrant l'existence d'une sous-catégorie de microtubules stables 2h après injection de tubuline biotinylée. (A) Image montrant l'ensemble du réseau de microtubules dans un fibroblaste. (B) Image montrant uniquement les microtubules ayant incorporé la nouvelle tubuline biotinylée injectée. Les microtubules étant présents dans l'image A et non en B sont les microtubules stables. (Adapté de E. Schulze et M. Kirschner, 1986).

Une question importante suite à ces observations, est de comprendre l'émergence de cette sous-catégorie de microtubules plus stables.

On peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène ; 1) certaines protéines associées aux microtubules peuvent moduler leur dynamique et stabiliser leurs extrémités, prévenant ainsi leur dépolymérisation ; 2) ces microtubules sont peut-être différents sur toute leur longueur car associés à certaines MAPs ; 3) ces microtubules ont leurs sous-unités modifiées par des modifications post-traductionnelles ; 4) le renouvellement des microtubules sur toute leur longueur permettrait un échange GDP, GTP qui les stabiliserait ; 5) une combinaison de toutes ces hypothèses.

L'émergence de l'étude du microtubule dans son ensemble et non plus seulement aux extrémités est un élément clé pour répondre à ces questions. Récemment dans notre équipe, des travaux se sont intéressés au devenir de la dynamique le long des microtubules et ont montré que leurs parois n'étaient pas passives comme il l'a souvent été supposé mais qu'une dynamique y était aussi possible (Schaedel et al. 2015a). Il a été notamment démontré que des dimères de tubulines pouvaient manquer à la surface de la paroi des microtubules et que ces défauts pouvaient être réparés par l'incorporation de nouveaux dimères. Mais la régulation de cette dynamique est encore mal connue, comment sont générés les défauts, comment la réparation est régulée, quels sont les effets dans le temps ? Autant de questions qui sont encore sans réponses. Une caractérisation plus précise reliant la quantité de défauts à la quantité de réparation est primordiale. Cette étude pourrait expliquer la différence de durée de vie entre les microtubules.

Suite à une observation faite par mon laboratoire, mon premier objectif pendant ma thèse a été d'étudier la fragilité des parois du microtubule en fonction de leur vitesse de croissance. En effet, pendant l'étude de l'effet de contraintes mécaniques sur le devenir des propriétés mécaniques du microtubule, mon laboratoire a mis en évidence un lien entre la vitesse de croissance des microtubules et la variation de ses propriétés mécaniques (flexibilité) (figure 31).



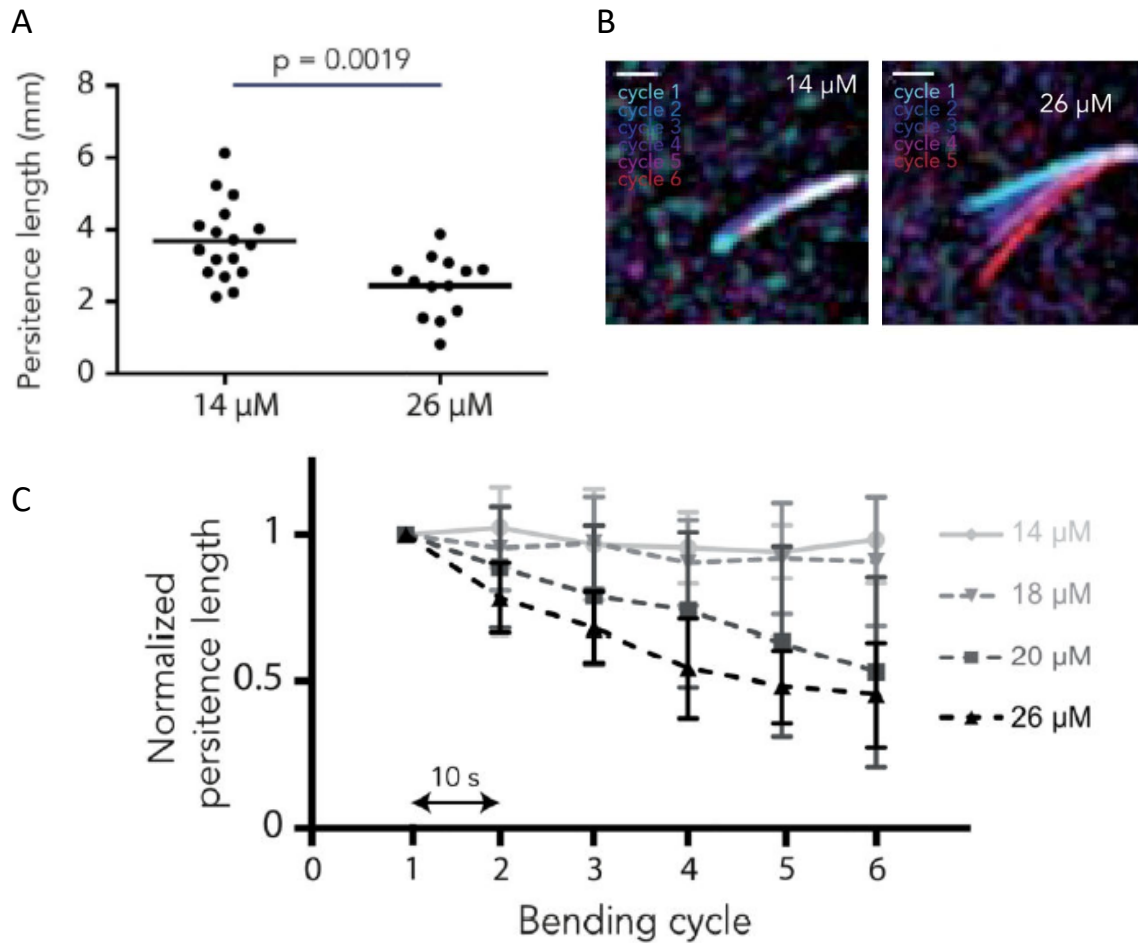


Figure 31 : Une croissance rapide des microtubules favorise une plus grande flexibilité. (A) Longueur de persistance initiale de microtubules polymérisés en présence de 14  $\mu\text{M}$  ou 26  $\mu\text{M}$  de tubuline libre. (B) Image superposant la déformation maximale observée à chaque cycle pour des microtubules ayant polymérisé en présence de 14  $\mu\text{M}$  (à gauche) ou 26  $\mu\text{M}$  (à droite) de tubuline. (C) Graphe représentant la longueur de persistance de microtubules à différentes concentrations de tubuline (14, 18, 20 et 26  $\mu\text{M}$ ) et en fonction du cycle de courbure (1 à 6). (Adapté de Schaedel et al. 2015a).

Ces observations m'ont mené à explorer cette piste et chercher à montrer de manière directe le lien entre vitesse de croissance, défauts et renouvellement. Ainsi plus généralement, j'ai étudié l'apparition spontanée d'une dynamique le long du microtubule, sans génération de défauts dus aux contraintes mécaniques. Et j'ai démontré que des échanges de dimères le long du microtubule sont possibles de manière spontanée, et que ces échanges sont proportionnels à la

quantité de défauts préexistant ; échanges eux-mêmes dépendant de la vitesse de croissance des microtubules.

Pour cela, j'ai utilisé un système de micro-fluidique adapté (flux parallèle à longueur des microtubules). Ce système permet un contrôle optimal des conditions car il permet de changer de milieu de manière rapide et propre, permettant ainsi de pouvoir alterner l'utilisation de différents nucléotides ; GTP pour la croissance des microtubules, GMPCPP pour leur stabilisation à l'extrémité plus (capping) ; et ainsi d'assembler des microtubules non stabilisés, de les exposer à de la tubuline libre et de suivre leur évolution (figure 32). Ce système est particulièrement important ici car le contrôle du flux permet une uniformité d'une expérience à une autre et limite considérablement les biais dus à celui-ci. Il permet aussi de contrôler la direction du flux, que nous utilisons parallèle à la longueur des microtubules, prévenant ainsi toutes contraintes mécaniques (figure 33).

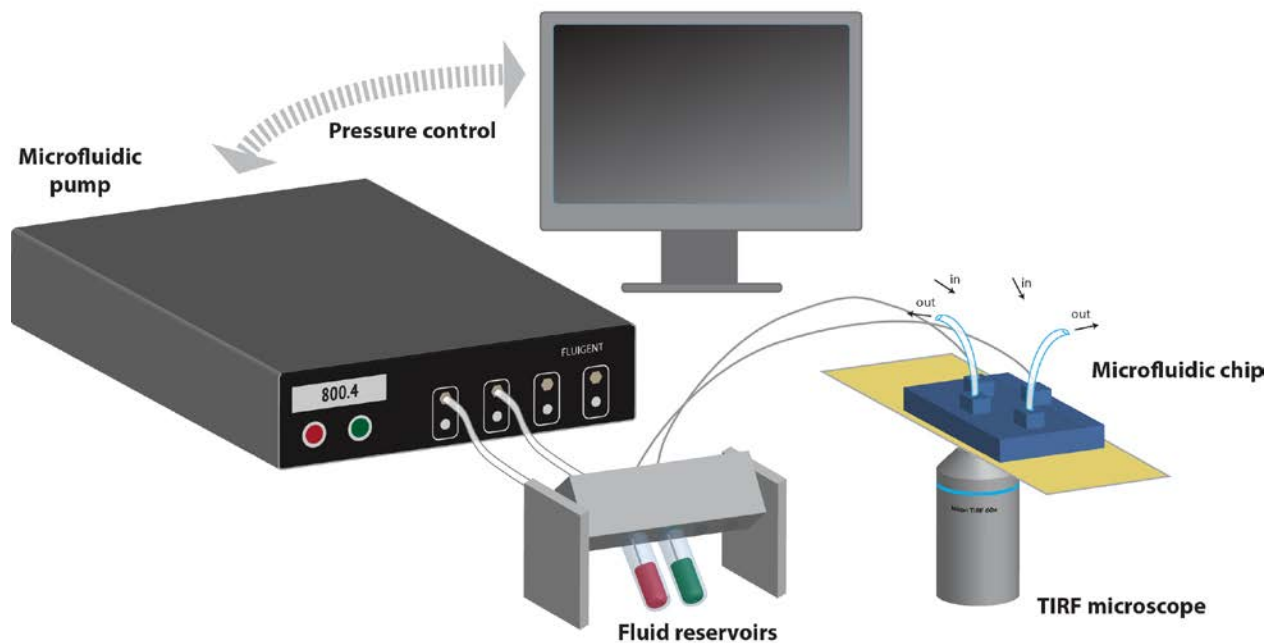


Figure 32 : Illustration du système de microfluidique. Une pompe permet de contrôler le flux qui passe dans la chambre à flux. Les milieux sont dans un « réservoir » et vont passer dans la chambre via un tube, puis ressortir de l'autre côté via un second tube. Pour pouvoir imager un échantillon au niveau de la lamelle nous utilisons un microscope TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence), l'échantillon est maintenu à une température optimale de 37°C.

De plus, l'utilisation de micropatrons (micropatterns) développés par Portran et al. (Didier Portran et al. 2013) permet de fixer les microtubules uniquement par l'une des extrémités (leurs amorces) et de limiter l'interaction des microtubules en croissance avec leur environnement. Ce qui permet d'étudier des microtubules libres dont le devenir ne sera pas altéré par des interactions avec la lamelle (figure 33).

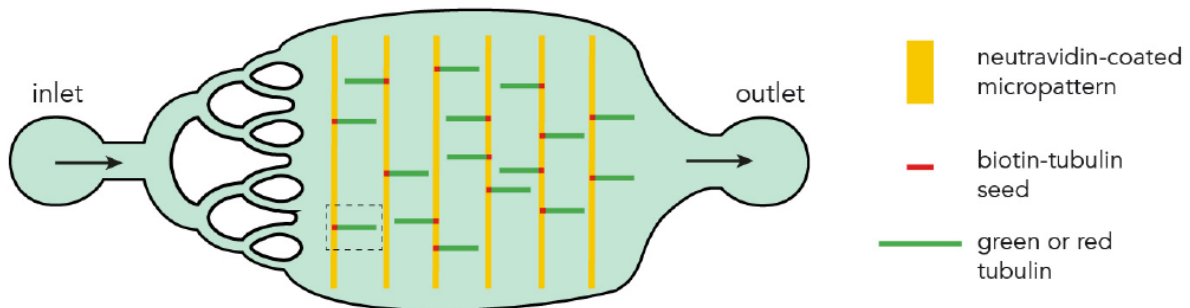
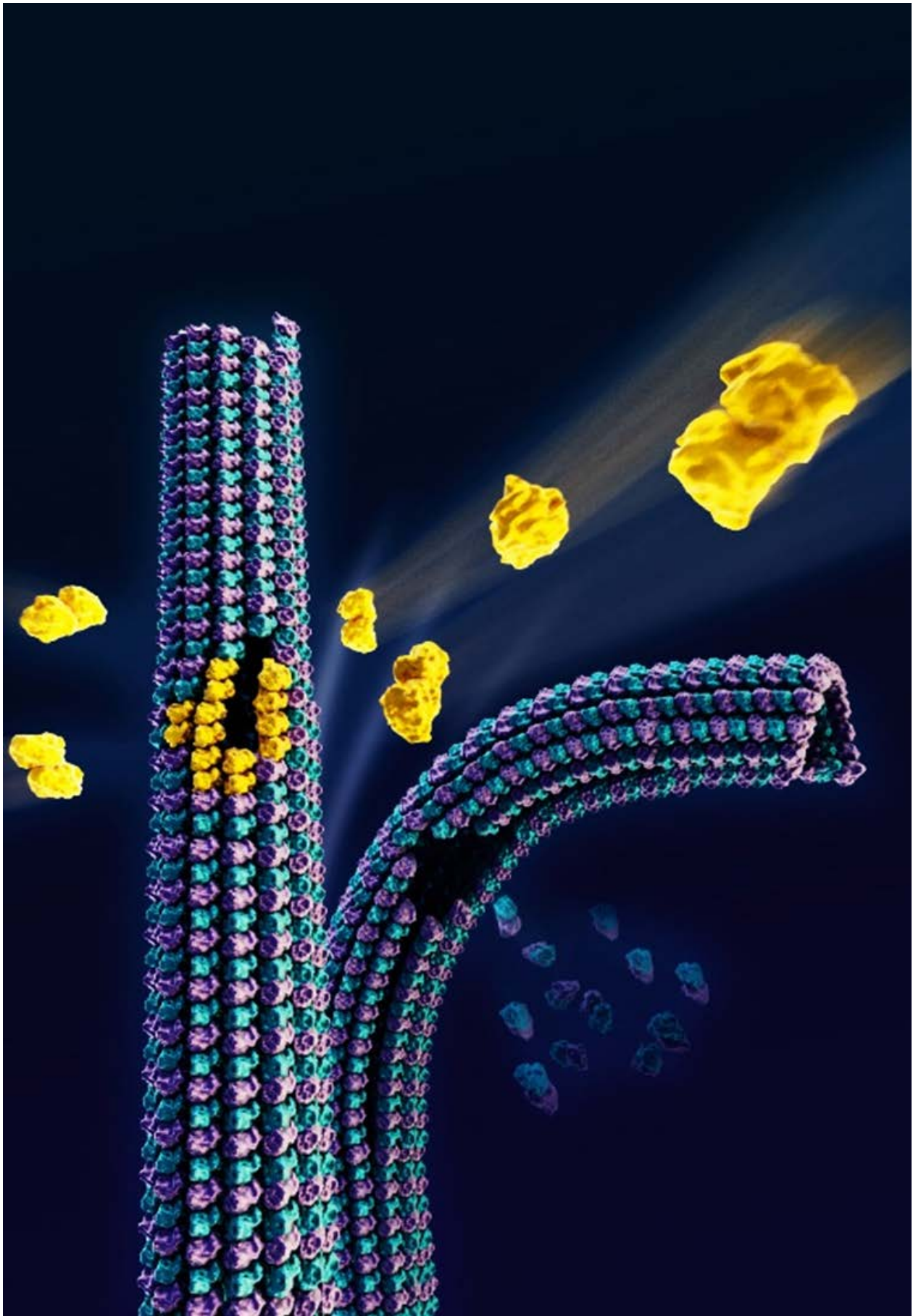


Figure 33 : vue du dessus d'une chambre à flux. La perfusion du milieu dans la chambre commence par l'entrée (à gauche) et le milieu ressort par la sortie (à droite). La lamelle est patternée avec des lignes verticales perpendiculaires au flux (jaune). Les amorces (petits microtubules stabilisés) sont attachées au pattern (rouge) et les microtubules sont libres (vert).

Dans cette étude nous avons combiné les données obtenues grâce à la microscopie à fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, total internal reflection microscopy), la microscopie électronique et des simulations mathématiques pour tenter d'élucider l'origine de l'apparition de défauts le long du microtubule et leur devenir. Nos données confortent l'idée qu'un simple stress élastique, dû aux mouvements du microtubule (vibrations, courbure...) associés à des défauts structuraux présents le long du microtubule apparus lors de la croissance même du microtubule ; vont suffirent à favoriser un renouvellement spontané des dimères constituant le microtubule.

### 2.3.2. Manuscrit



# Lattice defects induce microtubule self-renewal

Laura Schaedel<sup>1</sup>, Sarah Triclin<sup>1</sup>, Denis Chrétien<sup>2</sup>, Ariane Abrieu<sup>3</sup>, Charlotte Aumeier<sup>1</sup>,  
Jérémy Gaillard<sup>1</sup>, Laurent Blanchoin<sup>1,4\*</sup>, Manuel Théry<sup>1,4\*</sup> and Karin John<sup>5\*</sup>

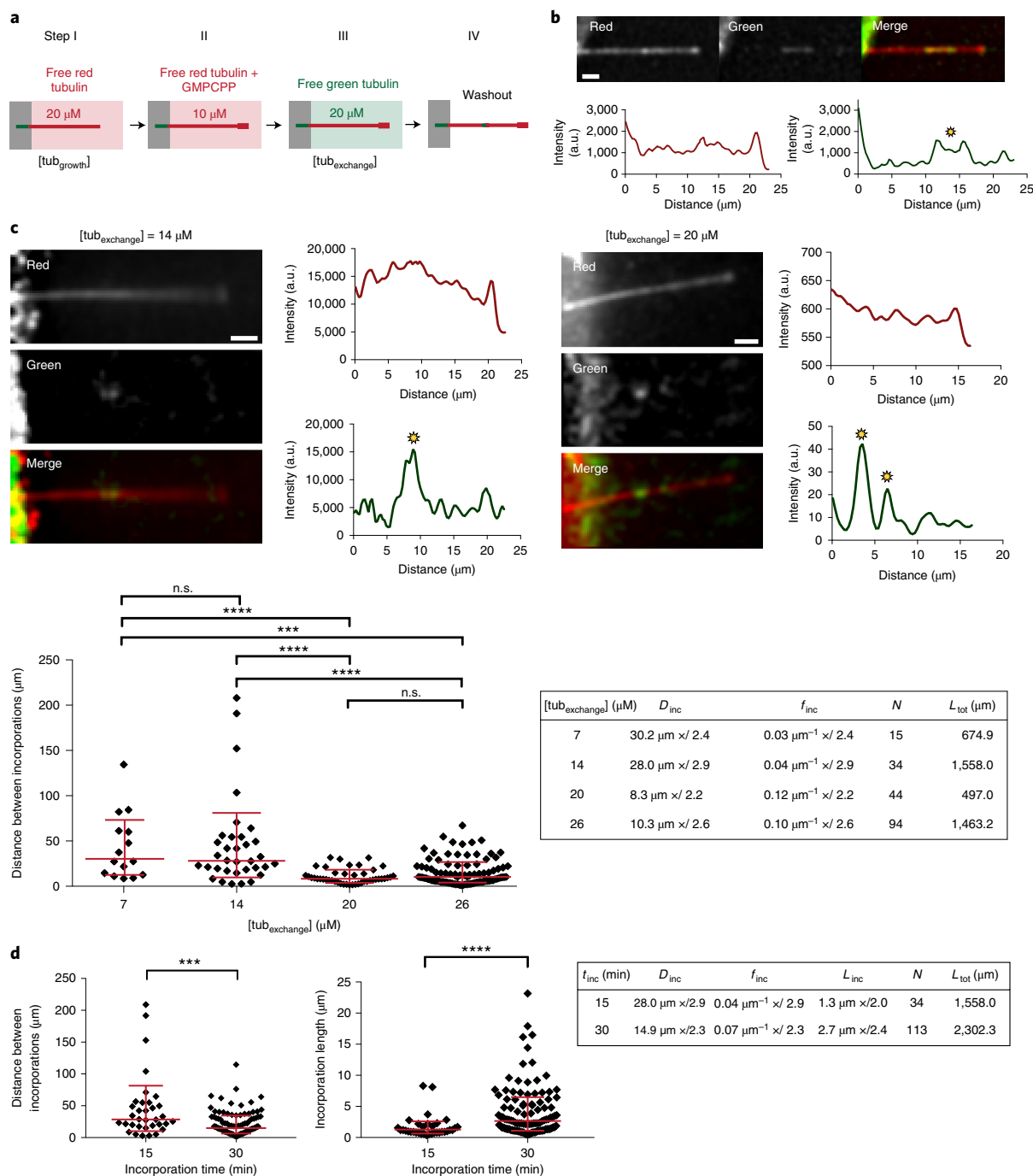
**Microtubules are dynamic polymers, which grow and shrink by addition and removal of tubulin dimers at their extremities. Within the microtubule shaft, dimers adopt a densely packed and highly ordered crystal-like lattice structure, which is generally not considered to be dynamic. Here, we report that thermal forces are sufficient to remodel the microtubule shaft, despite its apparent stability. Our combined experimental data and numerical simulations on lattice dynamics and structure suggest that dimers can spontaneously leave and be incorporated into the lattice at structural defects. We propose a model mechanism, where the lattice dynamics is initiated via a passive breathing mechanism at dislocations, which are frequent in rapidly growing microtubules. These results show that we may need to extend the concept of dissipative dynamics, previously established for microtubule extremities, to the entire shaft, instead of considering it as a passive material.**

Microtubules are self-organized tubular scaffolds serving as tracks for intracellular transport. They are dynamic dissipative structures, which grow or shrink primarily by tubulin dimer addition or removal at their extremities. Their non-equilibrium behaviour results from the irreversible hydrolysis of GTP<sup>1,2</sup> and manifests itself as stochastic transitions between growth and shrinkage phases, called dynamic instability<sup>2–6</sup>. For three decades, a substantial effort in microtubule research has been dedicated to the study of the dynamic instability at the microtubule tips<sup>7</sup>. In contrast, only little is known about the dynamical properties of the microtubule shaft<sup>8</sup>. A first hint that the shaft is dynamic came from the observation of end-stabilized microtubules in the absence of free tubulin. Microtubules started to soften in a localized region and eventually broke apart. Breakage of soft regions could be prevented by reintroducing GTP-tubulin into the solution, suggesting that both dimer loss and incorporation occurred along the shaft<sup>9</sup>. More recently, Schaedel et al.<sup>10</sup> demonstrated that microtubules, subjected to short (~10 s) repeated cycles of bending, softened and incorporated free tubulin dimers into the shaft. Reid et al.<sup>11</sup> showed tubulin incorporation into the shaft of stabilized microtubules containing massive structural defects. Others have detected GTP-tubulin islands along the shaft<sup>12,13</sup>, potentially resulting from a dynamic tubulin turnover in the shaft. Live-cell imaging revealed that sites of tubulin turnover also exist *in vivo*, predominantly in microtubule bundles or at intersections between two microtubules<sup>13,14</sup>. Recently, it was shown that microtubule-severing enzymes, such as spastin and katanin, are able to actively remove tubulin dimers from the shaft. The ensuing gaps in the lattice are repaired rapidly by the incorporation of free tubulin<sup>15</sup>. Estimates of the change in free energy upon transferring a dimer from the fully occupied lattice into the surrounding medium range from  $35 k_B T$  to  $80 k_B T$  (refs. 16–18), suggesting that spontaneous dimer loss is not relevant during the lifetime of a microtubule. However, it is known that the microtubule lattice is not perfect but exhibits defects, such as missing dimers, cracks and dislocations<sup>19–24</sup>. Here, we combine data of tubulin turnover obtained by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and structural data obtained by cryo-electron

microscopy with kinetic Monte Carlo modelling to elucidate the origin of the lattice turnover. Our data support the idea that the elastic stress associated with structural lattice defects is sufficient to promote a spontaneous localized tubulin turnover on the timescale of minutes, even in the absence of external forces. We propose a robust and simple breathing mechanism that relates lattice turnover to the presence of dislocation defects. Our simulations capture the dynamic instability at the tip, as well as the localized turnover in the shaft, thus extending the concept of microtubule dynamics from the tip to the shaft.

To test the possibility of spontaneous dimer turnover we polymerized microtubules *in vitro* from purified brain tubulin<sup>25</sup>. As depicted in Fig. 1a, dynamic microtubules were nucleated from short taxol-stabilized microtubule seeds and elongated in the presence of 20  $\mu\text{M}$  of free tubulin dimers ('tubulin growth' condition), 20% of which was labelled with red fluorophores. Importantly, microtubules were not stabilized with taxol, which is known to impact the lattice structure<sup>11,26,27</sup>. Microtubule ends were then capped with GMPCPP-tubulin, a non-hydrolysable analogue of GTP, to protect them from depolymerization. Capped microtubules were exposed to 20  $\mu\text{M}$  of free tubulin dimers labelled with a green fluorophore for 15 min ('tubulin exchange' condition). After washout of the free tubulin, green tubulin spots of micrometre size became apparent along microtubule shafts (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1a). This method revealed that tubulin incorporation occurs spontaneously, that is, in the absence of external mechanical forces. To test the dependence of the incorporation on the free tubulin concentration, microtubules generated in the tubulin growth process (step I in Fig. 1a) were exposed to different concentrations of free green fluorescently labelled tubulin in the tubulin exchange process (step III in Fig. 1a). Sites of incorporated tubulin were identified using line scans of the green fluorescence intensity along the microtubule (Fig. 1b,c and Methods). We analysed incorporation by randomly concatenating all microtubules and by measuring the distance between adjacent incorporation spots. The resulting distribution of distances (Fig. 1c) is skewed and better described by the geometric mean  $\times$ / geometric standard deviation (s.d.) factor than by the

<sup>1</sup>Univ. Grenoble-Alpes, CEA, CNRS, INRA, Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, CytoMorpho Lab, Grenoble, France. <sup>2</sup>Univ. Rennes, CNRS, IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes)—UMR 6290, Rennes, France. <sup>3</sup>CRBM, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France. <sup>4</sup>Univ. Paris Diderot, INSERM, CEA, Hôpital Saint Louis, Institut Universitaire d'Hématologie, UMRS 1160, CytoMorpho Lab, Paris, France. <sup>5</sup>Univ. Grenoble-Alpes, CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Grenoble, France. \*e-mail: [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr); [manuel.thery@cea.fr](mailto:manuel.thery@cea.fr); [karin.john@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:karin.john@univ-grenoble-alpes.fr)



**Fig. 1 | Incorporation of free tubulin into the microtubule lattice visualized by TIRF.** **a**, Schematic representation of the experimental set-up used to test microtubule-lattice turnover in the absence of external forces. Microtubules were grown with red fluorescent tubulin at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  (step I) before they were capped with GMPCPP (step II) and exposed to green-fluorescent free tubulin at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  (step III). After 15 min, the green tubulin was washed out to reveal spots of green tubulin along the red microtubule (step IV). **b**, Example of a red microtubule showing spots of incorporated green tubulin along the lattice. The graphs represent line scans along the microtubule (red curve, red fluorescent channel; green curve, green fluorescent channel). Sites of incorporated tubulin were identified as zones of fluorescence intensity, which were at least 2.5-fold higher than the background fluorescence (yellow star). Scale bar, 3  $\mu\text{m}$ . **c**, Microtubules grown at 20  $\mu\text{M}$  tubulin concentration were exposed to 14  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  and 26  $\mu\text{M}$  of green-fluorescent free tubulin (step III in **a**). The images and line scans represent typical examples for 14  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  as described in **b**. Scale bars, 3  $\mu\text{m}$ . The graph (bottom left) shows the distribution of distances between incorporation spots after concatenating all microtubules in a random order. The red bars indicate the geometric mean  $\times$  / s.d. factor.  $P$  values are  $<0.0001$  for the concentration pairs (7  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ), (14  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) and (14  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$ ) and  $P = 0.0004$  for the pair (7  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$ ). n.s., not significant. The table (bottom right) summarizes the average distance  $D_{\text{inc}}$  and frequency  $f_{\text{inc}}$  (geometric mean  $\times$  / s.d. factor) of incorporation spots. **d**, Comparison of distances between incorporations (left) and lengths of incorporation spots (right) for two different incubation times (15 min and 30 min) at 14  $\mu\text{M}$  free tubulin in step III of **a**. The  $P$  value is 0.0005 ( $<0.0001$ ) for the distance between (length of) incorporation spots after 15 and 30 min of incorporation. The table summarizes the average distance  $D_{\text{inc}}$ , frequency  $f_{\text{inc}}$  and size  $L_{\text{inc}}$  of incorporation spots (geometric mean  $\times$  / s.d. factor) for each incubation time  $t_{\text{inc}}$ . The estimated speed of elongation of the incorporation spots is  $v \approx L_{\text{inc}} / t_{\text{inc}} \approx 0.09 \mu\text{m min}^{-1}$ .  $L_{\text{tot}}$  and  $N$  in the tables in **c,d** denote the total length of microtubules analysed and the total number of observed incorporation spots, respectively.

arithmetic mean  $\pm$  s.d. (ref. 28; see Methods). At low free tubulin concentrations (7  $\mu$ M and 14  $\mu$ M), the typical spatial frequencies of incorporation sites ( $f_{\text{inc}} = 0.03 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.4$  and  $f_{\text{inc}} = 0.04 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.9$ , respectively) are not significantly different. On increasing the free tubulin concentration to 20  $\mu$ M, the typical frequency increases significantly to  $f_{\text{inc}} = 0.12 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.2$ . Increasing the free tubulin concentration to 26  $\mu$ M does not significantly further increase the typical frequency ( $f_{\text{inc}} = 0.10 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.6$ ). We conclude that tubulin incorporation depends critically on the concentration of free tubulin. Furthermore, tubulin incorporation is a continuous process, whereby the frequency and length of incorporation spots at 14  $\mu$ M free tubulin increases between 15 and 30 min of incorporation (Fig. 1d). The increase in spot size allows us to estimate the growth speed of the incorporation spots to about  $0.09 \mu\text{m min}^{-1}$ . The increase in the frequency of incorporation spots over time (Fig. 1d) could potentially be the result of two different mechanisms: (1) small incorporation spots that are undetectable at short incorporation times become bigger and therefore visible after longer incorporation times, or (2) new incorporation spots are nucleated over time along the microtubule shaft. We will come back to the distinction between the two mechanisms later. The mean size of incorporation spots after 15 min of incubation increases slightly with the free tubulin concentration (Supplementary Fig. 1b), indicating that although the appearance of incorporation spots depends critically on the free tubulin concentration, a higher tubulin concentration (above a critical concentration) favours a faster growth of incorporation spots. In summary, the incorporation of tubulin into microtubules in the absence of external constraints suggests a genuine spontaneous and continuous process of tubulin turnover.

How is a spontaneous localized tubulin turnover possible in such a highly ordered structure as the microtubule shaft? Using lower estimates for the binding energy and taking into account the entropic loss upon dimer polymerization, the typical time for a dimer to leave the lattice of a 20- $\mu$ m-long microtubule ranges between 15 min and 3 h (see Supplementary Information and Supplementary Fig. 2a). Given the stochastic nature of chemical reactions, and the fact that dimer loss occurs in a cooperative manner (the loss of the first dimer reduces the time for the loss of the next neighbours), we felt it worthwhile to test whether the loss or incorporation of dimers at the perfect shaft could reproduce the experimentally observed localized exchange pattern (Fig. 1b,c). To that end, we developed a simple, albeit robust, kinetic Monte Carlo model (Fig. 2a and Methods) for the canonical microtubule lattice (13 protofilaments, 3-start left-handed helix<sup>29,30</sup>), hereafter referred to as the 13 protofilament lattice. Similar types of Monte Carlo model have

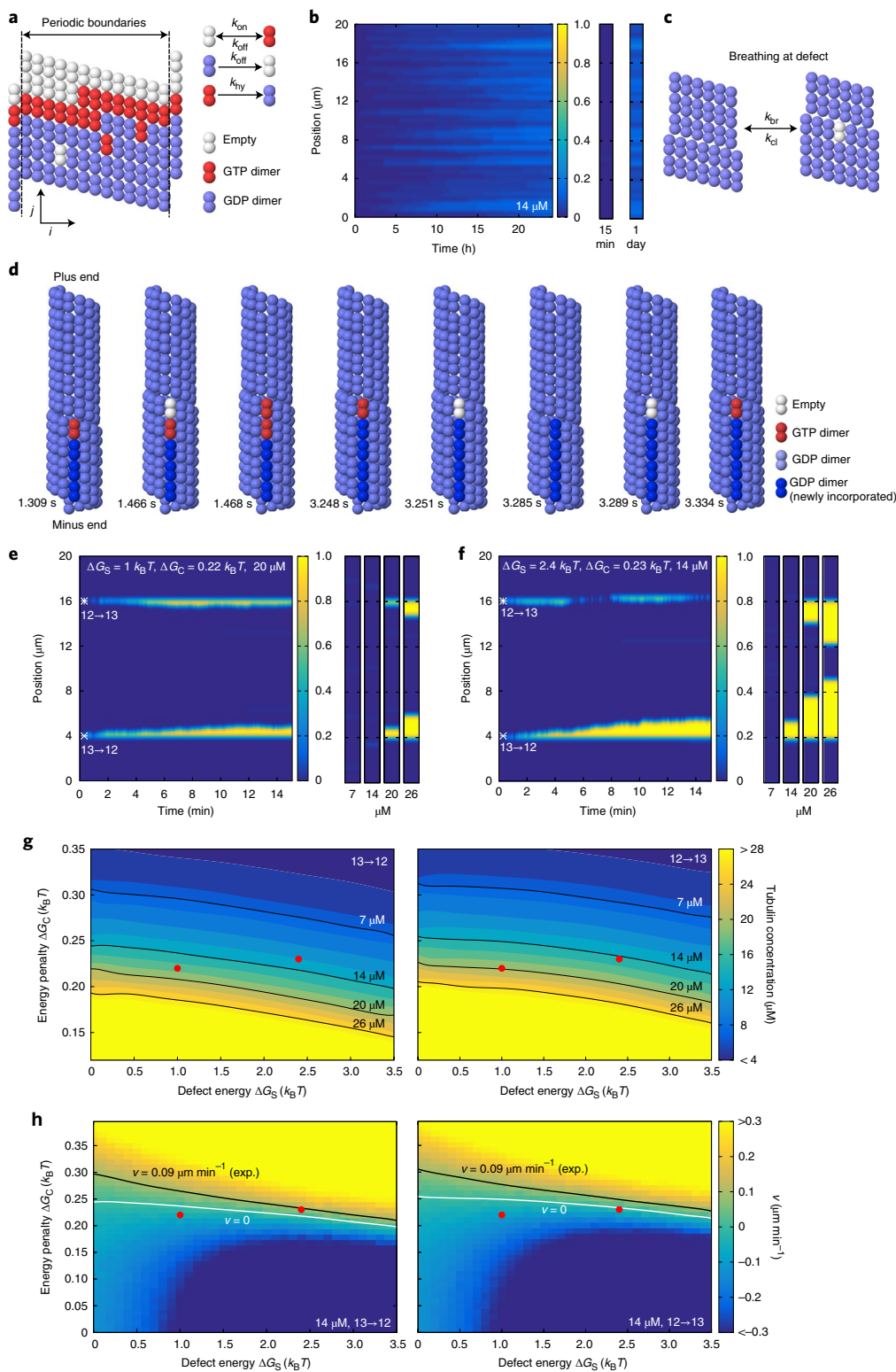
been used to study the microtubule tip dynamics<sup>16,31,32</sup>. Here, we specifically allowed for the exchange of dimers between the microtubule shaft and the surrounding solution, which had not been considered previously. The model parameters (see Supplementary Table 1) are comparable to values found in the literature and are adapted to reproduce dynamic instability of the microtubule plus end (Supplementary Fig. 2b). To investigate the experiments of end-stabilized microtubules shown in Fig. 1, we simulated the exchange of dimers between 20- $\mu$ m-long microtubule shafts and the solution containing 14  $\mu$ M free tubulin (Fig. 2b). A single dimer occasionally left the lattice, however the open lattice space was rapidly filled, before more neighbouring dimers could leave the lattice. Thus, the frequency of dimer exchange between the lattice and the pool of free dimers during the first 15 min was considered too low to be detectable experimentally. Within 1 day, the shaft exchanged about 1 dimer per 5 helical turns with the solution in an almost homogeneous fashion. Therefore, a regular lattice cannot explain the localized exchange pattern. We hypothesized that the elastic stress, associated with dislocation defects, might be sufficient to promote a spontaneous localized tubulin turnover. We therefore extended our Monte Carlo model to simulate the microtubule dynamics at transitions between 12 and 13 protofilament lattice conformations via dislocation defects. Thereby, we postulated (1) that a passive lattice breathing mechanism occurs at the defect site (Fig. 2c); (2) that the defect is associated with an elastic strain energy  $\Delta G_s$ ; and (3) that the 12 protofilament lattice is slightly less stable than the 13 protofilament lattice<sup>33</sup> by a small conformational energy penalty  $\Delta G_c$ . As an illustration, Fig. 2d shows snapshots of a numerical simulation of a 13 $\rightarrow$ 12 dislocation (the arrow indicates the direction of the plus end) in the presence of free tubulin. Shown are consecutive single events in the Monte Carlo model, for example breathing, incorporation and loss of tubulin dimers and hydrolysis. Thereby, the position of the dislocation is moving along the microtubule long axis. For the 13 $\rightarrow$ 12 dislocation depicted in Fig. 2d a motion of the dislocation towards the plus end leads to an elongation of the additional protofilament, that is, free tubulin is incorporated into the microtubule. A motion of the dislocation towards the minus end leads to a depolymerization of the additional protofilament, corresponding to a loss of tubulin dimers from the microtubule. With this model, we simulated the exchange of dimers for microtubule shafts containing two dislocation defects, a 13 $\rightarrow$ 12 and a 12 $\rightarrow$ 13 transition. Figure 2e shows a kymograph for the tubulin incorporation into the shaft over 15 min at a free tubulin concentration of 20  $\mu$ M. Also shown are the final states of the microtubule shaft at varying free tubulin concentrations. In this example, tubulin incorporation is not detectable at

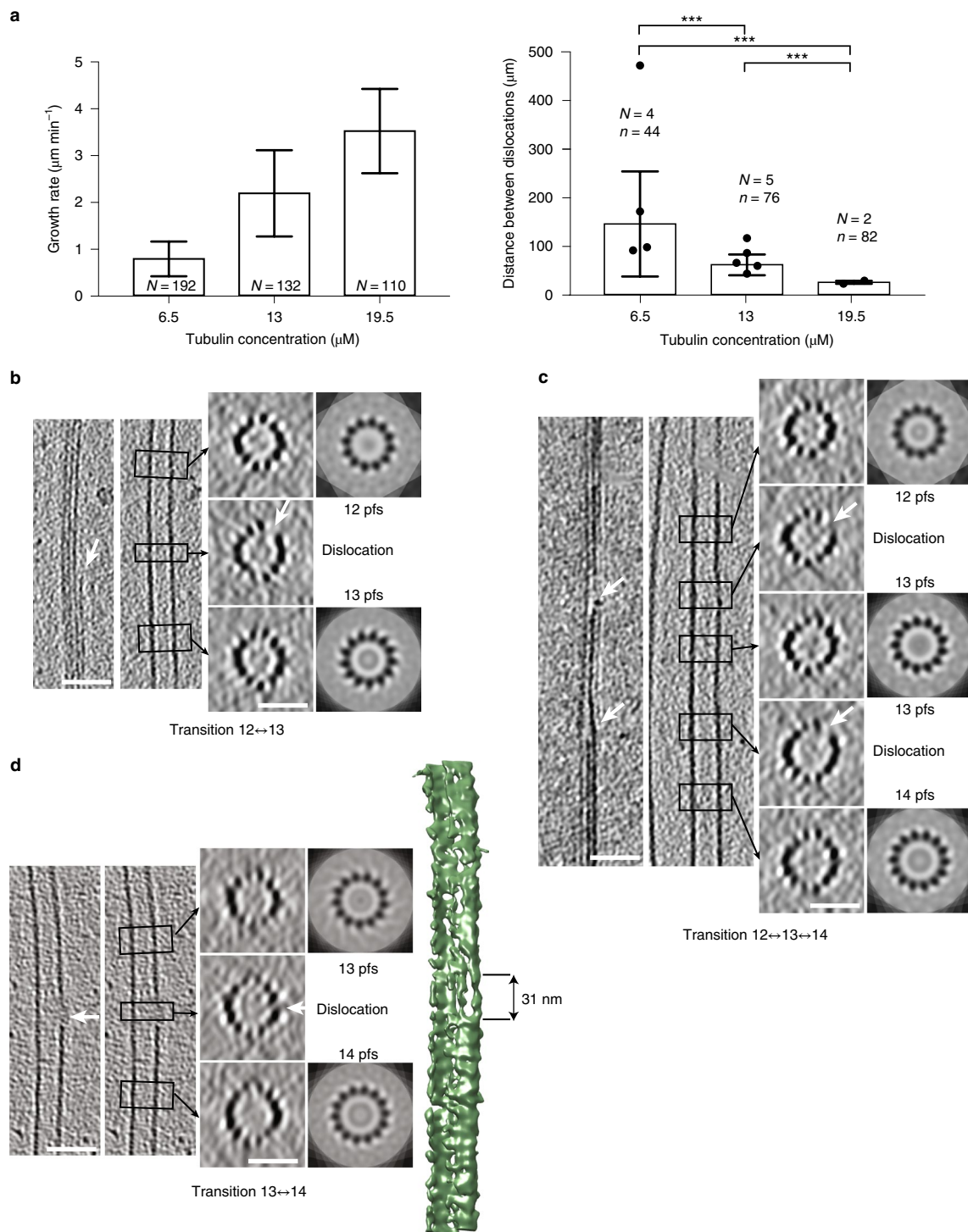
**Fig. 2 | Monte Carlo simulations of microtubule lattice dynamics.** **a**, Lattice scheme for a 13 protofilament lattice with a seam (left) and possible lattice transitions with their associated rate constants (right). **b**, Simulated kymograph of the incorporation of free tubulin dimers into the shaft of an end-stabilized 13 protofilament microtubule within 24 h. The free tubulin concentration is 14  $\mu$ M. The small graphs on the right are representative for the microtubule appearance at the indicated times. The colour scale indicates the number of incorporated dimers per helical turn. **c**, Scheme of the breathing mechanism of the microtubule lattice at a dislocation defect. **d**, Sequence of simulation snapshots of tubulin turnover at a dislocation defect, where the protofilament number changes from 13 to 12 into the direction of the microtubule plus end. The snapshots correspond to consecutive single events in the Monte Carlo model with the simulation times indicated below. **e,f**, Simulated kymographs of the incorporation of free tubulin dimers into the microtubule shaft containing defects, whose initial position is marked by the white asterisk. The defect strain energy  $\Delta G_s$ , the conformational energy penalty  $\Delta G_c$  and the free tubulin concentration are indicated at the top of each kymograph. The small graphs on the right show snapshots of the incorporation pattern after 15 min at the indicated free tubulin concentrations below each snapshot. The colour code indicates the number of incorporated dimers per helical turn. **g**, Phase diagrams of the critical concentration of tubulin incorporation depending on the conformational energy penalty  $\Delta G_c$  and the defect strain energy  $\Delta G_s$ . The colour code indicates the critical free tubulin concentration where the dislocation is stationary. Shown are the phase diagrams of a 13 $\rightarrow$ 12 (left) and a 12 $\rightarrow$ 13 (right) transition. The black lines indicate the isolines of the experimentally used free tubulin concentrations. **h**, Phase diagrams of the speed of motion of dislocations depending on the conformational energy penalty  $\Delta G_c$  and the defect strain energy  $\Delta G_s$  for a free tubulin concentration of 14  $\mu$ M. Shown are the phase diagrams of a 13 $\rightarrow$ 12 (left) and a 12 $\rightarrow$ 13 (right) transition. The colour code indicates the speed of motion of the dislocation along the microtubule axis in  $\mu\text{m min}^{-1}$ . Note that a positive speed  $v > 0$  indicates a net elongation of the free protofilament end at the dislocation, which becomes visible as tubulin incorporation spots in the experiments. The white line indicates a stationary dislocation with  $v = 0$  and the black line indicates the experimentally measured incorporation speed ( $-0.09 \mu\text{m min}^{-1}$  at 14  $\mu$ M free tubulin). The red dots in **g,h** indicate the parameter combination for the simulations of **e** and **f**. Remaining parameters for all simulations are as in Supplementary Table 1 with  $\Delta G_s = 2.4 k_B T$  and  $\Delta G_c = 0.23 k_B T$  in **d**.



low tubulin concentrations (7 and 14  $\mu\text{M}$ ). However, both dislocations are incorporating free tubulin at higher tubulin concentrations (20 and 26  $\mu\text{M}$ ), whereby an increase in the tubulin concentration leads to longer incorporation stretches. This example shows two important experimental features (Fig. 1c): tubulin incorporation is localized at dislocations and requires a critical concentration of free tubulin. Figure 2f shows a simulated kymograph of tubulin

incorporation for a different set of parameters that demonstrates the effect of the directionality of the protofilament transition. At 14  $\mu\text{M}$ , the 13 $\rightarrow$ 12 transition is incorporating free tubulin, whereas the 12 $\rightarrow$ 13 transition is not. At a higher tubulin concentration of 20  $\mu\text{M}$  both transitions are incorporating free tubulin. The different dynamics of the two types of defect arise from the fact that hydrolysis of a GTP dimer can only occur if its top neighbour site (in the





**Fig. 3 | Dislocation defects in the microtubule lattice detected by cryo-electron microscopy.** **a**, Growth rate (left) and mean distances between dislocations (right) in centrosome-nucleated microtubules as a function of free tubulin concentration.  $N$  in the left graph denotes the number of microtubules analysed.  $N$  and  $n$  in the right graph denote the number of cryo-electron microscopy samples analysed and the total number of dislocations detected, respectively (see Methods and Supplementary Information). Mean  $\pm$  s.d. values for the spatial frequencies of dislocations are  $0.007 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$ ,  $0.016 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$  and  $0.040 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$  for 6.5  $\mu\text{M}$ , 13  $\mu\text{M}$  and 19.5  $\mu\text{M}$  free tubulin, respectively.  $P$  values are 0.0007, 0.0001 and 0.0006 for the concentration pairs (6.5  $\mu\text{M}$ , 13  $\mu\text{M}$ ), (6.5  $\mu\text{M}$ , 19.5  $\mu\text{M}$ ) and (13  $\mu\text{M}$ , 19.5  $\mu\text{M}$ ), respectively. **b–d**, Cryo-electron tomograms of protofilament number transitions. The left panels show longitudinal slices through the microtubule in the transition region whereas the right panels show transverse sections. The left longitudinal section shows a cut through the transition region, whereas the right longitudinal section shows a cut through a central part of the microtubule. The transverse sections are averaged over the height of the black rectangles shown in the longitudinal sections (corresponding regions are indicated by black arrows) and correspond to  $N$ -fold rotational averages of the closed microtubule regions ( $N$  denotes the protofilament number). White arrows indicate the free end of a protofilament (dislocation) with the accompanying gap in the lattice at the transition. The scale bars are 50 nm for longitudinal and 25 nm for transverse sections. pfs, protofilaments. **b**, 12 $\leftrightarrow$ 13 protofilament number transition. **c**, 12 $\leftrightarrow$ 13 and 13 $\leftrightarrow$ 14 protofilament number transitions in close proximity in the same microtubule. **d**, 13 $\leftrightarrow$ 14 protofilament number transition. The image on the far right shows the 3D rendering of the microtubule with the dislocation at the edge of the microtubule. A gap in the lattice with an approximate length of 31 nm is clearly visible. In **d**, both longitudinal sections are identical.

**Table 1 | Summary of mean frequencies of tubulin incorporation spots observed by TIRF microscopy for various growth and exchange conditions after 15 min of tubulin incorporation**

Tubulin concentration (elongation) ( $\mu\text{M}$ )	Tubulin concentration (incorporation) ( $\mu\text{M}$ )	Total length analysed ( $\mu\text{m}$ )	Number of incorporation spots	Incorporation frequency (mean $\times$ / s.d. factor) ( $\mu\text{m}^{-1}$ )
20	7	675	15	0.03 $\times$ / 2.4
20	14	1,558	34	0.04 $\times$ / 2.9
20	20	497	44	0.12 $\times$ / 2.2
20	26	1,463	94	0.10 $\times$ / 2.6
14	20	149	8	0.08 $\times$ / 1.8
20	20	497	44	0.12 $\times$ / 2.2
26	20	377	65	0.23 $\times$ / 2.0
20 ( <i>Xenopus</i> egg extract)	14	3,278	210	0.09 $\times$ / 2.8

Also shown is the s.d. factor characterizing the width of the lognormal distribution, as well as the total length of microtubules analysed and the total number of incorporation spots.

**Table 2 | Lattice defect frequency (mean  $\pm$  s.d.) in centrosome-nucleated microtubules observed by cryo-electron microscopy for various concentrations of tubulin during elongation**

Tubulin concentration ( $\mu\text{M}$ )	Total length analysed ( $\mu\text{m}$ )	Number of lattice defects	Lattice defect frequency (mean $\pm$ s.d.) ( $\mu\text{m}^{-1}$ )
6.5	6,385	44	0.007 $\pm$ 0.005
13	4,673	76	0.016 $\pm$ 0.005
19.5	2,056	82	0.040 $\pm$ 0.005

Also shown is the total length of microtubules analysed and the total number of defects.

direction of the plus end) is occupied (see Methods), reminiscent of the different dynamic properties of plus and minus microtubule tips<sup>5</sup>. Figure 2g and h present how the tubulin incorporation varies with the properties of the 13 $\rightarrow$ 12 and 12 $\rightarrow$ 13 transitions. For comparison, the black line in Fig. 2h shows the experimentally measured elongation speed of incorporation spots (see Fig. 1d,  $\sim$ 0.09  $\mu\text{m min}^{-1}$  at 14  $\mu\text{M}$  free tubulin), which allows us to approximately situate our experiments in the model parameter space. Supplementary Figs. 2c,d and 3 show further phase diagrams for other parameter combinations. We have further tested the model behaviour by comparing it to experiments with end-stabilized microtubules (grown

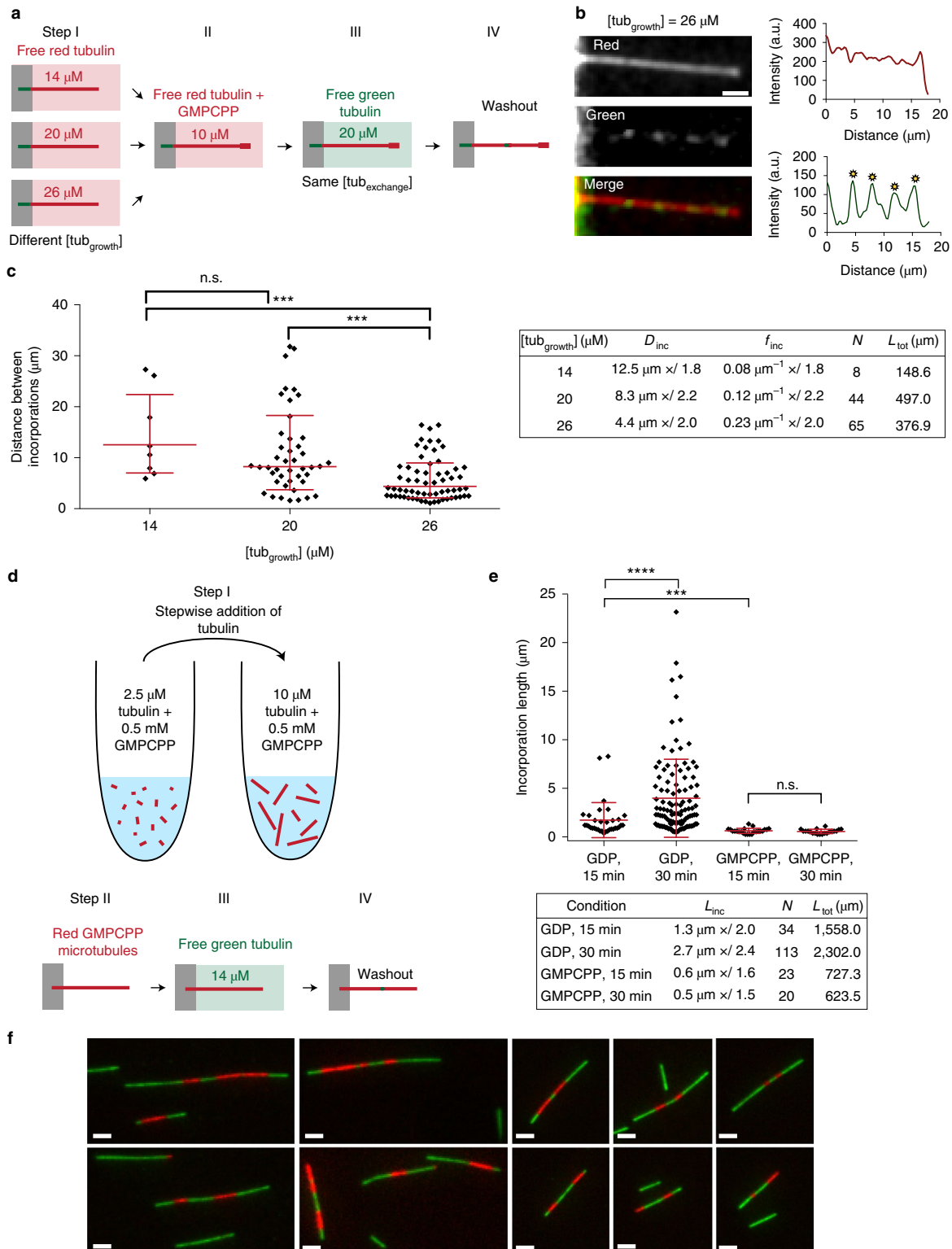
at 20  $\mu\text{M}$  free tubulin) in the complete absence of free tubulin. The dynamics and typical timescale of microtubule breakage matched well between simulations and experiments and also confirmed the observations of Dye et al.<sup>9</sup> albeit on a shorter timescale (see Supplementary Information and Supplementary Fig. 4). Overall, the breathing mechanism reproduces the localized and continuous incorporation of tubulin into the shaft with a critical dependency on the free tubulin concentration, as observed experimentally (Fig. 1c,d). In the model, dimer incorporation occurs only by elongation of free protofilament ends. It is straightforward to include a destabilization of neighbouring protofilaments close to the dislocation into the model to extend the incorporation spots laterally. However, as a proof of principle, our simple model captures well the measured data. The breathing mechanism allows for a dynamic lattice restructuring by guaranteeing at the same time an overall stable lattice with little impact on overall microtubule appearance (width and curvature).

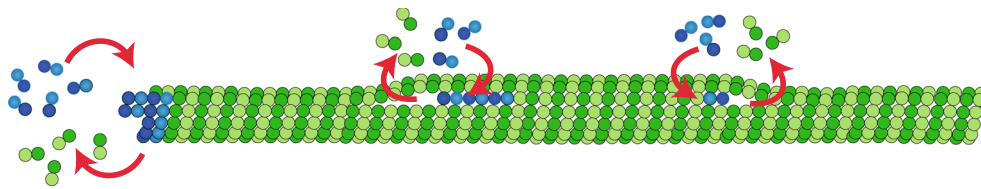
Dislocations are the predominant defect structures, which can be detected by cryo-electron microscopy<sup>19,20</sup>. However, their dynamics has not been characterized yet. Since the direct observation of tubulin incorporation at defects was too challenging, we decided to establish the link between defects and lattice turnover indirectly. It has previously been hypothesized that the defect frequency increases with the microtubule growth speed, that is, the concentration of free tubulin during elongation<sup>10,34</sup>. Therefore, we investigated the effect

**Fig. 4 | Incorporation of free tubulin into the microtubule lattice visualized by TIRF.** **a**, Schematic representation of the experimental set-up to test the role of the microtubule growth rate (that is, lattice-defect frequency) on tubulin turnover in the microtubule lattice. Microtubules were grown in 14  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  or 26  $\mu\text{M}$  red-fluorescent free tubulin (step I) before capping with GMPCPP (step II). Microtubules were then exposed to 20  $\mu\text{M}$  green-fluorescent free tubulin for 15 min (step III) before washout and imaging (step IV). **b**, The images and line scans (red curve, red fluorescent channel; green curve, green fluorescent channel) show an example of a microtubule grown at a free tubulin concentration of 26  $\mu\text{M}$ , which contains several incorporation spots marked by the yellow asterisks. Scale bar, 3  $\mu\text{m}$ . **c**, The graph shows the distribution of distances between incorporation sites after concatenating all microtubules in a random order. The red bars represent the geometric mean  $\times$ / s.d. factor. *P* values are 0.0001 and 0.0009 for the concentration pairs (20  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$ ) and (14  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$ ). The table summarizes the mean distance ( $D_{\text{inc}}$ ) and frequency ( $f_{\text{inc}}$ ) between incorporation spots (geometric mean  $\times$ / s.d. factor). *N* and  $L_{\text{tot}}$  denote the total number of observed incorporation spots and the total length of microtubules analysed, respectively. **d,e**, Incorporation of free tubulin into GMPCPP-microtubules. **d**, Schematic representation of the experimental set-up used to test microtubule lattice turnover in GMPCPP-microtubules. Red-labelled GMPCPP microtubules were first polymerized in a test tube by the stepwise addition of GMPCPP-tubulin (step I), before being transferred and fixed to the bottom of a passivated microfluidic chamber (step II). GMPCPP-microtubules were then exposed to green-labelled free tubulin for 15 or 30 min (step III). Before imaging, the free tubulin was washed out (step IV). **e**, The graph shows the distributions of the length of tubulin incorporation spots ( $L_{\text{inc}}$ ) into the GMPCPP lattice (and the GDP lattice for comparison, see Fig. 1d) after 15 and 30 min of incubation at 14  $\mu\text{M}$  free tubulin. The red bars indicate the geometric mean  $\times$ / s.d. factor, which are also summarized in the table (*N* and  $L_{\text{tot}}$  denote the total number of observed incorporation spots and the total length of microtubules analysed, respectively). The *P* value is  $<$ 0.0001 for the incorporation of free tubulin during 15 and 30 min into the GDP lattice and 0.0001 for the incorporation during 15 min into the GDP and GMPCPP lattice. **f**, Alternating patterns of red- and green-labelled tubulin along GMPCPP-microtubules that indicate annealing. In a separate experiment from the scheme indicated in **d**, to show microtubule annealing, microtubules were first polymerized in a test tube from red-labelled GMPCPP-tubulin and then elongated with green GMPCPP-tubulin. The simple pattern green-red-green shows the initial red tubulin stretch, which was elongated at the plus and minus ends by green tubulin. The alternating pattern green-red-green-red-green indicates annealing between two microtubules. Scale bars, 5  $\mu\text{m}$ .

of tubulin concentration, and hence of microtubule growth rate, on the frequency of lattice defects using previously acquired cryo-electron microscopy data (Fig. 3). Since dislocations could result from annealing of self-assembled microtubules with different lattice conformations and to facilitate the visualization of elongating plus ends, we chose to grow microtubules from centrosomes at tubulin concentrations below the critical concentration for self-assembly<sup>35</sup>. While the vast majority of the microtubules were in the 13\_3 conformation

(13 protofilament, 3 start helix) in these conditions, we also detected other lattice conformations, for example 14\_3 and 12\_3 lattice conformations. Transition types were preferentially single changes in protofilament numbers, for example, 13→12, 13→14 and 14→13 (see Supplementary Information and Supplementary Fig. 5a). We characterized the growth rate and the dislocation frequency as a function of tubulin concentration at assembly (6.5 μM, 13 μM and 19.5 μM, see Methods). Both the microtubule growth rate and the





**Fig. 5 | Schematic representation of microtubule dynamics, showing elongation and shortening of the microtubule at the tip and elongation and shortening of free protofilament ends at dislocations along the shaft.**

dislocation frequency increased with increasing tubulin concentration (Fig. 3a,b). Furthermore, the defect frequency detected by cryo-electron microscopy ( $0.007 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$ ,  $0.016 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$  and  $0.040 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$  for tubulin concentrations of  $6.5 \mu\text{M}$ ,  $13 \mu\text{M}$  and  $19.5 \mu\text{M}$ ) is comparable to the frequency of tubulin incorporation observed by TIRF microscopy (Tables 1 and 2). Note that a direct comparison of the frequencies is difficult since microtubules were grown under different conditions for TIRF and cryo-electron microscopy observations. In our breathing model (Fig. 2c), we proposed that the opening of the lattice close to the dislocation allows for the incorporation of free tubulin. Indeed, we could visualize a gap in the lattice structure in the vicinity of a protofilament dislocation in three dimensions based on microtubule reconstructions from cryo-electron tomography at medium resolution and in the absence of averaging methods<sup>36</sup> (Fig. 3b–d and Supplementary Fig. 5b–e). Figure 3d shows the surface of a microtubule with a gap of about 31 nm in length in the transition region, suggesting that tubulin can indeed be added at the free ends of protofilaments at dislocations.

We then took advantage of the correlation between microtubule growth rate and lattice defect frequency. Red microtubules were grown at various concentrations of free tubulin, capped and exposed to the same concentration of green tubulin ( $20 \mu\text{M}$ ) for 15 min (Fig. 4a,b). Microtubules grown at 14, 20 and  $26 \mu\text{M}$  showed frequencies of incorporations of  $0.08 \mu\text{m}^{-1} \times / 1.8$ ,  $0.12 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.2$  and  $0.23 \mu\text{m}^{-1} \times / 2.0$ , respectively (Fig. 4c). This clearly demonstrates that higher defect frequencies from structural data are associated with higher frequencies for incorporation sites from TIRF data. It indicates that tubulin incorporation is related to specific lattice structures and not an unspecific aggregation of tubulin at the shaft. It also invalidates the previously mentioned hypothesis (Fig. 1d) that incorporation sites are continuously nucleated along the shaft, as both processes, unspecific aggregation and continuous nucleation of incorporation spots, should be independent of the speed at which microtubules are polymerized.

The role of structural defects in lattice turnover suggests that a perfect lattice would display a different dynamics. We aimed at testing this prediction by growing microtubules from GMPCPP–tubulin as they exist almost exclusively (96%) in the 14 protofilament lattice configuration, in contrast to the polymorphism of the GDP lattice<sup>37</sup> (see also our Supplementary Data). To that end, microtubules were polymerized from GMPCPP–tubulin in a test tube and transferred into a microfluidic chamber to perform the incorporation experiment (Fig. 4d and Methods). GMPCPP–microtubules showed tubulin incorporation, however the incorporation spots were smaller than in our previous experiments (Fig. 4e), suggesting they were annealing sites rather than actual sites of lattice turnover. To test this possibility we performed another experiment aimed at highlighting annealing events. We polymerized short red-labelled GMPCPP–microtubules, which were elongated at the plus and minus ends using green-labelled tubulin, in a test tube (Methods), resulting in microtubules with typical stripe patterns green–red–green or green–red–green–red–green (Fig. 4f), confirming the occurrence of numerous annealing events. Moreover, the incorporation spots did not elongate between 15 and 30 min of incorporation (Fig. 4e) in contrast to the lattice turnover sites we observed

previously, suggesting that the incorporation stopped when the annealing was completed. We conclude that incorporation of free tubulin occurred preferentially at annealing sites between microtubules with frayed ends and rarely along the regular GMPCPP shaft.

To test the occurrence of turnover in more physiological conditions where microtubule binding proteins accompany the growth of microtubules, we performed the incorporation experiment for microtubules grown in *Xenopus* egg extract cytoplasm and also in an alternative TicTac buffer (Supplementary Information and Supplementary Figs. 6 and 7). Both experiments showed tubulin incorporation with frequencies comparable to the in vitro set-up using BRB buffer (see Tables 1 and 2). In a final set of experiments we roughly quantified the number of incorporated dimers. We found that small incorporation spots  $\leq 1 \mu\text{m}$  contained several tens of fluorescent dimers (Supplementary Information and Supplementary Fig. 8), in agreement with our model mechanism, where a single protofilament elongates at the dislocation.

Localized tubulin incorporations have been observed in living cells and attributed to mechanical stresses in the lattice<sup>13,14</sup>. Our in vitro experiments now suggest that dimer loss and incorporation may occur spontaneously in the absence of mechanical stress. Furthermore, our model simulations and the correlation between fluorescence data and structural data indicate that a spontaneous and localized lattice turnover may occur in the vicinity of lattice defects (Fig. 5), which are frequent in rapidly growing microtubules. A simple passive breathing model for dislocation defects shows that dislocations with a strain energy as weak as the thermal energy  $k_{\text{B}}T$  are sufficient to induce lattice plasticity and tubulin turnover.

### Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, statements of code and data availability and associated accession codes are available at <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0542-4>.

Received: 18 June 2018; Accepted: 26 April 2019;

Published online: 3 June 2019

### References

1. Carlier, M.-F. Guanosine-5'-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. *Mol. Cell. Biochem.* **47**, 97–113 (1982).
2. Mitchison, T. & Kirschner, M. W. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
3. Walker, R. A. et al. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* **107**, 1437–1448 (1988).
4. Howard, J. & Hyman, A. A. Dynamics and mechanics of microtubule plus end. *Nature* **422**, 753–758 (2003).
5. Duellberg, C., Cade, N. I., Holmes, D. & Surrey, T. The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLife* **5**, e13470 (2016).
6. Aher, A. & Akhmanova, A. Tipping microtubule dynamics, one protofilament at a time. *Curr. Opin. Cell Biol.* **50**, 86–92 (2018).
7. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 711–726 (2015).
8. Gasic, I. & Mitchison, T. J. Autoregulation and repair in microtubule homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **56**, 80–87 (2019).

9. Dye, R. B., Flicker, P. F., Lien, D. Y. & Williams, R. C. End-stabilized microtubules observed in vitro: stability, subunit, interchange, and breakage. *Cell Motil. Cytoskel.* **21**, 171–186 (1992).
10. Schaedel, L. et al. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat. Mater.* **14**, 1156–1163 (2015).
11. Reid, T. A., Coombes, C. & Gardner, M. K. Manipulation and quantification of microtubule lattice integrity. *Biol. Open* **6**, 1245–1256 (2017).
12. Dimitrov, A. et al. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescue. *Science* **322**, 1353–1356 (2008).
13. de Forges, H. et al. Localized mechanical stress promotes microtubule rescue. *Curr. Biol.* **26**, 3399–3406 (2016).
14. Aumeier, C. et al. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1054–1064 (2016).
15. Vemu, A. et al. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* **361**, eaau1504 (2018).
16. VanBuren, V., Odde, D. J. & Cassimeris, L. Estimations of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 6035–6040 (2002).
17. VanBuren, V., Cassimeris, L. & Odde, D. J. Mechanochemical model of microtubule structure and self-assembly kinetics. *Biophys. J.* **89**, 2911–2926 (2005).
18. Sept, D., Baker, N. A. & McCammon, J. A. The physical basis of microtubule structure and stability. *Prot. Sci.* **12**, 2257–2261 (2003).
19. Chrétien, D. & Fuller, S. D. Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation. *J. Mol. Biol.* **298**, 663–676 (2000).
20. Chrétien, D., Metz, F., Verde, F., Karsenti, E. & Wade, R. H. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.* **117**, 1031–1040 (1992).
21. Atherton, J., Stouffer, M., Francis, F. & Moores, C. A. Microtubule architecture in vitro and in cells revealed by cryo-electron tomography. *Acta Cryst. D* **74**, 572–584 (2018).
22. Vitre, B. et al. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat. Cell Biol.* **10**, 415–421 (2008).
23. Doodhi, H. et al. Termination of protofilament elongation by eribulin induces lattice defects that promote microtubule catastrophes. *Curr. Biol.* **26**, 1713–1721 (2016).
24. Schaap, I. T., de Pablo, P. J. & Schmidt, C. F. Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.* **33**, 462–467 (2004).
25. Weisenberg, R. C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**, 1104–1105 (1972).
26. Kellogg, E. H. et al. Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and non-taxane microtubule stabilizers from cryo-EM structures. *J. Mol. Biol.* **429**, 633–646 (2017).
27. Yajima, H. et al. Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **198**, 315–322 (2012).
28. Kirkwood, T. B. L. Geometric means and measures of dispersion. *Biometrics* **35**, 908–909 (1979).
29. Mandelkow, E.-M., Schultheiss, R., Rapp, R., Müller, M. & Mandelkow, E. On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *J. Cell Biol.* **102**, 1067–1073 (1986).
30. Chrétien, D. & Wade, R. H. New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell* **71**, 161–174 (1991).
31. Gardner, M. K. et al. Rapid microtubule self-assembly kinetics. *Cell* **146**, 582–592 (2011).
32. Wu, Z. et al. Simulations of tubulin sheet polymers as possible structural intermediates in microtubule assembly. *PLoS ONE* **4**, e7291 (2009).
33. Hunyadi, V., Chrétien, D. & Jánosi, I. M. Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *J. Mol. Biol.* **348**, 927–938 (2005).
34. Janson, M. E. & Dogterom, M. A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys. J.* **87**, 2723–2736 (2004).
35. Chrétien, D., Fuller, S. D. & Karsenti, E. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* **129**, 1311–1328 (1995).
36. Coquelle, F. et al. Cryo-electron tomography of microtubules assembled in vitro from purified components. *Methods Mol. Biol.* **777**, 193–208 (2011).
37. Hyman, A. A., Chrétien, D., Arnal, I. & Wade, R. Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-( $\alpha,\beta$ )-methylene-diphosphonate. *J. Cell Biol.* **128**, 117–125 (1995).

### Acknowledgements

This work was supported by the French National Agency for Research (ANR-16-CE11-0017-01 to D.C., ANR-12-BSV5-0004-01 to M.T., ANR-14-CE09-0014-02 to L.B. and ANR-18-CE13-0001 to K.J., M.T. and D.C.), the Human Frontier in Science Program (RGY0088 to M.T.) and the European Research Council (Consolidator Grant 771599 (ICEBERG) to M.T. and Advanced Grant 741773 (AAA) to L.B.).

### Author contributions

L.S. and S.T. performed all dimer exchange and fracture experiments with the help of J.G. and A.A. L.S., L.B. and M.T. designed these experiments. D.C. designed and performed cryo-electron microscopy experiments. K.J. designed and performed numerical simulations. L.S., S.T., C.A., L.B., M.T. and K.J. analysed data. L.S., M.T., D.C. and K.J. wrote the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0542-4>.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to L.B., M.T. or K.J.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2019

## Methods

**Tubulin purification and labelling.** Tubulin was purified from fresh bovine brain by three cycles of temperature-dependent assembly and disassembly in Brinkley Buffer 80 (BRB80 buffer; 80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>, plus 1 mM GTP<sup>38</sup>). Microtubule-associated proteins (MAP)-free neurotubulin was purified by cation-exchange chromatography (EMD SO, 650 M, Merck) in 50 mM PIPES, pH 6.8, supplemented with 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EGTA<sup>39</sup>. Purified tubulin was obtained after a cycle of polymerization and depolymerization. Fluorescent tubulin (ATTO-488- and ATTO-565-labelled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared as previously described<sup>40</sup>. Microtubules from neurotubulin were polymerized at 37 °C for 30 min and layered onto cushions of 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 60% v/v glycerol, and sedimented by high centrifugation at 30 °C. Then, microtubules were resuspended in 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 40% v/v glycerol and labelled by adding 1/10 volume 100 mM NHS-ATTO (ATTO Tec) or NHS-Biotin (Pierce) for 10 min at 37 °C. The labelling reaction was stopped using 2 volumes of 2X BRB80, containing 100 mM potassium glutamate and 40% v/v glycerol, and then microtubules were sedimented onto cushions of BRB80 supplemented with 60% glycerol. Microtubules were resuspended in cold BRB80. Microtubules were then depolymerized and a second cycle of polymerization and depolymerization was performed before use.

**Cover-glass micropatterning.** The micropatterning technique was adapted from Portran et al.<sup>41</sup>. Cover glasses were cleaned by successive chemical treatments: 30 min in acetone, 15 min in ethanol (96%), rinsing in ultrapure water, 2 h in Hellmanex III (2% in water, Hellmanex), and rinsing in ultrapure water. Cover glasses were dried using nitrogen gas flow and incubated for three days in a solution of triethoxysilane-PEG (30 kDa, PSB-2014, Creative PEG works) 1 mg ml<sup>-1</sup> in ethanol 96% and 0.02% of HCl, with gentle agitation at room temperature. Cover glasses were then successively washed in ethanol and ultrapure water, dried with nitrogen gas and stored at 4 °C. Passivated cover glasses were placed into contact with a photomask (Toppan) with a custom-made vacuum-compatible holder and exposed to deep-UV (7 mW cm<sup>-2</sup> at 184 nm, Jelight) for 2 min 30 s. Deep-UV exposure through the transparent micropatterns on the photomask created oxidized micropatterned regions on the PEG-coated cover glasses.

**Microfluidic circuit fabrication and flow control.** The microfluidic device was fabricated in polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) using standard photolithography and soft lithography. The master mould was fabricated by patterning 50-µm-thick negative photoresist (SU8 2100, Microchem, MA) by photolithography<sup>42</sup>. A positive replica was fabricated by replica moulding PDMS against the master. Before moulding, the master mould was silanized (trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane, Sigma) for easier lift-off. Four inlet and outlet ports were made in the PDMS device using 0.5-mm-diameter soft substrate punches (UniCore 0.5, Ted Pella, Redding, CA). Connectors to support the tubing were made out of PDMS cubes (0.5 cm side length) with a 1.2 mm diameter through hole. The connectors were bonded to the chip ports using still liquid PDMS as glue, which was used to coat the interface between the chip and the connectors, and was then rapidly cured on a hotplate at 120 °C. Teflon tubing (Tefzel, inner diameter: 0.03", outer diameter: 1/16", Upchurch Scientific) was inserted into the two ports serving as outlets. Tubing with 0.01" inner and 1/16" outer diameter was used to connect the inlets via two three-way valves (Omnifit Labware, Cambridge, UK) that could be opened and closed by hand to a computer-controlled microfluidic pump (MFCS-4C, Fluigent, Villejuif, France). Flow inside the chip was controlled using the MFCS-Flex control software (Fluigent). Custom rubber pieces that fit onto the tubing were used to close the open ends of the outlet tubing when needed.

### Microtubule growth on micropatterns using standard (BRB80) buffer.

Microtubule seeds were prepared at 10 µM tubulin concentration (30% ATTO-488-labelled or ATTO-565-labelled tubulin and 70% biotinylated tubulin) in BRB80 supplemented with 0.5 mM GMPCPP at 37 °C for 1 h. The seeds were incubated with 1 µM Taxotere (Sigma) at room temperature for 30 min and were then sedimented by high centrifugation at 30 °C and resuspended in BRB80 supplemented with 0.5 mM GMPCPP and 1 µM Taxotere. Seeds were stored in liquid nitrogen and quickly warmed to 37 °C before use.

The PDMS chip was placed on a micropatterned cover glass and fixed on the microscope stage. The chip was perfused with neutravidin (25 µg ml<sup>-1</sup> in BRB80; Pierce), then washed with BRB80, passivated for 20 s with PLL-g-PEG (PLL 20 K-G35-PEG2K, Jenkam Technology) at 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in 10 mM Na-HEPES (pH = 7.4), and washed again with BRB80. Microtubule seeds were flowed into the chamber at high flow rates perpendicularly to the micropatterned lines to ensure proper orientation of the seeds. Non-attached seeds were washed out immediately using BRB80 supplemented with 1% BSA. Seed grafting on PEGylated micropatterned surfaces prevents microtubule displacement while switching the medium and minimizes shaft interaction with the substrate<sup>10,41</sup>. Seeds were elongated with a mix containing 14, 20 or 26 µM of tubulin (20% labelled) in BRB80 supplemented with 50 mM NaCl, 25 mM NaPi, 1 mM GTP, an oxygen scavenger cocktail (20 mM DTT, 1.2 mg ml<sup>-1</sup> glucose, 8 µg ml<sup>-1</sup> catalase

and 40 µg ml<sup>-1</sup> glucose oxidase), 0.1% BSA and 0.025% methyl cellulose (1,500 cP, Sigma) at 37 °C. GMPCPP caps were grown by substituting in the before-mentioned buffer GTP with 0.5 mM GMPCPP (Jena Bioscience) and using 10 µM tubulin (100% labelled with a red fluorophore) at 37 °C. Capping extends the microtubule lifetime and allows for the investigation of lattice turnover over a period of several minutes despite the dynamic instability in vitro. For fracture experiments, this buffer was then replaced by a buffer containing the same supplements, but without free tubulin and GTP ('washing buffer'). For incorporation experiments, the same buffer as for seed elongation was used, supplemented with 7 µM, 14 µM, 20 µM or 26 µM tubulin (100% labelled, green fluorescent, labelling ratio of about 2 fluorophores per dimer). Microtubules were incubated in this buffer for 15 or 30 min at 37 °C before replacing it with washing buffer for imaging.

**GMPCPP-microtubule growth in solution and incorporation of free tubulin on micropatterns.** Seeds were elongated with a mix containing 2.5 µM of tubulin (20% labelled) in BRB80 supplemented with 0.5 mM GMPCPP for 10 min at 37 °C. Stepwise, 1.5 µM tubulin (20% labelled) was added in the mix every 10 min. The final tubulin concentration was 10 µM. Microtubules were incubated for 1 h at 37 °C. A PDMS chip was placed on a micropatterned cover glass and fixed on the microscope stage. The chip was perfused with neutravidin (25 µg ml<sup>-1</sup> in BRB80; Pierce), then washed with HKEM (10 mM HEPES pH 7.2; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 50 mM KCl), passivated for 1 min with PLL-g-PEG (PLL 20 K-G35-PEG2K, Jenkam Technology) at 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in 10 mM Na-HEPES (pH = 7.4), and washed again with HKEM supplemented with 1% BSA. Microtubules were flowed into the chamber perpendicularly to the micropatterned lines. Non-attached microtubules were washed out immediately using HKEM supplemented with 1% BSA. For incorporation experiments, GMPCPP-microtubules were incubated with 14 µM tubulin (100% labelled, green fluorescent, labelling ratio of about 2 fluorophores per dimer) in TicTac (16 mM PIPES pH 6.9; 10 mM HEPES; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 50 mM KCl) supplemented with an oxygen scavenger cocktail (20 mM DTT, 1.2 mg ml<sup>-1</sup> glucose, 8 µg ml<sup>-1</sup> catalase and 40 µg ml<sup>-1</sup> glucose oxidase), 0.1% BSA, 0.025% methyl cellulose (1,500 cP, Sigma) and 1 mM GTP. Microtubules were incubated in this buffer for 15 or 30 min at 37 °C before replacing it with washing buffer for imaging.

**Imaging.** Microtubules were visualized using an objective-based azimuthal ilas2 TIRF microscope (Nikon Eclipse Ti, modified by Roper Scientific) and an Evolve 512 camera (Photometrics). The microscope stage was kept at 37 °C using a warm stage controller (LINKAM MC60). Excitation was achieved using 491 and 561 nm lasers (Optical Insights). Time-lapse recording was performed using Metamorph software (version 7.7.5, Universal Imaging). Movies were processed to improve the signal-to-noise ratio (smooth and subtract background functions of ImageJ, version 1.47n5). To visualize incorporation, images were typically taken every 150 ms and 30 images were overlain and averaged. Sites of incorporated tubulin were identified using line scans of the green fluorescence intensity along the microtubule (Fig. 1b) and corresponded to zones of fluorescence intensity that were at least 2.5-fold higher than the background fluorescence. For fracture experiments, images were taken every 10 s. Visualization of fluctuating microtubules allowed for a clear distinction between fluorescence emanating from the microtubule and from the background.

**Cryo-electron microscopy and tomography.** Analysis of lattice defect frequency as a function of tubulin concentration was performed on microtubules assembled from phosphocellulose-purified calf-brain tubulin nucleated by centrosomes isolated from KE-37 human lymphoid cells<sup>35,43</sup>. Briefly, centrosomes (final concentration 1 × 10<sup>8</sup> centrosomes per ml) were mixed with tubulin at the desired concentration (6.5 µM, 13.5 µM and 19 µM). Samples were incubated directly on the electron-microscopy grid under controlled humidity and temperature conditions<sup>20</sup> for short assembly times (2 to 5 min), or incubated in a test tube for longer times. Grids were blotted with a filter paper to form a thin film of suspension, and quickly plunged into liquid ethane. Microtubules were visualized with an EM 400 electron microscope (Philips) operating at 80 kV. Images were taken at ~1.5 µm underfocus on negatives (SO-163, Kodak). Sites of transition of protofilament and/or helix-start numbers were determined on printed views of the negatives (see ref. <sup>19</sup> for details). The field of view in cryo-electron microscopy is much smaller than in light microscopy. Therefore, it was impossible to concatenate all microtubules and measure distances between defects. Instead, we calculated mean distances between defects (and spatial frequencies) and s.d. from the total length of analysed microtubules and the number of observable lattice defects from different samples. For each negative, the total length of the non-13\_3 microtubule segments was measured. Since the vast majority of the microtubules were 13\_3, their percentage was estimated by counting all 13\_3 and non-13\_3 microtubules. The total length of 13\_3 microtubules was then extrapolated from these measurements. The average defect frequency was calculated by dividing the number of defects by the total microtubule length. Mean values (±s.d.) provided for each tubulin concentration represent the weighted average of 4, 5 and 2 sample grids for the 6.5 µM, 13 µM and 19.5 µM tubulin concentration conditions, respectively, as explained in the section

'Statistical methods'. The high density of microtubule asters at 19  $\mu\text{M}$  tubulin concentration allowed us to analyse specimens prepared at short assembly times (2 and 3 min), compared with the other assembly conditions (up to 30 min of assembly). Microtubule growth rates at these tubulin concentrations are taken from Chrétien et al.<sup>35</sup> (see Table III therein).

Cryo-electron tomography was performed on microtubules self-assembled from phosphocellulose-purified porcine brain tubulin<sup>44</sup>. Ten nanometre gold nanoparticles coated with BSA (Aurion) were added to the suspension to serve as fiducial markers<sup>36</sup>. Specimens in 4  $\mu\text{l}$  aliquots were pipetted at specific assembly times and vitrified as described above. Specimen grids were observed with a Tecnai G<sup>2</sup> T20 Sphera (FEI) operating at 200 kV. Tilt series, typically in the angular range  $\pm 60^\circ$ , were acquired in low-electron-dose conditions using a 2k  $\times$  2k CCD (charge-coupled device) camera (USC1000, Gatan). Three-dimensional reconstructions were performed using the eTomo graphical user interface of the IMOD software package<sup>45</sup> and UCSF Chimera<sup>46</sup>.

**Statistical methods.** The incorporation patterns of microtubules observed by TIRF microscopy were analysed by concatenating all microtubules in a random order together and by measuring the distance between two adjacent incorporation spots (centre-to-centre distance). As the data represent approximately a lognormal distribution, we calculated the geometric mean and s.d. factor of the measured distances, since they better represent the central tendency than the arithmetic mean, as proposed by Kirkwood<sup>28</sup>. The range between the lower bound (the geometric mean divided by the geometric s.d. factor) and the upper bound (the geometric mean multiplied by the geometric s.d. factor) contains about two thirds of the data points, assuming that they follow a lognormal distribution. To test the significance between mean values obtained by the above described method we used the Mann-Whitney test (two-tailed) as a non-parametric alternative to a *t*-test, given that the distribution is non-Gaussian. The cryo-electron microscopy data were analysed by calculating the mean distance  $\langle d \rangle_k$  between transitions for each sample *k* (that is, each time point, see Supplementary Information) using  $\langle d \rangle_k = L_k/N_k$ , where  $N_k$  and  $L_k$  denote the total number of transitions and the total length of the microtubules in the sample. From these values we calculated weighted averages  $\langle d \rangle = \sum_k \langle d \rangle_k N_k / \sum_k N_k$  and estimates for the standard deviations  $\sigma^2 \approx \sum_k (\langle d \rangle_k - \langle d \rangle)^2 N_k / \sum_k N_k$ . The thus determined statistical values were analysed using a two-tailed *t*-test with Welch's correction for unequal standard deviations. The data are represented as mean  $\pm$  s.d.

**Monte Carlo simulations.** Kinetic Monte Carlo simulations were performed using a rejection-free random-selection method<sup>47</sup>.

**Lattice structure.** We used the same lattice structure (Fig. 2a) as previously introduced by others<sup>16,31</sup>. Briefly, the microtubule is modelled on the scale of the tubulin dimer as the canonical 13\_3 (13 protofilament, 3 start left-handed helix) structure. In addition, we postulate the existence of a less stable 12\_3 (12 protofilament, 3 start helix) lattice structure<sup>30,48</sup>. The 13\_3 lattice and the 12\_3 lattice are connected via dislocation defects, where a single protofilament is lost or added (Fig. 2c). All lattice structures are modelled as square lattices, that is, each dimer has two longitudinal and two lateral neighbours. Individual lattice sites on the square lattice are identified by a doublet of integers (*i, j*). The lattice is periodic in a direction perpendicular to the long axis of the microtubule with an offset of 3/2 lattice sites to reproduce the seam structure. Therefore, lattice sites at the seam have 2 nearest 'half' neighbours across the seam, that is, dimers at the left seam in Fig. 2a with the doublet (1, *j*) are in contact with dimers (13, *j* + 2) and (13, *j* + 1) and dimers at the right seam with doublet (13, *j*) are in contact with dimers (1, *j* - 1) and (1, *j* - 2) for a 13 protofilament lattice. At a dislocation defect a lattice site has only one longitudinal neighbour site.

**Lattice transitions and rate constants.** Lattice sites can be either empty or occupied by GTP-bound (T) or GDP-bound (D) dimers. Dimers interact with other dimers on nearest-neighbour lattice sites via attractive interactions, characterized by bond energies  $\Delta G_1$  and  $\Delta G_2$  for longitudinal and lateral bonds, respectively. We assume that longitudinal and lateral bonds of T-T contacts are further stabilized by the energy,  $\Delta G_{T1}$  and  $\Delta G_{T2}$ , respectively, following the allosteric model proposed by Alushin et al.<sup>49</sup> Note that the stabilization of longitudinal T-T contacts is a major difference to the model by vanBuren et al.<sup>16</sup>, but permits to capture the dynamic instability without further assumptions. The stabilization of only lateral T-T contacts is not sufficient to induce a dynamic instability with sufficiently long phases of growth and shrinkage. To limit the number of free parameters we fix the lattice anisotropy in the binding energies as  $\Delta G_1/\Delta G_2 = \Delta G_{T1}/\Delta G_{T2} = 2$ , that is, longitudinal contacts are twice as stable as lateral contacts. This property is also reflected in the stabilizing effects of T-T contacts.

Typically, different lattice conformations correspond to different lattice energies<sup>33</sup>. We include this property by assuming a small destabilizing conformational energy penalty,  $\Delta G_C$ , for dimers in the 12 protofilament lattice compared with the 13 protofilament lattice. Dislocation defects perturb the lattice structure and induce an additional elastic strain in the lattice. In our simple approach we attribute a destabilizing energy,  $\Delta G_S$ , to the dimer located directly at the dislocation defect to mimic the defect strain energy.

For the passive process of polymerization and depolymerization, the principle of detailed balance has to hold. Therefore, on and off rate constants,  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$  (Fig. 2a), must be coupled by the relation<sup>50</sup>

$$\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}c_0} = e^{\frac{\Delta G}{k_B T}} \quad (1)$$

where  $c_0$  denotes the standard concentration of free tubulin in solution, that is, 1 M by convention, and  $\Delta G$  denotes the change in free energy upon transferring a free dimer from the solution into the lattice. Note that  $c_0$  in equation (1) is not the actual concentration of the free tubulin in solution, but the standard concentration and originates from the concentration dependence of the chemical potential, that is,  $k_B T \ln(c/c_0)$ , where  $c$  denotes the actual concentration of free tubulin in solution.  $\Delta G = \Delta G_B + \Delta G_E + \dots$  contains contributions from binding of the dimer to nearest neighbours  $\Delta G_B$ , the loss of entropy due to immobilization of the free dimer in the lattice  $\Delta G_E$ , and further contributions related to the conformation of the lattice  $\Delta G_C$ , and the presence of defects  $\Delta G_S$ . For practical reasons, we rewrite equation (1) into

$$k_{\text{off}} = k_{\text{off}}^* e^{\frac{\Delta G^*}{k_B T}} \quad (2)$$

with  $k_{\text{off}}^* = k_{\text{on}}c_0 e^{\frac{\Delta G_E}{k_B T}}$  and where  $\Delta G^*$  contains now only binding, conformational and defect strain contributions. We assume that equation (2) also governs the depolymerization of GDP dimers. The difference between the off-rates for GDP-bound and GTP-bound dimers arises from the difference in the binding energy  $\Delta G_B$ .

GTP dimers are irreversibly hydrolysed into GDP dimers by the rate constant  $k_{\text{hy}}$  if their hydrolysable  $\beta$  subunit is in contact with the  $\alpha$  subunit of another dimer, that is, if the top-next longitudinal lattice site in Fig. 2a in the direction of the microtubule plus end is occupied. Hence, our modelling permits the following transitions: free GTP dimers can polymerize into a lattice structure, bound GTP dimers can depolymerize from the lattice or hydrolyse into GDP dimers; and bound GDP dimers can depolymerize from the lattice.

At dislocation defects, the lattice can breathe (that is, open with rate constant  $k_{\text{br}}$  to create an empty lattice site and close with rate constant  $k_{\text{cl}}$  to annihilate an empty lattice site) as depicted in Fig. 2c. Because breathing is a reversible process,  $k_{\text{br}}$  and  $k_{\text{cl}}$  are related by

$$\frac{k_{\text{br}}}{k_{\text{cl}}} = e^{\frac{\Delta G_{\text{BR}}}{k_B T}} \quad (3)$$

$\Delta G_{\text{BR}}$  denotes the difference in lattice free energy between the closed and open lattice state. It contains contributions from the conformational energy penalty for a 12 protofilament lattice,  $\Delta G_C$ , which accelerates opening because a less favourable 12 protofilament lattice is receding in favour of a more stable 13 protofilament lattice, contributions from the lateral binding energy of the lateral bond that will be opened,  $\Delta G_2$  or  $\Delta G_2 + \Delta G_{T2}$ , and the release in defect strain energy,  $\Delta G_S$ .  $\Delta G_{\text{BR}}$  depends on the occupation of the lattice sites in proximity to the defect.

Monte Carlo simulations were performed using a custom-written C code. Unless stated otherwise, we used the parameters listed in Supplementary Table 1 for the simulations shown in Fig. 2 and in Supplementary Figs. 2 and 4, and the parameters listed in Supplementary Table 2 for the simulations shown in Supplementary Fig. 3. The microtubule lattice was visualized using the Jmol software package<sup>51</sup>.

**Reporting Summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the authors upon reasonable request, see author contributions for specific datasets.

## Code availability

The source code of the kinetic Monte Carlo model along with detailed instructions to reproduce the data for this manuscript is available online (<https://sourceforge.net/projects/microtubulelattice/>). The codes for the analysis of the model simulations are available from the corresponding authors upon request.

## References

- Shelanski, M. L. Chemistry of the filaments and tubules of brain. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 529–539 (1973).
- Malekzadeh-Hemmat, K., Gendry, P. & Launey, J. F. Rat pancreas kinesin: identification and potential binding to microtubules. *Cell Mol. Biol.* **39**, 279–285 (1993).
- Hyman, A. et al. Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* **196**, 478–485 (1991).



41. Portran, D., Gaillard, J., Vantard, M. & Théry, M. Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks. *Cytoskeleton* **70**, 12–23 (2013).
42. Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. & Whitesides, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **70**, 4974–4984 (1998).
43. Chrétien, D., Buendia, B., Fuller, S. D. & Karsenti, E. Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J. Struct. Biol.* **120**, 117–133 (1997).
44. Weis, F., Moulintraffort, L., Heichette, C., Chrétien, D. & Garnier, C. The 90-kDa heat shock protein HSP90 protects tubulin against thermal denaturation. *J. Biol. Chem.* **285**, 952–534 (2010).
45. Mastronarde, D. N. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J. Struct. Biol.* **120**, 343–352 (1997).
46. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
47. Lukkien, J. J., Segers, J. P. L., Hilbers, P. A. J., Gelten, R. J. & Jansen, A. P. J. Efficient Monte Carlo methods for the simulation of catalytic surface reactions. *Phys. Rev. E* **58**, 2598–2610 (1998).
48. Sui, H. & Downing, K. H. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure* **18**, 1022–1031 (2010).
49. Alushin, G. M. et al. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in  $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* **157**, 1117–1129 (2014).
50. Groot, De, S. R. & Mazur, P. *Non-Equilibrium Thermodynamics* (Dover Publications Inc., 1984).
51. Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D; <http://www.jmol.org>

# Lattice defects induce microtubule self-renewal

Laura Schaedel,<sup>1</sup> Sarah Triclin,<sup>1</sup> Denis Chrétien,<sup>2</sup> Ariane Abrieu,<sup>3</sup> Charlotte Aumeier,<sup>1</sup>  
Jérémy Gaillard,<sup>1</sup> Laurent Blanchoin,<sup>4,\*</sup> Manuel Théry,<sup>4,†</sup> and Karin John<sup>5,‡</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble-Alpes, CEA, CNRS, INRA, Biosciences & Biotechnology Institute of Grenoble,  
Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, CytoMorpho Lab, 38054 Grenoble, France.

<sup>2</sup>Univ. Rennes, CNRS, IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes) - UMR6290, F-35000 Rennes, France.

<sup>3</sup>CRBM, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France.

<sup>4</sup>Univ. Paris Diderot, INSERM, CEA, Hôpital Saint Louis,

Institut Universitaire d'Hématologie, UMRS1160, CytoMorpho Lab, 75010 Paris, France.

<sup>5</sup>Univ. Grenoble-Alpes, CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, 38000 Grenoble, France.

## Supplementary Information

### I. ESTIMATION OF THE TYPICAL TIME SCALE OF DIMER EXCHANGE AT THE PERFECT LATTICE

In a fully occupied lattice the binding energy  $\Delta G_B$  of a dimer is about  $-45$  to  $-65 k_B T$ , assuming an entropic loss  $\Delta G_E$  of  $10$  to  $20 k_B T$  upon transferring a dimer from the solution into the lattice [1, 2]. These estimates have been obtained by fitting the measured tip dynamics to a kinetic model. In contrast, calculations based on a Poisson-Boltzmann model on the atomic scale have estimated a binding energy of about  $-90 k_B T$  [3]. The typical time  $\tau$  for the loss of a single dimer from the shaft of a  $20 \mu\text{m}$  long 13 protofilament microtubule (containing  $N=13*125*20=32500$  dimers) can be estimated from the principle of detailed balance [cf. Eq. (1) in Methods] as  $1/\tau = k_{on}c_0 N e^{(\Delta G_B + \Delta G_E)/k_B T}$ . Thereby  $k_{on}=5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  denotes the on-rate constant [4] with the standard concentration  $c_0=1 \text{ M}$ . Using the lower estimates  $\Delta G_B=-45 k_B T$  and  $\Delta G_E=10 k_B T$  we find a typical time  $\tau \approx 3$  hours. However, a small energy decrease of the binding energy of about  $2.5 k_B T$  (This corresponds e.g. roughly to the difference in the lattice energy between a GDP and GTP-lattice [1]) reduces the typical time  $\tau$  to 15 minutes, since the energy dependence of the rate constants is exponential. As an illustration, Supplementary Fig. S2a shows the dependence of  $\tau$  on  $\Delta G_B$  and  $\Delta G_E$ .

### II. SIMULATIONS AND EXPERIMENTS OF MICROTUBULE LATTICE DYNAMICS IN THE ABSENCE OF FREE TUBULIN

We have further tested the model behavior in the absence of free tubulin. Microtubule breakage in the absence of free tubulin is length dependent (i.e. long microtubules break faster than short microtubules) and is crucially dependent on the lattice energy. We simulated the fracture process for end-capped microtubules in the absence and presence of defects (2 defects per  $16 \mu\text{m}$  shaft length, corresponding roughly to the experimentally measured incorporation frequency and microtubule length at  $20 \mu\text{M}$  free tubulin). The distribution of microtubule life times to breakage was wide with typical times of the order of 10 min (Supplementary Fig. S4a). Microtubules containing defects broke faster than without defects, although the difference was small, and can be attributed rather to the presence of less stable lattice structures than to the presence of the defects themselves, i.e. the 12 protofilament lattice structure breaks faster, than the more stable 13 protofilament lattice structure. Apparently, the perturbation of the lattice structure (i.e. missing bonds at the dislocation) and the strain accumulated at the defect core was too small to initiate breakage. Typically in the simulations in the presence of defects, a single hole formed which grew rapidly in a longitudinal direction and reached a length of a few  $\mu\text{m}$  at breakage (Supplementary Fig. S4b). This rapid loss of dimers in a longitudinal direction reflects the lattice anisotropy in the bond energies. Dimers were lost at the defect, but the lattice was stabilized by the breathing mechanism, which led to a rapid motion of the dislocation, thereby extending the region of the 12 protofilament structure at the expense of the 13 protofilament structure. To test the model predications of breakage times we performed experiments with end stabilized microtubules (grown at  $20 \mu\text{M}$  free tubulin) in the complete absence of free tubulin. We found that microtubules developed soft, flexible regions a few micrometers in length, which continued to spread along the microtubule shafts. The highly bent regions eventually broke after  $10 \pm 5$  min, followed by rapid shortening of the remaining microtubule ends (Supplementary Fig. S4c). The typical time scale of breakage and the size of soft regions matched well with the simulations and confirmed also the observations of Dye *et al.* [5] albeit on a shorter time scale. This indicates that

\* laurent.blanchoin@cea.fr

† manuel.thery@cea.fr

‡ karin.john@univ-grenoble-alpes.fr

tubulin is lost preferentially in a longitudinal direction and in a cooperative process, as expected for an anisotropic lattice where longitudinal bonds are stronger than lateral bonds [3]. In our simulations we used a ratio of longitudinal to lateral binding energies of  $\Delta G_1/\Delta G_2 = 2$ . A higher ratio, as for instance used in VanBuren *et al.* [1] would lead to much longer holes at breakage, which does not agree with our experimental observations (Supplementary Fig. S4c). At this point we cannot exclude the possibility that lattice bond energies are higher than anticipated and that defects play a critical role in the fracture process. However, our model simulations naturally include the fracture process consistent with our experimental data without additional assumptions.

### III. TABLES OF PARAMETER VALUES FOR MONTE-CARLO SIMULATIONS

Parameter	Explanation	Value	References/Remarks
$\Delta G_1$	longitudinal binding energy (D-D, T-D)	$-15 k_B T$	similar values have been used by others [1, 6, 7] lattice anisotropy is $G_1/G_2 = G_{T1}/G_{T2} = 2$
$\Delta G_2$	lateral binding energy (D-D, T-D)	$-7.5 k_B T$	
$\Delta G_{T1}$	longitudinal stabilizing binding energy (T-T)	$-3.8 k_B T$	
$\Delta G_{T2}$	lateral stabilizing binding energy (T-T)	$-1.9 k_B T$	
$\Delta G_E$	entropic loss due to dimer immobilization, estimated using Eq. (1) in the main text	$14.4 k_B T$	estimates range from $10-20 k_B T$ [1, 2, 8]
$\Delta G_C$	conformational energy penalty for a 12 protofilament lattice compared to a 13 protofilament lattice	$0-0.4 k_B T$	adapted for our model [9]
$\Delta G_S$	dislocation strain energy	$0-5 k_B T$	adapted for our model
rate constants with $\tau \approx 0.6$ s (estimated by assuming a microtubule elongation speed of $2 \mu\text{m}/\text{min}$ at a tubulin concentration of $20 \mu\text{M}$ )			
$k_{on}$	on-rate constant	$1 \mu\text{M}^{-1} \tau^{-1}$	overall on-rate per 13 protofilament microtubule is $k_{on}^{MT} = 13 \mu\text{M}^{-1} \tau^{-1}$ comparable to other studies [1, 6, 10, 11]
$k_{off}$	off-rate constant	$1 \tau^{-1}$	exemplary for a GTP-dimer with one lateral and one longitudinal GTP-dimer neighbor [Eq. (1) in the main text]
$k_{hy}$	GTP-hydrolysis rate constant	$0.6 \tau^{-1}$	comparable to Melki <i>et al.</i> [11]
$k_{br}$	breathing rate constant	$1 \tau^{-1}$	closing rate constant $k_{cl}$ can be obtained via Eq. (3) in the main text, varied in the range $0.1-10 \tau^{-1}$ in Supplementary Fig. S2d

TABLE S1. Parameter values used for the Monte-Carlo simulations in Fig. 2 and Supplementary Figs. S2 and S4 unless stated otherwise (see also Methods in the main text).

Parameter	Explanation	Value	References/Remarks
$\Delta G_1$	longitudinal binding energy (D-D, T-D)	$-20 k_B T$	similar values have been used by others [1, 6, 7] lattice anisotropy is $G_1/G_2 = G_{T1}/G_{T2} = 2$
$\Delta G_2$	lateral binding energy (D-D, T-D)	$-10 k_B T$	
$\Delta G_{T1}$	longitudinal stabilizing binding energy (T-T)	$-3.8 k_B T$	
$\Delta G_{T2}$	lateral stabilizing binding energy (T-T)	$-1.9 k_B T$	
$\Delta G_E$	entropic loss due to dimer immobilization, estimated using Eq. (1) in the main text	$21.9 k_B T$	estimates range from $10-20 k_B T$ [1, 2, 8]
$\Delta G_C$	conformational energy penalty for a 12 protofilament lattice compared to a 13 protofilament lattice	$0-0.4 k_B T$	adapted for our model [9]
$\Delta G_S$	dislocation strain energy	$0-5 k_B T$	adapted for our model
rate constants with $\tau \approx 0.5$ s (estimated by assuming a microtubule elongation speed of $2 \mu\text{m}/\text{min}$ at a tubulin concentration of $20 \mu\text{M}$ )			
$k_{on}$	on-rate constant	$1 \mu\text{M}^{-1} \tau^{-1}$	overall on-rate per 13 protofilament microtubule is $k_{on}^{MT} = 13 \mu\text{M}^{-1} \tau^{-1}$ comparable to other studies [1, 6, 10, 11]
$k_{off}$	off-rate constant	$1 \tau^{-1}$	exemplary for a GTP-dimer with one lateral and one longitudinal GTP-dimer neighbor [Eq. (1) in the main text]
$k_{hy}$	GTP-hydrolysis rate constant	$0.45 \tau^{-1}$	comparable to Melki <i>et al.</i> [11]
$k_{br}$	breathing rate constant	$1 \tau^{-1}$	closing rate constant $k_{cl}$ can be obtained via Eq. (3) in the main text

TABLE S2. Parameter values used for Monte-Carlo simulations shown in Supplementary Fig. S3 for a higher total lattice binding energy of  $-60 k_B T$  (see also Methods in the main text).

#### IV. DETAILED DATA OBTAINED BY CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

Notation of lattice conformation: N\_n (N: protofilament number, n: helix start number) The 11\_2 lattice is a special configuration which allows 2 different conformations, denoted as 11\_2a and 11\_2b (see Ref. [12]). n.d. (not determined) indicates that the lattice type could not be determined precisely.

The arrow gives precisely the direction of the transition in the direction of elongation. The directionality can be inferred from the fact that in centrosome nucleated microtubules only the plus end is growing (the minus end was attached to the centrosome). For example, a 13\_3  $\rightarrow$  12\_3 transition means that the microtubule changed from the 13\_3 to the 12\_3 conformation during growth. A double arrow  $\leftrightarrow$  indicates that the direction of the transition with respect to the direction of elongation could not be determined.

The microtubule tip growth rates have been obtained by video microscopy data and have been given in Chrétien *et al.* [13].

##### A. $6.5 \mu\text{M}$

The average growth rate of these microtubules was  $0.78 \pm 0.37 \mu\text{m}/\text{min}$ , and the catastrophe frequency was  $0.18 \text{ min}^{-1}$ .

##### 1. $6.5 \mu\text{M}$ , 3 min (mean sheet length 98 nm)

13\_3: 96.667 %

Others: 3.334 %

12\_2: 2605.4 nm (0.152 %)

12\_3: 50055.0 nm (2.929 %)

14.3: 3857.3 nm (0.226 %)  
 14.4: 455.0 nm (0.027 %)

Total length: 1709.18  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 12.97  
 Percentage of modified lattices\*: 0.179 % (\*see Chrétien and Fuller [12])  
 Number of transitions: 10  
 Average distance between transitions: 170.9  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 13.3  $\rightarrow$  12.3: n=8  
 13.3  $\rightarrow$  12.2: n=1  
 12.3  $\rightarrow$  11\_ (n.d.): n=1

2. 6.5  $\mu\text{M}$ , 10 min

13.3: 94.667.0 %  
 Others: 5.333 %  
 12.2: 3503.5 nm (0.186 %)  
 12.3: 44056.0 nm (2.340 %)  
 14.3: 50259.0 nm (2.669 %)  
 14.4: 2614.0 nm (0.139 %)

Total length: 1883.11  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.00  
 Percentage of modified lattices: 0.325 %  
 Number of transitions: 4  
 Average distance between transitions: 470.8  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 13.3  $\rightarrow$  14.4: n=1  
 14.3  $\rightarrow$  13.3: n=3

3. 6.5  $\mu\text{M}$ , 20 min

13.3: 90.0 %  
 Others: 10.0 %  
 11.2b: 2204.0 nm (0.128 %)  
 12.3: 44177.0 nm (2.739 %)  
 13.2: 595.3 nm (0.035 %)  
 14.3: 122283.4 nm (7.099 %)

Total length: 1722.60  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.04  
 Percentage of modified lattices: 0.163 %  
 Number of transitions: 19  
 Average distance between transitions: 90.7  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 12.3  $\rightarrow$  13.2: n=1  
 12.3  $\rightarrow$  13.3: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  12.3: n=3  
 13.3  $\rightarrow$  14.3: n=5  
 14.3  $\rightarrow$  13.3: n=8  
 14.3  $\rightarrow$  13.2: n=1

4. 6.5  $\mu\text{M}$ , 30 min

13\_3: 86.667 %  
 Others: 11.333 %  
 12\_3: 24062.0 nm (2.249 %)  
 13\_2: 1194.3 nm (0.112 %)  
 14\_2: 472.9 nm (0.044 %)  
 14\_3: 95534.0 nm (8.929 %)

Total length: 1069.96  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.07  
 Percentage of modified lattices: 0.156 %  
 Number of transitions: 11  
 Average distance between transitions: 97.3  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 12\_3  $\leftrightarrow$  13\_3: n=1  
 13\_2  $\rightarrow$  13\_3: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  13\_2: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  12\_3: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  14\_3: n=1  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=5  
 14\_2  $\rightarrow$  13\_3: n=1

**B. 13.0  $\mu\text{M}$** 

The average growth rate was  $2.18 \pm 0.92 \mu\text{m}/\text{min}$ . No catastrophes.

1. 13.0  $\mu\text{M}$ , 3 min (mean sheet length 209 nm)

13\_3: 90.333 %  
 Others: 9.667 %  
 11\_2a: 1483.6 nm (0.163 %)  
 11\_2b: 2106.0 nm (0.231 %)  
 12\_2: 1431.7 nm (0.157 %)  
 12\_3: 62373.0 nm (6.842 %)  
 14\_3: 13823.0 nm (1.516 %)  
 14\_4: 6557.4 nm (0.719 %)  
 15\_4: 353.9 nm (0.039 %)

Total length: 911.68  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 12.95  
 Percentage of modified lattices: 1.107 %  
 Number of transitions: 14  
 Average distance between transitions: 65.1  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 11\_2b  $\rightarrow$  11\_2a: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  12\_3: n=6  
 13\_3  $\rightarrow$  14\_3: n=2  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=2  
 15\_4  $\rightarrow$  14\_4: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  11\_2b: n=1  
 16\_(n.d.)  $\rightarrow$  15\_(n.d.): n=1

2. 13.0  $\mu$ M, 5 min

13\_3: 89.333 %  
 Others: 10.667 %  
 12\_2: 7281.5 nm (0.500 %)  
 12\_3: 79370.0 nm (5.455 %)  
 14\_3: 60986.0 nm (4.192 %)  
 14\_4: 6887.9 nm (0.473 %)  
 15\_3: 504.7 nm (0.035 %)  
 15\_4: 164.4 nm (0.011 %)

Total length: 1454.95  $\mu$ m  
 Average protofilament number: 12.99  
 Percentage of modified lattices: 0.971 %  
 Number of transitions: 34  
 Average distance between transitions: 42.8  $\mu$ m  
 Transition types:  
 12\_2  $\rightarrow$  13\_3: n=1  
 12\_3  $\rightarrow$  12\_2: n=1  
 12\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=2  
 12\_3  $\rightarrow$  15\_3: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  12\_2: n=2  
 13\_3  $\rightarrow$  12\_3: n=10  
 13\_3  $\rightarrow$  14\_3: n=9  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=5  
 14\_4  $\rightarrow$  13\_3: n=1  
 14\_3  $\rightarrow$  15\_3: n=1  
 15\_4  $\rightarrow$  14\_4: n=1

3. 13.0  $\mu$ M, 10 min

13\_3: 84 %  
 Others: 16.0 %  
 12\_2: 2128.4 nm (0.241 %)  
 12\_3: 21817.0 nm (2.469 %)  
 13\_2: 811.0 nm (0.092 %)  
 14\_3: 112474.5 nm (12.729 %)  
 14\_4: 2688.4 nm (0.304 %)  
 16\_3: 1453.8 nm (0.165 %)

Total length: 883.58  $\mu$ m  
 Average protofilament number: 13.11  
 Percentage of modified lattices: 0.802 %  
 Number of transitions: 15  
 Average distance between transitions: 58.9  $\mu$ m  
 Transition types:  
 12\_3  $\rightarrow$  12\_2: n=1  
 12\_2  $\rightarrow$  12\_3: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  14\_3: n=4  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_2: n=1  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=7  
 16\_3  $\rightarrow$  15\_(n.d.): n=1

4. 13.0  $\mu\text{M}$ , 20 min

13\_3: 76 %  
 Others: 24.0 %  
 12\_3: 45390.0 nm (5.597 %)  
 14\_3: 149234.1 nm (18.403 %)

Total length: 810.93  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.13  
 Percentage of modified lattices: 0 %  
 Number of transitions: 7  
 Average distance between transitions: 115.8  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 13\_3  $\rightarrow$  12\_3: n=1  
 13\_3  $\rightarrow$  14\_3: n=3  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=3

5. 13.0  $\mu\text{M}$ , 30 min

13\_3: 74.333 %  
 Others: 25.667 %  
 12\_3: 39299.0 nm (7.680 %)  
 14\_3: 92042.0 nm (17.987 %)

Total length: 511.72  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.10  
 Percentage of modified lattices: 0 %  
 Number of transitions: 6  
 Average distance between transitions: 85.3  $\mu\text{m}$   
 Transition types:  
 12\_3  $\leftrightarrow$  13\_3: n=2  
 13\_3  $\leftrightarrow$  14\_3: n=2  
 14\_3  $\rightarrow$  13\_3: n=2

C. 19.5  $\mu\text{M}$ 

The average growth rate was  $3.51 \pm 0.90 \mu\text{m}/\text{min}$ . No catastrophes.

1. 19.5  $\mu\text{M}$ , 2 min (mean sheet length 307 nm)

13\_3: 84 %  
 Others: 16 %  
 12\_2: 1689.3 nm (0.156 %)  
 12\_3: 39846.0 nm (3.691 %)  
 13\_2: 500.2 nm (0.046 %)  
 14\_3: 108989.4 nm (10.097 %)  
 14\_4: 18321.0 nm (1.697 %)  
 15\_3: 1440.0 nm (0.133 %)  
 15\_4: 855.2 nm (0.079 %)  
 16\_4: 1068.4 nm (0.100 %)

Total length: 1079.43  $\mu\text{m}$   
 Average protofilament number: 13.09  
 Percentage of modified lattices: 1.899 %  
 Number of transitions: 38



Average distance between transitions: 28.4  $\mu\text{m}$

Transition types:

13.2  $\rightarrow$  14.3: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  12.3: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  14.3: n=8  
 14.3  $\rightarrow$  12.2: n=1  
 14.3  $\rightarrow$  13.3: n=15  
 14.4  $\rightarrow$  13.3: n=3  
 14.3  $\rightarrow$  14.4: n=2  
 14.3  $\rightarrow$  15.3: n=3  
 15.3  $\rightarrow$  13.2: n=1  
 15.3  $\rightarrow$  14.3: n=2  
 15.3  $\rightarrow$  16.4: n=1

## 2. 19.5 $\mu\text{M}$ , 3 min (mean sheet length 312 nm)

13.3: 86.667 %  
 Others: 13.333 %  
 10.2: 501.7 nm (0.051 %)  
 11.2b: 3209.4 nm (0.329 %)  
 12.2: 7744 nm (0.793 %)  
 12.3: 50296.0 nm (5.152 %)  
 13.2: 900.3 nm (0.092 %)  
 14.3: 61390.0 nm (6.288 %)  
 14.4: 4479.1 nm (0.459 %)  
 15.4: 1648.6 nm (0.169 %)

Total length: 976.27  $\mu\text{m}$

Average protofilament number: 13.00

Percentage of modified lattices: 1.673 %

Number of transitions: 44

Average distance between transitions: 22.2  $\mu\text{m}$

Transition types:

12.3  $\rightarrow$  13.3: n=1  
 12.2  $\rightarrow$  12.3: n=1  
 12.3  $\rightarrow$  13.3: n=1  
 13.2  $\rightarrow$  14.3: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  12.3: n=3  
 13.3  $\rightarrow$  12.2: n=2  
 13.3  $\rightarrow$  13.2: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  14.4: n=1  
 13.3  $\rightarrow$  14.3: n=18  
 13.3  $\rightarrow$  11.2b: n=1  
 14.3  $\rightarrow$  13.3: n=11  
 14.3  $\rightarrow$  14.4: n=1  
 14.3  $\rightarrow$  15.4: n=1  
 15.4  $\rightarrow$  13.3: n=1

## V. FREE TUBULIN INCORPORATION USING TICTAC BUFFER

To test the robustness of our TIRF *in vitro* setup, we performed the incorporation experiment in an alternative buffer (Tic Tac buffer, see Supplementary Methods), yielding comparable incorporation frequencies,  $0.04 \mu\text{m}^{-1} * /3.9$  and  $0.09 \mu\text{m}^{-1} * /3.3$ , for microtubules grown at 20  $\mu\text{M}$  and 32  $\mu\text{M}$  free tubulin, respectively (see Supplementary Fig. S6).

## VI. FREE TUBULIN INCORPORATION INTO MICROTUBULES GROWN IN XENOPUS EGG EXTRACT

In order to further challenge our model of spontaneous lattice turnover, we tested whether turnover occurs in a physiological context using *Xenopus* egg extract cytoplasm. We used the same set-up as shown in Fig. 1a for *in vitro* experiments, except that the elongation mix was composed of approximately  $20\mu\text{M}$  endogenous *Xenopus* tubulin (supplemented with  $1\mu\text{M}$  red tubulin) along with the whole egg cytoplasm content (Supplementary Fig. S7a, step I). After washout of the extract, microtubules were capped by GMPCPP in the presence of green fluorescent tubulin, then exposed to  $14\mu\text{M}$  free green-labeled tubulin in solution, washed again and inspected for tubulin incorporation at the shaft (Supplementary Fig. S7a, steps II-IV). Microtubules grown in *Xenopus* egg extract showed incorporation of free tubulin with a typical spatial frequency of  $0.09\mu\text{m}^{-1} * 2.8$  (Supplementary Fig. S7b), comparable to microtubules grown *in vitro* (Figs. 1c and 4c). Furthermore, the typical frequency matches well with earlier measured frequencies of dislocation defects for microtubules grown in cell free *Xenopus* egg extract ( $\sim 0.04\mu\text{m}^{-1}$ , see Table II in Chretien *et al.* [14]). Note, that during elongation in the *Xenopus* egg extract microtubules are exposed to microtubule associated proteins (MAPs) and may be subjected to mechanical forces induced by molecular motors. However, any nanoscale damage left by severing enzymes has been repaired rapidly within a minute [15] and microtubules with severe damage were lost during washout. A low fraction of MAPs might still be bound to the microtubules after washout of the extract and therefore present during the tubulin incorporation phase. Nevertheless, this experiment shows, that tubulin turnover takes place, despite the presence of cellular proteins and it indicates that the lattice turnover that we characterized *in vitro* is likely to occur *in vivo* as well.

## VII. QUANTIFICATION OF THE NUMBER OF INCORPORATED DIMERS AT INCORPORATION SITES

In a last set of experiments we tried to quantify the order of magnitude of the number of incorporated dimers at incorporation sites. To that end we grew end-stabilized microtubules, which contained a short stretch of green fluorescently labeled tubulin (10%) as reference stretch and performed the incorporation experiment (Supplementary Fig. S8a). We then used the fluorescence of the reference stretch to estimate the number of fluorescent dimers in the incorporation site (see Supplementary Methods). Typically, the incorporation spots were small in the range  $\leq 1\mu\text{m}$  and contained several tens of fluorescent dimers (Supplementary Fig. S8b). Although this experiment can only give a crude estimate, it confirms, that only a small fraction of the microtubule cross section participates in the turnover, i.e. the elongation of a single protofilament is a plausible scenario.

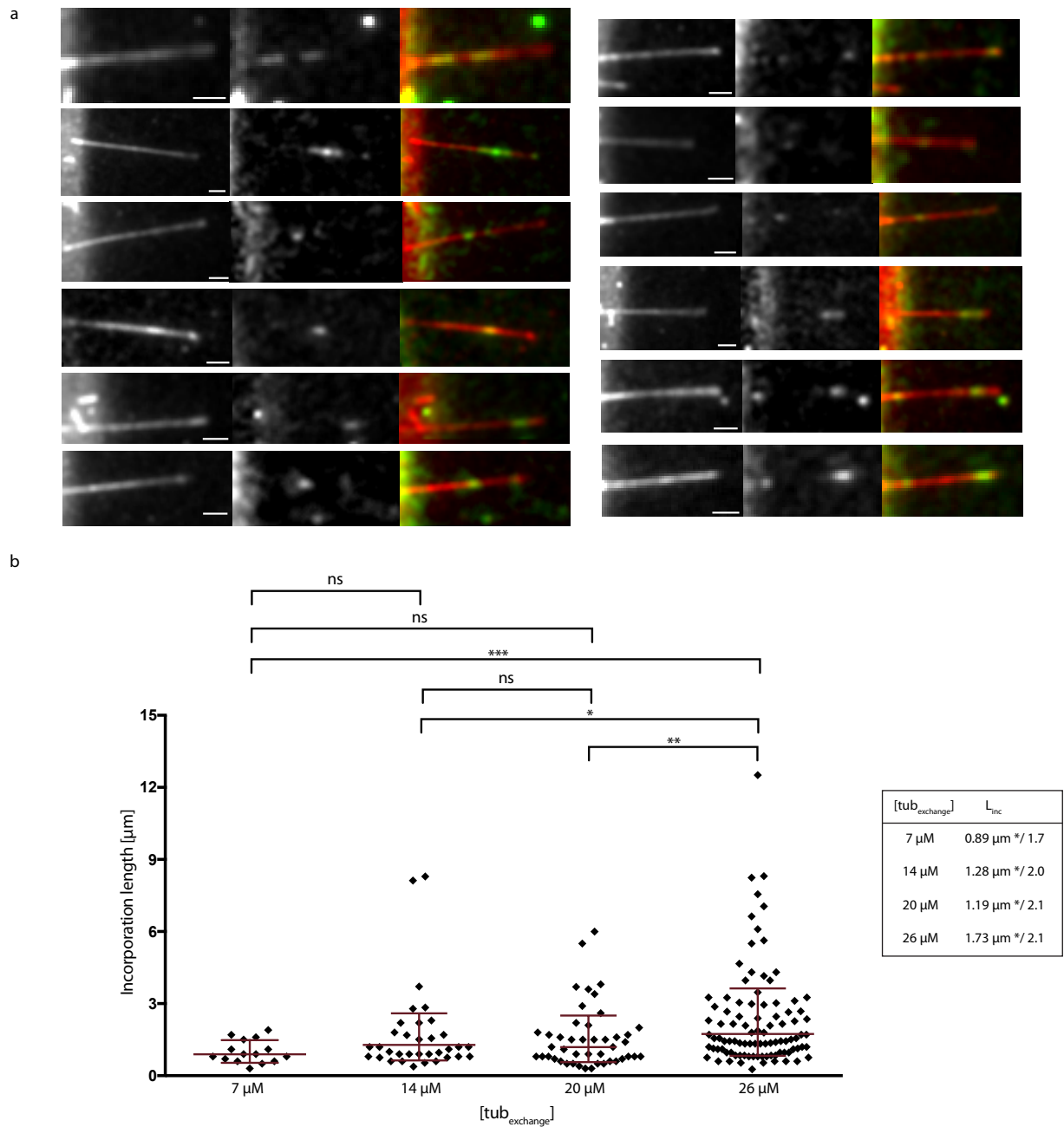


FIG. S1. (a) Examples of red microtubules showing spots of incorporated green tubulin along the lattice. The concentration of free tubulin at growth and incorporation was  $20 \mu\text{M}$ . (b) Distribution of the length of incorporation spots of free tubulin into GDP-microtubules for a concentration of free tubulin at incorporation as indicated in the abscissa. The tubulin concentration at growth was  $20 \mu\text{M}$ . The table summarizes the geometric mean \* / sd factor of the size distribution of incorporation spots. The total number of incorporation spots and the total length of microtubules analyzed correspond to the data given in Fig. 1c. The p-values are 0.001, 0.02, and 0.008 for the pairs ( $7 \mu\text{M}$ ,  $26 \mu\text{M}$ ), ( $14 \mu\text{M}$ ,  $26 \mu\text{M}$ ) and ( $20 \mu\text{M}$ ,  $26 \mu\text{M}$ ). All other differences are not significant.

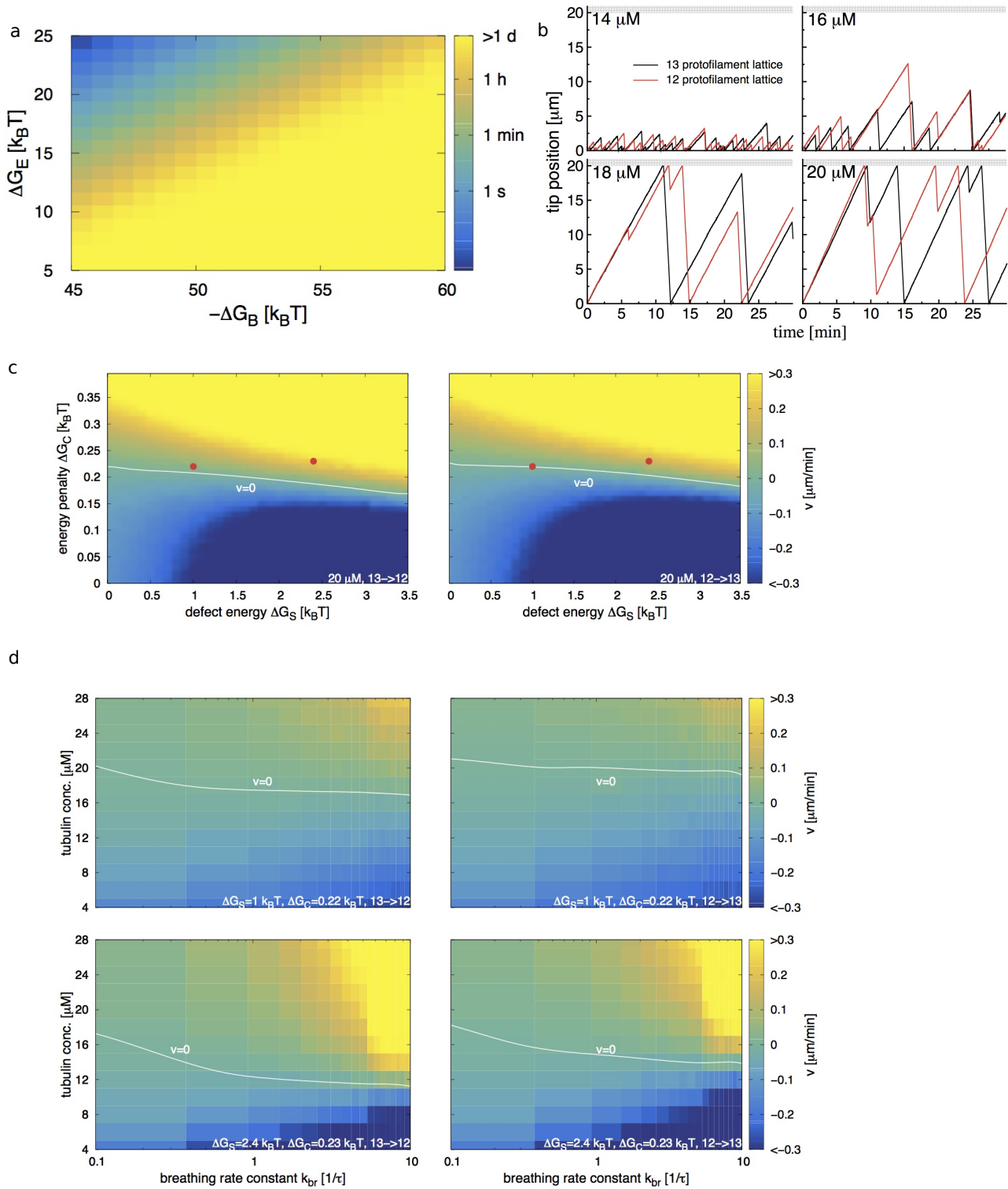


FIG. S2. (a) Phase diagram for the estimated typical time  $\tau$  for a dimer to leave the intact lattice depending on the total binding energy  $\Delta G_B$  and the entropic penalty for immobilizing a dimer in the lattice  $\Delta G_E$  using the relation  $1/\tau = k_{on}c_0Ne^{(\Delta G_B + \Delta G_E)/k_B T}$  with the on-rate constant  $k_{on} = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , the standard concentration  $c_0 = 1 \text{ M}$  and the number of dimers  $N = 13 \times 125 \times 20 = 32500$  in a  $20 \mu\text{m}$  long microtubule. (b-d) Monte Carlo simulations of the microtubule tip and the shaft. (caption continues on next page)

FIG. S2. (b) (+)-end dynamics of the 13 (black line) and the 12 protofilament lattice (red line) at the free tubulin concentrations indicated in the legends. The growth is limited to a length of  $20\ \mu\text{m}$  indicated by the grey horizontal bar in each plot, beyond which no dimer addition takes place. Note, that in our experimental conditions, at  $14\ \mu\text{M}$  free tubulin, microtubules are short and catastrophes are frequent. (c) Phase diagrams of defect dynamics depending on the conformational energy penalty  $\Delta G_C$  and the defect strain energy  $\Delta G_S$  for a free tubulin concentration of  $20\ \mu\text{M}$ . Shown are the phase diagrams of a 13 $\rightarrow$ 12 (left) and a 12 $\rightarrow$ 13 (right) transition. (d) Phase diagrams of defect dynamics at 13 $\rightarrow$ 12 (left plots) and 12 $\rightarrow$ 13 (right plots) transitions depending on the breathing rate constant  $k_{br}$  ( $\tau=0.6\ \text{s}$ ) and the free tubulin concentration. The defect strain energy  $\Delta G_S$  and the conformational energy penalty  $\Delta G_C$  is indicated in the bottom of each phase diagram. The color code in (c,d) indicates the speed of motion of the dislocation along the microtubule axis in  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Note, that a positive speed  $v > 0$  indicates a net elongation of the free protofilament end at the dislocation, which gets visible as incorporation spots in experiments. The white line indicates a stationary dislocation with  $v = 0$ . The red dots in (c) indicate the parameter combinations for the simulated kymographs of Fig. 2 e and f. Remaining parameters are as in Supplementary Table S1 and  $\Delta G_C=0$  in (b).

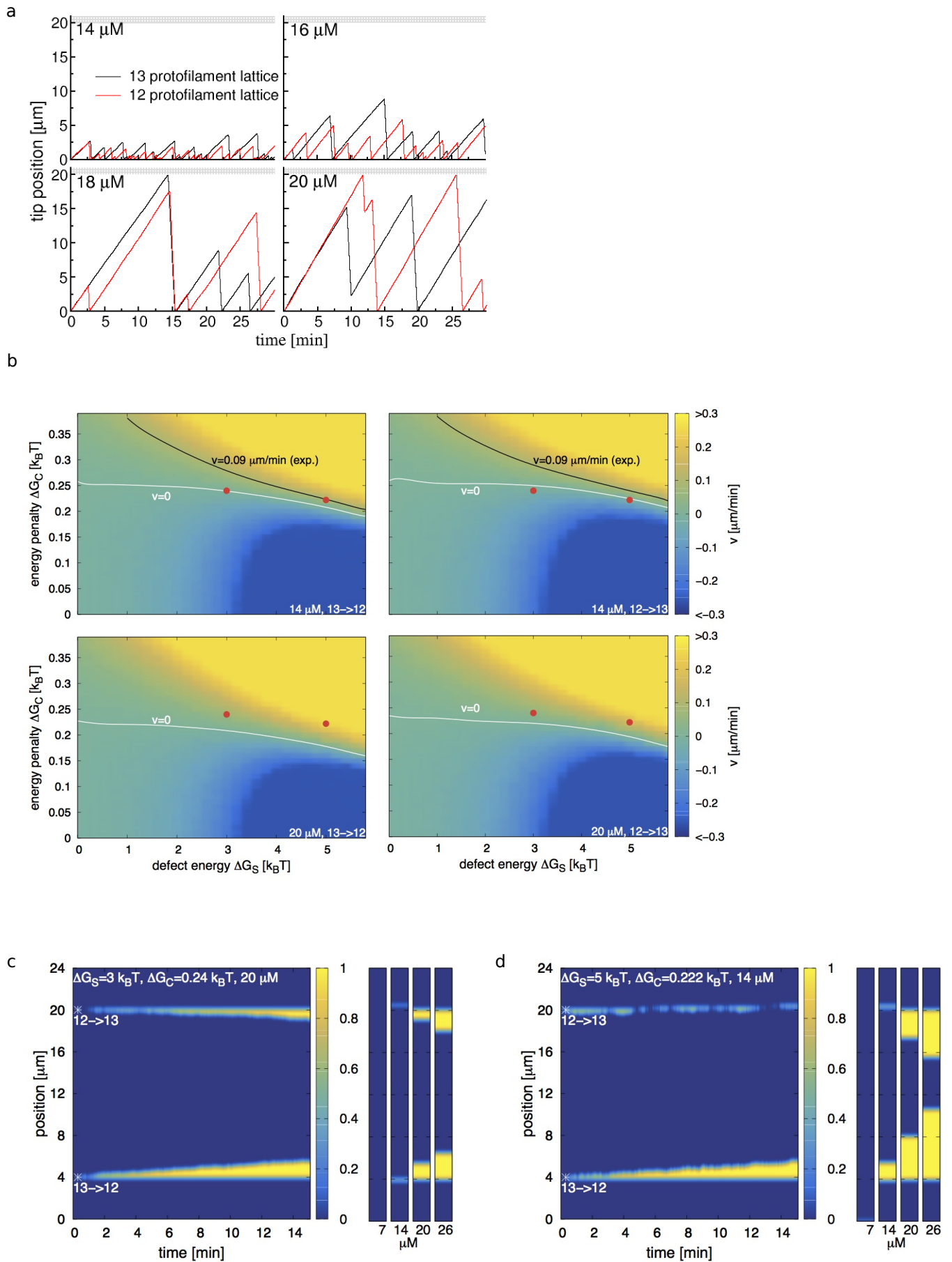


FIG. S3. (caption see next page)

FIG. S3. Monte Carlo simulations of the microtubule tip and lattice dynamics using an alternative parameter set with a high total binding energy  $\Delta G_B = -60 k_B T$ . (a) Tip dynamics of the 13 (black lines) and the 12 protofilament lattice (red lines) at the free tubulin concentrations indicated in the legends. The growth is limited to a length of  $20 \mu\text{m}$  indicated by the grey horizontal bar in each plot, beyond which no dimer addition takes place and catastrophe is thus induced. (b) Phase diagrams of defect dynamics at 13 $\rightarrow$ 12 (left) and 12 $\rightarrow$ 13 (right) transitions depending on the defect strain energy  $\Delta G_S$  and the conformational energy penalty  $\Delta G_C$  for two different free tubulin concentrations ( $14 \mu\text{M}$  and  $20 \mu\text{M}$ ) as indicated at the bottom of each phase diagram. The color code indicates the velocity of motion of the defect. For  $v > 0$  free tubulin is incorporated, whereas for  $v < 0$  the additional protofilament of the 13 protofilament lattice is depolymerizing. The black line with  $v = 0.09 \mu\text{m}/\text{min}$  corresponds to the experimentally measured dislocation speed at  $14 \mu\text{M}$  free tubulin. The red dots indicate the parameter combinations used in the simulations in (c,d). (c,d) Simulated kymographs of free tubulin incorporation into the lattice using parameter values indicated by the red dots in (b) and as indicated at the top of each kymograph. The original positions of the lattice defects are indicated by asterisks. Shown are a 13 $\rightarrow$ 12 (bottom) and 12 $\rightarrow$ 13 (top) transition. The small graphs to the right of each kymograph show the appearance of the microtubules after 15 min at the free tubulin concentration indicated below each graph. Remaining parameters are as in Supplementary Table S2 and  $\Delta G_C = 0$  in (a).

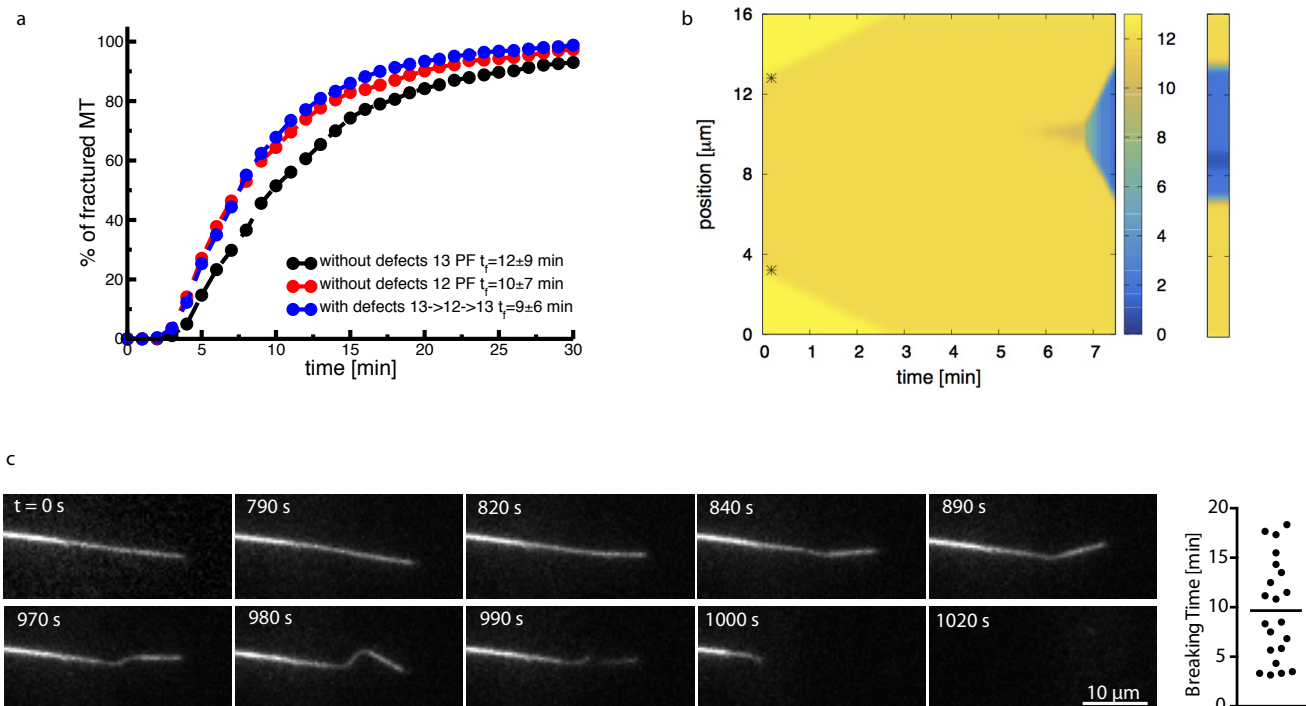


FIG. S4. Monte Carlo simulations (a,b) and experiments (c) of microtubule breakage in the absence of free tubulin. (a) Cumulative distribution of microtubule fracture times for 16  $\mu\text{m}$  long end-stabilized microtubules without defects in the 13 and 12 protofilament lattice conformation and for microtubules containing 2 defects and the two different lattice conformations (each lattice conformation is 8  $\mu\text{m}$  long). The legends indicate the mean time to fracture. (b) Typical example of fracture of a 16  $\mu\text{m}$  long end-stabilized microtubule containing 2 defects, whose initial position is marked by the black asterisks. The color code indicates the number of occupied lattice sites per helical turn. The motion of the defect is visible by a slight change in the yellow color between 13 and 12 dimers per helical turn. The graph on the right shows the final state of the microtubule at fracture. Parameters for (a,b) are as in Supplementary Table S1 and  $\Delta G_S = 2.4 k_B T$ ,  $\Delta G_C = 0.23 k_B T$ . (c) Sequence of experimental images showing a capped microtubule in the absence of free tubulin, which develops a soft region that extends several  $\mu\text{m}$  along the microtubule before breakage. The graph on the right shows the time that microtubules survive before breaking, the bar represents the mean survival time.



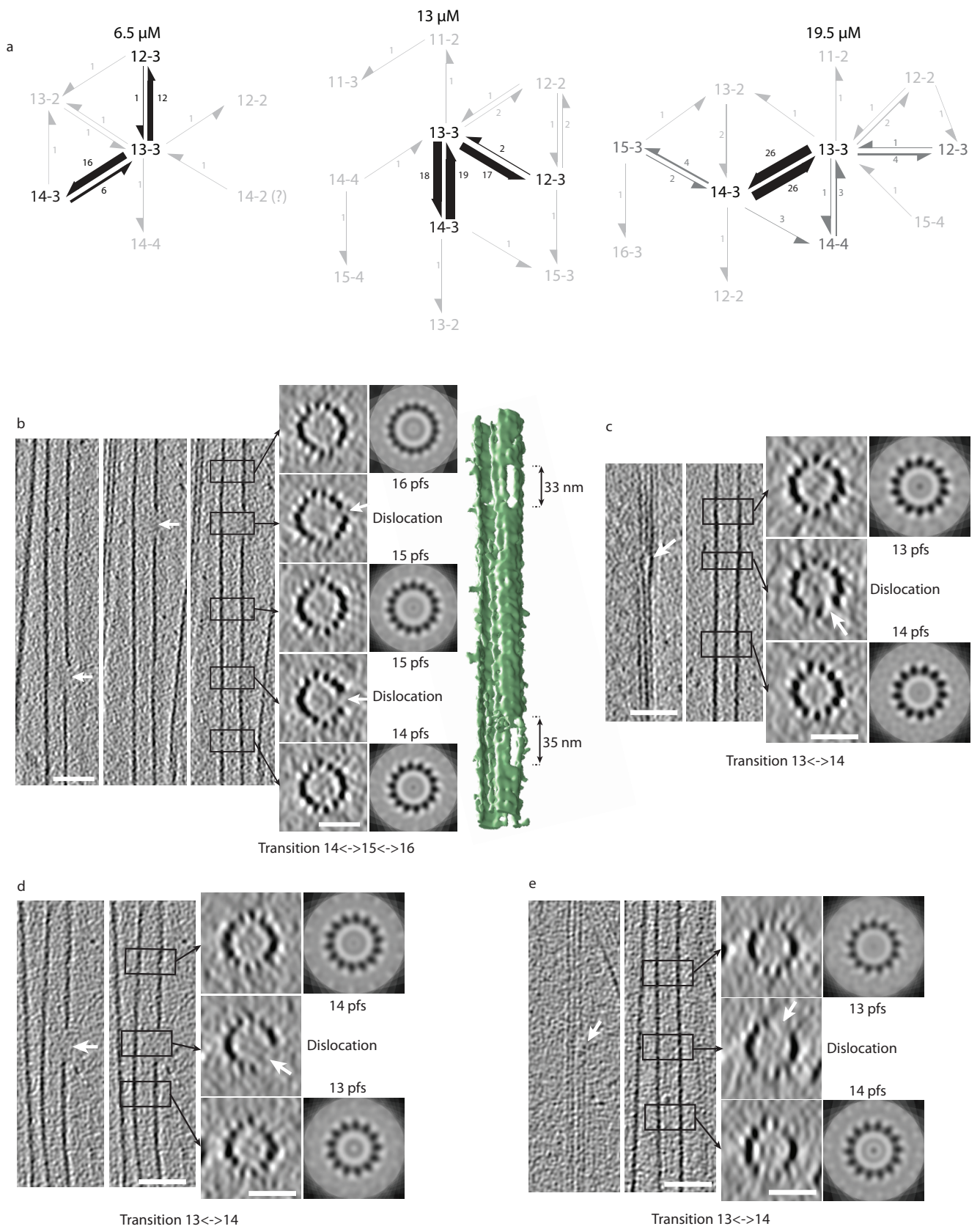


FIG. S5. (caption see next page)

FIG. S5. Dislocation defects in the microtubule lattice detected by cryo-electron microscopy. (a) Schema of the lattice transitions observed by cryo-electron microscopy.  $N_n$  denotes a  $N$  protofilament lattice with a  $n$ -helix start number. The numbers on the arrows indicate the numbers of observed transitions. The arrows indicate the transitions occurring in the direction of growth. The most prominent lattice conformations and transitions are shown in black (the rest in gray). The thickness of the arrows correlates with the frequency of transitions. (b-e) Cryo-electron tomograms of protofilament number transitions. The left panels show longitudinal slices through the microtubule in the transition region whereas the right panels show transverse sections. The transverse sections are averaged over the height of the black rectangles shown in the longitudinal sections (corresponding regions are indicated by black arrows) and correspond to  $N$ -fold rotational averages of the closed microtubule regions ( $N$  denotes the protofilament number). White arrows indicate the free end of a protofilament (dislocation) with the accompanying gap in the lattice at the transition. The scale bars are 50 nm for longitudinal and 25 nm for transverse sections. (b) A  $15 \leftrightarrow 16$  and  $14 \leftrightarrow 15$  protofilament number transitions in close proximity in the same microtubule. The left most and central longitudinal sections were imaged at different depths to show the gaps in the transition regions. The central and right most longitudinal sections are identical. The image to the far right shows the 3D rendering (visualized under UCSF Chimera [16]) of the microtubule with the dislocations at the edge the microtubule. Two gaps in the lattice with approximate lengths of 33 nm and 35 nm are clearly visible. (c-e) Three examples of  $14 \leftrightarrow 13$  protofilament number transitions. The left longitudinal section shows a cut through the transition region, whereas the right longitudinal section shows a cut through a central part of the microtubule. In (d) both longitudinal sections are identical.

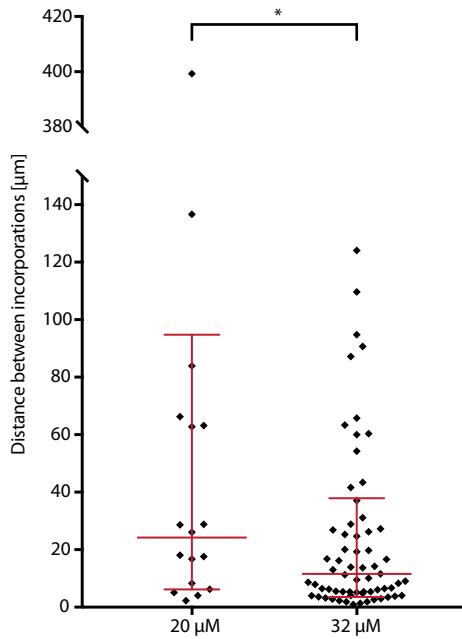
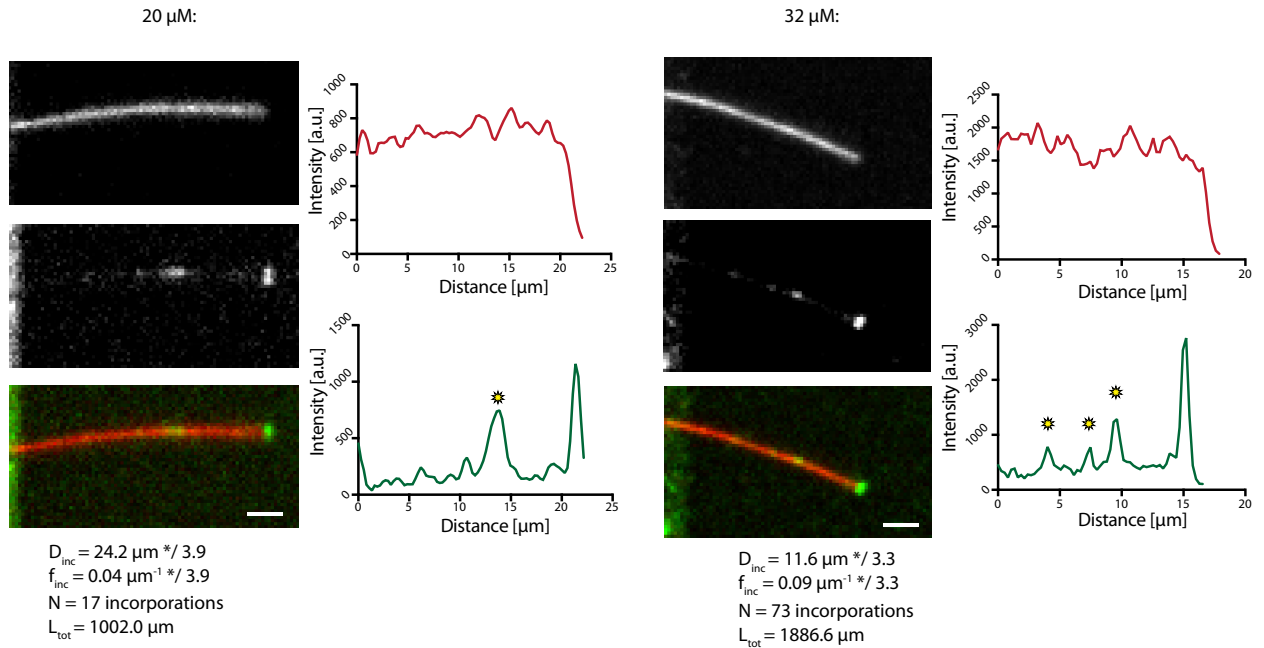


FIG. S6. Incorporation of free tubulin into GDP-microtubules using a different buffer (Tic Tac buffer instead of BRB buffer). Microtubules were grown in Tic Tac buffer at 20  $\mu\text{M}$  (left) and 32  $\mu\text{M}$  (right) free tubulin concentration before they were capped with GMPCPP and exposed to 14  $\mu\text{M}$  of green-fluorescent free tubulin. The images and line scans represent typical examples of tubulin incorporation into the shaft. The average distance ( $D_{inc}$ ) and frequency ( $f_{inc}$ ) between incorporation spots is indicated below the images as geometric mean  $^*/\text{sd}$  factor.  $N$  and  $L_{tot}$  denote the total number of incorporation spots and the total length of microtubules analyzed, respectively. Scale bars: 3  $\mu\text{m}$ . The graph shows the distribution of distances between incorporation spots after concatenating all microtubules in a random order. The red bars indicate the geometric mean  $^*/\text{sd}$  factor. The p-value is 0.047.

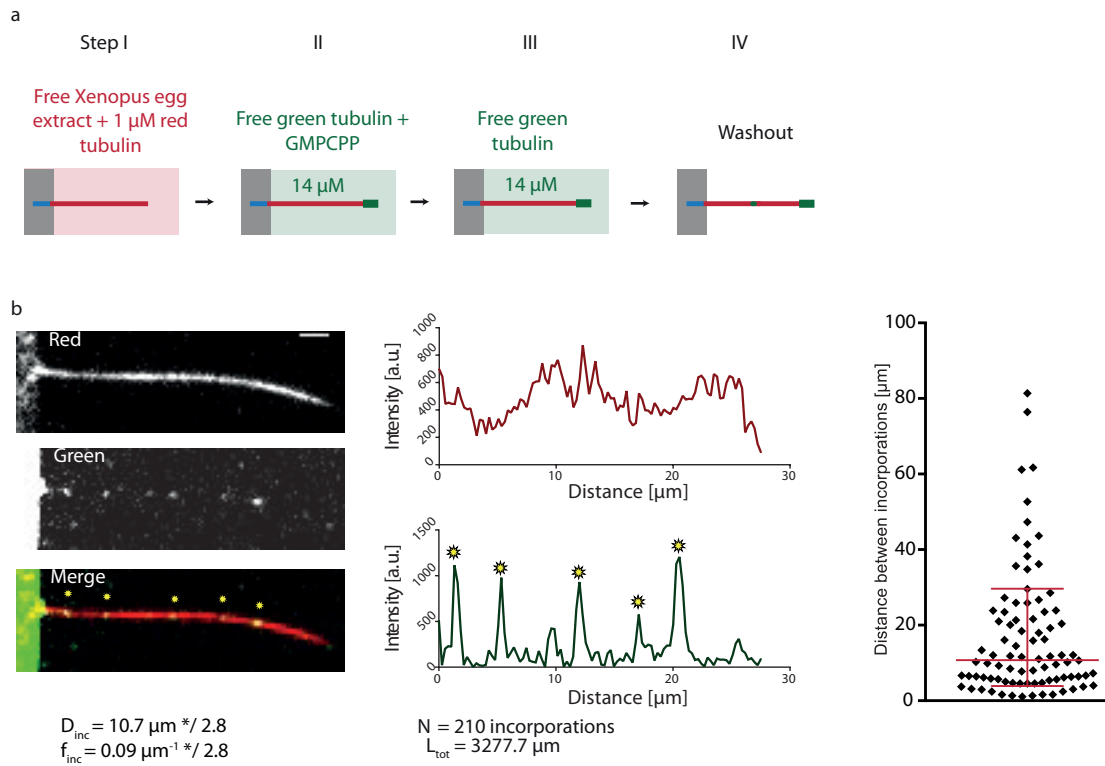
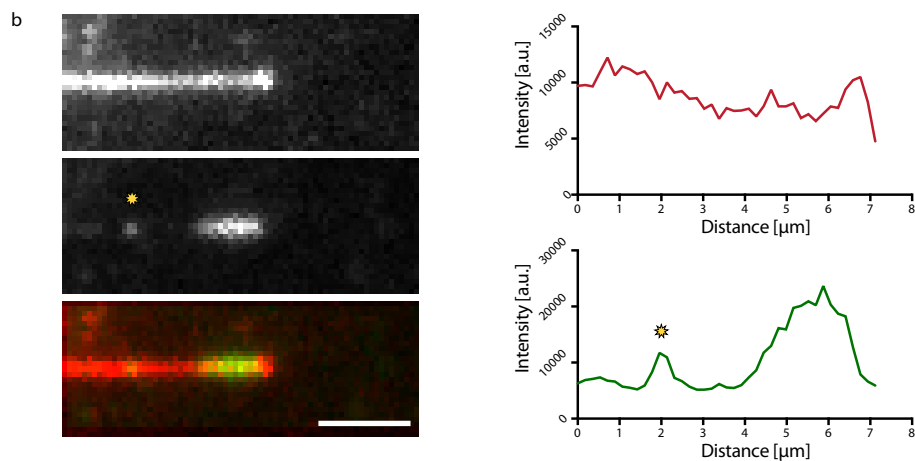
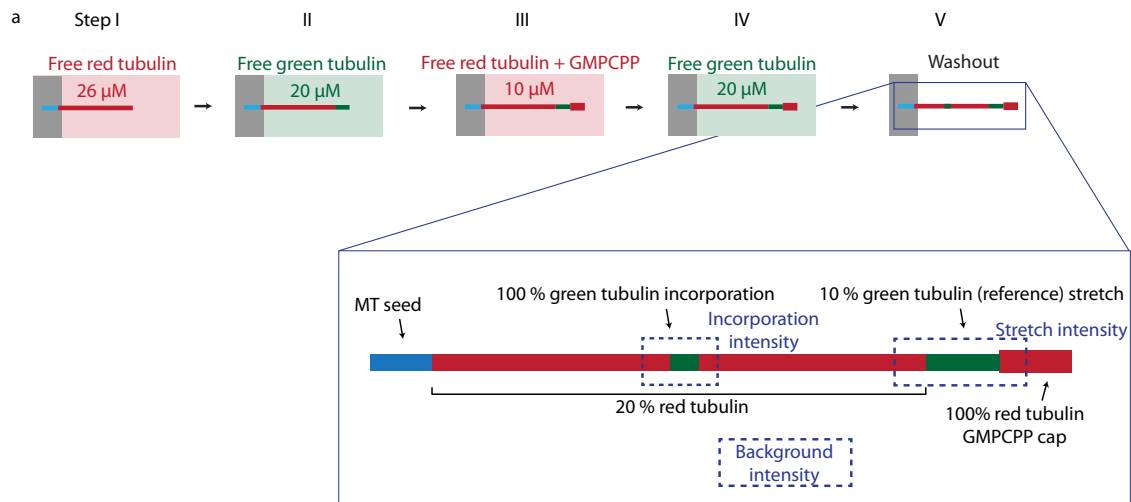


FIG. S7. Incorporation of free tubulin into microtubules grown in *Xenopus* egg extract. (a) Schematic representation of the experimental setup to test the role of the microtubule growth medium on tubulin turnover in the microtubule lattice. Microtubules were grown in cell free *Xenopus* egg extract supplemented by 1  $\mu\text{M}$  red-fluorescent free tubulin (step I) before washing and capping with GMPCPP (14  $\mu\text{M}$  green tubulin, step II). Microtubules were then exposed to 14  $\mu\text{M}$  green-fluorescent free tubulin for 15 min (step III) before a final washout and subsequent observation (step IV). (b) The images and line scans show an example of a microtubule grown in cell free *Xenopus* egg extract. The average distance  $D_{inc}$  and frequency  $f_{inc}$  (geometric mean  $^*/\text{sd}$  factor) between sites of tubulin incorporation are shown below. N and  $L_{tot}$  denote the total number of incorporations and the total length of microtubules analyzed, respectively. Scale bar: 3  $\mu\text{m}$ . The graph shows the distribution of distances between incorporation sites after concatenating all microtubules in a random order. The red bars represents the geometric mean  $^*/\text{sd}$  factor.



Number of incorporated dimers

Microtubule	Laser intensity	
	High	Low
1	$42 \pm 9$	$44 \pm 9$
2	$62 \pm 11$	$76 \pm 14$
3	$6 \pm 3$	$9 \pm 5$
4	$23 \pm 12$	$32 \pm 16$
5	$21 \pm 9$	$21 \pm 13$
Mean	$31 \pm 22$	$36 \pm 26$

FIG. S8. Quantification of the approximate number of tubulin dimers at incorporation sites. (a) Schematic representation of the experimental setup used to quantify the number of fluorescent tubulin dimers at incorporation sites. Microtubules were grown with red-fluorescent tubulin at a concentration of  $26 \mu\text{M}$  (step I) then further elongated with  $20 \mu\text{M}$  green tubulin (10%, “reference stretch”, step II), before they were capped with GMPCPP (step III) and exposed to  $20 \mu\text{M}$  of green-fluorescent free tubulin (step IV). After 15 min, the free green tubulin was washed out (step V) to reveal spots of green tubulin along the red microtubule, which were compared to the “reference stretch” to estimate the number of fluorescent dimers (see Methods). (b) Example images and line scans of green and red fluorescence along a microtubule grown with the protocol shown in (a). The table summarizes the estimates of incorporated dimers for two different laser intensities (low, high). Values are mean  $\pm$  sd calculated from 10 individual images, respectively. The length of the incorporation spots was  $\leq 1 \mu\text{m}$ . Scale bar:  $3 \mu\text{m}$ .

## VIII. SUPPLEMENTARY METHODS

### A. Microtubule growth on micropatterns using Tic Tac buffer

The PDMS chip was placed on a micropatterned cover glass and fixed on the microscope stage. The chip was perfused with neutravidin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in BRB80; Pierce), then washed with HKEM (10 mM Hepes pH7.2; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EGTA; 50 mM KCl), passivated for 20 s with PLL-g-PEG (Pll 20K-G35-PEG2K, Jenkam Technology) at 0.1 mg/ml in 10 mM Na-Hepes (pH = 7.4), and washed again with HKEM. Microtubule seeds were flowed into the chamber at high flow rates perpendicularly to the micropatterned lines to ensure proper orientation of the seeds. Non-attached seeds were washed out immediately using HKEM supplemented with 1 % BSA. Seeds were elongated with 20  $\mu\text{M}$  tubulin (20 % labeled) in Tic Tac (16 mM Pipes pH 6.9; 10 mM Hepes; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EGTA; 50 mM KCl) supplemented with an oxygen scavenger cocktail (20 mM DTT, 1.2 mg/ml glucose, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  catalase and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  glucose oxidase), 0.1 % BSA, 0.025 % methyl cellulose (1500 cp, Sigma) and 1 mM GTP at 37 °C. GMPCPP caps were grown by supplementing a mix containing 14  $\mu\text{M}$  of tubulin (100 % labeled) in HKEM supplemented with an oxygen scavenger cocktail (20 mM DTT, 1.2 mg/ml glucose, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  catalase and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  glucose oxidase), 0.1 % BSA, 0.025 % methyl cellulose (1500 cp, Sigma) and 0.5 mM GMPCPP (Jena Bioscience) at 37 °C. For incorporation experiments, the same buffer as for elongation was used, supplemented by 14  $\mu\text{M}$  tubulin (100 % labeled, green fluorescent, labeling ratio of about 2 fluorophores per dimer). Microtubules were incubated in this buffer for 15 min at 37 °C before replacing it with washing buffer for imaging.

### B. Microtubule growth on micropatterns using cell free *Xenopus* egg extract

The PDMS chip was placed on a micropatterned cover glass and fixed on the microscope stage. The chip was perfused with neutravidin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in BRB80; Pierce), then washed with HKEM (10 mM Hepes pH 7.2; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EGTA; 50 mM KCl), passivated for 20 s with PLL-g-PEG (Pll 20K-G35-PEG2K, Jenkam Technology) at 0.1 mg/ml in 10 mM Na-Hepes (pH 7.4), and washed again with HKEM. Microtubule seeds were flowed into the chamber at high flow rates perpendicularly to the micropatterned lines to ensure proper orientation of the seeds. Non-attached seeds were washed out immediately using HKEM supplemented with 1 % BSA. Seeds were elongated with *Xenopus* egg extract supplemented with 1  $\mu\text{M}$  of tubulin (100 % labeled, red fluorescent) in BRB80 at 37 °C. *Xenopus* egg extract was prepared as described by Murray *et al.* [17]. CSF arrested extracts were induced to interphase by addition of 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  for 45 minutes. In that type of “low speed” extracts, microtubule concentration is estimated to range around 20  $\mu\text{M}$  [18]. Dynein-dependent motility was then inhibited with 0.5 mM vanadate, and microtubule nucleation was facilitated by addition of 11  $\mu\text{M}$  RanQ69L as described by Petry *et al.* [19]. GMPCPP caps were grown by supplementing a mix containing 14  $\mu\text{M}$  of tubulin (100 % labeled, green fluorescent) in HKEM supplemented with an oxygen scavenger cocktail (20 mM DTT, 1.2 mg/ml glucose, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  catalase and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  glucose oxidase), 0.1 % BSA, 0.025 % methyl cellulose (1500 cp, Sigma) and 0.5 mM GMPCPP (Jena Bioscience) at 37 °C. For incorporation experiments, the same buffer as for capping was used, supplemented by 14  $\mu\text{M}$  tubulin (100 % labelled, green fluorescent, labeling ratio of about 2 fluorophores per dimer) and we replaced 0.5 mM GMPCPP by 1 mM GTP. Microtubules were incubated in this buffer for 15 min at 37 °C before replacing it with washing buffer for imaging.

### C. Estimation of the number of fluorescent dimers at incorporation sites

From the length (FWHM), the length of a tubulin dimer ( $L$ ), and the integral ( $I_{total}$ ) of the fluorescence intensity of a 10 % fluorescently labeled microtubule stretch we can estimate the fluorescence intensity emitted by a single dimer ( $I_{dimer}$ ) as  $I_{dimer} = I_{total} * L / (\text{FWHM} * 13 * 0.1)$ , assuming a 13 protofilament structure. From the integral of the fluorescence ( $I_{inc}$ ) at the incorporation spot we can deduce the number of incorporated dimers as  $N_{inc} = I_{inc} / I_{dimer}$ . Measurements were performed at two different laser intensities to get a rough error estimate.

---

[1] V. VanBuren, D. J. Odde, and L. Cassimeris, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 6035 (2002), doi:10.1073/pnas.092504999.

[2] J. Howard, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton* (Sinauer associates Sunderland, MA, 2001).

[3] D. Sept, N. A. Baker, and J. A. McCammon, Prot. Sci. **12**, 2257 (2003), doi:10.1110/ps.03187503.

[4] T. Mitchison and M. W. Kirschner, Nature **312**, 237 (1984), doi:10.1038/312237a0.

[5] R. B. Dye, P. F. Flicker, D. Y. Lien, and R. C. Williams, Cell Mot. Cytoskel. **21**, 171 (1992), doi:10.1002/cm.970210302.

[6] M. K. Gardner, B. D. Charlebois, I. M. János, J. Howard, A. J. Hunt, and D. J. Odde, Cell **146**, 582 (2011), doi:10.1016/j.cell.2011.06.053.

- [7] Z. Wu, H.-W. Wang, W. Mu, Z. Ouyang, E. Nogales, and J. Xing, *PLoS ONE* **4**, e7291 (2009), doi:10.1371/journal.pone.0007291.
- [8] H. P. Erickson, *J. Mol. Biol.* **206**, 465 (1989).
- [9] V. Hunyadi, D. Chrétien, and I. M. Jánosi, *J. Mol. Biol.* **348**, 927 (2005), doi:10.1016/j.jmb.2005.03.019.
- [10] R. A. Walker, E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson, and E. D. Salmon, *J. Cell Biol.* **107**, 1437 (1988), doi:10.1083/jcb.107.4.1437.
- [11] R. Melki, S. Fievez, and M.-F. Carlier, *Biochem.* **35**, 12038 (1996).
- [12] D. Chrétien and S. D. Fuller, *J. Mol. Biol.* **298**, 663 (2000), doi:10.1006/jmbi.2000.3696.
- [13] D. Chrétien, S. D. Fuller, and E. Karsenti, *J. Cell Biol.* **129**, 1311 (1995), doi:10.1083/jcb.129.5.1311.
- [14] D. Chrétien, F. Metz, F. Verde, E. Karsenti, and R. H. Wade, *J. Cell Biol.* **117**, 1031 (1992), doi:10.1083/jcb.117.5.1031.
- [15] A. Vemu, E. Szczesna, E. A. Zehr, J. O. Spector, N. Grigorieff, A. M. Deaconescu, and A. Roll-Mecak, *Science* **361**, eaau1504 (2018), doi:10.1126/science.aau1504.
- [16] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25**, 1605 (2004), doi: 10.1002/jcc.20084.
- [17] A. Murray, *Meth. Cell Biol.* **36**, 581 (1991).
- [18] S. F. Parsons and E. D. Salmon, *Cell Mot. Cytoskel.* **36**, 1 (1997), doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1997)36:1::AID-CM1;3.0.CO;2-E.
- [19] S. Petry, A. C. Groen, K. Ishihara, T. J. Mitchison, and R. D. Vale, *Cell* **152**, 768 (2013), doi:10.1016/j.cell.2012.12.044.

### 2.3.3. Conclusions et perspectives

L'originalité des travaux présentés dans ce chapitre a reposé sur le fait que l'étude porte sur la dynamique le long du microtubule et non pas sur les extrémités de celui-ci, ainsi que sur des microtubules non stabilisés, plus proche des conditions physiologiques. Nous avons pu mettre en évidence l'importance de la vitesse de croissance dans la génération de défauts le long du microtubule et la capacité de celui-ci à s'auto-renouveler spontanément sur toute sa longueur, sans stress extérieur.

Il est maintenant bien connu que le nombre de protofilaments formant un microtubule varie selon le nucléotide utilisé mais aussi la composition biochimique du milieu (D. Chrétien et al. 1992a). Mais il a été montré qu'au sein d'une même condition, du même microtubule, le nombre de protofilaments peut changer de manière spontanée et abrupte, le plus souvent la variation implique l'incrémentement d'un protofilament mais parfois il s'agit de 2 protofilaments. On peut ainsi passer de 13 à 14 protofilaments comme de 12 à 14 par exemple (D. Chrétien and Fuller 2000). Cette discontinuité dans le nombre de protofilaments correspond alors à un défaut structural, une dislocation à la surface du microtubule. *In vitro*, il existe aussi des défauts ponctuels, isolés, que l'on appelle des « points » défectueux, correspondant à l'absence de dimères de tubuline (Schaap, de Pablo, and Schmidt 2004) mais les translocations représentent la majorité des défauts observés. Il est possible de contrôler le nombre de ces dislocations en variant la vitesse d'élongation des microtubules (Janson and Dogterom 2004; Schaedel et al. 2015a). En effet, il a été démontré que plus la vitesse d'élongation des microtubules est élevée plus le nombre de dislocations augmente. Nous avons pu confirmer cette affirmation en microscopie électronique grâce à l'aide de Denis Chrétien et en montrant l'existence d'un renouvellement plus important pour les microtubules dont la polymérisation a été rapide. En effet, lorsque ces microtubules formés à différentes vitesses ont été mis en contact avec des dimères de tubuline libre, permettant ainsi la réparation et l'échange de dimère le long du microtubule, nous avons pu voir la présence de sites d'incorporations de nouvelle tubuline, d'autant plus nombreux lorsque la vitesse d'élongation de ces derniers a été élevée. Nous avons ainsi corrélé de manière précise le nombres de défauts structuraux avec le nombre de sites de



réparations, et par conséquent, avec le renouvellement du microtubule. Nous avons aussi montré que le taux de renouvellement dépend du nombre de défauts initiale, de la concentration de tubuline libre disponible et du temps d'exposition de celle-ci. Enfin nous avons montré que ce renouvellement du microtubule existe dans un modèle plus physiologique, dans lequel nous avons toutes les protéines associées aux microtubules. Pour cela nous avons utilisé de l'extrait d'œuf de xénope comme milieu pour faire croître des microtubules. Les expériences d'incorporations sur ces microtubules ont montré que de nouveaux dimères de tubuline se sont effectivement incorporés le long du microtubule, avec une fréquence deux fois plus élevée que dans les mêmes conditions *in vitro*. Cette observation laisse à penser que différents mécanismes et acteurs peuvent être impliqués dans ce processus de renouvellement *in vivo*. Et qu'une synergie entre la dynamique interne spontanée et le recrutement de certaines MAPs pourrait expliquer cette augmentation de la dynamique *in vivo*. Nous verrons dans le chapitre suivant le rôle possible des moteurs moléculaires dans le renouvellement de la paroi des microtubules. Le choix des moteurs a été basé sur l'hypothèse qu'une part de l'énergie utilisée par les moteurs pour se déplacer pouvait être dédiée à la destruction de la paroi du microtubule.

### 3. Chapitre 3 : Les moteurs moléculaires et leurs rôles dans la régulation de la dynamique des microtubules.

#### 3.1. Introduction : pourquoi étudier l'effets des moteurs moléculaires sur la paroi du microtubule ?

La présence de renouvellement du microtubule sur sa longueur *in vivo* (Dimitrov et al. 2008; Aumeier et al. 2016), et le fait que celle-ci soit plus importante en comparaison avec les observations *in vitro* (Schaedel et al. 2019) laisse imaginer que des mécanismes supplémentaires à l'auto-renouvellement spontané entrent en jeu dans le contrôle de la dynamique des microtubules dans la cellule. Le fait que le renouvellement et donc le rajeunissement des microtubules dépendent de la quantité de défauts le long du microtubule est une observation particulièrement importante, car elle met l'accent sur un mécanisme contre-intuitif qui consisterait à abimer une structure pour pouvoir la réparer et la maintenir en perpétuel renouvellement.

Des études récentes, ainsi que nos travaux montrent donc qu'il existe une fragilité de la paroi du microtubule et donc un très haut degré de plasticité du microtubule sur toute sa longueur. Cela ouvre de nombreuses perspectives sur la régulation de cette plasticité par des protéines associées aux microtubules. En effet, il a récemment été montré que les moteurs moléculaires pouvaient changer les propriétés du microtubule, en changeant la conformation de celui-ci (Peet, Burroughs, and Cross 2018) et il est communément admis que les moteurs, en se déplaçant sur le microtubules, convertissent de l'énergie chimique en énergie mécanique. Appliquant ainsi des forces sur le microtubule (Visscher, Schnitzer, and Block 1999; M. Schnitzer, Visscher, and Block 2000). C'est la raison pour laquelle nous avons pensé que les moteurs moléculaires pourraient amplifier le phénomène de renouvellement de la paroi des microtubules par le mécanisme de destruction/réparation.

Le trafic cellulaire est un mécanisme complexe et primordial pour le bon fonctionnement cellulaire. Principalement il s'agit de transport de vésicules ou de membranes entre les différents organites. Le trafic cellulaire peut être décomposé en quatre étapes principales : la déformation

de la membrane, le tri des éléments à transporter (grâce à un peptide signal dans la séquence d'acide aminés qui est reconnu par des récepteurs protéiques spécifiques), le transport à proprement dit et enfin la fusion avec la membrane réceptrice. Dans ce manuscrit je n'introduis que la 3<sup>ème</sup> étape, le transport, en me concentrant sur l'effet des moteurs moléculaires sur le microtubule, lorsqu'ils sont fixés ou lorsqu'ils se déplacent sur le microtubule.

Le transport cellulaire s'effectue dans deux sens, du centre de la cellule vers son extrémité et inversement (Hirokawa 1998)(figure 34). Globalement, le transport antérograde, du golgi vers le réticulum endoplasmique est assuré par les kinésines ("Kinesin Is the Motor for Microtubule-Mediated Golgi-to-ER Membrane Traffic [Published Errata Appear in J Cell Biol 1995 Mar;128(5):Following 988 and 1995 May;129(3):893]" 1995). Ainsi celles-ci se déplacent vers l'extrémité plus du microtubule. A l'inverse, le transport rétrograde, du RE vers le Golgi, est principalement assuré par les dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité moins du microtubule (Paschal and Vallee 1987).

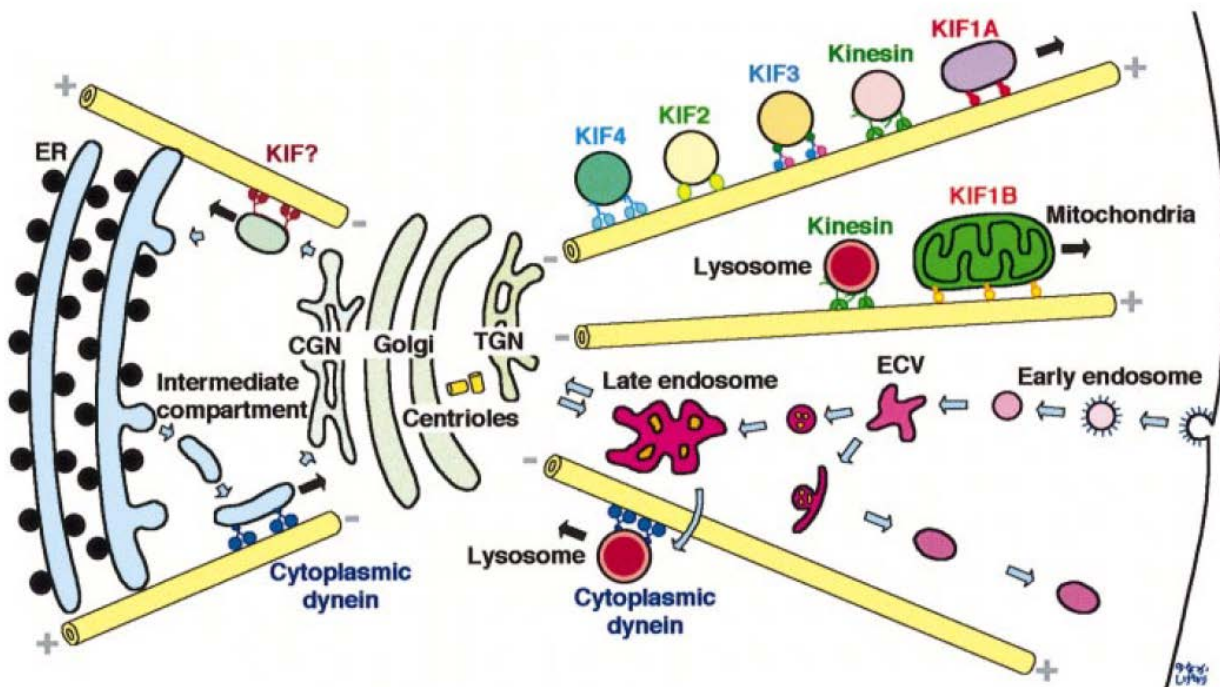
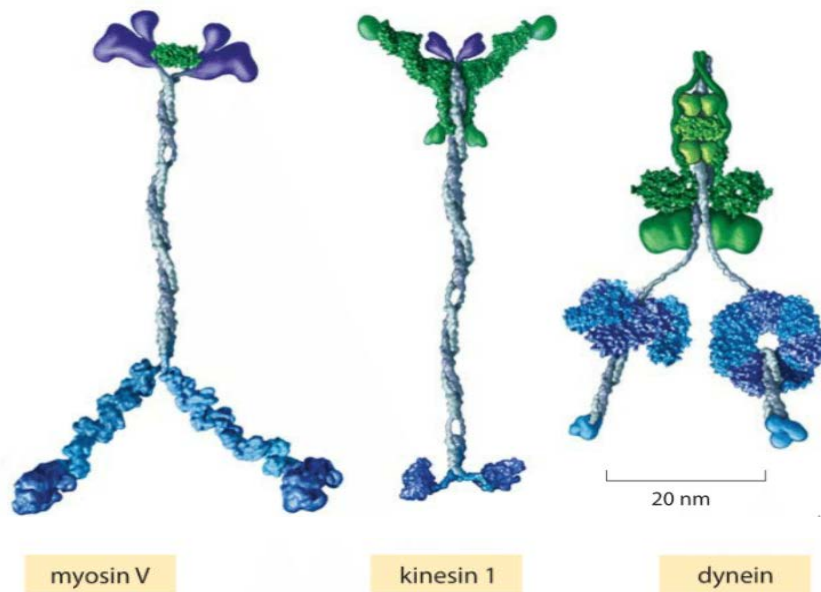


Figure 34 : Schéma représentant le transport bidirectionnel dans la cellule. Avec les kinésines qui marchent sur les microtubules en direction de l'extérieur de la cellule et les dynéines qui se déplacent vers le centre de la cellule. (Adapté de Hirokawa 1998).

### 3.2. Le transport cellulaire

Les moteurs moléculaires englobent les kinésines, les dynéines et les myosines. Ce sont des enzymes, capables de convertir de l'énergie chimique (l'hydrolyse de nucléotide ATP ou GTP) en énergie mécanique. Ce processus de transduction chimico-mécanique induit une réaction cyclique d'une molécule motrice avec un polymère du cytosquelette ; un microtubule dans le cas des dynéines et des kinésines et un filament d'actine dans le cas de la myosine (figure 35) (Vale 2003).



*Figure 35 : Représentation des trois moteurs moléculaires cellulaire. De gauche à droite, la myosine, la kinésine-1 et la dynéine. (Adapté de Vale 2003).*

Dans la suite de ce manuscrit nous nous bornerons à l'étude de l'effet des moteurs sur la dynamique interne du microtubule, et donc sur l'étude des kinésines et des dynéines.

L'une des principales différences entre les kinésines et les dynéines est la direction du transport ; les kinésines se déplacent généralement vers l'extrémité plus du microtubule (déplacement antérograde) alors que les dynéines se déplacent vers l'extrémité moins du microtubule (déplacement rétrograde) (figure 36).

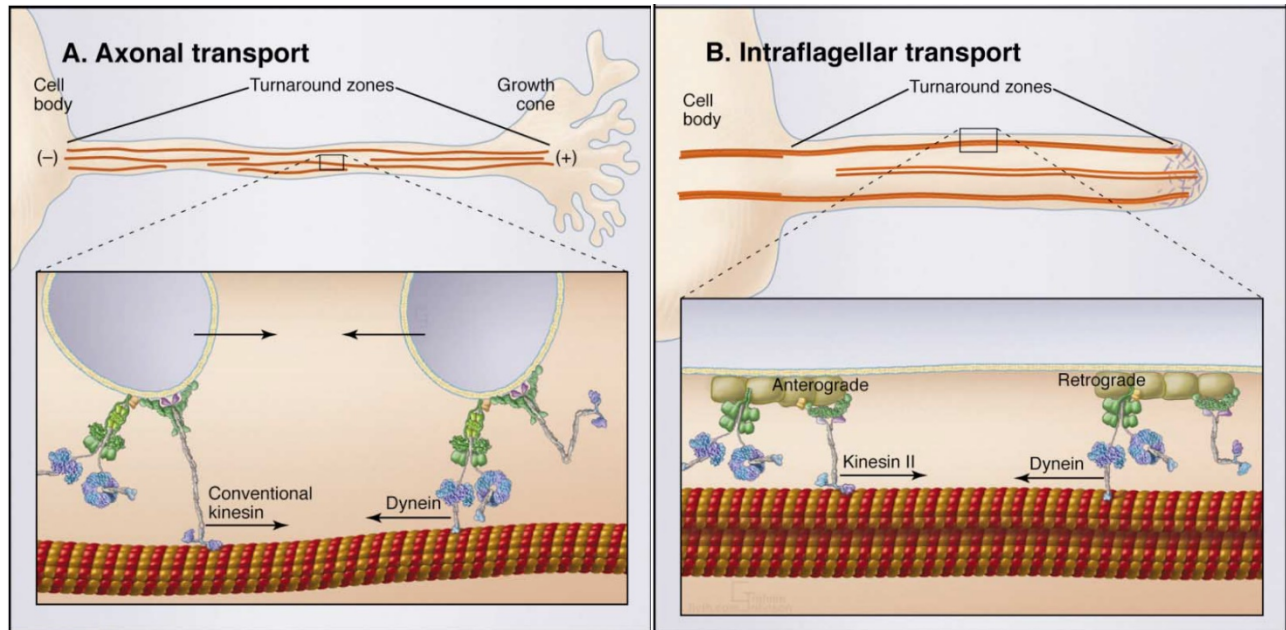


Figure 36 : Schéma représentant la coordination de transport opposé dans l'axone ou le flagelle. Les kinésines conventionnelles se dirigent vers l'extrémité plus des microtubules alors que les dynéines font le trajet inverse. (Adapté de Vale 2003).

Le rôle essentiel attribué aux kinésines et aux dynéines est le transport cellulaire et leur interaction avec le microtubule lors de ce transport. Récemment, les moteurs moléculaires (surtout les kinésines) ont été décrits pour jouer un rôle sur la dynamique du microtubule à ses extrémités (Marceiller et al. 2005; Gupta et al. 2006; Helenius et al. 2006; Stumpff et al. 2007; Gardner et al. 2011). Cependant très peu d'études adressent l'effet éventuel des moteurs sur la dynamique intrinsèque du microtubule et plus particulièrement de sa paroi. De plus, l'utilisation très répandue de microtubules stabilisés a longtemps limité la capacité des expériences mises en œuvre à identifier un potentiel effet des moteurs sur la stabilité et la dynamique de la paroi du microtubule. Mais les travaux récents notamment dans notre laboratoire portant sur cette dynamique interne du microtubule ouvrent de nombreuses questions et champs de recherches. Il a par exemple été récemment montré que les moteurs étaient sensibles à la conformation de la tubuline, qu'ils sont capables de reconnaître et d'avoir une affinité plus forte pour une conformation particulière ; et qu'ils sont capables d'induire un changement de conformation de la paroi du microtubule (Liang et al. 2016; Peet, Burroughs, and Cross 2018; Shima et al. 2018).

En effet, la paroi du microtubule a longtemps été considérée comme inerte mais il est maintenant admis que le microtubule est dynamique sur toute sa longueur. Etant donné que les moteurs se déplacent sur cette paroi dynamique et fragile, il est naturel de se demander s'ils sont capables de déstabiliser celle-ci.

### 3.3. Les moteurs moléculaires.

Avant de présenter mes résultats je vais introduire les moteurs moléculaires. Il m'a paru plus logique de ne pas les introduire précédemment car cette partie n'était pas nécessaire dans la compréhension de mes premiers résultats et du premier papier décrit (chapitre 2).

#### 3.3.1. La super famille des kinésines.

Les kinésines sont des moteurs moléculaires découverts lors de travaux remarquables dans les années 80 (Vale, Reese, and Sheetz 1985). La kinesine-1 a été la première à être identifiée par ce groupe de chercheurs. Ils ont pu montrer que ces moteurs étaient capables de déplacer, de propulser des microtubules sur une lame de verre à une vitesse de 0.3 à 0.5  $\mu\text{m/s}$ . En effet, les kinésines, comme les autres moteurs moléculaires, vont utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour générer des forces et ainsi des mouvements.

De manière générale les kinésines sont composées de trois domaines :

- Un domaine moteur conservé (tête motrice), il présente une homologie de séquence en acides aminés qui peut atteindre 60% entre les différentes kinésines. Ce domaine contient la poche nucléotidique (là où se lie l'ATP) et est le principal domaine d'interaction avec le microtubule.

- Un domaine central, correspondant à une longue chaîne formant une double hélice (le coiled-coil). Il est impliqué dans l'oligomérisation des kinésines et peut se lier aux cargos.
- Un domaine carboxy-terminal ou la queue (tail), différent d'une kinésine à une autre, est le principal responsable de la reconnaissance et de la liaison aux cargos.

Les kinésines font partie d'une superfamille (KIFs) composée de 45 familles (Miki et al. 2001; Lawrence et al. 2004; Daire and Poüs 2011) (figure 37). Les familles de kinésines ont des rôles autant cruciaux que différents dans le fonctionnement cellulaire. Par exemple, bien que la majorité des kinésines soit connue pour marcher le long des microtubules dans le but de transporter du matériel cellulaire, certaines comme les membres de la famille des kinésines 13 ne sont pas pourvues de mobilité mais diffusent sur le microtubule et induisent une dépolymérisation des deux extrémités de celui-ci (Helenius et al. 2006). Chez les mammifères, les kinésines sont regroupées en trois classes en fonction de la position de leur domaine moteur, nous avons ainsi des :

- Kinésines-N ou conventionnelles, dont le domaine moteur est dans la partie N-terminale de la molécule et qui se déplacent conventionnellement vers l'extrémité plus du microtubule. La majorité de ces kinésines sont impliquées dans le transport cellulaire.
- Kinésines-M, dont le domaine moteur est dans la partie interne de la molécule et qui ont une action de dépolymérase sur le microtubule.
- Kinésines-C, dont le domaine moteur est dans la partie C-terminale de la molécule et qui se déplacent vers l'extrémité moins du microtubule.

Kinesin family	Kinesin names	Effect on MT dynamics
Kinesin-1	Conventional kinesin, kinesin-1, KHC, KIF5B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promotes MT elongation by activating JNK</li> <li>- Transports CRMP2 which promotes MT assembly and axon growth</li> <li>- Contributes to APC localization at MT plus ends and thus indirectly involved in MT stabilization</li> </ul>
Kinesin-2	Heterotrimeric kinesin with KIF3A, KIF3B and KAP3 KIF17	<ul style="list-style-type: none"> <li>- KIF3 and KIF17 contribute to APC localization at MT plus ends and thus indirectly involved in MT stabilization</li> <li>- KIF3 transports pVHL which reduces catastrophes and increases rescue frequency</li> <li>- KIF17 moderately decreases MT growth rates</li> </ul>
Kinesin-4	KIF27	<ul style="list-style-type: none"> <li>- KIF27 binds to Fu, which is essential for building the central pair of MTs in cilia axonemes</li> </ul>
Kinesin-5	KIF7 (zebrafish, mammalian) Cin8p, Kip1p (Budding yeast) Eg5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- KIF7 contributes to Gli activation and stathmin expression</li> <li>- Destabilize MTs by promoting catastrophes</li> </ul>
Kinesin-7	CENP-E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promotes MT elongation in vitro</li> </ul>
Kinesin-8	Kip3 (Budding yeast)  Klp5 Klp6 heterocomplex (Fission yeast) Klp67A ( <i>Drosophila</i> )  KIF18A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Depolymerizes MTs in a length-dependent manner</li> <li>- Promotes catastrophes/rescue frequencies and inhibits MT growth</li> <li>- Promotes catastrophe/rescue frequencies, no change in MT growth or shrinking rate</li> <li>- Length-dependent increase in the catastrophe frequency</li> <li>- Inhibits spindle flux at the minus end</li> <li>- Decreases the length of interpolar MTs, their sliding rate, and spindle elongation during the anaphase</li> <li>- Depolymerizes MTs in a length-dependent manner</li> <li>- Limits poleward kinetochore movements in anaphase</li> <li>- Decreases the duration of each phase of dynamic instability (except pauses that are longer), and promotes catastrophes/rescue</li> </ul>
Kinesin-13	Klp10A, Klp59C ( <i>Drosophila</i> )  KIF2A, KIF2B, KIF2C = MCAK,	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Klp10A acts predominantly on MT minus ends at spindle poles to disrupt spindle MT turnover</li> <li>- Klp59C and Klp67A concentrate proximally to plus ends but Klp59C is not a flux suppressor like Klp67A</li> <li>- Induces a conformational change of tubulin into a bent conformation, and hence depolymerize MTs, from both MT ends</li> <li>- Promotes catastrophes and sequesters tubulin</li> <li>- Uses lattice diffusion to target MT ends</li> <li>- Controls spindle bipolarity</li> </ul>
Kinesin-14	KIFC2, KIFC3, HSET Kar 3 (Budding yeast) Ncd ( <i>Drosophila</i> ) XCTK2 ( <i>Xenopus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minus end-directed MT motors</li> <li>- Needed in mitosis and in meiosis to organize with kinesin-5 anti-parallel MTs together in spindle</li> <li>- Cross-link MTs to form stable contacts between parallel MTs near the spindle poles and cause sliding between anti-parallel MTs in the spindle midzone</li> <li>- Sequestered in the nucleus during interphase</li> <li>- Targeted by the non-motor subunit Cik1 to the plus ends to depolymerize MTs, each tubulin-subunit release event being coupled to one ATP turnover</li> </ul>
Other kinesins	Kip2p (Budding yeast) tea2p (Fission yeast)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favor elongation and stabilize MTs by targeting CLIP-170 analogues to the plus ends</li> </ul>

Figure 37 : Tableau récapitulatif des différentes kinésines impliquées dans le contrôle de la dynamique des microtubules. (Issu de Daire and Poüs, 2011).



Certaines kinésines vont former des homo-dimères (kinésine 14), d'autres des hétéro-trimères composés de deux têtes motrices et d'un adaptateur (kif3a, kif3b), d'autres encore peuvent être sous forme monomérique (kif1a) ou dimérique *in vivo*. La kinésine-1 est le moteur moléculaire le plus décrit, c'est un hétéro-tétramère composé de 2 chaînes lourdes de 120 kDa (KHC pour kinesin heavy chain) et de 2 chaînes légères de 70 kDa (KLC pour kinesin light chain). Les chaînes lourdes sont chacune constituées d'un domaine moteur qui se lie au microtubule et qui contient le site de fixation à l'ATP (en N-terminal de la protéine), d'un cou, d'une longue chaîne qui forme une double hélice (le coiled-coil) et une queue en C-terminal qui va interagir avec les cargos. Les chaînes légères sont coté C-terminal de la protéine, au niveau de la queue des chaînes lourdes (figure 38). Elles sont aussi impliquées dans l'interaction avec les cargos et régulent l'activité de la kinésine. Vale et al. ont montré qu'elle était capable de se lier aux microtubules et qu'en présence d'ATP, elle était capable de se déplacer et transporter des particules le long de celui-ci en direction de son extrémité plus (Vale, Reese, and Sheetz 1985).

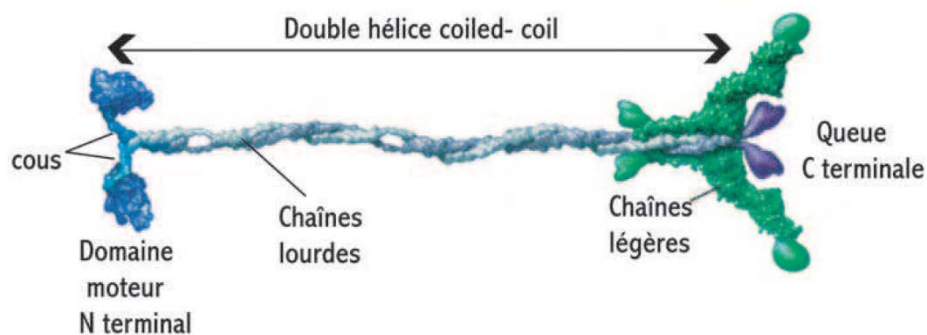


Figure 38 : Structure de la Kinésine-1. Sont représentées en bleu les chaînes lourdes, en vert les chaînes légères. (Adapté de Vale 2003).

La kinésine peut avoir deux conformations, compactée et repliée ou allongée. La forme compacte est la forme la moins active, en effet les queues des chaînes lourdes ainsi que les chaînes légères vont venir inhiber le domaine moteur de la kinésine, le moteur est donc bloqué, sous une forme inactive (Dietrich et al. 2008)(figure 39). La liaison de la kinésine à son cargo va lever cette inhibition (Verhey et al. 1998; Cai et al. 2007; Dietrich et al. 2008; Watanabe, Yanagida, and Iwane 2010) (figure 40).

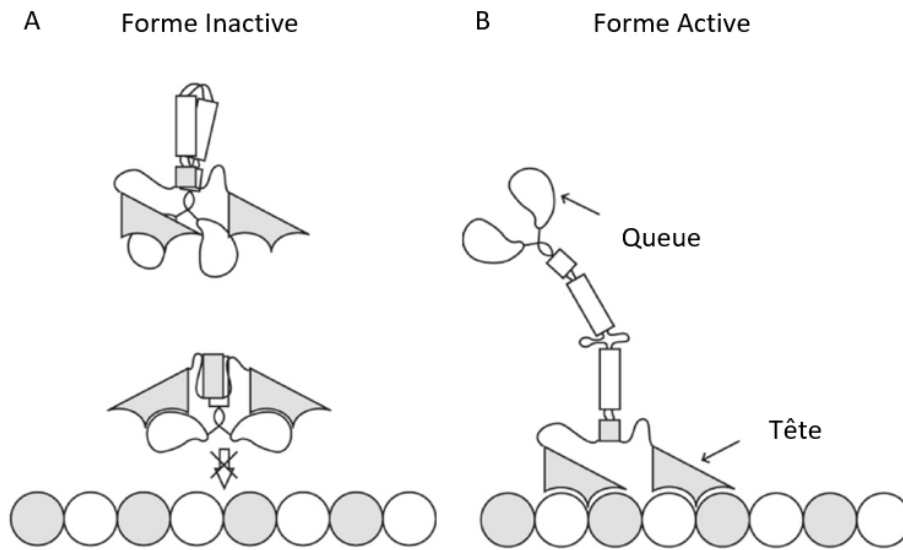


Figure 39 : Schéma représentant les formes repliées ouvertes d'une Kinésine. (A) Forme inactive, incapable de se lier au microtubule. (B) Forme active, les têtes sont capables de se lier au microtubule. (Adapté de Watanabe et al. 2010).

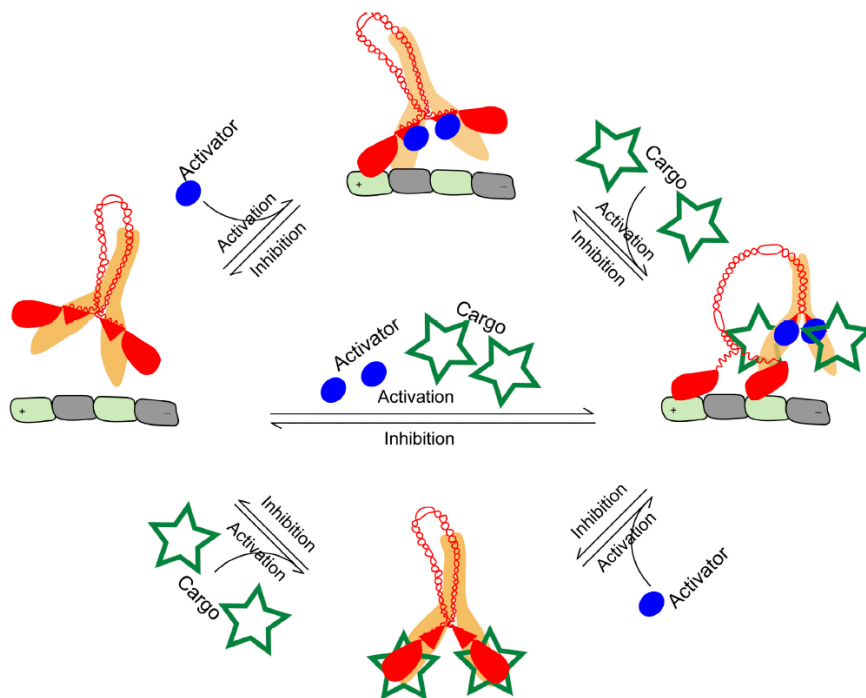


Figure 40 : Modèle de l'activation de la kinésine-1. L'activation de la kinésine-1 nécessite un détachement des queues des chaînes lourdes et des chaînes légères. Pour cela, il faut qu'elle se fixe à son cargo et son activateur, qui peuvent agir de manière séquentielle (voie représentée en haut et en bas) ou de manière simultanée (voie du milieu). (Adapté de Cai et al. 2007).

La kinésine-1, comme la plupart des kinésines conventionnelles se déplace sur le microtubule selon un modèle appelé « Hand over hand ». C'est-à-dire que les deux têtes motrices se déplacent l'une après l'autre, effectuant ainsi des pas avec l'une des deux têtes, pendant que le second reste lié au microtubule, empêchant ainsi que le moteur ne se détache complètement et n'arrête son déplacement (figure 41). Ce mouvement coordonné permet à la kinésine de marcher de manière processive le long du microtubule (Vale and Milligan 2000).

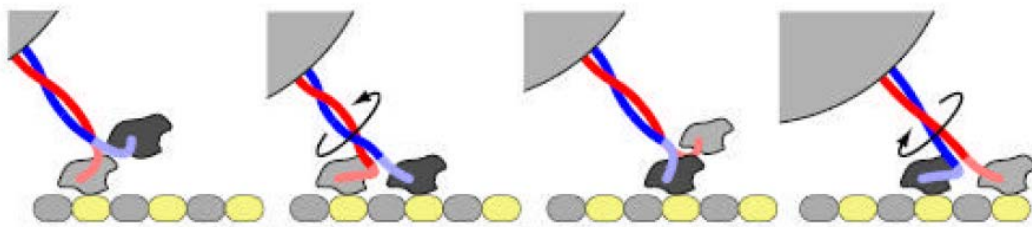


Figure 41 : Schéma représentant le déplacement d'une kinésine. L'une des deux têtes motrices (gris clair) est liée au microtubule pendant que l'autre pivote, vient se fixer à son tour sur le dimère suivant, et ainsi de suite. (Adapté de Asbury, Fehr, and Block 2003).

Ainsi, pour chaque pas effectué, la kinésine hydrolyse une molécule d'ATP lui permettant d'avancer (Hua et al. 1997). La tête motrice liée au microtubule va lier une molécule d'ATP, ensuite celle-ci va être hydrolysée en ADP + Pi (une molécule de phosphate). Lorsque ce dernier va être libéré, la tête motrice va se détacher, pivoter et venir se fixer au dimère de tubuline suivant (figure 42).

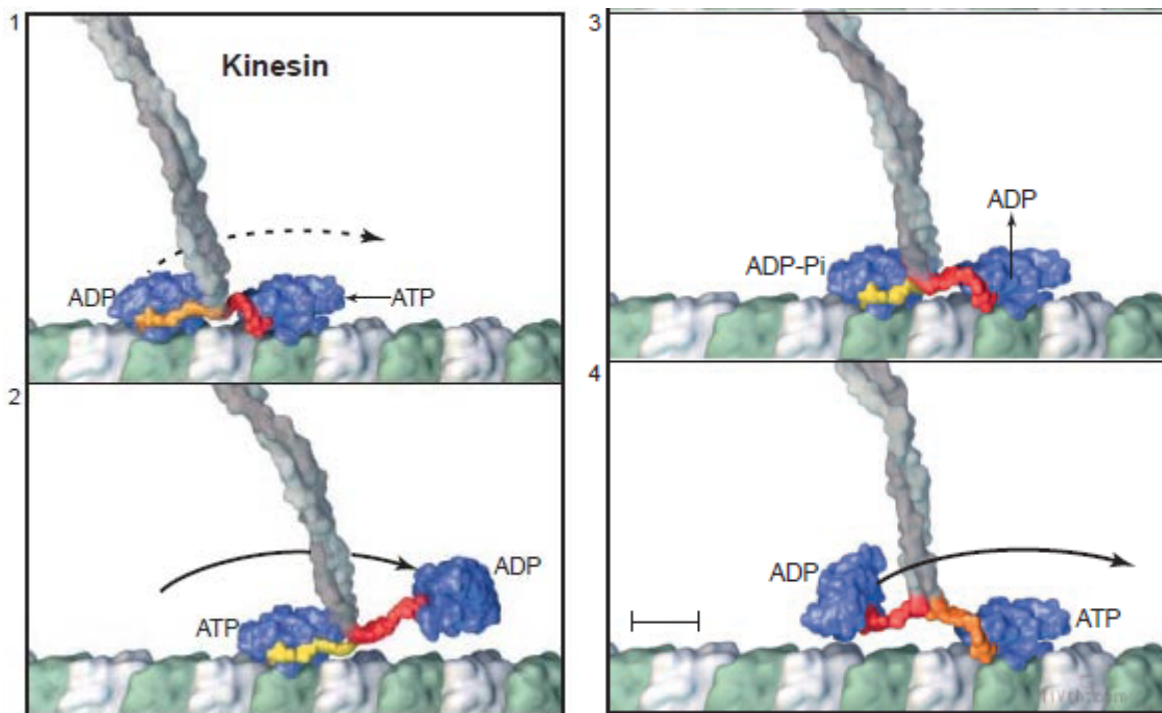


Figure 42 : Modèle du mouvement d'une kinésine conventionnelle couplé à l'hydrolyse de l'ATP. 1) Chaque tête motrice (bleu) est liée le long d'un protofilament du microtubule. La liaison d'une molécule d'ATP à la tête en avant va initier la rotation du cou de la kinésine. 2) La rotation est terminée, ce qui a emmené la tête arrière en avant, la projetant ainsi sur le prochain site de fixation, soit le dimère de tubuline suivant. 3) Cette fixation permet le relargage de l'ADP de la tête motrice avant. L'ATP de la tête arrière va être hydrolysé en ADP + Pi. 4) Une molécule d'ATP se lie alors à la tête motrice en avant, ce qui entraîne une rotation du cou de la kinésine, et projette la tête arrière (après dissociation du phosphate inorganique) en avant. Et ainsi de suite. (Adapté de Vale and Milligan 2000).

Pour chaque molécule d'ATP, la kinésine avance en moyenne de 8 nm (M. J. Schnitzer and Block 1997; N. Carter and Cross 2005; Toleikis, Carter, and Cross 2019), ce qui correspond à la longueur d'un dimère de tubuline (figure 43). Le nombre de pas que peut faire le moteur avant de se détacher du microtubule caractérise sa processivité. Par exemple, la kinésine-1 va en moyenne faire 100 pas avant de se détacher du microtubule (Taylor and Borisy 2000).

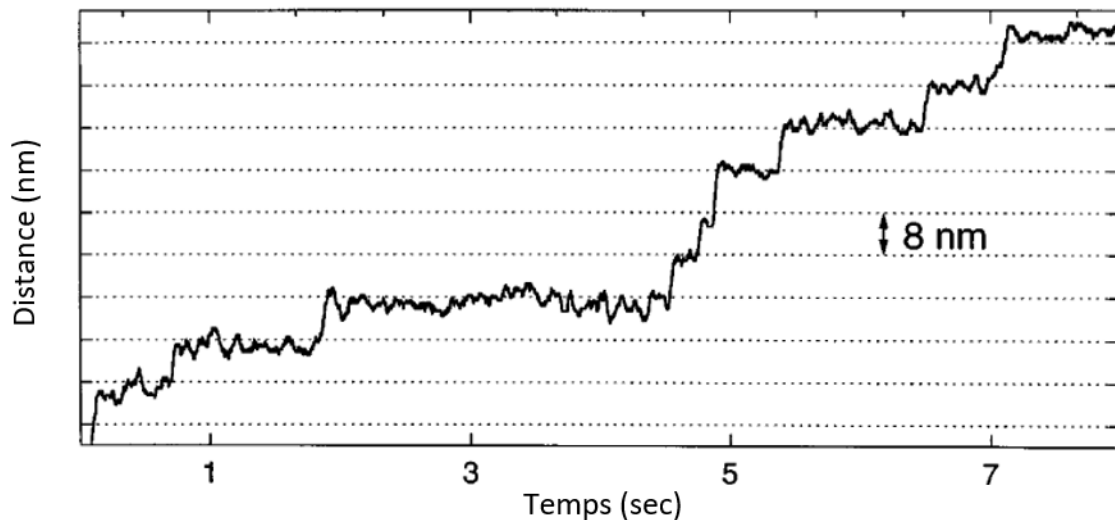


Figure 43 : Exemple d'enregistrement du mouvement d'une kinésine en présence d'ATP, montrant la distance parcourue pour chaque pas. Les lignes horizontales sont espacées de 8 nm. (Adapté de M. J. Schnitzer and Block 1997).

La distance parcourue par un moteur ainsi que sa vitesse dépendent notamment de la concentration en ATP ou encore de la charge qui lui est associée (M. Schnitzer, Visscher, and Block 2000). La vitesse par exemple va augmenter à mesure que la concentration en ATP augmente et diminuer à mesure que la charge augmente (figure 44).

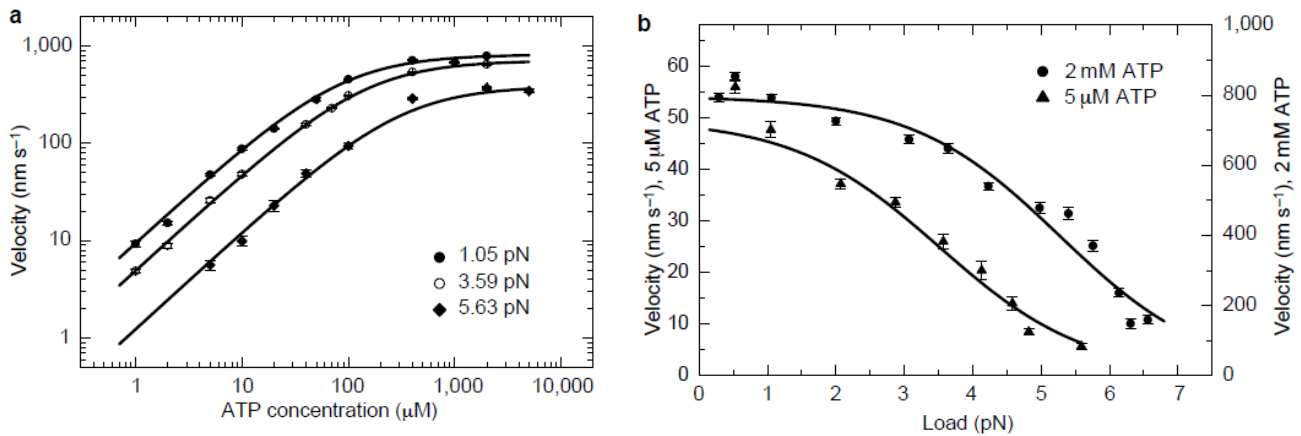


Figure 44 : Vitesse en fonction de la concentration en ATP (A) et de la charge (B). (Adapté de M. Schnitzer, Visscher, and Block 2000).

Howard et al. ont étudié les propriétés biophysiques de la kinésine, et ont pu montrer, quelques années après sa découverte, que la force exercée par un seul moteur sur un microtubule pour le propulser lorsque celui-ci bouge à une vitesse de 600 nm/s est de 2-3 fN par μm de microtubule (“Movement of Microtubules by Single Kinesin Molecules | Nature” n.d.). Des expériences de pinces optiques ont pu montrer qu’une kinésine unique était capable de générer une force pouvant aller jusqu’à 6 pN (figure 45). Ces expériences ont aussi mis en évidence que la longueur des pas peut être variable (jusqu’à 16 nm, voir 24 nm) et que sous une contrainte de charge, les pas peuvent être en avant (antérograde) ou vers l’arrière (rétrograde) (Coppin et al. 1997). Cependant, une étude récente montre qu’il ne s’agit pas là de réels pas mais d’une diffusion du moteur (Tolcikis, Carter, and Cross 2019)(figure 45).

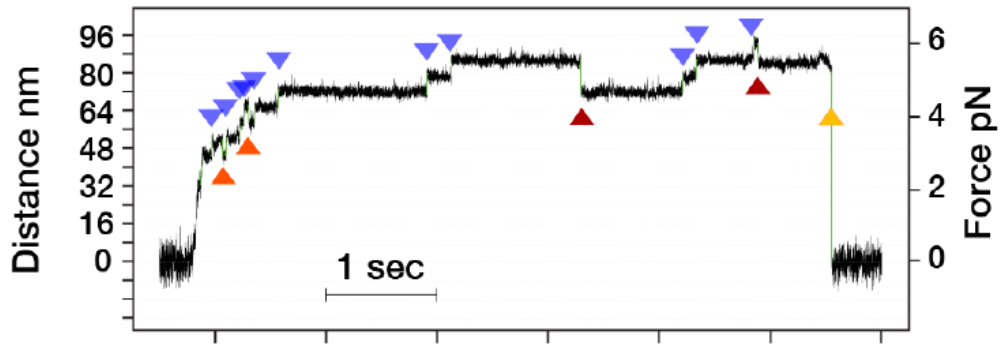


Figure 45 : Progression d'une molécule unique de kinésine sur un microtubule stabilisé au taxol, contre une force appliquée grâce à une pince optique. On distingue les mouvements antérogrades (bleue), mouvements rétrogrades courts (orange) et long (bordeaux). A un moment donné (flèche jaune) la molécule se détache du microtubule. On constate que la force maximale exercée par le moteur est ici de 6 pN. (Adapté de Toleikis, Carter, and Cross 2019).

*In vitro* les forces générées et la durée d'attachement de la Kinésine-1 ont été montrées comme dépendantes de la géométrie de la force et du microtubule en lui-même. En effet, les propriétés d'une kinésine changent en fonction de la composition du microtubule (Taxol, GMPCPP, GDP..)(Tolcikis, Carter, and Cross 2019) mais aussi en fonction de « l'état » du microtubule, qui, lorsqu'il est sous tension (étiré) induit une augmentation de la processivité du moteur marchant sur celui-ci. Ainsi le moteur reste plus longtemps sur le microtubule et la force maximale générée est maintenue plus longtemps (Pyrpassopoulos, Shuman, and Ostap 2020)(figure 46).

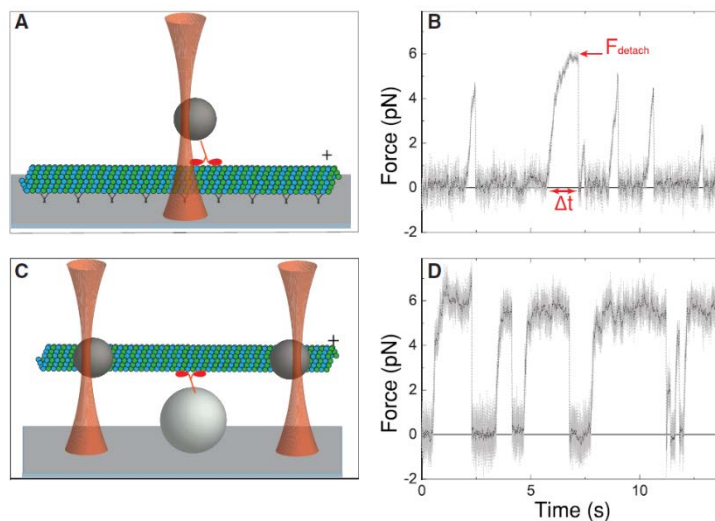


Figure 46 : Expériences de pinces optiques avec une bille ou trois billes. Permettant d'étudier l'effet des directions et des angles, des forces qui s'appliquent au moteur et au microtubule. Le microtubule est représenté en bleue, les billes en gris, les pinces optiques sont représentées par les faisceaux oranges et la kinésine en rouge. (A) Le moteur est attaché à une bille qui est capté par la pince optique. Le moteur se déplace sur un microtubule stabilisé à la surface de la lamelle. En (B) le tracé de la progression du moteur correspondant. Avec la force  $F$  maximale générée par la kinésine avant qu'elle ne se détache et  $\Delta t$  le temps pendant lequel la kinésine applique cette force. (C) Modèle représentant l'expérience à 3 billes. Un microtubule est attaché à deux billes elles-mêmes capturées par les faisceaux de deux pinces optiques. Le microtubule n'est donc pas attaché à la membrane, il est étiré entre les deux faisceaux optiques, ce qui augmente les forces verticales. Une kinésine liée à une bille est mise en contact avec le microtubule. En (D) le tracé de la progression du moteur montre que la kinésine atteint plus fréquemment des forces supérieures à 5 pN ( $F_{\text{detach}}$ ) et qu'elle reste attachée au microtubule plus longtemps ( $\Delta t$ ). (Adapté de Pyrpassopoulos, Shuman, and Ostap 2020).



### 3.3.2. Les moteurs qui se dirigent vers l'extrémité moins du microtubule

Nous verrons dans la suite de ce chapitre que dans nos expériences d'essai de motilité, l'utilisation de moteurs se dirigeant vers l'extrémité plus du microtubule n'était pas possible. L'effet « déstabilisateur » de ces moteurs sur l'extrémité plus du microtubule masque leurs effets potentiels sur la paroi des microtubules. En effet, nous travaillons sur des microtubules stabilisés uniquement à leurs extrémités par un « cap » GMPCPP (analogue non-hydrolysable du GTP). Mais la transition entre le microtubule GTP et ce cap GMPCPP, correspond à un changement de conformation, soit un défaut, qui est amplifié par le passage des moteurs, induisant ainsi la perte de ce cap et la dépolymérisation totale du microtubule.

C'est la raison pour laquelle j'ai utilisé des moteurs qui se dirigeaient vers l'extrémité moins. Nous avons alors étudié l'effet de 2 moteurs, l'un sous forme d'agrégat (klp2), l'autre sous forme de molécule unique (dynéines).

#### 3.3.2.1. Klp2 (Kinesin-like protein 2)

Comme vu précédemment, certaines kinésines, se déplacent vers l'extrémité moins du microtubule, notamment les kinésines de la famille des kinésines 14. Parmi elles, la kinésine Klp2 (Kinesin-like protein 2) qui est une protéine de levure (*S.pombe*) impliquée dans l'organisation et le maintien de la polarité des faisceaux de microtubules (Carazo-Salas, Antony, and Nurse 2005; Braun et al. 2009).

Elle possède un domaine moteur en C-terminal et un domaine de liaison au microtubule en N-terminal (figure 47), qui lui permet de faire un pont entre deux microtubules et de les faire glisser entre eux, ceci favorise la création de microtubule en faisceaux (Braun et al. 2009).

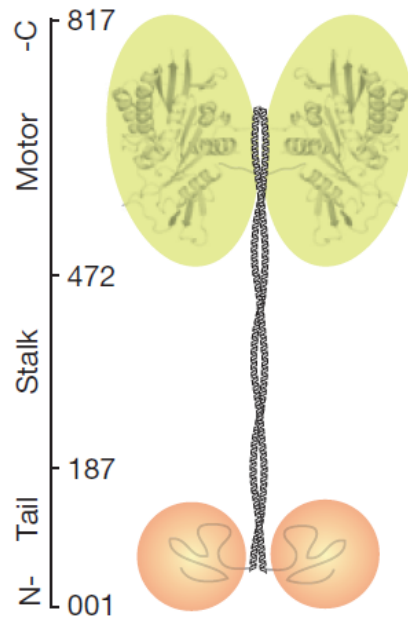


Figure 47 : Schéma de la structure de Klp2. En vert le domaine C-terminal (moteur), en orange le domaine N-terminal (queue) et le coiled-coil entre les deux. (Adapté de Braun et al. 2009).

### 3.3.2.2. Les dynéines

Les dynéines sont des moteurs moléculaires découverts par Ian Gibbons en 1965 (Gibbons and Rowe 1965). Bien qu'ils aient été découverts avant les kinésines, ils n'ont été isolés et purifiés qu'en 1987. ("MAP 1C Is a Microtubule-Activated ATPase Which Translocates Microtubules in Vitro and Has Dynein-like Properties" 1987). Contrairement aux kinésines et aux myosines, les détails structuraux et mécanistiques du mouvement des dynéines sont peu connus. En effet les dynéines divergent de leurs cousins et ne font pas partie de la même branche évolutive (Vale and Milligan 2000).

Les dynéines sont des moteurs moléculaires primordiaux à la fonction cellulaire (Laan et al. 2012). Elles sont responsables de la grande majorité des mouvements en direction de l'extrémité moins des microtubules dans les cellules eucaryotes. Elles transportent une grande variété de cargos, qui peuvent être composés de molécules de signalisation, d'organelles, d'ARN mais aussi de Virus. Elles sont aussi impliquées dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des

chromosomes (Vallee et al. 2004). La perte partielle de la fonction des dynéines est impliquée dans l'apparition de dysfonctionnement grave, conduisant à des troubles tels que la lissencephalie ou encore la schizophrénie (Gerdes and Katsanis 2005; Vallee et al. 2004).

Les dynéines sont des ATPases qui font partie de la famille des AAA+ (Neuwald et al. 1999; Burgess et al. 2003; Roberts et al. 2009). Leur domaine moteur est constitué de 6 à 7 domaines AAA+ (A. P. Carter et al. 2011), 4 de ces domaines peuvent lier l'ATP (Takahashi, Edamatsu, and Toyoshima 2004). Le domaine AAA1 est le principale site d'hydrolyse (figure 48). Une coiled-coil stalk de 10 à 15 nm de long émerge du domaine AAA4, à son extrémité se trouve un site de liaison au microtubule (Gennerich et al. 2007).

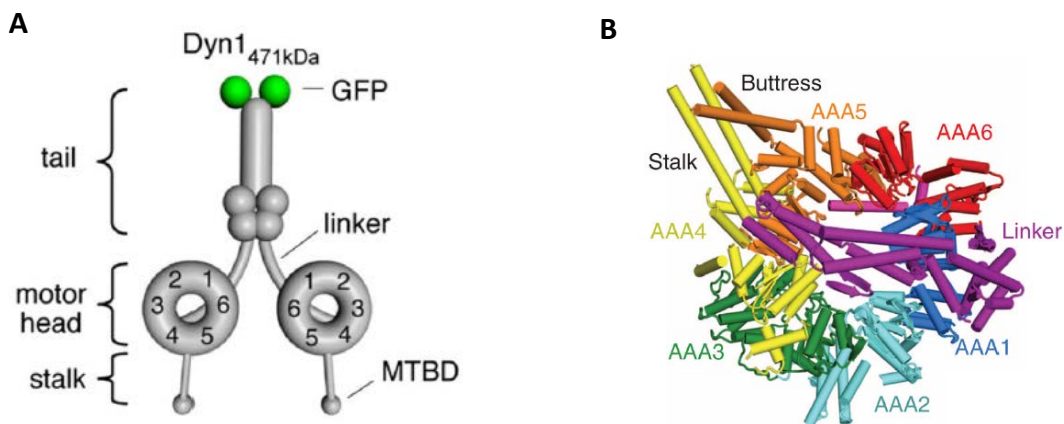
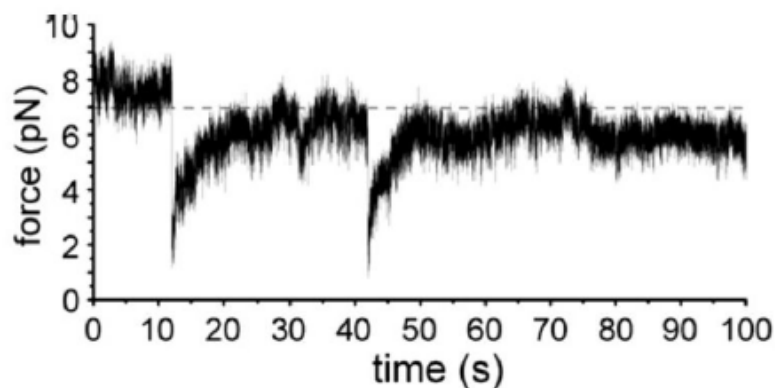


Figure 48 : (A) Schéma d'un dimère de dynéine où l'on peut voir de haut en bas, la queue (ici marquée avec un fluorophore GFP), les domaines moteurs formant un cercle, et le domaine de liaison au microtubule (MTBD pour microtubule binding domain). (Adapté de Gennerich et al. 2007). (B) Modèle représentant les six domaines AAA de couleurs différentes. (Adapté de Carter et al. 2011).

La région NH2 terminale des chaînes lourdes des dynéines est impliquée dans la dimérisation de celle-ci mais aussi de l'interaction avec d'autres protéines associées et les cargos. Cette région étant aussi le lien avec le domaine AAA suggère qu'elle pourrait être responsable de la force générée par le moteur.

Comme pour les kinésines, il est possible de déterminer les paramètres caractérisant les dynéines, il a ainsi été montré que les dynéines peuvent générer des forces jusqu'à 7pN (figure 49), qu'elles étaient capables de se déplacer sur les microtubules de manière processive grâce aux mouvements alternatifs de ces deux domaines moteurs, avec un pas de 8 nm (Reck-Peterson et al. 2006). Cependant, il a été démontré, que contrairement aux kinésine-1 dont le pas est régulier, les pas des dynéines sont variables en termes de taille et de direction, et ce en fonction de la conformation du moteur et de la localisation du marquage. En effet il peut être petit, 8nm, correspondant à la taille d'un dimère de tubuline ou grand, 16 nm, correspondant en réalité à un seul mouvement pour deux cycles d'ATPase. Il est aussi très intéressant de constater que 20% des dynéines sont aussi capables de se déplacer latéralement et en arrière (Reck-Peterson et al. 2006; Gennerich et al. 2007).



*Figure 49 : Graphe montrant le déplacement d'une molécule unique de dynéine en présence d'ATP. On peut voir que la force maximale est de 7 pN, et que la dynéine s'est détaché deux fois du microtubule. (Adapté de Gennerich et al. 2007).*

Les dynéines peuvent être sous différentes conformations, une conformation dites « Phi » qui est une version auto-inhibée de la dynéine, qui a très peu d'affinité pour le microtubule ; et une conformation dite « ouverte », qui est capable de se fixer au microtubule mais qui ne sera pas processive (figure 50). Cette forme ouverte va devoir se lier à un activateur pour pouvoir être

processive. En effet *in vivo* les dynéines ne peuvent assurer le transport que si elles forment un complexe avec la dynactine (“Dynactin, a Conserved, Ubiquitously Expressed Component of an Activator of Vesicle Motility Mediated by Cytoplasmic Dynein” 1991; Kardon, Reck-Peterson, and Vale 2009). Ce complexe est régulé par des adaptateurs comme BicD2 ou BicDR1 par exemple (Elshenawy et al. 2019; K. Zhang et al. 2017) (figure 51).

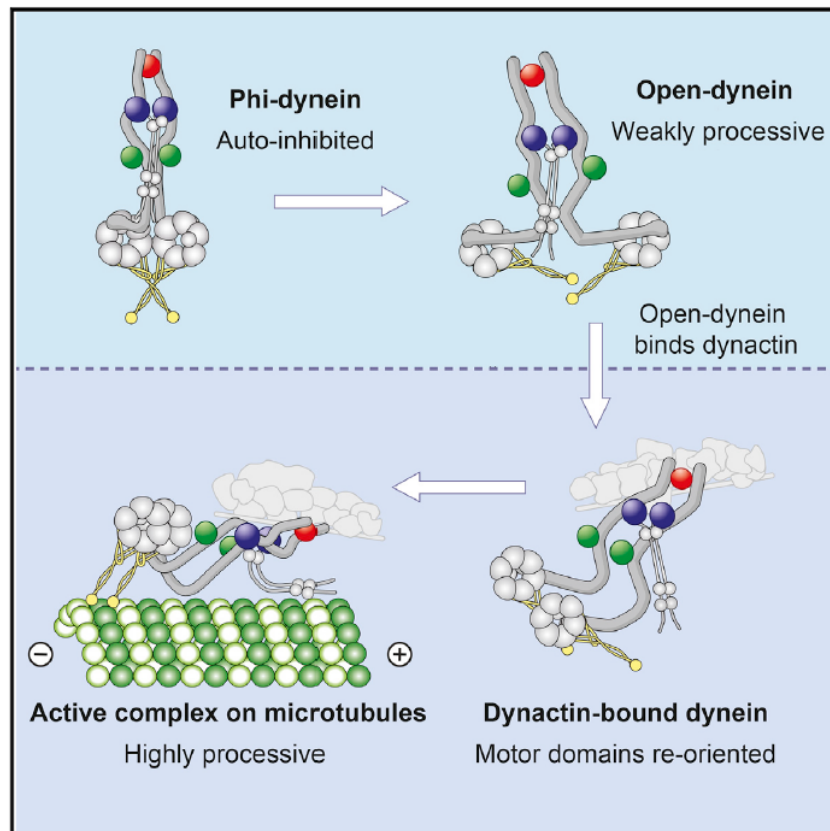


Figure 50 : Représentation d’une dynéine sous sa forme « phi » (en haut à gauche), qui va changer de conformation pour être en conformation « ouverte » (en haut à droite) puis se lier à la dynactine pour pouvoir être processive. (Adapté de K. Zhang et al. 2017).

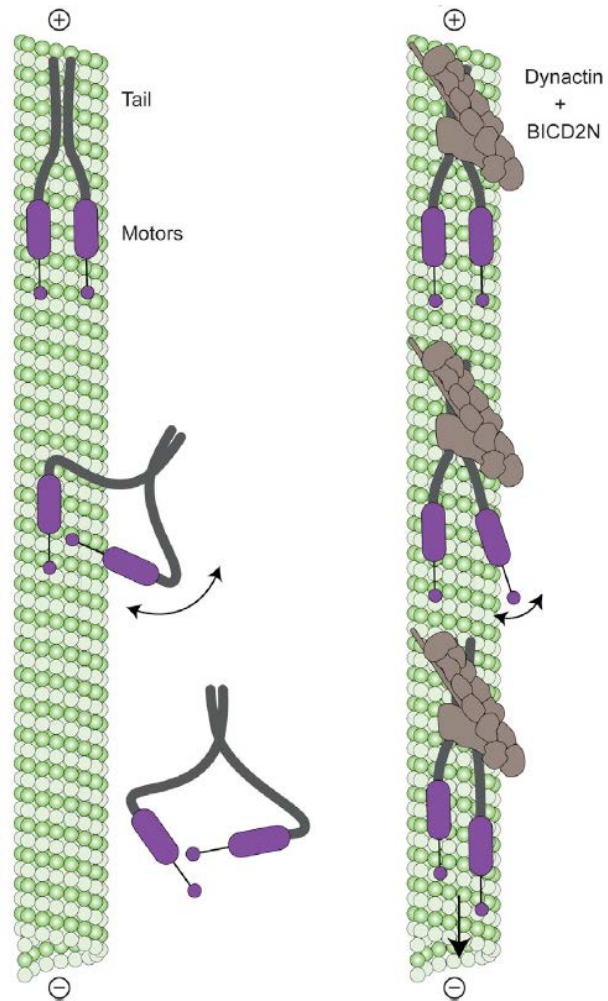


Figure 51 : Schéma représentant une dynéine en conformation « ouverte » liée au microtubule (vert) mais qui n'est pas processive et va se détacher rapidement de celui-ci (à gauche). Représentation d'une dynéine liée à la dynactine et à BICD2N, qui permettent de maintenir la dynéine dans une conformation parallèle, bien plus processive (à droite). (Adapté de K. Zhang et al. 2017).

### 3.4. Effet des moteurs moléculaires sur la dynamique des microtubules

Le rôle des kinésines et plus généralement des moteurs moléculaires est primordial *in vivo*, ils ont un rôle dans le transport cellulaire mais aussi dans la régulation de la dynamique et de la stabilité des microtubules. La grande majorité des moteurs ayant une action sur la régulation de la dynamique des microtubules, ont une action sur les extrémités de ceux-ci. Par exemple, la kinésine-1 va avoir une action à l'extrémité plus du microtubule, où elle favorise la croissance de celui-ci ; au contraire HSET de la famille des kinésines-14 va agir sur l'extrémité moins et la stabiliser. Les kinésines peuvent aussi avoir une action déstabilisatrice, comme les kinésines de type -8, -13 et -14 (Gardner et al. 2011). Récemment, il a été montré que des Kinésines de type 5 stimulent la dépolymérisation du microtubule. Les kinésine-13 facilitent le désassemblage du microtubule pendant la mitose, certaines kinésines comme les kinésines-8, -14 et -5 sont plus spécifiquement impliquées dans la mitose et sont contrôlées par les Kinases mitotiques. (Les sous familles des kinésines sont détaillées dans tableau, figure 37) (Lawrence et al. 2004; Daire and Poüs 2011). Les kinésines-8 contrôlent la dynamique du microtubule, elles se déplacent sur le microtubule en allant vers l'extrémité plus, où elles favorisent la dépolymérisation de celui-ci (Stumpff et al. 2007; Gupta et al. 2006; Varga et al. 2009). Les kinésines Kip3 ou Klp5/6 (*S.cerevisiae*) modulent la fréquence de catastrophe et de sauvetage (rescue) à l'extrémité plus.

Il existe une grande variabilité d'effets sur les microtubules (tableau figure 37). Certaines ont besoin d'adaptateurs pour être activés ; d'autres pour les aider à traverser le trafic cellulaire dense (crowding), ou encore pour augmenter leur efficacité, en augmentant par exemple la vitesse de déplacement ou la distance parcourue (Henrichs et al. 2020; Hooikaas et al. 2019).

Rare sont les études portant sur l'effet des moteurs moléculaires et sur le dynamique interne du microtubule. Récemment des équipes se sont plus particulièrement intéressées à l'effet des moteurs sur celle-ci mais aussi à l'effet de l'état de la paroi sur le comportement des moteurs. Ainsi il a été montré que la kinésine-1 était capable d'induire un changement de conformation de la tubuline (Peet, Burroughs, and Cross 2018) et qu'elle était sensible à la présence de défauts le long de la paroi des microtubules (Gramlich et al. 2017). En effet, les kinésines qui rencontrent

un défaut ont tendance à se dissocier plus facilement des microtubules. Ceci laisse penser qu'il existe un feedback entre structure des microtubules et propriétés des moteurs moléculaires qui les parcours.



### 3.5. Article : L'auto-réparation du microtubule le protège de la destruction par les moteurs moléculaires. Triclin et al., Nature Material, janvier 2021

#### 3.5.1. Introduction

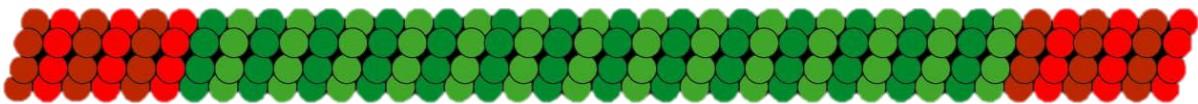
Pendant ma thèse j'ai donc étudié la dynamique des microtubules le long de la paroi. J'ai tout d'abord étudié cette dynamique sur des microtubules uniquement agités par le mouvement brownien, c'est-à-dire sans élément (stimuli) extérieur qu'il soit mécanique (Schaedel et al. 2015a) ou moléculaire (Vemu et al. 2018). Puis je me suis intéressée à l'effet d'un composant cellulaire primordial, le moteur moléculaire sur la dynamique de la paroi du microtubule. En effet, il est l'un des acteurs principaux du fonctionnement cellulaire et plus particulièrement du fonctionnement des microtubules. Les kinésines et les dynéines sont impliquées dans divers mécanismes mais celui dont je me suis particulièrement intéressée pendant ma thèse est le déplacement de ces moteurs lors du transport cellulaire. Ce dernier est un processus contrôlé et polarisé qui permet de faire transiter au sein de la cellule les composants nécessaires à son fonctionnement, il peut s'agir de molécules, de vésicules ou encore d'organites. Lors de ce transport les moteurs moléculaires marchent sur le microtubule qui leur sert de route.

Le microtubule est couramment considéré comme étant une structure quasi-cristalline parfaite mais en réalité c'est une structure fragile, ayant des défauts et dont les défauts peuvent évoluer, que ce soit vers la disparition du celui-ci (réparation) ou vers son aggravation (disparition du microtubule par dépolymérisation). Le microtubule est donc une base fragile pour les moteurs moléculaires lors de leur passage.

Basé sur ce constat, je me suis demandé si les microtubules pouvaient être sensibles aux moteurs qui les parcourent perpétuellement. En effet, lors de son déplacement, le moteur hydrolyse de l'ATP, l'énergie générée pendant cette hydrolyse est supérieure à l'énergie nécessaire à son déplacement (Block 2007). Alors qu'en est-il de cette énergie résiduelle ? Notre hypothèse est que cette énergie supplémentaire, est transférée au microtubule et induirait la coupure de liaison entre les dimères de tubuline facilitant ainsi leur dissociation de la paroi.

Jusqu'à aujourd'hui il n'a jamais été démontré que de tels évènements pouvaient influencer sur la dynamique le long du microtubule. En particulier car la plupart des études menées sur l'interaction des microtubules avec leurs moteurs moléculaires associés sont faites sur microtubules stabilisés (taxol ou GMPCPP) ou en présence de tubuline libre, ce qui a pour conséquence de masquer de potentiels effets.

C'est la raison pour laquelle ici nous nous sommes concentrés sur l'effet des moteurs moléculaires sur les parois de microtubules non stabilisés sur toute leur longueur. J'ai donc généré des microtubules dont j'ai uniquement bloqué la dynamique aux extrémités pour qu'ils soient suffisamment stables pour réaliser mes études (figure 52).



*Figure 52: Schéma d'un microtubule non stabilisé sur sa longueur (vert) et stabilisé à ses deux extrémités (rouge).*

J'ai ainsi étudié l'effet des moteurs sur la paroi du microtubule dans deux types de modèles expérimentaux :

- Le « gliding assay » où les moteurs individuels sont immobilisés sur la lamelle par leurs queues et dont les têtes motrices sont libres (figure 53). Elles peuvent alors interagir avec les microtubules. Ce sont donc les microtubules qui se déplacent, propulsés par les moteurs.

La vitesse et le déplacement des microtubules dépendant ici de la concentration en ATP ou encore de la densité de kinésines à la surface de la lamelle (Kaneko et al. 2020).

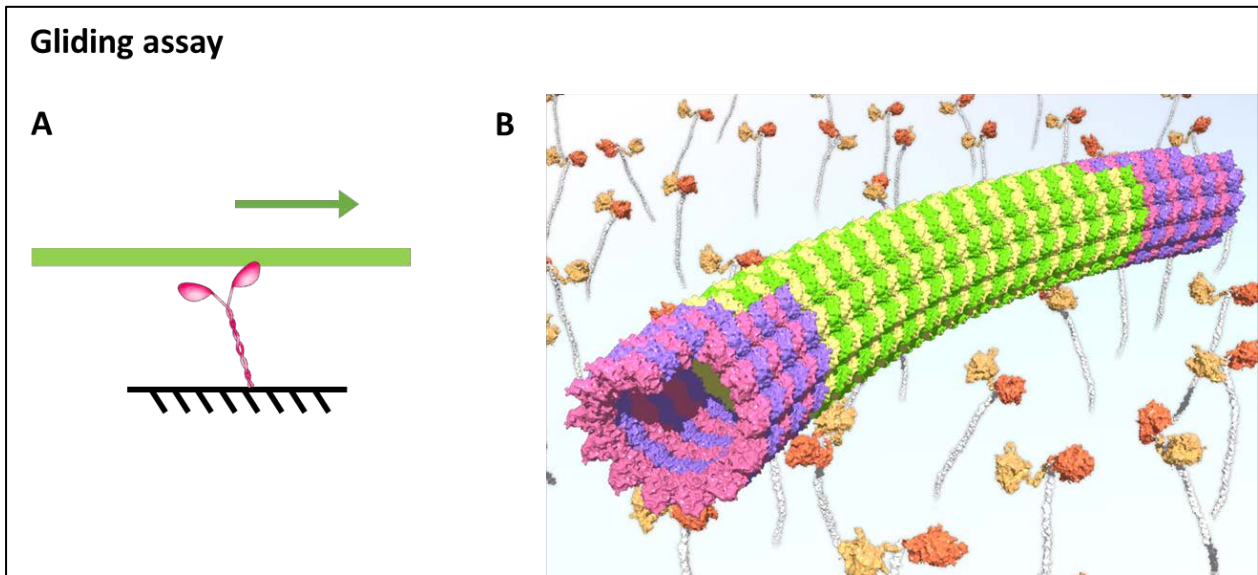


Figure 53 : Expérience de "Gliding Assay". (A) Schéma simplifié représentant l'expérience de gliding assay, en noir la surface (lamelle) sur laquelle est fixé un moteur (rouge). Un microtubule (vert) se déplace, propulsé par le moteur. (B) Illustration du gliding assay (D. Inoue).

- Le « motility assay » où les microtubules sont attachés par l'une de leurs extrémités à la lamelle et les moteurs se déplacent librement dessus (figure 54).
  - Cette expérience a été faite dans un premier temps avec un moteur qui a tendance à s'oligomériser et ainsi former des agrégats. Agrégats pouvant représenter une vésicule ou une bille recouverte de moteurs (« bead assay »). Cette expérience permet de voir l'effet des moteurs dans un contexte de déplacement de cargo, ou en plus de l'effet des têtes motrices, nous avons des forces de tensions et de torsions dues à l'action simultanée de plusieurs moteurs (qui n'ont pas tous la même vitesse, certains peuvent être à l'arrêt pendant que d'autres avancent).
  - Puis elle a été faite avec des moteurs uniques. Ce qui permet de voir l'effet de la force de molécules uniques sur la dynamique des microtubules.

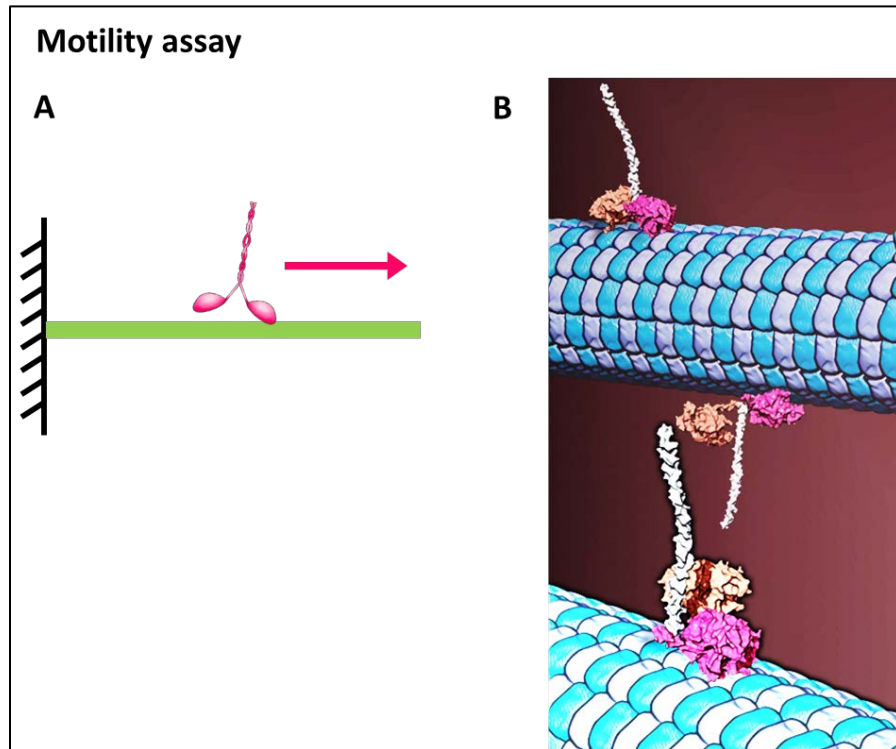
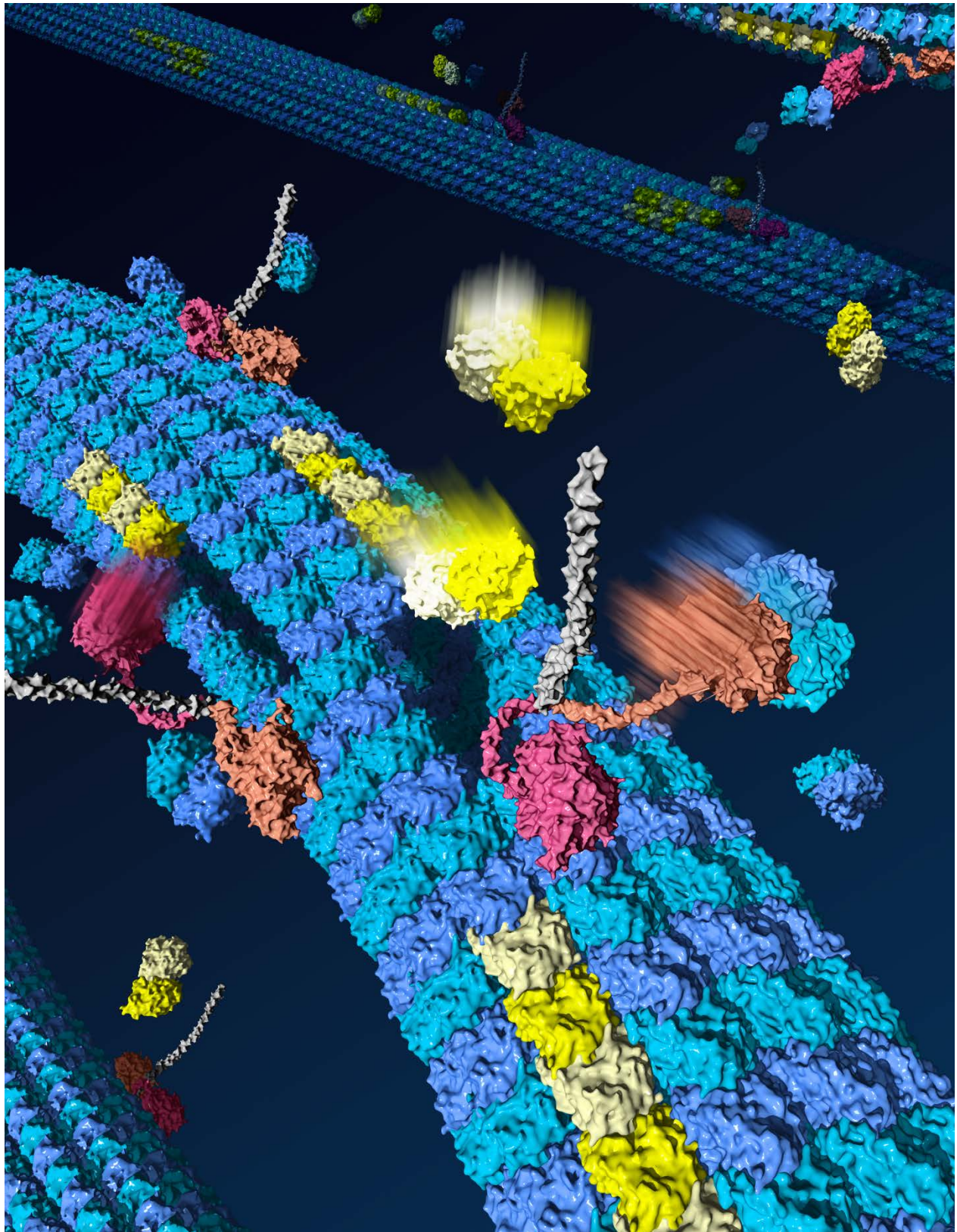


Figure 54 : Expérience de "Motility Assay". (A) Schéma simplifié représentant l'expérience de motility assay, en noir la surface (lamelle) sur laquelle est fixé un microtubule par l'extrémité moins (vert). Un moteur (rouge) se déplace sur le microtubule. (B) Illustration du motility assay (D. Inoue).

### 3.5.2. Manuscrit



D. Inoue



# Self-repair protects microtubules from destruction by molecular motors

Sarah Triclin<sup>1,11</sup>, Daisuke Inoue<sup>1,2,11</sup>, Jérémie Gaillard<sup>1</sup>, Zaw Min Htet<sup>3</sup>, Morgan E. DeSantis<sup>3</sup>, Didier Portran<sup>4</sup>, Emmanuel Derivery<sup>5</sup>, Charlotte Aumeier<sup>6</sup>, Laura Schaedel<sup>1</sup>, Karin John<sup>7</sup>, Christophe Letierrier<sup>8</sup>, Samara L. Reck-Peterson<sup>3,9</sup>, Laurent Blanchoin<sup>1,10</sup>✉ and Manuel Théry<sup>1,10</sup>✉

**Microtubule instability stems from the low energy of tubulin dimer interactions, which sets the growing polymer close to its disassembly conditions. Molecular motors use ATP hydrolysis to produce mechanical work and move on microtubules. This raises the possibility that the mechanical work produced by walking motors can break dimer interactions and trigger microtubule disassembly. We tested this hypothesis by studying the interplay between microtubules and moving molecular motors in vitro. Our results show that molecular motors can remove tubulin dimers from the lattice and rapidly destroy microtubules. We also found that dimer removal by motors was compensated for by the insertion of free tubulin dimers into the microtubule lattice. This self-repair mechanism allows microtubules to survive the damage induced by molecular motors as they move along their tracks. Our study reveals the existence of coupling between the motion of molecular motors and the renewal of the microtubule lattice.**

Molecular motors can alter microtubule growth and shrinkage<sup>1</sup>. Kinesins impact microtubule growth by regulating the dynamics of dimer addition or the recruitment of macromolecular complexes at microtubule ends<sup>1,2</sup>. Dyneins, the other family of microtubule-based motor, can capture microtubule plus ends and induce slow microtubule depolymerization<sup>3</sup>. The kinesin-13 and kinesin-8 families actively depolymerize microtubules by removing dimers at the microtubule ends<sup>4,5</sup>. These motors travel along the shaft and modulate the microtubule dynamics as they reach the microtubule ends, but have not been shown to have any impact on the microtubule shaft. However, thermal forces are sufficient to promote the removal of tubulin dimers from the lattice<sup>6</sup>, and motors locked into a non-moving state are capable of expanding the microtubule lattice<sup>7,8</sup>, suggesting that the mechanical work produced by moving motors could impact the stability and dynamics of a microtubule shaft.

In vitro studies showed that microtubules can lose protofilaments or dimers as they glide on layers of motors<sup>9,10</sup>. However, in those experiments, as in most in vitro studies of the mechanical forces produced by molecular motors, microtubules were stabilized in order to block microtubule depolymerization<sup>11</sup>. These conditions do not reflect the physiological conditions in which GTP-tubulin is rapidly hydrolysed to GDP-tubulin following tubulin dimer incorporation at the growing microtubule end. Because the GDP-tubulin lattice is less stable than that with GTP-tubulin, lattice dismantling may be more frequent than suggested by early experiments. Here we set out to study the impact of mechanical forces produced by kinesin and dynein motors on microtubules under conditions where the lattice would be made up of GDP-tubulin. We started by using microtubule 'gliding assays', where motors are attached to the glass

surface of a small flow cell. Upon the addition of microtubules and ATP the forces produced by active motors result in microtubule gliding across the motor-coated surface.

## Molecular motors can destroy non-stabilized microtubules

We first performed gliding assays with the plus-end-directed human kinesin-1 on microtubules stabilized either with taxol (Fig. 1a(i)) or by assembling microtubules with guanylyl 5'-( $\alpha$ , $\beta$ )-methylenediphosphonate (GMPCPP)-bound tubulin, which traps tubulin in a state that mimics stable GTP-bound tubulin (Figure 1a(ii)). The total amount of microtubules did not change during the time-course of the assay in either condition (Fig. 1b,c and Supplementary Video 1). Next, to study the response of GDP-lattice microtubules, we capped microtubules on both ends with a short microtubule section consisting of GMPCPP-tubulin, which protects microtubules from depolymerizing from their ends (Fig. 1a(iii) and Methods). These capped GDP-microtubules started depolymerizing within minutes of initiating the gliding assay (Fig. 1b,c and Supplementary Video 2). Fifteen minutes later, no microtubules were detectable on the slide (Fig. 1b). The destruction of microtubules in contact with surface-bound motors appeared to depend on the ATP concentration (Supplementary Fig. 1a) and could not be observed in the absence of gliding, as previously reported<sup>7</sup>.

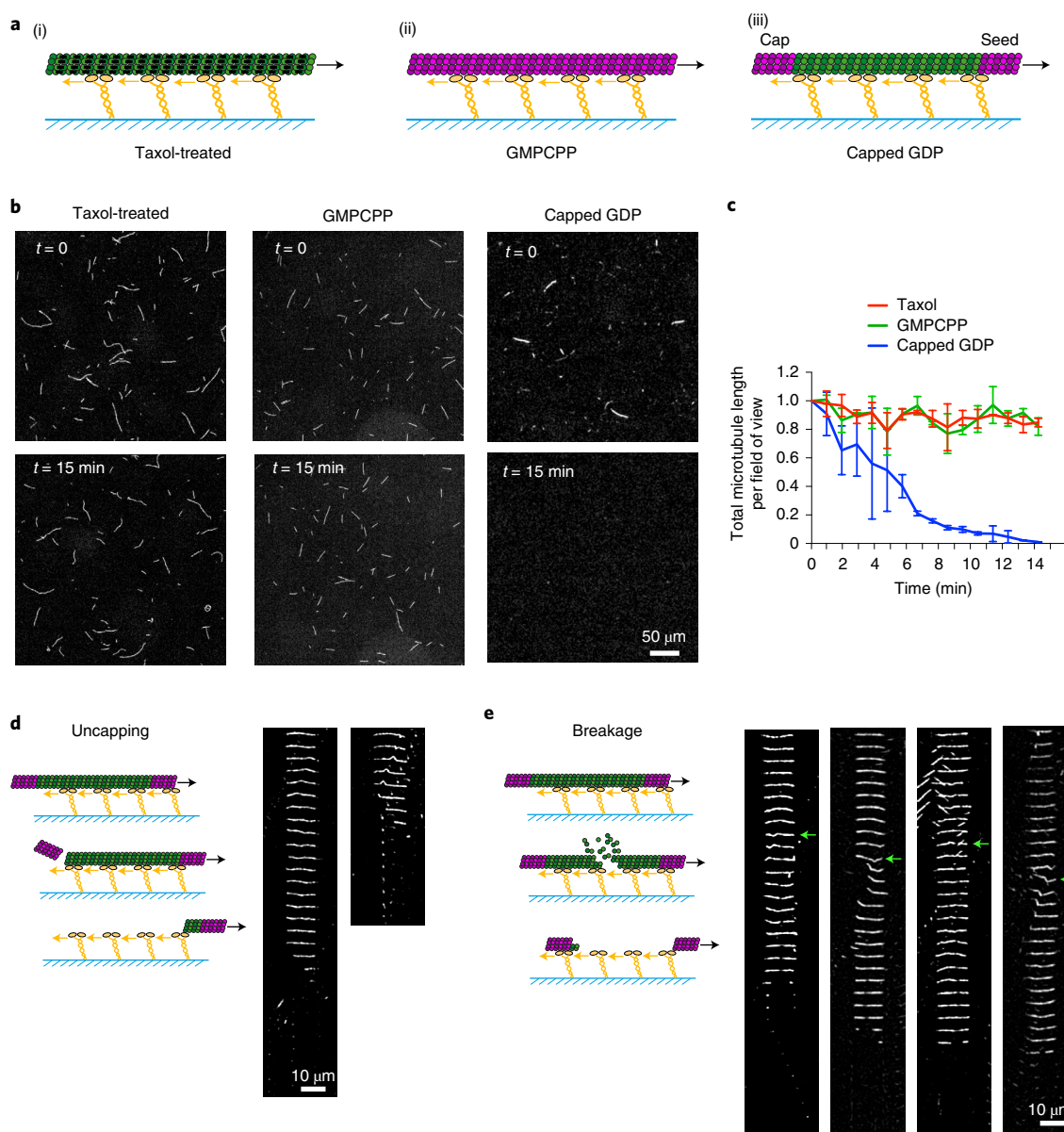
To investigate the mechanism leading to the disassembly of GDP-microtubules, we tracked individual microtubules gliding on kinesin-1, which moves towards the plus ends of microtubules. The majority of the microtubules appeared to depolymerize from their plus end (Fig. 1d), consistent with a previous report suggesting that kinesin-1 can trigger the loss of tubulin dimers at the end of

<sup>1</sup>Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, CytoMorpho Lab, University of Grenoble-Alpes, CEA, CNRS, INRA, Grenoble, France. <sup>2</sup>Department of Human Science, Faculty of Design, Kyushu University, Fukuoka, Japan. <sup>3</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine, and Cell and Developmental Biology Section, Division of Biological Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA.

<sup>4</sup>CRBM, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France. <sup>5</sup>MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK.

<sup>6</sup>Department of Biochemistry, University of Geneva, Genève, Switzerland. <sup>7</sup>Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, University of Grenoble-Alpes, CNRS, Grenoble, France. <sup>8</sup>Aix-Marseille University, CNRS, Marseille, France. <sup>9</sup>Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD, USA. <sup>10</sup>Institut de Recherche Saint Louis, U976 Human Immunology Pathophysiology Immunotherapy (HIPI), CytoMorpho Lab, University of Paris, INSERM, CEA, Paris, France.

<sup>11</sup>These authors contributed equally: Sarah Triclin, Daisuke Inoue. ✉e-mail: [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr); [manuel.thery@cea.fr](mailto:manuel.thery@cea.fr)



**Fig. 1 | Gliding assays destroy non-stabilized microtubules.** **a**, Schematic representation of the different types of microtubules used in gliding assays. Taxol-treated (purple) microtubules (i) and GMPCPP-microtubules (magenta dimers; ii) are stabilized along their length. Capped GDP-microtubules (iii) are stabilized at their ends (magenta dimers) but the central part (green dimers) is not stabilized. Molecular motors (yellow) are attached to the cover glass (blue) and propel the microtubules along the glass surface in the presence of ATP. **b**, Images of gliding microtubules when motors are activated by the addition of ATP (time  $t = 0$ , top row) and 15 minutes later ( $t = 15$  min, bottom row) in the three conditions described in **a**. Scale bar,  $50 \mu\text{m}$ . **c**, Quantification of microtubule length variations in the experiments shown in **b**. The microtubule lengths were measured for all microtubules in the  $600\text{-}\mu\text{m}$ -wide fields every minute over 15 minutes. Values were normalized with respect to the initial length. Number of independent experiments  $N = 2$ ; taxol-treated microtubules  $n = 55$ ; GMPCPP-microtubules  $n = 42$ ; capped GDP-microtubules  $n = 42$ . Error bars represent standard deviation. **d**, Schematic representation of microtubule disassembly induced by the loss of the cap. Two examples of microtubules that disassembled from an end during the gliding assay are shown. Images are vertical montages from a video where images were acquired every 5 s. Scale bar,  $10 \mu\text{m}$ . **e**, Schematic representation of microtubule disassembly induced by breakage of the central region of the microtubule. Four examples of microtubules that break and disassemble during the gliding assay are shown. Images are vertical montages from a video where images were acquired every 5 s. Green arrows point to bending events that precede the weakening and eventual breakage of the microtubule. Scale bar,  $10 \mu\text{m}$ .

stabilized microtubules<sup>9</sup>. In addition, 20% of microtubules broke within the GDP lattice (Fig. 1e and Supplementary Video 3). In some cases, breakage events were observed when microtubules encountered other microtubules or when microtubule buckling was observed (Fig. 1e, arrows), suggesting that in our assays, multiple mechanisms that induce breakage could be in play.

To distinguish between breaking mechanisms, we next performed ‘motility assays’ where microtubule-based motility was studied in the opposite geometry, with capped GDP-microtubules attached to the coverslip surface and motors walking along them<sup>12</sup>. Typically, in these assays the microtubules are attached to the surface along their entire length. To attempt to limit these surface



interactions (which could interfere with microtubule damage), we used micropatterning to attach microtubule seeds to the surface, leaving the rest of the capped GDP-microtubule unattached to the non-adhesive surface coating<sup>13</sup> (Fig. 2a).

We first tested the impact of Klp2, a *Schizosaccharomyces pombe* member of the minus-end-directed kinesin-14 family<sup>14</sup>, on the stability of capped GDP-microtubules. Klp2 motors fluorescently labelled with ATTO-488 moved towards the microtubule minus end at  $120 \text{ nm s}^{-1}$ , similar to previous reports (Fig. 2b)<sup>15</sup>. To limit photo-induced damage we next used non-labelled Klp2 and followed microtubules breaking (Fig. 2c and Supplementary Video 4) and disappearing over the course of an hour. In the absence of kinesins about 86% of microtubules disappeared spontaneously with a lifetime of about  $12.3 \pm 0.1 \text{ min}$  (Fig. 2d; Supplementary Methods and Supplementary Table 1 for statistical test and lifetime estimation). In the presence of 1 nM Klp2, 96% of microtubules disappeared with a lifetime of about  $5.3 \pm 0.1 \text{ min}$  (Fig. 2d and Supplementary Table 1). Note that the mean lengths of microtubules for both conditions were not significantly different ( $15 \pm 0.7 \mu\text{m}$  and  $13.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$  (average  $\pm$  s.e.m.)) for the control and at 1 nM Klp2, respectively) so the duration for disassembly was similar in both conditions.

The effect of Klp2 on microtubule lifetime was partially hindered by the fact that a substantial proportion of capped microtubules disappeared spontaneously, an effect that stems from structural defects in the lattice<sup>6</sup> and fluorescence photodamage<sup>16,17</sup>. In order to further reduce the photo-toxicity effects and increase the intrinsic stability of microtubules, we combined the use of reflection interference contrast microscopy (RICM) to visualize label-free microtubules<sup>18</sup> with the use of 10% glycerol in the reaction mixture (Fig. 2e and Supplementary Fig. 1c). In these conditions, only 49% of microtubules disappeared during the hour that the experiment lasted, and their lifetime was extended to  $20 \pm 2 \text{ min}$  (Fig. 2f). In the presence of 1 nM Klp2, this percentage increased to 86% and their average lifetime was reduced to  $8.7 \pm 0.2 \text{ min}$ . Similar effects were observed with 500 pM and 100 pM Klp2. They were diminished with 10 pM Klp2 and undetectable with 1 pM (Fig. 2f). In the presence of adenylyl-imidodiphosphate (AMPPNP), a non-hydrolysable form of ATP, motors bind to microtubules, but do not move<sup>19</sup>. When we assayed microtubule breakage in the presence of Klp2 and AMPPNP in our experiments we did not observe microtubule breakage<sup>7</sup> (Fig. 2g). The visualization of the microtubule shaft and cap with distinct fluorescent labels allowed us to distinguish the ability of Klp2 to induce shaft breakage, instead of cap removal (Fig. 2h and Supplementary Video 5). Several microtubules

were imaged in a row to quantify the relative proportions of breakage and uncapping. Interestingly, the proportion of shaft breakage increased with increasing motor concentration (Fig. 2i). At 10 nM Klp2 we measured an average of one breaking event per 14 micrometres of microtubule (Fig. 2j), corresponding in some cases to multiple breaks per microtubule (Supplementary Video 4). Together our data thus far show that kinesin motors damage microtubules as they move along them in a manner that leads to microtubule breakage.

### Single dimers of dynein can destroy non-stabilized microtubules

Klp2 is a non-processive motor<sup>20</sup>, so the long walking distances we observed suggested that Klp2 formed aggregates in our experimental conditions. Clusters of motors likely represent the mechanism by which they share the load as they transport vesicles along microtubules in cells and therefore constitute physiologically relevant conditions<sup>21</sup>. However, we also wanted to test whether single motors could also destroy the microtubule lattice. To do this, we used cytoplasmic dyneins that were purified from *Saccharomyces cerevisiae*<sup>22</sup>, since they exist as single dimeric molecules when used at 50 pM (ref. 23; Supplementary Fig. 3). We performed motility assays with capped GDP-microtubules (Fig. 3a) and tracked single fluorescently labelled dyneins as they moved along microtubules (Fig. 3b and Supplementary Video 6). In these conditions, we observed clear examples of lattice breakage followed by microtubule disassembly (Fig. 3c and Supplementary Video 7). Of note, in the absence of ATP, dyneins did not move and microtubule disassembly was generally induced by the spontaneous loss of the GMPCPP cap (Fig. 3d,e). Indeed, lattice breaking events in response to single dyneins (50 pM) were less frequent in the absence of ATP compared to in the presence of ATP (13%  $n=60$  versus 37%  $n=43$ ) (Fig. 3f), and the spatial frequency of lattice breakage increased from 0.44 to 1.6 per hundred micrometres of microtubule (Fig. 3g).

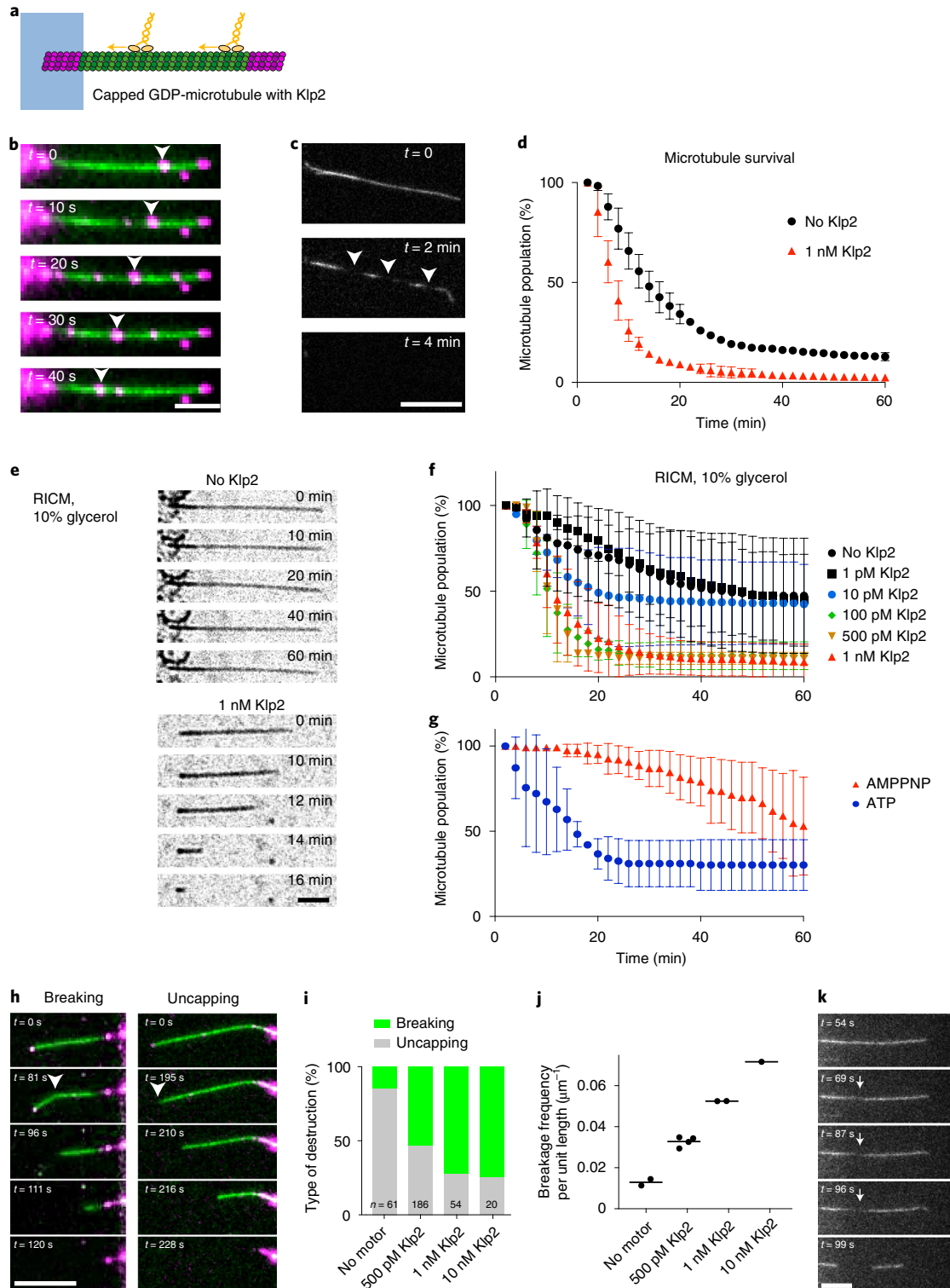
With RICM we could further test the impact of non-fluorescently labelled dyneins on non-labelled microtubules. Similar to kinesins, dyneins forced microtubule destruction at 1 nM: 96% of microtubules disappeared in the hour following addition of motors and their lifetime was reduced from 20 to  $12.4 \pm 0.3 \text{ min}$  (Fig. 3h). In the presence of single dyneins at 50 pM, the effect was reduced (the average lifetime,  $21.6 \pm 0.6 \text{ min}$ , was not significantly different from the control) but clearly detectable, as most microtubules were destabilized after one hour whereas 40% were still present in the absence of motors (Fig. 3h, Supplementary Fig. 2d and Supplementary Tables 10–14

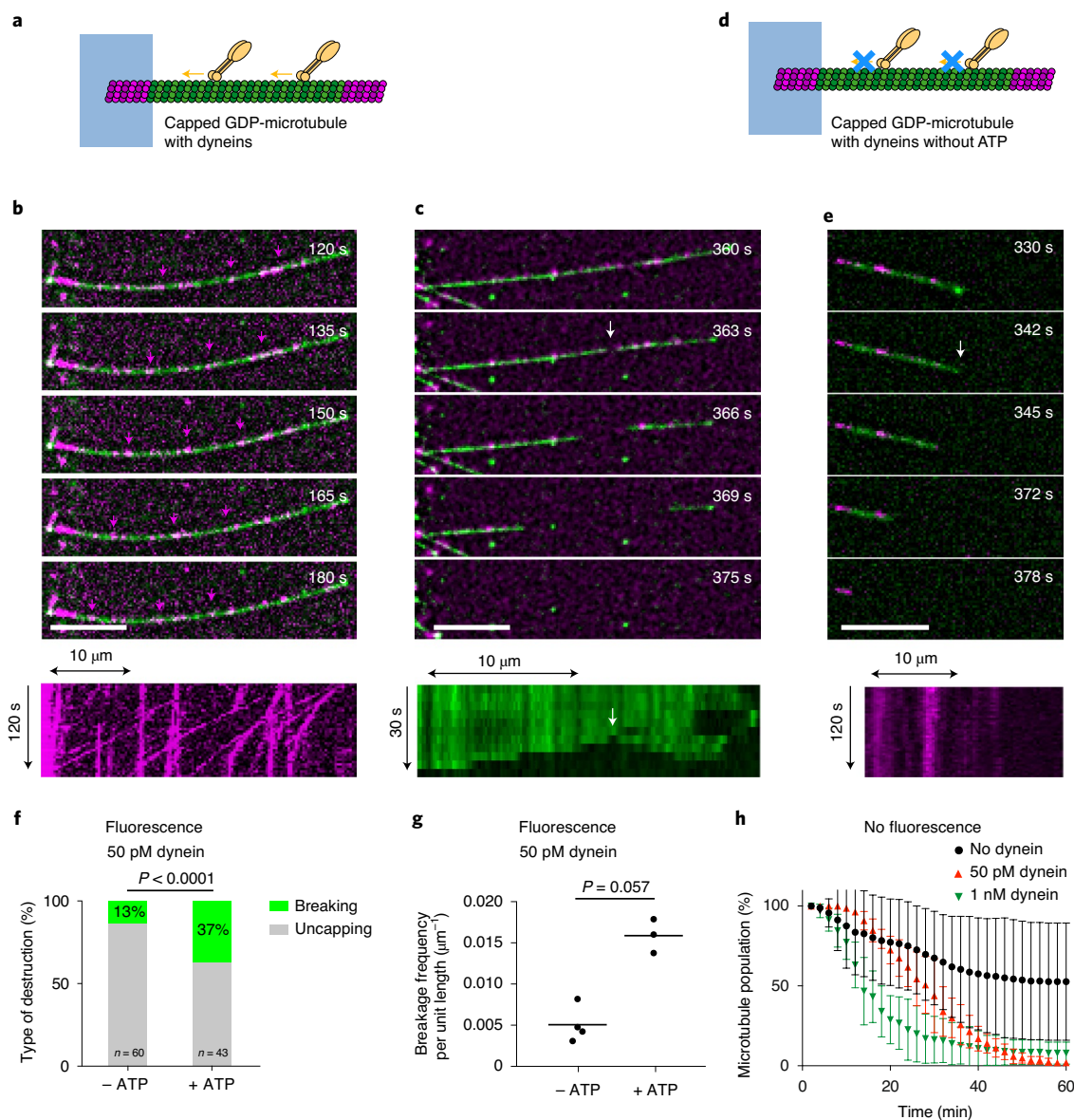
**Fig. 2 | Motility assays destroy non-stabilized microtubules.** **a**, Schematic representation of the motility assay. The microtubule seed (magenta at left) is attached to the micropattern (blue), while the shaft (green) and the cap (magenta) are free. Motors (yellow) walk along the microtubules in the presence of ATP. **b**, Sequence showing labelled Klp2 (magenta) walking towards the minus ends. Images were taken every 10 s. The arrowheads point at a cluster of moving motors. Note that the seed and the cap are also visible in the green channel. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **c**, Sequence showing the formation of breaks (arrowheads) in the microtubule shaft prior to disassembly. Motors were not labelled, and images were taken every 2 min. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **d**, Survival curve of microtubules in the absence (black) or presence (red) of motors. We measured the duration between the addition of motors and the disappearance of microtubules. Number of independent experiments  $N=2$ ; control  $n=588$ ; Klp2  $n=1,130$ ; where  $n$  is the number of microtubules. Pairwise testing (non-parametric Wilcoxon Mann-Whitney (Wilcoxon rank sum test), two-tailed) of the measured lifetimes gives  $P$  values of  $<0.0001$ . Error bars represent standard deviation. **e**, Sequence showing capped GDP-microtubule under RICM in the absence (top) or presence (bottom) of 1 nM Klp2. Images were taken every 2 min. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **f**, Survival curve of microtubules in the absence (black circle) or presence of motors at 1 pM to 1 nM Klp2. Data were acquired in the conditions described in **e**. Number of independent experiments and number of microtubules, no Klp2,  $N=9$ ,  $n=371$ ; 1 pM Klp2,  $N=2$ ,  $n=120$ ; 10 pM Klp2,  $N=2$ ,  $n=136$ ; 100 pM Klp2,  $N=4$ ,  $n=176$ ; 500 pM Klp2,  $N=2$ ,  $n=81$ ; 1 nM Klp2,  $N=5$ ,  $n=317$ . For the statistical test, see Supplementary Fig. 2 and Supplementary Tables 2–9. Error bars represent standard deviation. **g**, Survival curve of unlabelled microtubules visualized with RICM in the presence of 1 nM Klp2 in the presence of ATP (blue curve) or AMPPNP (red curve). Number of independent experiments and number of microtubules, with ATP,  $N=2$ ,  $n=142$ ; with AMPPNP,  $N=2$ ,  $n=89$ . For the statistical test, see Supplementary Tables 6–9. Error bars represent standard deviation. **h**, Sequence showing examples of microtubule breakage (left, arrowhead) or cap loss followed by depolymerization (right, arrowhead). The microtubule lattice is in green and the GMPCPP cap is in magenta. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **i**, Bar graph showing the relative proportion of microtubule disassembly after the loss of their cap (grey) or a breakage in their central part (green) depending on the concentration of Klp2. **j**, Graph showing the spatial frequency of microtubule breakage as a function of the concentration of Klp2. Number of independent experiments and number of microtubules, no Klp2,  $N=2$ ,  $n=61$ ; 500 pM Klp2,  $N=4$ ,  $n=186$ ; 1 nM Klp2,  $N=2$ ,  $n=54$ ; 10 nM Klp2,  $N=1$ ,  $n=20$ . **k**, Sequence showing the local loss of tubulin dimers in the lattice (arrows) prior to lattice breakage. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

for statistical analysis). Altogether these results show that single motors impact microtubule lattice stability. This is surprising since single motors in this assay are not supporting any load, and therefore do not develop counteracting forces on the microtubule they walk on. However, ATP hydrolysis during the motor cycle releases more energy than is required to displace motors at the observed speed<sup>24</sup>. One possibility is that some of this energy is transferred to the microtubule lattice and breaks dimer interactions, facilitating their detachment from the protofilaments.

### Free tubulin protects microtubules from motor-induced destruction

Interestingly, in both motility and gliding assays, most breaking events were preceded by a local reduction of microtubule fluorescence, which we hypothesized was due to the loss of tubulin dimers (Fig. 1e and Fig. 2k, arrow). These observations raised the possibility that free tubulin dimers in solution could compensate for this loss by incorporating into the damaged region and could protect the microtubule from breakage<sup>25,26</sup>.

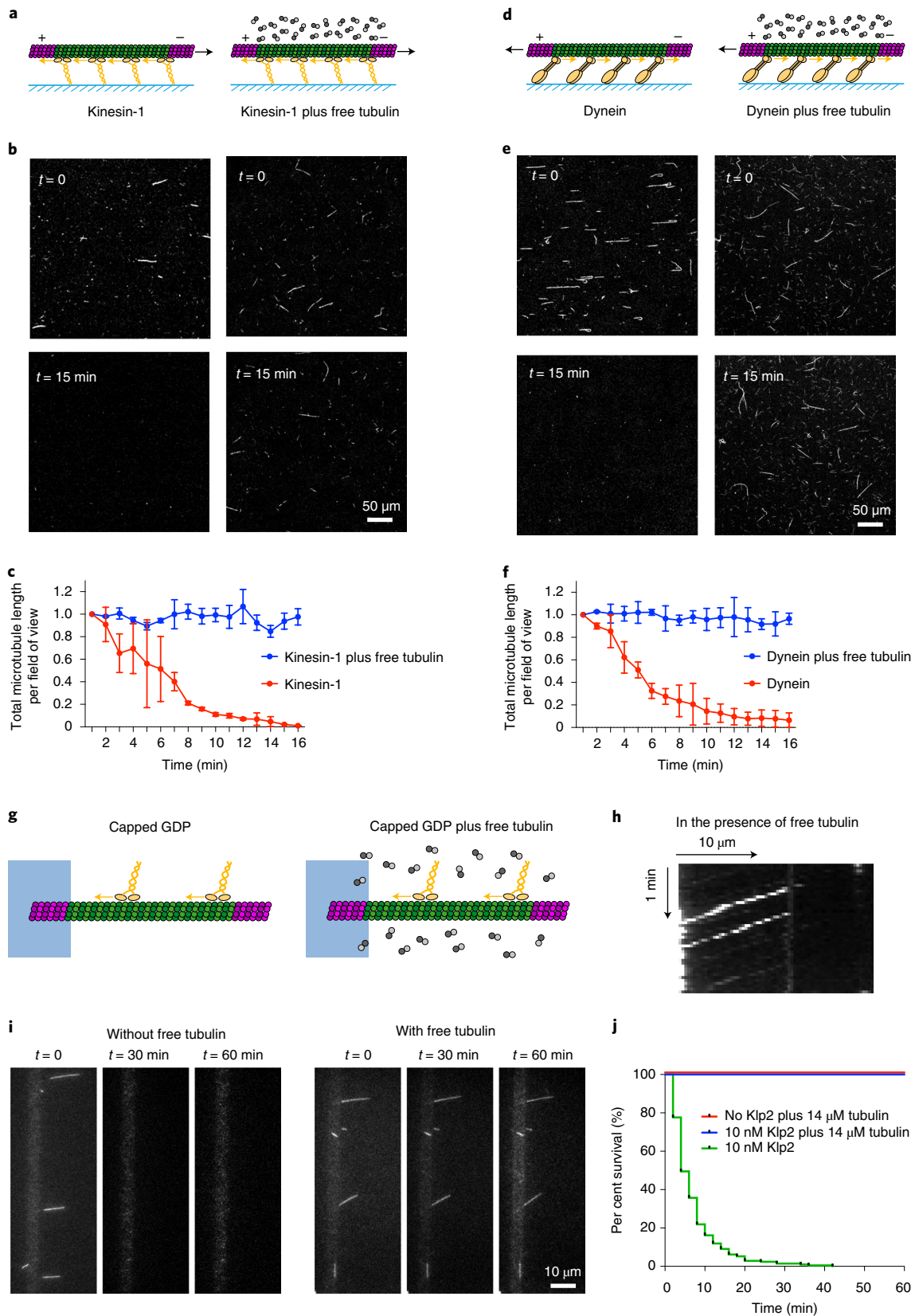




**Fig. 3 | Single dyneins can damage the microtubule lattice.** **a**, Schematic representation of the motility assay with dyneins. The microtubule seed (magenta at left) is attached to the micropattern (blue), while the shaft (green) and the cap (magenta) are free. Molecular motors (dyneins, yellow) walk along the microtubules towards the microtubule minus end in the presence of ATP. **b**, Image sequence showing single dyneins (magenta, 50 pM) walking along a micropatterned capped microtubule (green). The magenta arrows track moving dyneins. Images were taken every 3 s. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . The kymograph shows the traces of single dyneins (50 pM) moving towards the microtubule minus end on the micropattern. **c**, Image sequence illustrating lattice breakage (white arrow). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . The kymograph below shows the microtubule shaft and its disassembly towards both ends from the breaking point. **d**, Same schematic representation as in **a**. Molecular motors (yellow) do not walk along the microtubules in the absence of ATP. **e**, Image sequence showing single dyneins (magenta) binding to a micropatterned capped microtubule (green). The white arrow points at the loss of the GMPCPP cap that is followed by microtubule disassembly. The kymograph below shows the traces of single dyneins that are not moving on the microtubule. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **f**, Bar graph showing the relative proportion of microtubule disassembly after the loss of their cap (grey) or a breakage in their central part (green) in response to dynein (50 pM) depending on the presence or absence of ATP. With ATP,  $N=3$  independent experiments and  $n=43$  microtubules in total; without ATP,  $N=4$  independent experiments and  $n=60$  microtubules in total. The  $P$  value was measured with a Fisher exact test. **g**, Graph showing the spatial frequency of microtubule breakage in response to dynein (50 pM) depending on the presence or absence of ATP. With ATP,  $N=3$  independent experiments for a total length of 1,298  $\mu\text{m}$ . Without ATP,  $N=4$  independent experiments for a total length of 1,750  $\mu\text{m}$ . The  $P$  value was measured with a Fisher exact test. **h**, Survival curve of microtubules in the absence (black circle) or presence of dyneins at 50 pM (red triangles) or 1 nM (green triangles). Dyneins were not labelled and capped microtubules were not labelled. Data were acquired with RICM, that is, in the absence of fluorescence, and in the presence of glycerol. Number of independent experiments and number of microtubules, no dynein,  $N=9$ ,  $n=371$ ; 50 pM dynein,  $N=2$ ,  $n=211$ ; 1 nM dynein,  $N=2$ ,  $n=152$ . For the statistical test, see Supplementary Fig. 2. Error bars represent standard deviation.

To test this hypothesis, gliding assays were performed in the presence of free tubulin dimers (Fig. 4a). Free tubulin dimers were unlabelled to allow microtubules to be monitored without background

fluorescence. Strikingly, capped microtubules glided on kinesin-1 in the presence of tubulin dimers without any visible destruction (Fig. 4b,c and Supplementary Video 8). The microtubule gliding



speed was  $\sim 500 \text{ nm s}^{-1}$  in the presence or absence of free dimers ( $500 \pm 75 \text{ nm s}^{-1}$  and  $480 \pm 70 \text{ nm s}^{-1}$ , respectively), showing that free dimers do not interfere with the motor-driven gliding speed of microtubules. The same observation was made in the presence of dynein. Gliding on dyneins in the absence of free dimers led to rapid

microtubule disassembly, which could be prevented by the addition of free tubulin dimers (Fig. 4d–f and Supplementary Video 9). Similarly, the addition of free dimers in motility assays (Fig. 4g) did not interfere with motor movement (Fig. 4h), but fully protected microtubules from motor-induced breakage (Fig. 4i,j and Supplementary Video 10).

**Fig. 4 | Free tubulin dimers prevent microtubule destruction by kinesin and dynein.** **a**, Schematic representation of the gliding assay of capped GDP-microtubules on kinesin-1 in the absence (left) or presence (right) of free non-labelled tubulin dimers. **b**, Images of gliding microtubules when motors are activated by the addition of ATP ( $t=0$ , top row) and 15 minutes later ( $t=15$  min, bottom row) in the two conditions described in **a**. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **c**, Quantification of microtubule length variations in the experiments shown in **b**. The microtubule lengths were measured for all microtubules in the 600- $\mu\text{m}$ -wide fields every minute for 15 minutes. Values were normalized with respect to the initial length. Data in the absence of free tubulin dimers are shown in red and correspond to the data shown in Fig. 1b; data in the presence of 14  $\mu\text{M}$  free dimers are shown in blue. Values were normalized with respect to the initial intensity. Number of independent experiments  $N=2$ , without free tubulin,  $n=42$ ; with free tubulin,  $n=74$ ; where  $n$  is the number of microtubules. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Error bars represent standard deviation. **d–f**, The same images as in **a**, **b** and **c**, but in the presence of yeast dynein instead of kinesin-1. Number of independent experiments  $N=2$ , without free tubulin,  $n=24$ ; with free tubulin,  $n=12$ . Error bars represent standard deviation. **g**, Schematic representation of the motility assay in the absence (left) and presence (right) of free non-labelled tubulin dimers. **h**, Kymograph showing the position of fluorescent Klp2 along a microtubule over time. The presence of free dimer did not interfere with the ability of the motor to walk towards the microtubule minus end. **i**, Image sequences show microtubules after the addition of Klp2 motors in the absence (left) or presence (right) of 14  $\mu\text{M}$  free tubulin dimers. Images were taken every 2 min. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **j**, Survival curve of microtubules in the presence of molecular motors and absence of free tubulin (green), in the presence of molecular motors and 14  $\mu\text{M}$  free tubulin dimers (blue) or in the absence of motors and presence of 14  $\mu\text{M}$  free tubulin dimers (red). Data were acquired in the conditions described in **i**.  $N=1$ ; no motor,  $n=108$ ; 10 nM Klp2 with free tubulin,  $n=70$ ; 10 nM Klp2 without free tubulin,  $n=212$ .

### Molecular motors catalyse the self-repair of microtubule lattice

To directly visualize microtubule repair in response to motor-induced destruction, we performed a two-colour assay in which polymerized tubulin and free tubulin dimers were labelled with distinct fluorophores. Free fluorescent dimers were then washed away and replaced by non-labelled free tubulin in order to protect microtubules from spontaneous breakage and disassembly in the absence of free tubulin<sup>6</sup>. This allowed us to visualize tubulin incorporation at damaged sites<sup>26</sup> (Supplementary Fig. 4). In a kinesin-1 gliding assay in the presence of free green tubulin dimers (Fig. 5a), red-fluorescent, capped GDP-microtubules displayed micrometre-long green stretches along their shaft 30 minutes after the initiation of the gliding assay (Fig. 5b). These two-coloured microtubules could also be seen moving along the kinesin-1 surface (Supplementary Video 11). Similar two-coloured microtubules were observed in dynein microtubule gliding assays performed in the same manner (Fig. 5c). By varying the duration of the gliding step during the 30-minute assay (step 2 in Fig. 5a) we found that the size of the repaired sites remained constant, but that their frequency along the shaft increased regularly (Fig. 5d). This suggests that motors continuously generate new sites of damage. Note that the presence of repaired sites in microtubules that did not glide because of the absence of ATP during the 30 minutes of the assay ('time 0' in Fig. 5d and examples in Supplementary Fig. 5) was consistent with our recent observation that the microtubule lattice has an intrinsic

turnover rate<sup>6</sup>. In gliding microtubules, the increased frequency of repair sites corresponded to the addition of the intrinsic and the motor-induced contributions. The spatial frequency of the repaired sites was lower in the dynein gliding assay compared to the kinesin assay, perhaps due to differences in the force production and velocity of these two motors. Yeast dynein moves about 10-fold slower than kinesin-1 and also has a slightly lower stall force<sup>27</sup>.

The integration of free tubulin dimers into the microtubule shaft could also be visualized in motility assays using a similar experimental strategy (Fig. 5e). Clear stretches of green tubulin dimers along the shaft of red microtubules were present on 80% ( $n=85$ ) of microtubules after kinesin-1 or Klp2 moved along them (Fig. 5f and Supplementary Video 12). The frequency of the repaired sites was similar to those measured in gliding assays, but the size of the repaired sites was larger (Fig. 5g). In some occasions, the intensity of red fluorescence appeared correlated to the decrease of green fluorescence, but it was not always the case because of the low labelling frequency in the green lattice (Supplementary Fig. 6). Together these results show that walking motors can break the microtubule lattice, catalysing the incorporation of free tubulin dimers, which heal the lattice and protect it from disassembly. From this data, we infer that components of the microtubules that are supporting motor trafficking are continuously renewed.

At this point, we can only speculate about the detailed molecular mechanism of lattice destruction and repair. The increasing amount of lattice repair sites over time (Fig. 5d, top) supports the idea that

**Fig. 5 | Molecular motors enhance tubulin exchange in the microtubule lattice.** **a**, Schematic representation of the three sequences during gliding assays of capped GDP-microtubules in the presence of 14  $\mu\text{M}$  free fluorescent tubulin. All experiments lasted 30 minutes. Only the duration of the gliding step was varied. Step 1 corresponds to the loading of capped GDP-microtubules and free green tubulin dimers on the layer of motors. Step 2 corresponds to the initiation of gliding by the addition of ATP. In the 0-minute condition, that is, without gliding, step 2 was skipped and ATP was not added. In the 15-minute condition, step 2 was initiated 15 minutes after step 1. In the 30-minute condition, step 2 immediately followed step 1. In all cases, fluorescent tubulin was removed after 30 minutes to measure the incorporation of free tubulin. **b,c**, Images show the microtubule shaft (low intensity) with associated cap and seed (high intensity, top row), the incorporation of free tubulin (middle row) and the overlay of the two signals (bottom row) at the end of the gliding assay (step 3). In these examples, microtubules glided on kinesin-1 (**b**) or dynein (**c**) for 30 minutes. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ ; tub., tubulin. **d**, Quantifications of the spatial frequency (top) and size (bottom) of the incorporation sites upon gliding on kinesin-1 (left) or dynein (right) depending on the duration of the gliding step. Data were acquired during two independent experiments. Each experiment allowed the measurement of a single value of incorporation frequency over several microtubules. Red bars show geometrical means with 95% confidence interval.  $P$  values were obtained using a non-parametric Mann-Whitney test. The table indicates the number and total length of microtubules that were measured in each condition. **e**, Schematic representation of the three sequences during motility assays on capped GDP-microtubules in the presence of 14  $\mu\text{M}$  fluorescent tubulin. Step 1 is the growth and capping of microtubules. Step 2 corresponds to the addition of motors and fluorescent tubulin. Step 3 corresponds to the removal of motors and replacement of fluorescent tubulin by non-labelled tubulin 40 minutes later. **f**, Images show the microtubule shaft (top row), the incorporation of free dimers (middle row), and the overlay of the two signals (bottom row) at the end of the motility assay. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **g**, Quantification of the spatial frequency (top) and size (bottom) of the incorporation sites following the motility of kinesin-1 (10 nM) or Klp2 (10 nM). Data were acquired during four independent experiments for the control conditions without motors, a single experiment with kinesin-1 and two independent experiments with Klp2. Each experiment allowed the measurement of a single value of incorporation frequency over several microtubules. Red bars show geometrical means with 95% confidence interval.  $P$  values were obtained using a non-parametric Mann-Whitney test. The table indicates the number and total length of microtubules that were measured in each condition.

motors not only enhance the exchange of dimers at pre-existing defects such as dislocations<sup>6</sup> but also generate additional sites of tubulin removal and turnover. By contrast, the constant length of repair sites (Fig. 5d, bottom) and their micrometre range (Fig. 5d,g) suggest that the propagation is determined by a collective process of dimer loss and replacement until the defect is annihilated and the exchange dynamics stop rather than the result of motor activity.

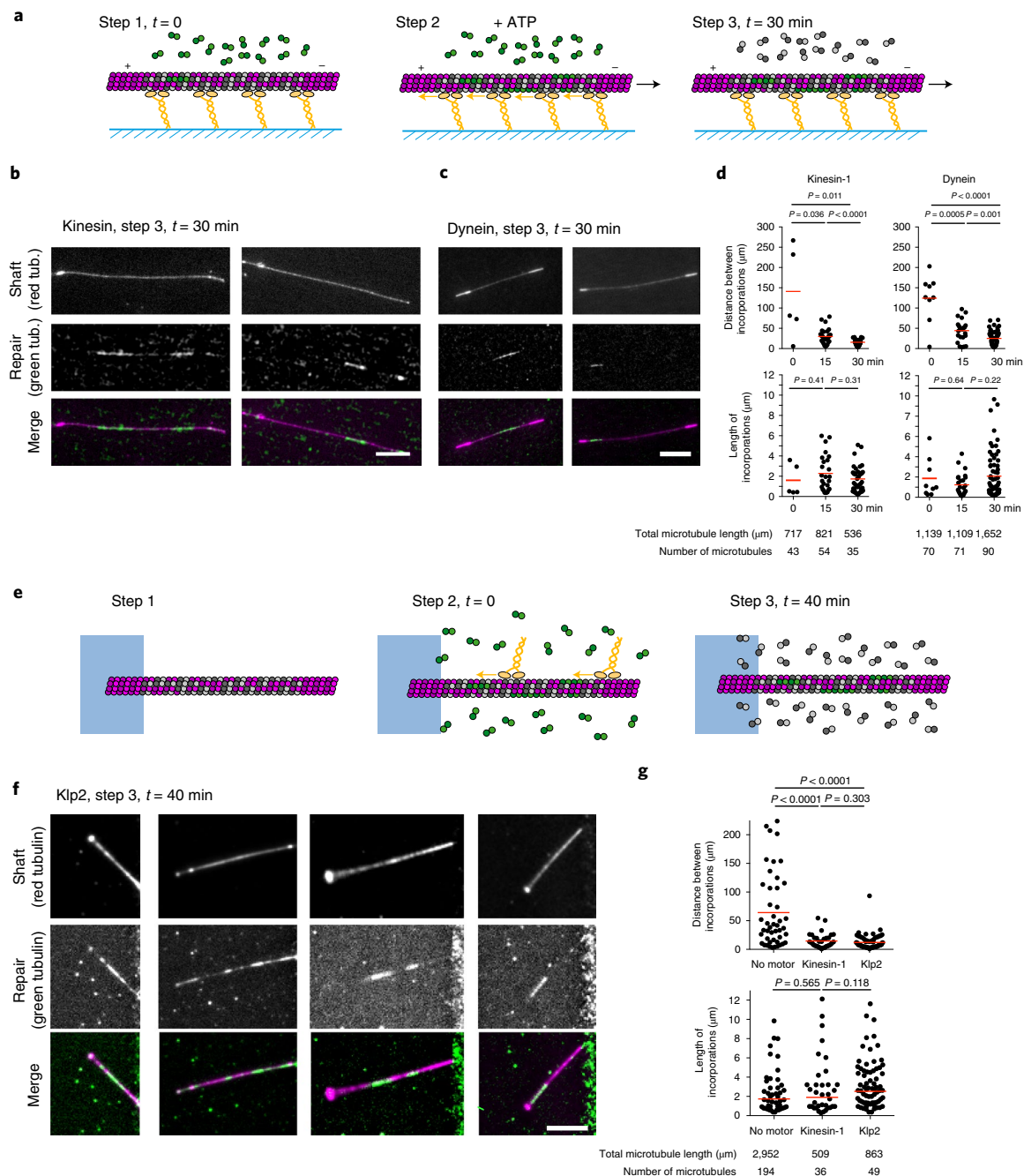
## Conclusions

Whether motor-induced destruction and repair of microtubules happens in cells remains to be established. The localization of GTP-tubulin<sup>28</sup> or microtubule-associated proteins mediating microtubule repair, such as CLIP-170 (cytoplasmic linker protein of 170 kDa)<sup>29</sup> and CLASP (cytoplasmic linker associated protein)<sup>30</sup>, can serve as a proxy for the identification of repair sites in living cells. These sites are numerous along microtubules submitted to high

conformational stress<sup>29</sup>, but also along straight microtubules in axons<sup>31</sup>, where motor-based trafficking is particularly intense, supporting our hypothesis that motors are involved in this process. Importantly, the incorporation of new GTP-tubulin dimers generates rescue sites along microtubules, increasing their lifespan<sup>29,32,33</sup>. This raises the possibility that dynein and kinesin motors may trigger the selective stabilization of the microtubules they are walking on, which could be instrumental in the definition of preferential tracks in microtubule networks and the establishment of cell polarity.

## Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00905-0>.



Received: 8 May 2020; Accepted: 9 December 2020;  
Published online: 21 January 2021

## References

1. Drummond, D. R. Regulation of microtubule dynamics by kinesins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 927–934 (2011).
2. Hibbel, A. et al. Kinesin Kip2 enhances microtubule growth *in vitro* through length-dependent feedback on polymerization and catastrophe. *Elife* **4**, e10542 (2015).
3. Laan, L. et al. Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell* **148**, 502–514 (2012).
4. Hunter, A. W. et al. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol. Cell* **11**, 445–457 (2003).
5. Arellano-Santoyo, H. et al. A tubulin binding switch underlies Kip3/kinesin-8 depolymerase activity. *Dev. Cell* **42**, 37–51.e8 (2017).
6. Schaedel, L. et al. Lattice defects induce microtubule self-renewal. *Nat. Phys.* **15**, 830–838 (2019).
7. Peet, D. R., Burroughs, N. J. & Cross, R. A. Kinesin expands and stabilizes the GDP-microtubule lattice. *Nat. Nanotechnol.* **13**, 386–391 (2018).
8. Shima, T. et al. Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. *J. Cell Biol.* **217**, 4164–4183 (2018).
9. Dumont, E. L. P., Do, C. & Hess, H. Molecular wear of microtubules propelled by surface-adhered kinesins. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 166–169 (2015).
10. VanDelinder, V., Adams, P. G. & Bachand, G. D. Mechanical splitting of microtubules into protofilament bundles by surface-bound kinesin-1. *Sci. Rep.* **6**, 39408 (2016).
11. Howard, J., Hudspeth, A. J. & Vale, R. D. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* **342**, 154–158 (1989).
12. Vale, R. D. et al. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**, 451–453 (1996).
13. Portran, D., Gaillard, J., Vantard, M. & Théry, M. Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks. *Cytoskeleton* **70**, 12–23 (2013).
14. Carazo-Salas, R. E., Antony, C. & Nurse, P. The kinesin Klp2 mediates polarization of interphase microtubules in fission yeast. *Science* **309**, 297–300 (2005).
15. Braun, M., Drummond, D. R., Cross, R. A. & McAinsh, A. D. The kinesin-14 Klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an ATP-dependent sorting mechanism. *Nat. Cell Biol.* **11**, 724–730 (2009).
16. Guo, H. et al. Mechanism and dynamics of breakage of fluorescent microtubules. *Biophys. J.* **90**, 2093–2098 (2006).
17. Vigers, G. P., Coue, M. & McIntosh, J. R. Fluorescent microtubules break up under illumination. *J. Cell Biol.* **107**, 1011–1024 (1988).
18. Mahamdeh, M., Simmert, S., Luchniak, A., Schäffer, E. & Howard, J. Label-free high-speed wide-field imaging of single microtubules using interference reflection microscopy. *J. Microsc.* **272**, 60–66 (2018).
19. Lasek, R. J. & Brady, S. T. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* **316**, 645–647 (1985).
20. Braun, M. et al. The human kinesin-14 HSET tracks the tips of growing microtubules *in vitro*. *Cytoskeleton* **70**, 515–521 (2013).
21. Jonsson, E., Yamada, M., Vale, R. D. & Goshima, G. Clustering of a kinesin-14 motor enables processive retrograde microtubule-based transport in plants. *Nat. Plants* **1**, 15087 (2015).
22. DeSantis, M. E. et al. Lis1 has two opposing modes of regulating cytoplasmic dynein. *Cell* **170**, 1197–1208.e12 (2017).
23. Reck-Peterson, S. L. et al. Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335–348 (2006).
24. Block, S. M. Kinesin motor mechanics: binding, stepping, tracking, gating, and limping. *Biophys. J.* **92**, 2986–2995 (2007).
25. Dye, R. B., Flicker, P. F., Lien, D. Y. & Williams, R. C. End-stabilized microtubules observed *in vitro*: stability, subunit, interchange, and breakage. *Cell Motil. Cytoskeleton* **21**, 171–186 (1992).
26. Schaedel, L. et al. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat. Mater.* **14**, 1156–1163 (2015).
27. Gennerich, A., Carter, A. P., Reck-Peterson, S. L. & Vale, R. D. Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* **131**, 952–965 (2007).
28. Dimitrov, A. et al. Detection of GTP-tubulin conformation *in vivo* reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* **322**, 1353–1356 (2008).
29. de Forges, H. et al. Localized mechanical stress promotes microtubule rescue. *Curr. Biol.* **26**, 3399–3406 (2016).
30. Aher, A. et al. CLASP mediates microtubule repair by restricting lattice damage and regulating tubulin incorporation. *Curr. Biol.* **30**, 2175–2183.e6 (2020).
31. Nakata, T., Niwa, S., Okada, Y., Perez, F. & Hirokawa, N. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J. Cell Biol.* **194**, 245–255 (2011).
32. Aumeier, C. et al. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1054–1064 (2016).
33. Vemu, A. et al. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* **361**, eaau1504 (2018).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

## Methods

**Microtubule gliding assay.** In vitro gliding assays were performed using flow chambers with dimensions of  $2 \times 10 \times 0.07$  mm (width  $\times$  length  $\times$  height) that were assembled from  $10 \times 10$  mm and  $24 \times 30$  mm cover glasses (Thermo Scientific) with double-sided tape as the spacer. Anti-green-fluorescent-protein (GFP) antibody (Invitrogen) at  $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$  ( $5 \mu\text{l}$ ) was applied to the flow chamber for gliding assays with kinesins. The flow chamber was washed with  $5 \mu\text{l}$  of 1% w/v bovine serum albumin (BSA) in HKEM buffer (10 mM HEPES buffer (pH 7.2), 50 mM KCl, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Next  $5 \mu\text{l}$  of 200 nM GFP-tagged kinesin-1 or  $3 \mu\text{l}$  of 10 nM yeast dynein in TicTac buffer (10 mM HEPES buffer (pH 7.2), 16 mM PIPES buffer (pH 6.8), 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 20 mM dithiothreitol (DTT),  $3 \text{ mg ml}^{-1}$  glucose,  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  catalase,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  glucose oxidase and 0.3% BSA) was introduced for 3 min and washed with  $10 \mu\text{l}$  wash buffer. Then  $10 \mu\text{l}$  of microtubules in HKEM buffer was introduced and incubated for 1 min, followed by extensive washing with TicTac buffer. Finally,  $10 \mu\text{l}$  of ATP (2.7 mM final; Sigma Aldrich, A3377) in TicTac buffer supplemented with 0.2% methyl cellulose was added into the flow chamber prior to imaging. In the experiment with taxol-stabilized microtubules, washing buffers and ATP buffers contained  $10 \mu\text{M}$  taxol. In the experiments in the presence of free tubulin,  $14 \mu\text{M}$  of unlabelled tubulin was added to the ATP buffer.

**Microtubule motility assay.** Micropatterning of glass slides and fabrication of the microfluidic circuitry are described in the Supplementary Methods.

Microtubule seeds were prepared at  $10 \mu\text{M}$  tubulin concentration (20% ATTO-647-labelled and 80% biotinylated tubulin) in BRB80 buffer (80 mM PIPES (pH 6.8), 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 mM EGTA) supplemented with 0.5 mM GMPCPP at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. The seeds were incubated with  $1 \mu\text{M}$  Taxotere (Sigma) at room temperature for 30 min and were then sedimented by centrifugation at  $30^\circ\text{C}$  for 15 min at 100,000g and resuspended in BRB80 supplemented with 0.5 mM GMPCPP and  $1 \mu\text{M}$  Taxotere. Microtubule seeds were stored in liquid nitrogen and quickly warmed to  $37^\circ\text{C}$  before use.

The poly-dimethyl-siloxane (PDMS) chip was placed on a micropatterned cover glass and fixed on the microscope stage. The chip was perfused with neutravidin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  in HKEM; Pierce), then washed with HKEM supplemented with 0.2% BSA and passivated for 1 min with PLL-g-PEG coating (PLL 20K-G35-PEG2K, Jenkem Technology) at  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$  in 10 mM Na-HEPES buffer (pH 7.4), and washed again with HKEM plus 0.2% BSA. Microtubule seeds were flowed into the chamber at high flow rates perpendicularly to the micropatterned lines to ensure proper orientation of the seeds. Non-attached seeds were washed out immediately using HKEM supplemented with 0.2% BSA. Seeds were elongated with a mix containing  $20 \mu\text{M}$  tubulin (5 or 20% labelled with an ATTO-488 or ATTO-565 fluorophore) in TicTac buffer (10 mM HEPES, 16 mM PIPES (pH 6.8), 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 20 mM DTT,  $3 \text{ mg ml}^{-1}$  glucose,  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  catalase,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  glucose oxidase, 0.3% BSA and 0.25% methyl cellulose (1,500 centipoise, Sigma)) for 20 min. GMPCPP caps were grown by supplementing the TicTac buffer with 0.5 mM GMPCPP (Jena Bioscience) instead of GTP and using  $14 \mu\text{M}$  tubulin (100% labelled with an ATTO-488 or ATTO-565 fluorophore) for 15 min. To monitor microtubule survival in the absence of free tubulin, the same buffer as for seed elongation was used, but without free tubulin. To quantify the effect of molecular motors on microtubule survival following the capping step, the same buffer as for seed elongation was used, but supplemented with molecular motors (at the appropriate concentration) and 2.66 mM ATP or AMPPNP (Sigma Aldrich, 10102547001).

To analyse non-fluorescently labelled microtubules using RICM (see 'Imaging' section below), seeds were prepared by polymerizing  $10 \mu\text{M}$  of non-fluorescent tubulin, 20% of which was biotinylated, and attached to neutravidin-coated micropatterns. Grafted seeds were further elongated with  $20 \mu\text{M}$  of unlabelled tubulin, and then capped by adding  $10 \mu\text{M}$  of unlabelled tubulin with  $30 \mu\text{M}$  GMPCPP. The capping medium was then replaced by the elongation buffer described above, but without tubulin and supplemented with 10% of glycerol to increase microtubule stability. Unlabelled kinesins or dyneins were added to this buffer at the concentrations reported in the main text.

**Visualization of free dimer incorporation.** To visualize incorporation of free tubulin dimers into the microtubule shaft during gliding, the glass surface was passivated with 1% w/v BSA and 1% w/v Pluronic F-127. Unlabelled SNAP-kinesin-1-His was used instead of GFP-kinesin-1-His. Green fluorescent dimers tend to attach to the layer of motors during the gliding assay, hindering the detection of the few dimers that may incorporate into the lattice. To limit this effect, the last coating step was performed with wash buffer containing  $14 \mu\text{M}$  unlabelled tubulin. Capped GDP-microtubules were assembled in a single red colour, but with a lower proportion of fluorescent dimers (3%) in the central GDP part compared to the stabilized ends (20% labelled tubulin). Fluorescence in the central part of the microtubule was required to visualize capped microtubules and distinguish them from individual seeds. The gliding of these capped microtubule was initiated with ATP buffer and recorded for 30 min. In the control experiment, ATP was not included in the reaction mixture. At the end of the gliding experiments, labelled tubulin was washed out and replaced by new ATP buffer with  $7 \mu\text{M}$  unlabelled tubulin in order to visualize green dimer

incorporation into the capped microtubules without triggering microtubule destruction due to dimer washout.

To visualize incorporation of free tubulin dimers into the microtubule shaft during motility assays, capped microtubules were exposed to  $14 \mu\text{M}$  of tubulin (100% labelled, green or red fluorescent) in 10 mM HEPES, 16 mM PIPES (pH 6.8), 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 20 mM DTT,  $3 \text{ mg ml}^{-1}$  glucose,  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  catalase,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  glucose oxidase, 0.3% BSA and 0.25% methyl cellulose (1,500 centipoise, Sigma), in the absence or presence of motors, for 40 min before replacing the reaction mixture with elongation buffer in which fluorescent tubulin dimers were replaced by  $10 \mu\text{M}$  unlabelled tubulin in order to protect microtubules from disassembly without perturbing the imaging process with background fluorescence.

**Imaging.** Large-scale measurement of microtubule lifetime during gliding assays was performed by illuminating the sample with a SOLA Light Engine (Lumencor) and visualized with an epifluorescence microscope (Eclipse Ti2, Nikon) using an S Plan Fluor  $\times 20$  objective lens (Nikon). The microscope stage was kept at  $37^\circ\text{C}$  using a warm stage controller (LCI). Images and videos were captured using an Orca flash 4LT camera (Hamamatsu) every 5 s for 15 min.

Individual microtubule destruction or repair events during gliding and motility assays were visualized using an objective-based total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy instrument composed of a Nikon Eclipse Ti, an azimuthal iLas<sup>2</sup> TIRF illuminator (Roper Scientific), a  $\times 60$  numerical aperture 1.49 TIRF objective lens followed by a  $\times 1.5$  magnification lens and an Evolve 512 camera (Photometrics). The microscope stage was kept at  $37^\circ\text{C}$  using a heated stage controller (LCI). Excitation was achieved using 491 and 565 nm or 642 nm lasers (Optical Insights). Time-lapse recording was performed using Metamorph software (version 7.7.5, Universal Imaging). Images were taken every second.

Large-scale measurement of microtubule lifetime during motility assays was performed by acquiring images every 2 min for 1 hour. To detect microtubule breakage, images were taken every 3 s until a microtubule disappeared. To visualize free tubulin dimer incorporation into polymerized microtubules, images were taken every second for 15 s at the end of the assay so that images could be averaged to improve the signal-to-noise ratio.

Non-labelled microtubules and non-labelled motors were imaged with RICM<sup>18</sup>: the sample was illuminated with a SOLA Light Engine (Lumencor) through a cube equipped with a monochromatic filter at 520 nm, a 50/50 dichroic mirror and a  $\times 60$  numerical aperture 1.49 TIRF objective.

**Image processing and measurements.** For gliding assays, microtubule lifetime was quantified by measuring the variation of the microtubule length over time by using the line tool of Adobe Photoshop CC 2018. The quantification of the free tubulin incorporation along the microtubule shaft was done using a line scan in ImageJ after the following image treatment. We arbitrarily selected three frames at different time points for the green and red channels (incorporated tubulin is green and the microtubule is red). Overlaid images were generated using an Adobe Photoshop original macro for each channel by cancelling the displacement of the microtubule during gliding. To generate the image overlay, the Photoshop layer mode 'darken mode' was applied to each image in order to reduce background noise. Finally, the background of the overlaid image was subtracted by ImageJ (rolling ball radius, 10.0 pixels). The incorporation was defined as a signal 1.5 times higher than the background (Supplementary Fig. 1).

For motility assays, videos were processed to improve the signal-to-noise ratio. Background was subtracted with a dedicated plug-in from ImageJ (version 1.47n5). Microtubule lifetime was quantified by manually counting the microtubule number at each frame, every 2 min for 1 hour. To quantify the incorporation of free tubulin dimers, line scans were used to measure fluorescence intensity along the microtubule. Incorporation was counted when a spot perfectly aligned with the microtubule lattice and followed microtubule lateral fluctuations, and the fluorescence intensity showed a peak at least twofold higher than the background fluorescence.

**Statistical analysis.** Statistical analysis and chart design were performed using Graphpad Prism 6 and R version 3.4.0 together with RStudio version 1.0.143.

**Reporting Summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

Raw data are available from the corresponding authors upon request. Source data are provided with this paper.

## Acknowledgements

This project benefited from several funding sources: European Research Council (ERC) Advanced 741773 (AAA) to L.B., ERC Consolidator 771599 (ICEBERG) to M.T.; Agence Nationale de la Recherche (ANR)-18-CE13-0001 to K.J. and M.T., Howard Hughes Medical Institute to S.L.R.-P and IRTELIS PhD programme from the CEA to S.T. Our imaging platform is supported by the Laboratory of Excellence Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology (LabEX GRAL) (ANR-10-LABX-49-01) and



the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche, CBH-EUR-GS, ANR-17-EURE-0003). We thank S. Diez (TU Dresden) for interesting discussions and sharing reagents.

### Author contributions

S.T. performed all experiments with motility assays; D.I. performed all experiments with gliding assays; J.G. purified and labelled tubulin and assisted S.T. and D.I. for all experiments; Z.M.H., M.E.D. and S.L.R.-P. purified dyneins; D.P., E.D. and C.L. discussed the founding hypothesis of the project; C.A. and L.S. performed preliminary experiments; K.J. analysed data; and L.B. and M.T. designed and directed the project.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00905-0>.

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to L.B. or M.T.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

---

**Supplementary information**

---

**Self-repair protects microtubules from  
destruction by molecular motors**

---

In the format provided by the  
authors and unedited

# Self-repair protects microtubules from their destruction by molecular motors

Sarah Triclin<sup>1\*</sup>, Daisuke Inoue<sup>1,2\*</sup>, Jérémie Gaillard<sup>1</sup>, Zaw Min Htet<sup>3</sup>, Morgan E. DeSantis<sup>3</sup>, Didier Portran<sup>5</sup>, Emmanuel Derivery<sup>6</sup>, Charlotte Aumeier<sup>7</sup>, Laura Schaedel<sup>1</sup>, Karin John<sup>8</sup>, Christophe Leterrier<sup>9</sup>, Samara L. Reck-Peterson<sup>3,4</sup>, Laurent Blanchoin<sup>1,10\$</sup>, Manuel Théry<sup>1,10\$</sup>

\*these authors contributed equally to this work.

\$ Address correspondence to: [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr) or [manuel.thery@cea.fr](mailto:manuel.thery@cea.fr)

1-University of Grenoble-Alpes, CEA, CNRS, INRA, Biosciences & Biotechnology Institute of Grenoble, UMR5168, LPCV, CytoMorpho Lab, 38054 Grenoble, France.

2-Department of Human Science, Faculty of Design, Kyushu University, 815-8540, Fukuoka, Japan.

3-Department of Cellular and Molecular Medicine, and Cell and Developmental Biology Section, Division of Biological Sciences, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA

4-Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase MD, USA

5-CRBM - CNRS UMR 5237, Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 05, FRANCE

6-MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0QH, UK

7-University of Geneva Department of Biochemistry, Science II 30, Quai Ernest-Ansermet  
1205 Genève, Switzerland

8- University of Grenoble-Alpes, CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, 38000 Grenoble, France.

9- University of Aix Marseille, CNRS, INP UMR7051, Marseille, France

10- University of Paris, INSERM, CEA, Institut de Recherche Saint Louis, U976, HIPI, CytoMorpho Lab, 75010 Paris, France.

## Supplementary information

Supplementary Methods

Supplementary References

Supplementary Figure legends

Supplementary Tables

Supplementary Movie legends

## Supplementary Methods

### Purification and labelling of brain tubulin

Bovine brain tubulin was purified in BRB80 buffer (80 mM 1,4-piperazinediethanesulfonic acid, pH 6.8, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>) according to previously published method<sup>1</sup>. Tubulin was purified from fresh bovine brain by three cycles of temperature-dependent assembly and disassembly in Brinkley Buffer 80 (BRB80 buffer; 80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl<sub>2</sub> plus 1 mM GTP)<sup>2</sup>. MAP-free neurotubulin was purified by cation-exchange chromatography (EMD SO, 650 M, Merck) in 50 mM PIPES, pH 6.8, supplemented with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EGTA (Malekzadeh-Hemmad et al., 1993). Purified tubulin was obtained after a cycle of polymerization and depolymerization.

Fluorescent tubulin (ATTO 488–labeled tubulin and ATTO 565–labeled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared according to previously published method<sup>3</sup>. Microtubules from neurotubulin were polymerized at 37°C for 30 min and layered onto cushions of 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 60% v/v glycerol, and sedimented by high centrifugation at 30°C. Then microtubules were resuspended in 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 40% v/v glycerol and labeled by adding 1/10 volume 100 mM NHS-ATTO (ATTO Tec), or NHSBiotin (Pierce) for 10 min at 37°C. The labeling reaction was stopped using 2 volumes of 2X BRB80, containing 100 mM potassium glutamate and 40% v/v glycerol, and then microtubules were sedimented onto cushions of BRB80 supplemented with 60% glycerol. Our labelling ratio is: for tubulin 488 nm 1.6 to 1.8 fluorophore by dimers and for tubulin 565 nm 0.6 to 0.7 fluorophore by dimers. We used NanoDrop one UV-Vis spectrophotometer (Thermofisher) to determine the labelling efficiency. Microtubules were resuspended in cold BRB80. Microtubules were then depolymerised and a second cycle of polymerization and depolymerization was performed before use.

### Purifications of molecular motors

Recombinant, truncated kinesin-1 motor protein was purified using bacterial expression as previously described<sup>4</sup>. Plasmid for the kinesin construct, pET17\_K560\_GFP\_His, was purchased from Addgene (15219, Cambridge, MA). Plasmid for the kinesin construct (GFP and SNAP) gratefully provided by Dr. Ross. Recombinant, truncated kinesin-1 motor protein fusion proteins were transfected into Rosetta2 (DE3)-pLysS E. coli (VWR) and expression was induced with 0.2 mM IPTG for 16 h at 20°C. Harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 8, 250 mM NaCl) containing 0.1% Tween-20, 0.5 mM ATP and

protease inhibitors (Roche) and lysed by sonification. The lysates were centrifuged 30 min at 25000 g and 4°C. We add 20 mM Imidazole to the clear lysates and were loaded onto a NiSepharose HP column (GE Healthcare). The column was washed with buffer B (50 mM sodium phosphate buffer pH 6, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP). Proteins were eluted in buffer C (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.2, 250 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP) then desalted into PEM-100 buffer containing 0.1 mM ATP, and snap-frozen in liquid nitrogen.

Klp2 was purified according to previous publication<sup>5</sup>. Full-length Klp2 cDNA (gratefully provided by Dr. S Diez) was cloned into the pET-30a(+) expression vector (Novagen) with Snap Tag to N-Ter and His Tag to C-Ter. The recombinant N-terminal SNAP tagged and C-terminal His Tagged fusion proteins were transfected into Rosetta2 (DE3)-pLysS E. coli (VWR) and expression was induced with 0.1 mM IPTG for 16 h at 15°C. Harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM ATP) containing 200 mM NaCl and protease inhibitors (Roche) and lysed in 0.05% v/v Triton X-100 (Sigma) by sonification. The lysates were centrifuged 30 min at 25000 g and 4°C. The clear lysates were loaded onto a NiSepharose HP column (GE Healthcare). The column was washed with buffer A containing 100 mM NaCl and 20 mM imidazole. Proteins were eluted in buffer A containing 100 mM NaCl and 250 mM imidazole then desalted into buffer A containing 100 mM NaCl without ATP. Gel filtration of Klp2 was performed on a fast protein liquid chromatography system with a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (Amersham Pharmacia Biotech). Column equilibration and chromatography were performed in buffer A containing 100 mM NaCl without ATP. Purified Klp2 was snap-frozen in liquid nitrogen. Snap-Klp2 was labelled with Snap Surface 488 (New England Biolabs) during purification.

Constitutive homodimer of Dyneins (Dyn1<sub>331 kDa</sub>) as previously described<sup>6</sup> were purified from yeast strain RPY1167 with the following genotype: MATa, his3-11,15, ura3-1, leu2-3,112, ade2-1, trp1-1, pep4Δ::HIS5, prb1Δ, PGAL1-ZZ-TEV-GFP-3XHA-GST- DYN1(331kDa)-gsDHA-KanR, pac1Δ, ndl1Δ::cgLEU2 according to<sup>7</sup>.

### **Preparation of microtubules for gliding assay experiment.**

Taxol stabilized microtubules were obtained by polymerising at 37°C a mixture of 20% labelled tubulin and unlabelled tubulin at 55 μM in BRB80 supplemented with 1 mM GTP, 5% DMSO and 2 mM MgCl<sub>2</sub>. The microtubule solution was then diluted with taxol buffer (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM paclitaxel and ~1% DMSO; pH 6.8).

GMPCPP microtubules were elongated by stepwise addition of tubulin (20 % labelled) into microtubule seeds in the presence of 0.5 mM GMPCPP in 1x BRB80 until the tubulin concentration reaches 10 μM. Prepared GMPCPP microtubules were diluted in HKEM (10 mM Hepes pH7.2; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 50 mM KCl).

Capped GDP microtubules were prepared by elongating microtubules from green-labelled GMPCPP seeds with 20  $\mu\text{M}$  of red-labelled tubulin in HKEM supplemented with 0.5 mM GTP for 20 min at 37°C. These microtubules were then capped by being diluted in 5  $\mu\text{M}$  of green-labelled tubulin in HKEM supplemented with 0.5 mM GMPCPP and incubation for 15 min at 37°C. Noteworthy, the preexisting red-tubulin is thus diluted in green-tubulin in the presence of GMPCPP. This led to the assembly of a second population of short microtubules that were less bright in the red channel than the capped GDP-microtubules.

### **Cover-glass micropatterning**

The micropatterning technique was adapted from according to previous publication<sup>5</sup>. Cover glasses were cleaned by successive chemical treatments: 30 min in acetone with sonication, 15 min in ethanol (96%), rinsing in ultrapure water, 2 h in Hellmanex III (2% in water), and rinsing in ultrapure water. Cover glasses were dried using nitrogen gas flow, oxidized with oxygen plasma (5 min, 80 W, FEMTO; Diener Electronics) and incubated for one day in a solution of silane-PEG (30 kDa, PSB-2014, creative PEG works) 1 mg/ml in ethanol 96% and 0.1% of HCl, with gentle agitation at room temperature. Cover glasses were then successively washed in ethanol 96 % and ultrapure water, dried with nitrogen gas, and stored at 4°C. Passivated cover glasses were placed into contact with a photomask (Toppan) with a custom-made vacuum-compatible holder and exposed to deep UV (7 mW/cm<sup>2</sup> at 184 nm, Jelight) for 1 min. Deep UV exposure through the transparent micropatterns on the photomask created oxidized micropatterned regions on the PEG-coated cover glasses.

### **Microfluidic circuit fabrication and flow control**

The microfluidic device was fabricated in PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) using standard photolithography and soft lithography. The master mold was fabricated by patterning 50- $\mu\text{m}$  thick negative photoresist (SU8 3050, Microchem, MA) by photolithography. A positive replica was fabricated by replica molding PDMS against the master. Prior to molding, the master mold was silanized (trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane, Sigma) for easier lift-off. One inlet and one outlet ports were made in the PDMS device using 0.5 mm soft substrate punches (UniCore 0.5, Ted Pella, Redding, CA). Connectors to support the tubing were made out of PDMS cubes (0.5 cm side length) with a 1.2 mm diameter through hole. The connectors were bonded to the chip ports using still liquid PDMS as glue, which was used to coat the interface between the chip and the connectors, and was then rapidly cured on a hotplate at 120°C. Teflon tubing (Tefzel, inner diameter: 0.03" outer

diameter: 1/16", Upchurch Scientific) was inserted into the two ports serving as outlets. Tubing with 0.01" inner and 1/16" outer diameter was used to connect the inlets to a computer- controlled microfluidic pump (MFCS-4C, Fluigent, Villejuif, France). Flow inside the chip was controlled using the MFCS-Flex control software (Fluigent).

## Statistical analysis of microtubule lifetimes

Statistical test were performed using the free software package R (<http://www.R-project.org>).

Analysis of survival curves in the absence of glycerol :

Survival curves were compared using a two-sample non-parametric log-rank test. To extract life-times we averaged survival curves over all experiments (simple averages) and fitted experimental survival curves to a theoretical model derived from a Weibull distribution

$$S(t) = 1 + \alpha \left[ e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^k} - 1 \right], \quad (1)$$

where  $k$  denotes a scale factor,  $\tau$  denotes a life-time, and  $\alpha$  denotes the fraction of microtubules which will break as time  $t \rightarrow \infty$  (see Supplementary Table 1 and Supplementary Figure 2A). A scale factor  $k \approx 1$  denotes an exponential decay, whereas a scale factor  $k > 1$  denotes an aging process, where the microtubule failure increases over time.

Analysis of survival curves in the presence of 10% glycerol :

Since microtubules depolymerized slowly in the presence of glycerol ( $\leq 1 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ) and to exclude any variation in microtubule survival times due to length variations in the microtubules (see Supplementary Tables S11-S14) we compared only microtubules of the same length, i.e. microtubules were sorted according to their length into bins with a width of  $2 \mu\text{m}$ . Survival curves were then compared using a two-sample non-parametric log-rank test. To extract life-times of microtubules we averaged survival curves over all experiments (simple averages) for microtubules of comparable length  $L = 10 \pm 1 \mu\text{m}$  and fitted these curves to a theoretical model derived from a Weibull distribution similar to Eq. (1) with a lag time  $t_0$

$$S(t) = 1 + \alpha \left[ e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)^k} - 1 \right], \quad (2)$$

where  $k$  denotes a scale factor,  $\tau$  denotes a life-time, and  $\alpha$  denotes the fraction of microtubules which will break as time  $t \rightarrow \infty$  (see Supplementary Tables 2 and 3 and Supplementary Figure 2B, C and D).

## Statistical analysis of tubulin incorporation sites

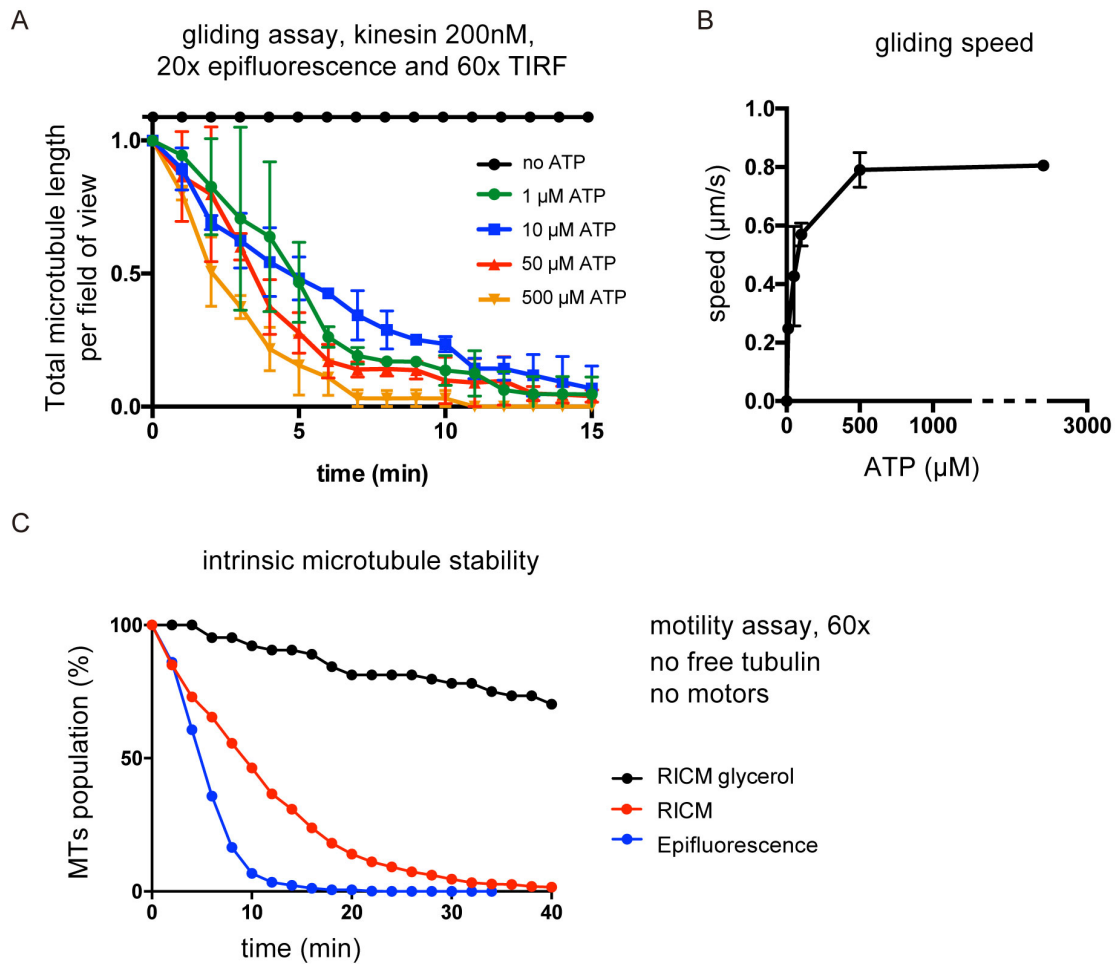
Incorporation of free tubulin into end-stabilized microtubules was characterized by analysing distances between incorporation sites and the length of incorporation spots. Only incorporation spots which were more than 3  $\mu\text{m}$  apart (on the same microtubule) were counted as separate incorporation spots. To determine distances, microtubules were concatenated in a random order but such that microtubules containing incorporation spots alternated with microtubules containing no incorporation spots in a regular order. We then measured center-to-center distances between incorporation sites. The samples of distance distributions and length distributions were compared using a two-sample non-parametric Wilcoxon test.

## Supplementary References

1. Vantard, M., Peter, C., Fellous, A., Schellenbaum, P. & Lambert, A. M. Characterization of a 100-kDa heat-stable microtubule-associated protein from higher plants. *Fed. Eur. Biochem. Soc. J.* **220**, 847–853 (1994).
2. Shelanski, M. Chemistry of the filaments and tubules of brain. *J. Histochem. Cytochemistry* **21**, 529–539 (1973).
3. Hyman, A. *et al.* Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* **196**, 478–85 (1991).
4. Pierce, D. W. & Vale, R. D. Assaying processive movement of kinesin by fluorescence microscopy. *Methods Enzymol.* **298**, 154–171 (1998).
5. Portran, D., Gaillard, J., Vantard, M. & Thery, M. Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks. *Cytoskeleton* **70**, (2013).
6. Reck-Peterson, S. L. *et al.* Single-Molecule Analysis of Dynein Processivity and Stepping Behavior. *Cell* **126**, 335–348 (2006).
7. DeSantis, M. E. *et al.* Lis1 Has Two Opposing Modes of Regulating Cytoplasmic Dynein. *Cell* **170**, 1197-1208.e12 (2017).



## Supplementary Figures

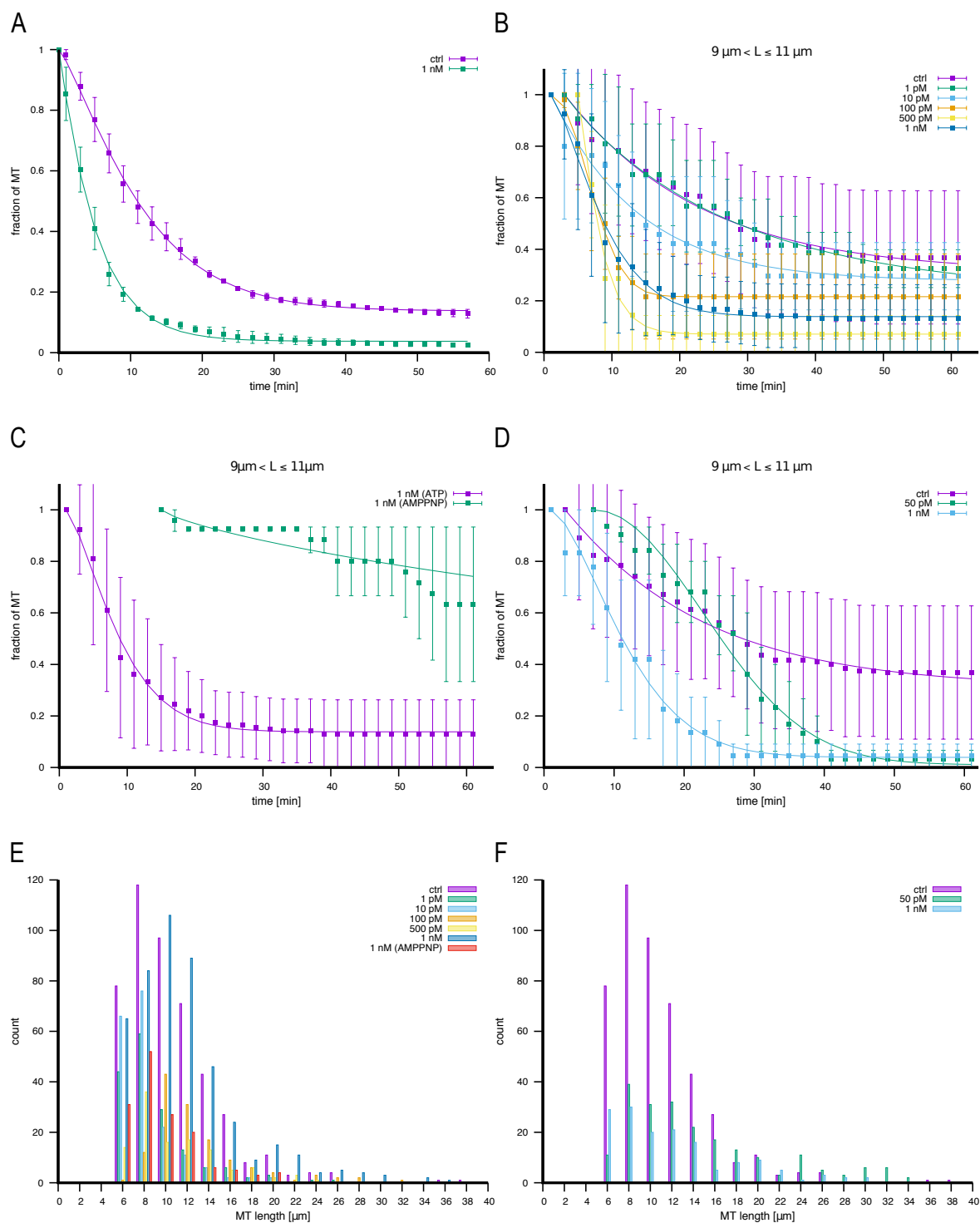


### Supplementary Figure 1 – Role of ATP in microtubule destruction

A – Quantification of microtubule length variations at varied ATP concentrations ranging from 0 to 500  $\mu$ M. The microtubule lengths were measured for all microtubules in the 600- $\mu$ m-wide fields every minute during 15 minutes. Values of microtubule length were averaged and normalized with respect to the initial length (Number of independent experiments N=2, n=20). Error bars correspond to standard deviation.

B – Dependence of the velocity of kinesin-driven microtubules on ATP concentration ranging from 0 to 2.7 mM. Microtubules were stabilized by taxol. (Number of independent experiments N=2, n=20). Error bars correspond to standard deviation.

C - Survival curve of labelled microtubules under TIRF visualisation (blue curve), unlabelled microtubule under RICM visualisation (red curve) and unlabelled microtubule stabilized by 10% glycerol visualised with RICM (black curve). Control epifluorescence: n=659, control RICM: n=541, control RICM 10% glycerol: n=64.



## Supplementary Figure 2 – Statistical tests for the role of molecular motors

A-D – Experimental microtubule survival curves (symbols) and analytical curves (solid lines) obtained by a best fit to Eqs. (1) (A) or (2) (B, D) in the supplemental material. The experimental curves were obtained by averaging the proportion of MTs with respect to the initial amount of MTs (normal averages) over several experiments. The error bars represent the standard deviation. The results of the parameter fits for A, B and D are summarized in Supplementary Tables 1, 2 and 10. Differences

between survival curves where tested via a non-parametric two-sample log rank test. The p-value in (A) is  $<0.0001$ . The remaining p-values are summarized in Supplementary Tables 3-6 and 11.

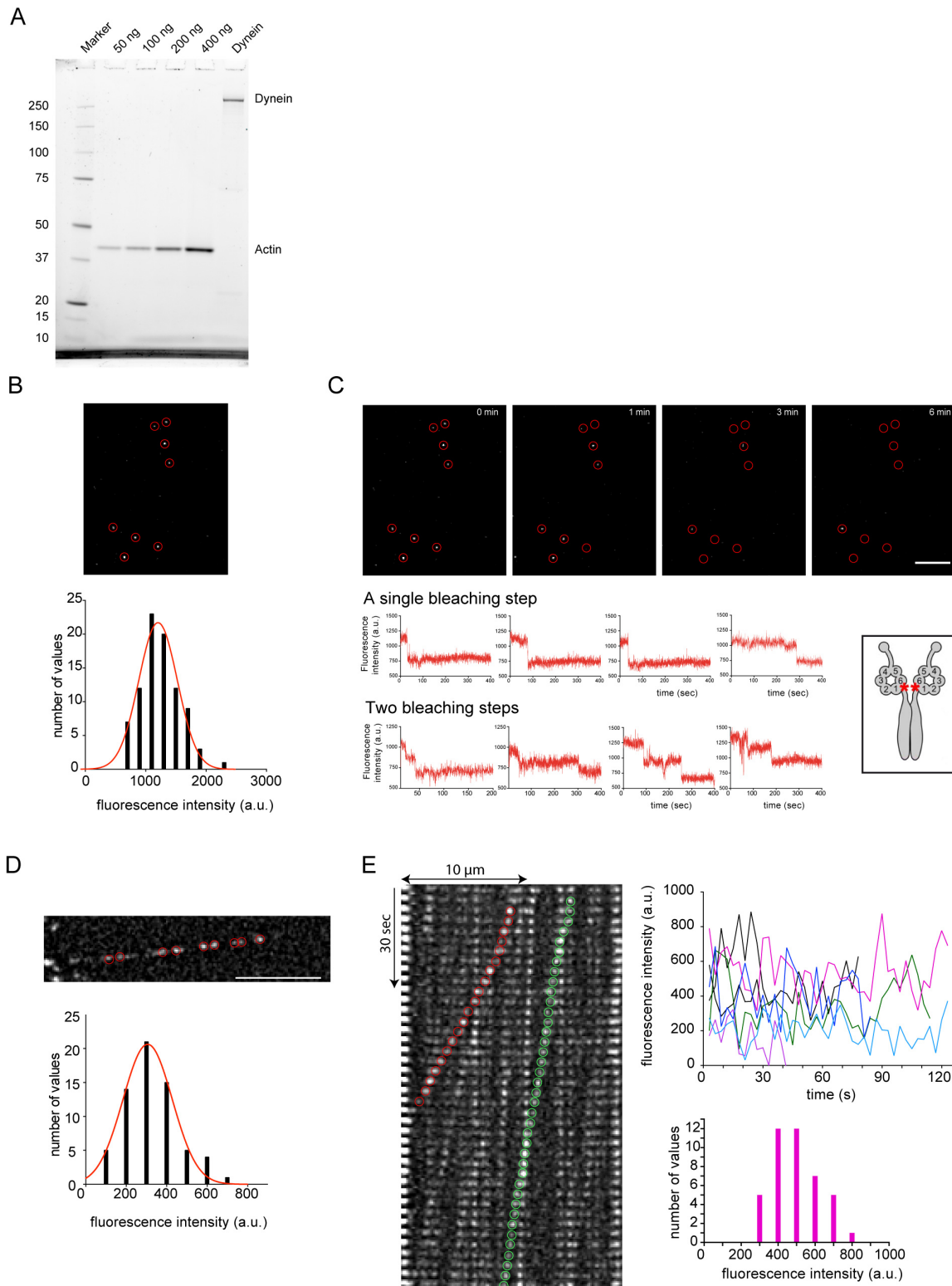
A – Survival curves in the absence and presence of klp2 motors (1 nM) in the absence of glycerol.

B – Survival curves of microtubules of length  $L=10\pm 1$  in the presence of klp2 motors with the concentrations as indicated in the legend and in the presence of 10% glycerol.

C – Survival curves of microtubules of length  $L=10\pm 1$  in the presence of klp2 motors (1 nM) with either ATP or the non-hydrolysable analogue AMPPNP and in the presence of 10% glycerol. The sample with 1 nM klp2 and ATP is the same as in (B).

D – Survival curves of microtubules of length  $L=10\pm 1$  in the presence of dynein motors with the concentrations as indicated in the legend and in the presence of 10% glycerol. The control sample is the same as in (B).

E,F – Histogramm of microtubule length distributions in survival experiments in the presence of klp2 (E) and dynein motors (F). Microtubule length distributions significantly vary between experimental conditions (see Supplementary Tables 8-9 and 13-14).



**Supplementary Figure 3 – Experimental evidence for the use of single dyneins.**

A - Sypro Red-stained SDS-PAGE gel of dynein purified from strain RPY1167 used in this work. Actin is used as a standard to determine protein amount. The right lane is representative of all dynein preps used in this study. The faint lower molecule weight band in the dynein prep is TEV protease left that was used to cleave dynein from

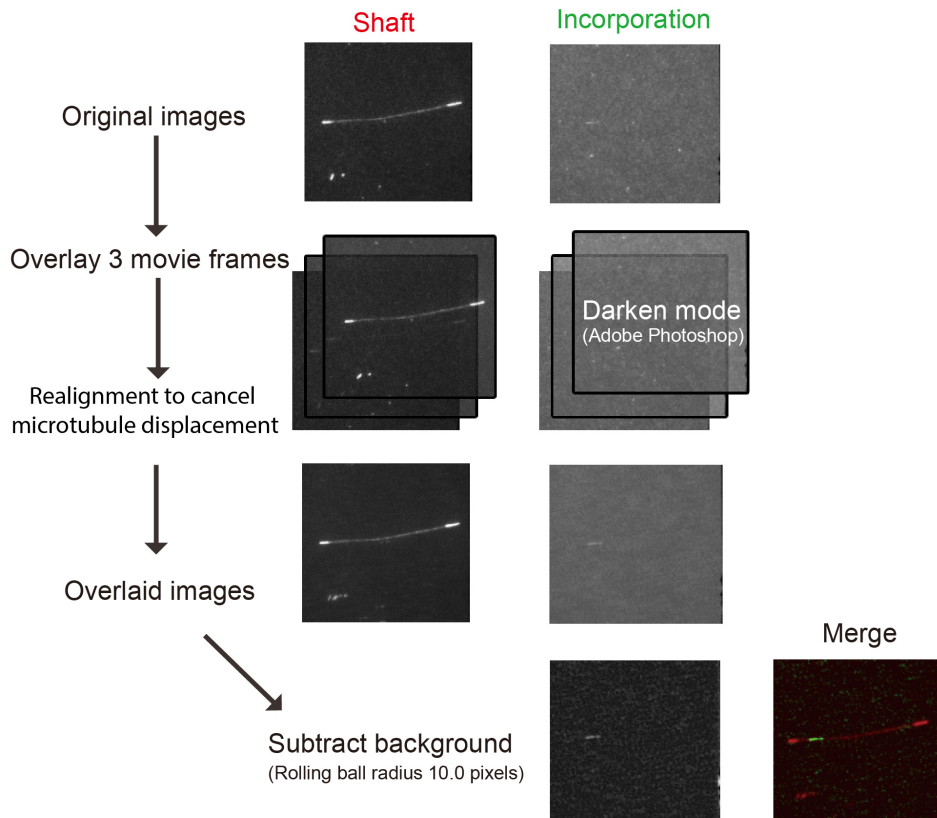
beads. This experiment has been performed once for this purification but is performed systematically for each purification and display the same degree of purity. B – TAMRA-labelled dyneins plated at 50 pM on the surface of a coverslip and photobleached by a high laser intensity in TIRF microscopy. The buffer was identical to the buffer used during the motility assay in Figure 3: 50 mM KCl; 16 mM pipes; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 2,6 mM ATP; 1 mM GTP; 10 mM hepes, 20 mM DTT; 3 mg/ml glucose; 20 µg/ml catalase; 100 µg/ml glucose oxidase, 0.3% BSA. Scale Bar: 10 µm. Red circles illustrate the region of interest in which fluorescence intensity was measured. Graph shows the distribution of fluorescence intensities in the first image of the photobleaching sequence. The distribution is not larger than the average value, suggesting the absence of clusters with multiple dimers of dyneins.

C – Graphs show the fluorescence intensities of bleaching particles over time. 96% (83/86) of the particles displayed one or two bleaching steps, as it can be expected for single dyneins dimers with two fluorophores<sup>7</sup>, as illustrated in the schematic drawing. Red circles illustrate the region of interest in which fluorescence intensity was measured. Scale Bar: 10 µm.

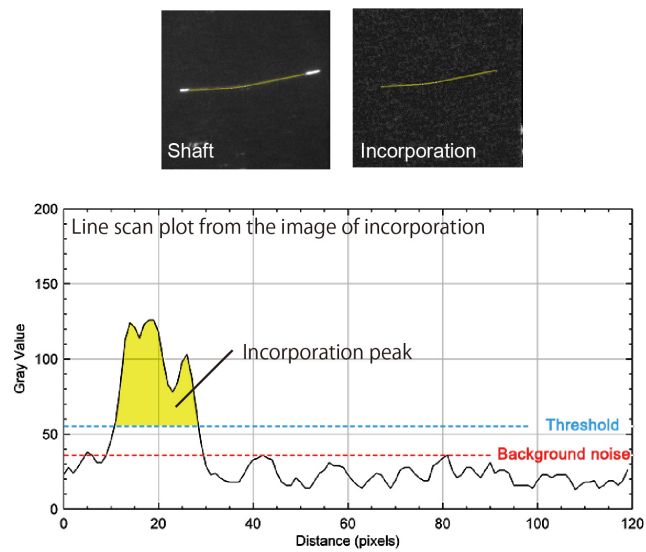
D- Same conditions and image sequence as in Figure 3C. TAMRA-labelled dyneins were plated at 50 pM onto capped microtubule. Red circles illustrate the region of interest in which fluorescence intensity was measured. Scale bar : 5 µm. Graph shows the distribution of fluorescence intensities in the first image of the sequence. Intensities were lower than in the bleaching sequence since the aim was to monitor motor motion and microtubule survival, but the relative width of the distribution with respect to the average value was similar to the one measured in the photobleaching sequence, showing that the apparent heterogeneity of signal intensity was consistent with the presence single dynein dimers observed in the photobleaching experiments in panel B.

E- Same experiment as in D. The fluorescence intensities of particles were monitored over time as illustrated on the kymograph by colored circles and plotted on the top graph. The fluorescence intensity of isolated particles appeared to fluctuate about 100% over time. The amplitude of the variations, represented in the bottom histogram, was similar to the amplitude measured over various particles in the first image (analysed in panel D). This showed that the origin of fluorescence variations were associated to the biochemical conditions and imaging procedure rather than to the presence of clusters of dimers of dynein.

A



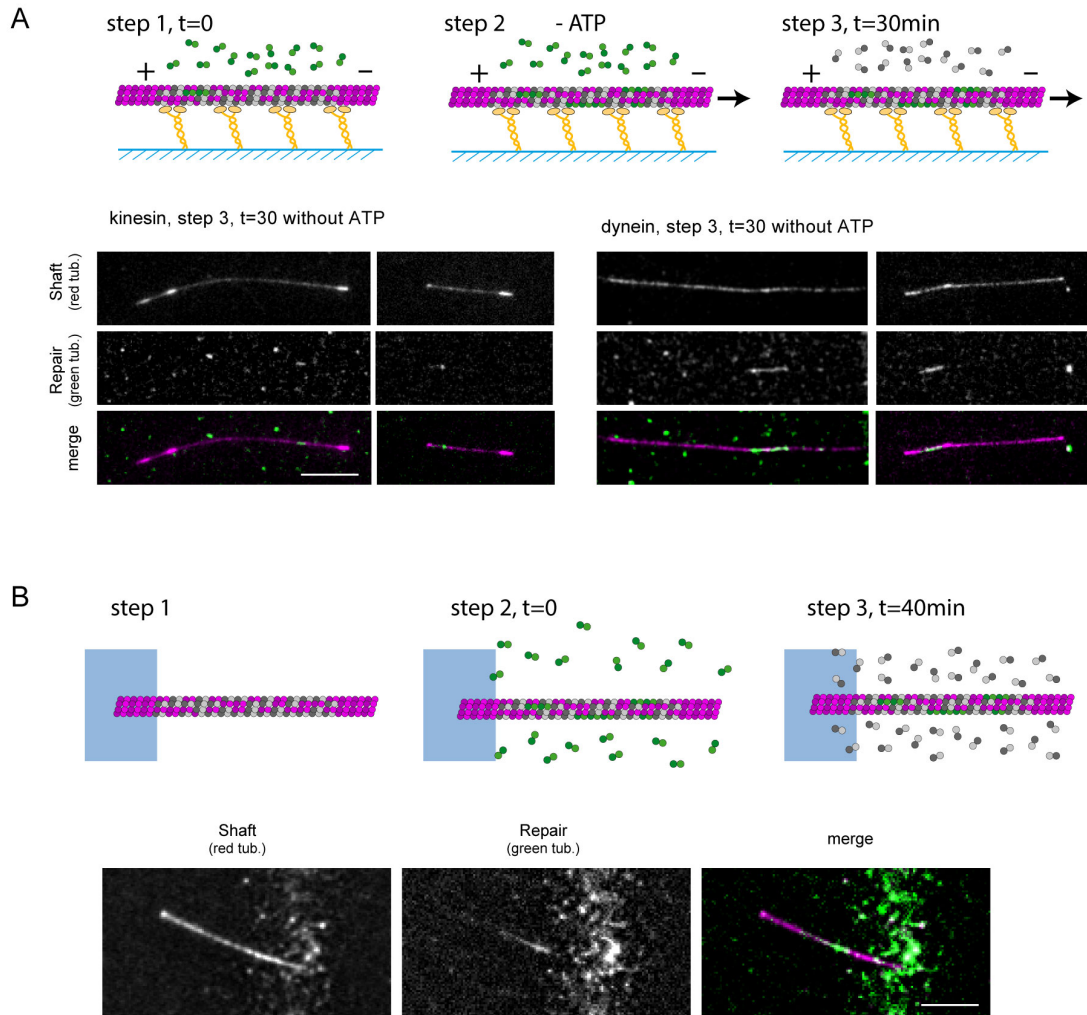
B



## **Supplementary Figure 4 – image processing to detect incorporations**

Movies were recorded by taking images every second during 30 s. Quantification of the incorporation of free green tubulin dimers in red microtubule shaft was done by measuring green fluorescence intensity along the microtubule using a line scan after image processing.

- A- Three sequential frames were selected at an arbitrarily given time point. Overlaid images were prepared by using Adobe Photoshop original macro for each channel by cancelling the displacement of microtubules. To overlay incorporation images, Photoshop layer mode “darken mode” was applied to each image in order to reduce background noise. The background of the overlaid image of incorporation was subtracted by Image J (Rolling ball radius 10.0 pixels).
- B- The incorporation peak in the Image J line scan plot was defined as peaks above the threshold value 1.5 times higher than background peaks.



### Supplementary Figure 5 – Spontaneous incorporation on microtubule lattice.

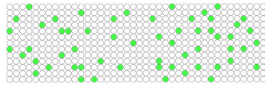
A- Images show the microtubule shaft (low intensity) with associated cap and seed (high intensity) (top row), the incorporation of free tubulin dimers (middle row), and the overlay of the two signals (bottom row) after 30 mn in absence of ATP, ie: no gliding condition. In these examples, microtubules are immobilized on kinesin-1 or dynein for 30 minutes. Scale bar: 10  $\mu$ m.

B- Images show the microtubules shaft (left), the incorporation of free dimers tubulin (middle) and the overlay of the two signals (right) after 40 min of self-repair in control condition without molecular motors. Scale bar: 10  $\mu$ m.



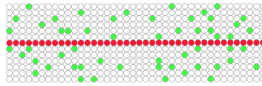
A

lattice with 10% green dimers

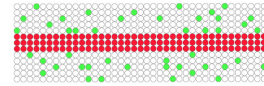


Only 52 dimers are labelled so linear intensity is not constant.

incorporation with 100% red dimers

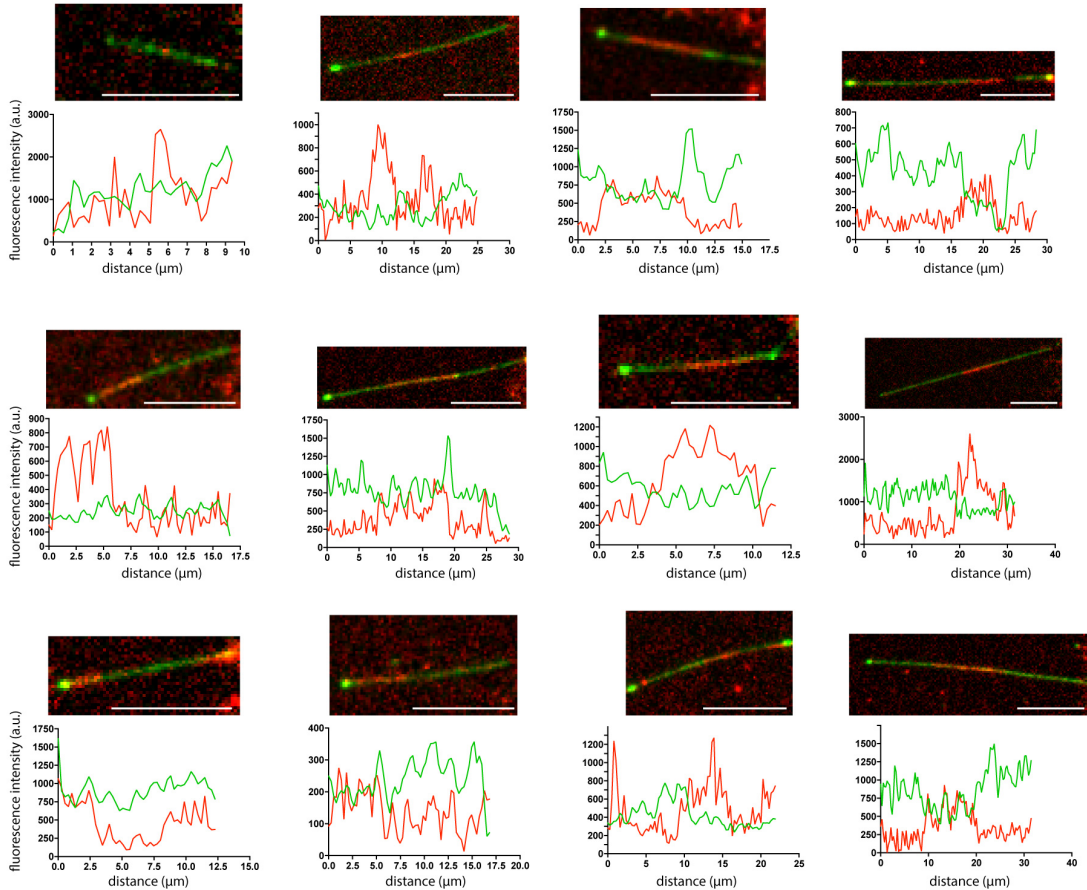


Green loss is low and random (3 dimers here); it may not be detectable nor correlated to red incorporation.



Green loss (14 dimers) is more likely to be detected and correlated to red incorporation.

B



## Supplementary Figure 6 – Replacement of green by red dimers at repair sites

A- Schematic representation of the repair process. Considering that all dimers are not labelled in the lattice, the green fluorescence intensity along the lattice is heterogeneous. So the loss of a protofilament may be associated to a low reduction of fluorescence which may not be detected. In addition, when detectable, the decrease of fluorescence is a probabilistic event which may not be correlated to the loss of material and thus to the gain of red fluorescence.

B- Examples of fluorescence linescan in green (initial lattice) and red (incorporation) fluorescences. Conditions are similar to Figure 5F. Examples on the left do not show a correlation whereas it is clearly visible in examples on the right.

## Supplementary Tables

### Microtubule life times in the presence of KINESINS without glycerol :

kpl2 conc.	amplitude $\alpha$	scale factor k	life time $\tau$ [min]
Ctrl	0.862±0.003	1.24±0.02	12.3±0.1
1 nM	0.962±0.003	1.04±0.03	5.26±0.09

**Supplementary Table 1** : Effect of klp2 motors on the failure of microtubules: Results of a parameter fit of a theoretical survival function derived from the Weibull distribution [Eq. (1), see Supplementary Methods] to the experimental survival curves of microtubules (see Supplementary Figure 2A). The parameters are presented as mean±SD. A two-sample log-rank test gives a p-value of <0.0001. The total number of microtubules is N=588 (Ctrl) and N=1130 (1 nM klp2).

### Microtubule lifetimes in the presence of KINESINS with 10% glycerol :

For the analysis, one experiment with control conditions was dropped, since during the whole observation period, only 1 out of 56 microtubules depolymerized.

kpl2 conc.	amplitude $\alpha$	scale factor k	life time $\tau$ [min]	lag time $t_0$ [min]
Ctrl	0.69±0.03	1.02±0.07	20±2	3
1 pM	0.78±0.03	0.96±0.06	25±2	3
10 pM	0.72±0.01	1.02±0.07	12.7±0.7	1
100 pM	0.784±0.002	2.10±0.06	7.47±0.08	1
500 pM	0.929±0.005	1.18±0.08	3.5±0.1	5
1 nM	0.862±0.005	1.39±0.06	8.7±0.2	1

**Supplementary Table 2** : Effect of klp2 motors on the failure of microtubules in the presence of glycerol: Results of a parameter fit of a theoretical survival function derived from the Weibull distribution to [Eq. (2), see Supplementary Methods] the experimental survival curves of microtubules of the length  $9 \mu\text{m} < L \leq 11 \mu\text{m}$  (see Supplementary Figure 2B). The lag time  $t_0$  was determined as the latest time, where all observed microtubules are intact. The parameters are presented as mean±SD. The results of statistical tests and the sample sizes are summarized in Supplementary Tables 3 to 9.

**P-values for the comparison of survival curves of microtubules in the presence of KINESINS (two-sample log-rank test) :**

klp2 conc .	1 pM	10 pM	100 pM	500 pM	1 nM
Ctrl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	** 0.0015
1 pM	—	n.s.	n.s.	n.s.	*** 0.0003
10 pM	—	—	n.s.	n.s.	** 0.0088
100 pM	—	—	—	n.s.	n.s.
500 pM	—	—	—	—	n.s.

**Supplementary Table 3** : p-values of a two-sample log-rank test performed for microtubules of length  $7 \mu\text{m} < L \leq 9 \mu\text{m}$  in the presence of klp2 motors of varying concentration with 10% glycerol. The sample sizes are given in Supplementary Table 7.

klp2 conc.	1 pM	10 pM	100 pM	500 pM	1 nM
Ctrl	n.s.	n.s.	**** <0.0001	**** <0.0001	**** <0.0001
1 pM	—	n.s.	** 0.0051	**** <0.0001	** 0.0047
10 pM	—	—	n.s.	** 0.0093	n.s.
100 pM	—	—	—	n.s.	n.s.
500 pM	—	—	—	—	n.s.

**Supplementary Table 4** : p-values of a two-sample log-rank test performed for microtubules of length  $9 \mu\text{m} < L \leq 11 \mu\text{m}$  in the presence of klp2 motors of varying

concentration with 10% glycerol. The sample sizes are given in Supplementary Table 7.

kpl2 conc.	1 pM	10 pM	100 pM	500 pM	1 nM
Ctrl	n.s.	n.s.	****	n.s.	****
			<0.0001		<0.0001
1 pM	—	n.s.	**	n.s.	n.s.
			0.0049		
10 pM	—	—	*	n.s.	n.s.
			0.0106		
100 pM	—	—	—	n.s.	n.s.
500 pM	—	—	—	—	n.s.

**Supplementary Table 5** : p-values of a two-sample log-rank test performed for microtubules of length  $11 \mu\text{m} < L \leq 13 \mu\text{m}$  in the presence of klp2 motors of varying concentration with 10% glycerol. The sample sizes are given in Supplementary Table 7.

MT length	$7 \mu\text{m} < L \leq 9 \mu\text{m}$	$9 \mu\text{m} < L \leq 11 \mu\text{m}$	$11 \mu\text{m} < L \leq 13 \mu\text{m}$
p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001

**Supplementary Table 6** : p-values of a two-sample log-rank test performed for microtubules of length as indicated in the table header for microtubule survival statistics in the presence of 1 nM klp2 motors either with ATP or AMPPNP . The sample sizes are given in Supplementary Table 7.

**Summary of sample sizes of microtubule failure experiments in the presence of KINESINS and 10% glycerol:**

MT length	7 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 9 $\mu\text{m}$		9 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 11 $\mu\text{m}$		11 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 13 $\mu\text{m}$	
klp2 conc.	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>
Ctrl	118	60	97	63	71	52
1 pM	59	27	29	20	13	12
10 pM	76	35	22	16	11	9
100 pM	12	6	43	35	31	30
500 pM	36	21	16	15	17	13
1 nM	84	61	106	89	89	79
1 nM (AMPPNP)	52	24	27	9	20	10

**Supplementary Table 7 :** Summary of sample sizes for survival experiments of microtubules in the presence of klp2 motors. Shown is the total number of microtubules in the sample (N<sub>total</sub>) and the number of microtubules, which completely depolymerized during the observation period of ~60 min (N<sub>obs</sub>). L denotes the approximate length of the microtubules. The condition 1 nM (AMPPNP) indicates microtubule failure in the presence of 1 nM klp2 motors and the non-hydrolysable analogue AMPPNP, instead of ATP.

**Summary of the analysis of microtubule length distributions in the presence of KINESINS (normality Test, two-sample Wilcoxon test)**

klp2 conc.	Mean [ $\mu\text{m}$ ]	SD [ $\mu\text{m}$ ]	p-value	N
Ctrl	11	4	<0.0001	466
1 pM	9	4	<0.0001	164
10 pM	8	3	<0.0001	187
100 pM	13	5	<0.0001	132
500 pM	11	4	<0.0001	113
1 nM	12	5	<0.0001	468
1 nM (AMPPNP)	10	3	<0.0001	148

**Supplementary Table 8 :** Mean $\pm$ standard deviation (SD) of microtubule length distributions in microtubule failure experiments in the presence of klp2 motors and

10% glycerol. The p-value was obtained using a normality test (Shapiro-Wilk test). A p-value of <0.0001 indicates a non-Gaussian distribution. N denotes the sample size.

klp2 conc.	1 pM	10 pM	100 pM	500 pM	1 nM	1 nM
	AMPPNP					
Ctrl	<0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.	0.0031	—
1 pM	—	0.0087	<0.0001	0.0001	<0.0001	—
10 pM	—	—	<0.0001	<0.0001	<0.0001	—
100 pM	—	—	—	<0.0001	0.0003	—
500 pM	—	—	—	—	n.s.	—
1 nM	—	—	—	—	—	<0.0001

**Supplementary Table 9** : P-values of a non-parametric two-sample Wilcoxon test of the length distributions of microtubules (two-sided, unpaired) for microtubule failure experiments in the presence of klp2 motors and 10% glycerol. A p-value <0.0001 indicates a true-location shift in the distributions of the two samples. The sample sizes are given in Supplementary Table 7.

### Microtubule lifetimes in the presence of DYNEIN motors with 10% glycerol :

For the analysis, one experiment with control conditions was dropped, since during the whole observation period, only 1 out of 56 microtubules depolymerized. The control conditions are the same as for klp2 motors.

dynein conc.	amplitude $\alpha$	scale factor k	life time $\tau$ [min]	lag time [min]
Ctrl	0.69±0.03	1.02±0.07	20±2	3
50 pM	0.99±0.02	2.1±0.1	21.6±0.6	7
1 nM	0.961±0.008	1.55±0.08	12.4±0.3	1

**Supplementary Table 10** : Effect of dynein motors on the failure of microtubules: Results of a parameter fit of a theoretical survival function derived from the Weibull distribution [Eq. (2), see Supplementary Methods] to the experimental survival curves of microtubules of the length  $9 \mu\text{m} < L \leq 11 \mu\text{m}$  (see Supplementary Fig. S2D). The lag time  $t_0$  was determined as the latest time, where all observed microtubules are intact. The parameters are presented as mean±SD. The results of statistical tests and the sample sizes are summarized in Supplementary Tables 11 to 14.

### P-values for the comparison of survival curves of microtubules in the presence of DYNEINS (two-sample log-rank test) :

MT length	$7 \mu\text{m} < L \leq 9 \mu\text{m}$		$9 \mu\text{m} < L \leq 11 \mu\text{m}$		$11 \mu\text{m} < L \leq 13 \mu\text{m}$	
	dynein conc.	50 pM	1 nM	50 pM	1 nM	50 pM
Ctrl	****	****	*	****	n.s.	****
	<0.0001	<0.0001	0.0124	<0.0001		<0.0001
50 pM	—	n.s.	—	***	—	****
				0.0009		<0.0001

**Supplementary Table 11** : p-values of a two-sample log-rank test performed for microtubules of length L as indicated in the header for microtubule survival statistics in the presence and absence of dynein motors. The control sampe (Ctrl) is the same as in Supplementary Table 7. The sample sizes are given in Supplementary Table 12.

**Summary of sample sizes of microtubule failure experiments in the presence of DYNEINS and 10% glycerol:**

MT length dynein conc.	7 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 9 $\mu\text{m}$		9 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 11 $\mu\text{m}$		11 $\mu\text{m}$ < L $\leq$ 13 $\mu\text{m}$	
	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>	N <sub>total</sub>	N <sub>obs</sub>
Ctrl	118	60	97	63	71	52
50 pM	39	39	31	30	32	32
1 nM	30	26	20	19	21	21

**Supplementary Table 12 :** Summary of sample sizes for survival experiments of microtubules in the presence of dynein motors. Shown is the total number of microtubules in the sample (N<sub>total</sub>) and the number of microtubules, which completely depolymerized during the observation period of ~60 min (N<sub>obs</sub>). L denotes the approximate length of the microtubules. The control (Ctrl) is the same Ctrl sample as in Supplementary Table 7.

**Summary of the analysis of microtubule length distributions in the presence of DYNEINS (normality Test, two-sample Wilcoxon test)**

dynein conc.	Mean [ $\mu\text{m}$ ]	SD [ $\mu\text{m}$ ]	p-value	N
Ctrl	11	4	<0.0001	466
50 pM	15	7	<0.0001	211
1 nM	12	6	<0.0001	151

**Supplementary Table 13 :** Mean $\pm$ standard deviation (SD) of microtubule length distributions in microtubule failure experiments in the presence of dynein motors and 10% glycerol. The p-value was obtained using a normality test (Shapiro-Wilk test). A p-value of <0.0001 indicates a non-Gaussian distribution. N denotes the sample size.

dynein conc.	50 pM	1 nM
Ctrl	<0.0001	n.s
50 pM	—	<0.0001

**Supplementary Table 14 :** P-values of a non-parametric two-sample Wilcoxon test of the length distributions of microtubules (two-sided, unpaired) for microtubule failure



experiments in the presence of dynein motors and 10% glycerol. A p-value <0.0001 indicates a true-location shift in the distributions of the two samples. The sample sizes are given in Supplementary Table 12.

## Supplementary Movies legends

### **Supplementary Movie 1 - Gliding assay of stabilized microtubules.**

Taxol-treated (left) and GMPCPP-microtubules (right), labelled with 20% fluorescent tubulin, gliding on a layer of kinesin-1.

Images were taken with a 20x objective in epifluorescence microscopy.

Acquisition frame rate: 1 image every 5 seconds during 15 minutes. Display: 25  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 2 - Gliding assay of non-stabilized capped-GDP microtubules.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, gliding on a layer of kinesin-1.

Images were taken with a 20x objective in epifluorescence microscopy.

Acquisition frame rate: 1 image every 5 seconds during 15 minutes. Display: 25  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 3 - Microtubule breakage during gliding.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, gliding on a layer of kinesin-1. Microtubules were automatically detected and tracked in order to reposition the visualisation field so as to keep the moving microtubule at the center of the field.

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.

Acquisition frame rate: 1 image every 5 seconds during 15 minutes. Display: 5  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 4 - Microtubule breakage upon kinesin motor walk.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of kinesins (10nM Klp2).

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.

Acquisition frame rate: 1 image every 3 seconds during 3 minutes. Display: 5  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 5 – Microtubule breakage versus uncapping upon dynein motor walk.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of kinesins (1nM

Klp2).

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.  
Acquisition frame rate: 1 image every 3 seconds during 3 minutes. Display: 3 im/s.  
Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 6 – Single dynein motors walking on a capped microtubule.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of dyneins (50 pM). Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.  
Acquisition frame rate: 1 image every 3 seconds during 2 minutes. Display: 10 im/s.  
Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 7 – Microtubule breakage upon dynein motor walk.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of dyneins (50 pM). Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.  
Acquisition frame rate: 1 image every 3 seconds during 3 minutes. Display: 5 im/s.  
Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 8 - Free tubulin dimers protect microtubules during gliding assay on kinesins.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, gliding on a layer of kinesin-1 in the presence of unlabelled free tubulin dimers.  
Images were taken with a 20x objective in epifluorescence microscopy.  
Acquisition frame rate: 1 image every 5 seconds during 15 minutes. Display: 25 im/s.  
Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 9 - Free tubulin dimers protect microtubules during gliding assay on dyneins.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, gliding on a layer of dyneins in the presence of unlabelled free tubulin dimers.  
Images were taken with a 20x objective in epifluorescence microscopy.  
Acquisition frame rate: 1 image every 5 seconds during 15 minutes. Display: 25 im/s.  
Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

### **Supplementary Movie 10- Free tubulin dimers protect microtubules during motility assay.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 20% fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of kinesins (10 nM Klp2) in the absence (left) or presence (right) of free tubulin dimers (14  $\mu\text{M}$ ).

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.

Acquisition frame rate: 1 image every 2 minutes during 1 hour. Display: 5 im/s.

Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Movie 11 - Free tubulin dimers incorporate along microtubules during gliding assay.**

Capped-GDP-microtubules, with the shaft labelled with 3% red fluorescent tubulin and the stable ends labelled with 20% red fluorescent tubulin (middle column), gliding on a layer of kinesins (kinesin-1) in the presence of unlabelled fluorescent free tubulin dimers after a 30-minute-long exposure to 14  $\mu\text{M}$  free green fluorescent tubulin dimers (left column).

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.

Acquisition frame rate: 1 image every second during 30 seconds. Display: 5 im/s.

Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Movie 12 - Free tubulin dimers incorporate along microtubules during motility assay.**

Capped-GDP-microtubules, labelled with 3% red fluorescent tubulin, were assembled from micropatterned seeds and served as tracks for the motility of kinesins (10 nM Klp2) in the presence of green free tubulin dimers (14  $\mu\text{M}$ ) which were further replaced by unlabelled dimers prior to imaging.

Images were taken with a 63x objective in TIRF microscopy with 1.5x magnifier.

Acquisition frame rate: 1 image every second during 30 seconds. Display: 5 im/s.

Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.3. Conclusions et perspectives

Nous avons donc mis en évidence que les moteurs moléculaires :

- 1) Sont capables de détruire des microtubules non stabilisés sur leur longueur suite à un « gliding assay ». Cet effet n'avait jamais été observé car la majorité de ces essais sont réalisés avec des microtubules stabilisés. Nous avons en effet pu constater que l'effet de déstabilisation par des moteurs n'existe effectivement pas sur des microtubules stabilisés par du taxol ou du GMPCPP. En présence de moteurs, les microtubules GDP (non stabilisés) sont détruits par le mouvement des moteurs suite à l'addition d'ATP. La majorité disparaissent par une dépolymérisation commençant par l'extrémité plus du microtubule, et 20% disparaissent suite à une cassure au sein de la paroi du microtubule. Les mécanismes aboutissant à la destruction des microtubules sont ici très difficiles à identifier, car en « gliding assay » nous avons plusieurs effets/forces qui s'appliquent simultanément sur les microtubules : des forces dues à la tension, à la torsion, ou à la collision des microtubules ; mais aussi, et c'est celui qui nous intéresse, l'effet direct de la marche des têtes motrices des moteurs sur la paroi du microtubule (VanDelinder, Adams, and Bachand 2016). C'est la raison pour laquelle j'ai ensuite fait des expériences de « motility assay » pendant lesquelles nous n'avons que l'effet direct des têtes motrices sur le microtubule.
- 2) Les moteurs moléculaires sont capables de détruire des microtubules non stabilisés sur leur longueur suite à un « motility assay ». En effet j'ai pu constater une diminution de la durée de vie en présence de moteurs et d'ATP. Et ce, même dans des conditions sans photo-toxicité en utilisant une méthode d'imagerie se basant sur le contraste de réflexion, permettant ainsi de s'affranchir du marquage des molécules par des fluorophores : le IRM (Interference Reflection Microscopy)(Mahamdeh et al. 2018). Dans le but de comprendre un peu mieux les mécanismes de destruction j'ai analysé la manière dont les microtubules étaient déstabilisés et j'ai mis en évidence qu'en présence de moteurs les microtubules subissent plus souvent des cassures au sein de leurs paroi (effet dépendant de la concentration en moteurs). Il a été aussi très intéressant de constater que ces effets des moteurs sont présents dans le cas de l'utilisation de Klp2 et des dynéines, soit dans le cas

d'agrégats (vésicule/ cargo-like) ou de molécules uniques respectivement. Le fait que des molécules uniques soient capables de créer des défauts et de détruire les microtubules montrent que les seules forces dues à la marche du moteur et à l'hydrolyse de l'ATP sont responsables de ce mécanisme. Ceci va donc dans le sens de notre hypothèse qui est qu'une partie de l'énergie générée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP est transférée au microtubule, induisant ainsi une déstabilisation locale des liaisons entre les dimères de tubuline.

- 3) Les moteurs moléculaires sont capables d'induire un renouvellement de la paroi du microtubule. En présence de tubuline libre, la destruction des microtubules par les moteurs semble inhibée. En effet, la durée de vie des microtubules ne diminue plus, elle est même augmentée. Cette absence de destruction des microtubules est due au fait que chaque défaut créé par l'extraction de dimères par les moteurs est réparé par l'incorporation de nouveaux dimères de tubuline. Ceci a pu être mis en évidence grâce à l'utilisation de tubuline d'une couleur différente de celle constituant le microtubule initial. Dans le chapitre 2 j'ai montré que ce mécanisme de dynamique de la paroi existe, sans moteurs. Ici, je montre que les moteurs sont des catalyseurs, ils accélèrent, amplifient cette dynamique, induisant un renouvellement, un rajeunissement plus important du microtubule.

Nous avons mis en évidence l'importance de la présence de l'ATP et donc du mouvement des moteurs dans cet effet de destruction/réparation. Il est très intéressant de voir qu'il ne suffit pas que les moteurs interagissent avec le microtubule en se fixant mais il faut vraiment que celui-ci se déplace sur le microtubule. Ainsi, en se déplaçant sur le microtubule, les moteurs induisent un renouvellement permanent de la structure de celui-ci. Les détails du mécanisme permettant ce renouvellement induit par la « destruction » sont encore à explorer.

Nos données ouvrent de nouvelles perspectives sur l'étude de la dynamique des microtubules mais aussi sur ces propriétés mécaniques car en effet la structure de la paroi du microtubule dépend de l'état du nucléotide de la sous-unité  $\beta$ . L'hydrolyse du GTP en GDP provoque un

changement de conformation induisant une plus grande flexibilité du microtubule et une fragilité de celui-ci. Au contraire, l'échange de dimères GDP par de nouveaux dimères GTP, va changer localement la structure de la paroi, la rendre plus stable par définition, et plus rigide. Ainsi, en plus de moduler de manière directe les propriétés du microtubule, les moteurs moléculaires ont une action indirecte sur celui-ci, en induisant son rajeunissement. De plus, ces régions GTP sont certainement des lieux privilégiés pour le recrutement ou l'inhibition d'autres MAPs. Par exemple, il est possible que les moteurs moléculaires, en générant des sites constitués de tubuline GTP, soient impliqués dans la localisation spécifique de protéines le long des microtubules et pourraient être à l'origine par exemple de la distribution inégale de Tau dans les neurones. Ce qui aurait pour conséquence d'inhiber le passage de certains moteurs comme les kinésine-1 (Siahaan et al. 2019) et par conséquent de perturber l'équilibre du trafic cellulaire, participant ainsi à l'apparition de certaines maladies neurodégénératives (Chaudhary et al. 2018). Il est aussi intéressant de voir que cette action des moteurs peut aussi délocaliser certaines MAPs comme par exemple l'enzyme responsable de l'acétylation de la tubuline TAT1 (C. Coombes et al. 2016) ou encore MAP6 (Cuveillier et al. 2020). Il y aurait ainsi une coopération, une synergie entre les différents acteurs régulant la dynamique des microtubules.

#### 4. Conclusions et perspectives générale

Pendant ma thèse j'ai donc étudié la dynamique interne du microtubule ainsi que l'effet des moteurs moléculaires sur celle-ci. Depuis quelques années le domaine de la biologie du cytosquelette et plus particulièrement l'étude du microtubule voit l'émergence de nouvelles évidences montrant que le microtubule, longtemps considéré comme un simple tube homogène et inerte ayant uniquement une activité dynamique à ses extrémités, est en réalité dynamique tout au long de sa paroi.

Dans notre étude nous avons pu mettre en évidence grâce à des expériences couplées à de la simulation numérique la présence d'une dynamique de la paroi uniquement due à l'agitation thermodynamique des dimères de tubuline. Cette agitation thermodynamique favorise parfois la dissociation de dimères de tubuline, entraînant l'apparition de trous, de défauts, qui pourront par la suite être remplacés par de nouveaux dimères de tubuline, c'est que l'on a appelé la « respiration » de la paroi. Cependant ce phénomène est rare et apparait après des temps très longs. Nous avons ainsi montré qu'en plus de cet effet, il existe un mécanisme beaucoup plus important qui induit une dynamique de la paroi et une fragilité du microtubule : Les erreurs d'assemblages.

En effet, en fonction des conditions biochimiques dans lesquels ils ont été générés, les microtubules sont victimes d'erreurs pendant la polymérisation, entraînant une discontinuité du nombre de protofilaments, introduisant alors des défauts à leur surface (Janson and Dogterom 2004; Schaedel et al. 2015b). Mon laboratoire a aussi montré qu'il existe une plasticité de ces défauts et qu'ils peuvent être amplifiés par l'action d'une contrainte mécanique comme un flux.

Le début de mon travail de thèse a donc montré que les parois du microtubule sont loin d'être parfaites et qu'il existe une dynamique le long du microtubule *in vitro*. Cet environnement contrôlé nous a permis de pouvoir définir le caractère spontané de ce mécanisme.

Cependant sachant qu'il existe dans la cellule de multiples acteurs interagissant avec les microtubules, il a paru naturel de penser que ces acteurs pourraient avoir un effet sur la

dynamique de la paroi d'autant plus que récemment, nous avons pu assister à l'émergence d'études de l'effet de MAPs sur le microtubule sur toute sa longueur. Par exemple, l'équipe de Robert Cross a mis en évidence que l'attachement de la kinésine-1 à la surface du microtubule induit un changement dans la conformation de celui-ci (Peet, Burroughs, and Cross 2018). Antonina Roll-Mecak, a montré que les enzymes de coupures spastine et katanine sont aussi capables de moduler les propriétés internes de la paroi en induisant un renouvellement de celle-ci (Vemu et al. 2018). Très récemment l'équipe d'Isabelle Arnal et Christian Delphin ont mis en évidence que MAP6 pouvait en réalité créer des défauts le long de la paroi du microtubule et se retrouver dans le lumen de celui-ci (Cuveillier et al. 2020).

Dans la cellule, les microtubules sont au contact de moteurs moléculaires pour lesquels ils servent de rail lors du transport cellulaire. Cette étroite interaction entre microtubules et moteurs en font une piste privilégiée dans l'approfondissement de l'exploration de la dynamique du microtubule.

Ainsi pendant la deuxième partie de ma thèse j'ai étudié l'effet des kinésines et des dynéines sur la dynamique des parois des microtubules et j'ai pu mettre en évidence qu'il existe un mécanisme de destruction des microtubules par les moteurs, et que cette destruction est inhibée par la présence de tubuline libre qui va pouvoir s'incorporer et réparer le microtubule. Ce mécanisme de renouvellement du microtubule a un rôle de protection face à l'effet destructeur des moteurs moléculaires.

Ce qui est intéressant dans ce phénomène de réparation est que les dimères de tubuline nouvellement incorporés sont liés à un GTP, soit la forme non-hydrolysée du nucléotide, dont la conformation est connue pour être plus stable que sa version hydrolysée (Alushin et al. 2014; Manka and Moores 2018; Fedorov et al. 2019). Ces phénomènes d'échange de tubuline, de changement de la composition même de la paroi du microtubule entraîne des modifications de structure mais aussi de la mécanique du microtubule. Ce qui a notamment pour conséquence de créer des zones fortes, plus stables, qui ont été montrées comme étant des sites de sauvetage lors de la dépolymérisation du microtubule (Tropini et al. 2012; Dimitrov et al. 2008). Ces mécanismes de réparation et les changements de la dynamique du microtubule qui en découlent ont aussi été observés dans la cellule. Par exemple, il a aussi été montré que des sites de



réparation étaient présents au niveau des croisements entre microtubules ou dans des régions où les microtubules sont alignés. Ces sites sont en effet des lieux de frottements, où des contraintes mécaniques s'appliquent sur les microtubules (de Forges et al. 2016). Ces contraintes induisent des dommages, dont la visualisation est possible grâce à la présence de sites de tubuline d'une couleur différente du reste du microtubule ou indirectement grâce à l'utilisation d'anticorps dirigé contre la tubuline en conformation GTP (Dimitrov et al. 2008). Mon laboratoire a aussi montré l'existence de sites d'incorporation de nouveaux dimères de tubuline le long du microtubule (expérience de photoconversion (Aumeier et al. 2016)). L'une des observations importantes de ce travail est que la génération de défauts par impact laser induit une croissance accrue et une augmentation significative de la durée de vie des microtubules.

Etant donné que j'ai pu mettre en lumière que les moteurs sont capables de générer des défauts le long des microtubules, il est logique de proposer que les moteurs pourraient induire un changement de la dynamique des microtubules favorable à leur stabilisation.

Ainsi, la deuxième partie de ma thèse m'a permis de mettre en évidence que les moteurs moléculaires sont capables de favoriser le renouvellement des parois du microtubule. Mais les mécanismes moléculaires exactes régissant ce rajeunissement induit par la destruction sont encore à explorer. L'étude des corrélations entre les effets de plusieurs facteurs, dont les moteurs est primordial. En effet, il est clair que les kinésines et les dynéines sont influencées par les MAPs et influencent elles-mêmes le recrutement de ces MAPs ou l'apparition de modifications post traductionnelles. Par exemple, une déplétion de l'enzyme TAT1 va entraîner une diminution significative du taux d'acétylation du microtubule, ce qui va entraîner une perturbation du transport cellulaire (Even et al. 2019). Les moteurs sont ainsi impliqués dans les multiples processus de régulation tels que les inductions, les boucles de rétrocontrôle ou encore de compétitions qui existent dans la cellule.

Il sera donc important de passer sur un modèle cellulaire pour la suite de cette étude, dans le cadre d'une approche « bottom-up » et de montrer que ce rajeunissement induit par la destruction des moteurs existe *in vivo*. Des expériences où l'on ferait varier la quantité de moteurs empruntant tel ou tel microtubule et où les nouveaux dimères de tubuline seraient visualisés *in*

*vivo* grâce à leur conformation GTP ou à leur habilité à recruter certaines MAPs comme CLASP (Aher et al. 2020), CLIP-70 ou EB1 est primordial. Il serait particulièrement intéressant de travailler sur des cellules neuronales, connues pour avoir des microtubules particulièrement stables et un trafic cellulaire intense. Ces deux faits confortent notre hypothèse selon laquelle les moteurs auraient une implication très importante dans le maintien des microtubules stables au cours du temps. Toutes ces données soulèvent l'hypothèse qu'*in vivo*, les kinésines et les dynéines, ont un rôle primordial dans la durée de vie des microtubules et vont ainsi pouvoir cibler les microtubules qui doivent « vivre » plus longtemps. Instaurant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive à certains microtubules qui vont être stabilisés grâce à l'action des moteurs et avoir une conformation telle qu'ils vont recruter ou moduler certaines MAPs. Ce recrutement et le fait que le microtubule reste stable, augmente alors la probabilité de celui-ci d'être emprunté dans le cadre du trafic cellulaire. Il sera alors d'autant plus « détruit » puis « réparé » et donc d'autant plus rajeunit. Ce mécanisme pourrait aussi expliquer la présence de « route » préférentielle dans la cellule ou encore aider à comprendre les mécanismes régissant la polarité cellulaire (Nakata et al. 2011).

L'identification de ces nouveaux mécanismes mettent en lumière un nouvel aspect de la complexité de la dynamique des microtubules. Ils sont en effet importants et primordiaux dans la compréhension des mécanismes régulant le devenir et la fonction des microtubules, du cytosquelette et du vivant à plus grande échelle.

Pour finir sur une note plus philosophique, je voudrais soulever des questionnements auxquels je n'ai pas les réponses. Si un microtubule stable est en constant renouvellement, les dimères le constituant progressivement sont changés par de nouveaux dimères. Si bien que l'on peut imaginer qu'au bout d'un certain temps, aucun des dimères constituant un microtubule à un instant  $t$ , n'étant présent quand le microtubule a été créé. Alors est-ce le même microtubule ? Ceci rappelle inéluctablement l'expérience de pensée philosophique du bateau de Thésée qui soulève la question du problème de l'identité à travers le temps (Stéphane Ferret, Les éditions de minuit). Thésée, héros de la mythologie grec, partait en mer pour de grandes expéditions. Il affrontait de grands monstres marins, si bien qu'il abimait énormément son bateau. Il faisait alors réparer celui-ci par un maître artisan, qui remplaçait toutes les parties du bateau qui avait besoin d'être remplacées. Le bateau repart en mer, réparé, certains éléments sont neufs, mais le bateau est le même, il a la même forme, il a les mêmes performances, c'est le même bateau. A chaque retour d'expédition, le bateau, dans un piteux état doit être réparé. Avec le temps, absolument toutes les pièces du bateau ont été changées. Le bateau de Thésée est alors composé entièrement de nouveaux éléments. Peut-on alors toujours dire que c'est le bateau de Thésée ? Est-ce le même bateau qu'au départ ?

Je terminerai par une question encore plus générale. Si la majorité des cellules qui nous constitue ont été remplacées durant notre vie, et que même celles qui ne le sont pas, ont vu leurs composants se renouveler, finalement, sommes-nous la même personne qu'il y'a 10 ans ? Sommes-nous la même personne que le bébé que notre mère a mis au monde ? Qu'est-ce qui façonne notre identité ?

## Références

- Aher, Amol, Dipti Rai, Laura Schaedel, Jeremie Gaillard, Karin John, Qingyang Liu, Maarten Altelaar, Laurent Blanchoin, Manuel Thery, and Anna Akhmanova. 2020. "CLASP Mediates Microtubule Repair by Restricting Lattice Damage and Regulating Tubulin Incorporation." *Current Biology* 30 (11): 2175-2183.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.070>.
- Akhmanova, Anna, and Casper C. Hoogenraad. 2015. "Microtubule Minus-End-Targeting Proteins." *Current Biology* 25 (4): R162–71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.027>.
- Alushin, Gregory M., Gabriel C. Lander, Elizabeth H. Kellogg, Rui Zhang, David Baker, and Eva Nogales. 2014. "High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in  $\alpha$ -Tubulin upon GTP Hydrolysis." *Cell* 157 (5): 1117–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.053>.
- Arpağ, Göker, Elizabeth J. Lawrence, Veronica J. Farmer, Sarah L. Hall, and Marija Zanic. 2020. "Collective Effects of XMAP215, EB1, CLASP2, and MCAK Lead to Robust Microtubule Treadmilling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (23): 12847–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003191117>.
- Atherton, J., K. Jiang, M. Stangier, Yanzhang Luo, Shasha Hua, Klaartje Houben, Jolien J. E. van Hooff, et al. 2017. "A Structural Model for Microtubule Minus-End Recognition and Protection by CAMSAP Proteins." *Nature Structural & Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3483>.
- Atherton, J., Melissa A. Stouffer, F. Francis, and C. Moores. 2018. "Microtubule Architecture in Vitro and in Cells Revealed by Cryo-Electron Tomography." *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*. <https://doi.org/10.1107/S2059798318001948>.
- Aumeier, C., L. Schaedel, J. Gaillard, K. John, L. Blanchoin, and M. Théry. 2016. "Self-Repair Promotes Microtubule Rescue." *Nature Cell Biology* 18 (10): 1054–64. <https://doi.org/10.1038/ncb3406>.
- Baas, Peter W., Anand N. Rao, Andrew J. Matamoros, and Lanfranco Leo. 2016. "Stability Properties of Neuronal Microtubules." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 73 (9): 442–60. <https://doi.org/10.1002/cm.21286>.
- Bergmann, Andreas, and Hermann Steller. 2010. "Apoptosis, Stem Cells, and Tissue Regeneration." *Science Signaling* 3 (145): re8–re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3145re8>.
- Bergmann, Olaf, Ratan D. Bhardwaj, Samuel Bernard, Sofia Zdunek, Fanie Barnabé-Heider, Stuart Walsh, Joel Zupicich, et al. 2009. "Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5923): 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
- Block, S. 2007. "Kinesin Motor Mechanics: Binding, Stepping, Tracking, Gating, and Limping." *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.100677>.
- Boda-Romero, Emilio, Jennifer Martinez, Bradlee L. Heckmann, and Douglas R. Green. 2020. "The Clearance of Dead Cells by Efferocytosis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (7): 398–414. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0232-1>.
- Braun, Marcus, Douglas Robert Drummond, Robert A. Cross, and Andrew D. McAinsh. 2009. "The Kinesin-14 Klp2 Organizes Microtubules into Parallel Bundles by an ATP-Dependent Sorting Mechanism." *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb1878>.
- Brouhard, Gary J. 2015. "Microtubule-Associated Proteins Control the Kinetics of Microtubule Nucleation." *Nature Cell Biology* 17 (7): 907–16. <https://doi.org/10.1038/ncb3188>.
- Burgess, S., Matt L. Walker, H. Sakakibara, P. Knight, and K. Oiwa. 2003. "Dynein Structure and Power Stroke." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01377>.

- Cai, Dawen, Adam D. Hoppe, Joel A. Swanson, and Kristen J. Verhey. 2007. "Kinesin-1 Structural Organization and Conformational Changes Revealed by FRET Stoichiometry in Live Cells." *The Journal of Cell Biology* 176 (1): 51–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605097>.
- Campanacci, Valérie, Agathe Urvoas, Soraya Cantos-Fernandes, Magali Aumont-Nicaise, Ana-Andreea Arteni, Christophe Velours, Marie Valerio-Lepiniec, et al. 2019. "Insight into Microtubule Nucleation from Tubulin-Capping Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (20): 9859–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813559116>.
- Carazo-Salas, Rafael E., Claude Antony, and Paul Nurse. 2005. "The Kinesin Klp2 Mediates Polarization of Interphase Microtubules in Fission Yeast." *Science* 309 (5732): 297–300. <https://doi.org/10.1126/science.1113465>.
- Carter, Andrew P., Carol Cho, Lan Jin, and Ronald D. Vale. 2011. "Crystal Structure of the Dynein Motor Domain." *Science (New York, N.Y.)* 331 (6021): 1159–65. <https://doi.org/10.1126/science.1202393>.
- Carter, N., and R. Cross. 2005. "Mechanics of the Kinesin Step." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03528>.
- Chaudhary, Abdullah R., Florian Berger, Christopher L. Berger, and Adam G. Hendricks. 2018. "Tau Directs Intracellular Trafficking by Regulating the Forces Exerted by Kinesin and Dynein Teams." *Traffic* 19 (2): 111–21. <https://doi.org/10.1111/tra.12537>.
- Chrétien, D., and S. D. Fuller. 2000. "Microtubules Switch Occasionally into Unfavorable Configurations during Elongation." *Journal of Molecular Biology* 298 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3696>.
- Chrétien, D., F. Metoz, F. Verde, E. Karsenti, and R. H. Wade. 1992a. "Lattice Defects in Microtubules: Protofilament Numbers Vary within Individual Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 117 (5): 1031–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.5.1031>.
- . 1992b. "Lattice Defects in Microtubules: Protofilament Numbers Vary within Individual Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 117 (5): 1031–40.
- Chrétien, Denis, and Richard H. Wade. 1991. "New Data on the Microtubule Surface Lattice." *Biology of the Cell* 71 (1): 161–74.
- Cole, Nelson B., and Jennifer Lippincott-Schwartz. 1995. "Organization of Organelles and Membrane Traffic by Microtubules." *Current Opinion in Cell Biology* 7 (1): 55–64. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80045-X](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80045-X).
- Coombes, Courtney E., Ami Yamamoto, Madeline R. Kenzie, David J. Odde, and Melissa K. Gardner. 2013. "Evolving Tip Structures Can Explain Age-Dependent Microtubule Catastrophe." *Current Biology: CB* 23 (14): 1342–48. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.059>.
- Coombes, Courtney, Ami Yamamoto, Mark McClellan, Taylor A. Reid, Melissa Plooster, G. W. Gant Luxton, Joshua Alper, Jonathon Howard, and Melissa K. Gardner. 2016. "Mechanism of Microtubule Lumen Entry for the  $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase Enzyme ATAT1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (46): E7176–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605397113>.
- Coppin, Chris M., Daniel W. Pierce, Long Hsu, and Ronald D. Vale. 1997. "The Load Dependence of Kinesin's Mechanical Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (16): 8539–44.
- Cullen, Peter J., and Florian Steinberg. 2018. "To Degrade or Not to Degrade: Mechanisms and Significance of Endocytic Recycling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (11): 679–96. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0053-7>.
- Cuveillier, Camille, Julie Delaroche, Maxime Seggio, Sylvie Gory-Fauré, Christophe Bosc, Eric Denarier, Maria Bacía, et al. 2020. "MAP6 Is an Intraluminal Protein That Induces Neuronal Microtubules to Coil." *Science Advances* 6 (14). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4344>.

- Daire, Vanessa, Julien Giustiniani, Ingrid Leroy-Gori, Mélanie Quesnoit, Stéphanie Drevensek, Ariane Dimitrov, Franck Perez, and Christian Poüs. 2009. "Kinesin-1 Regulates Microtubule Dynamics via a c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 31992–1. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007906>.
- Daire, Vanessa, and Christian Poüs. 2011. "Kinesins and Protein Kinases: Key Players in the Regulation of Microtubule Dynamics and Organization." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Protein Kinases and Phosphatases: regulators of motile systems, 510 (2): 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.02.012>.
- Dietrich, Kristen A., Charles V. Sindelar, Paul D. Brewer, Kenneth H. Downing, Christine R. Cremo, and Sarah E. Rice. 2008. "The Kinesin-1 Motor Protein Is Regulated by a Direct Interaction of Its Head and Tail." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (26): 8938–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803575105>.
- Dimitrov, Ariane, Mélanie Quesnoit, Sandrine Moutel, Isabelle Cantaloube, Christian Poüs, and Franck Perez. 2008. "Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues." *Science (New York, N.Y.)* 322 (5906): 1353–56. <https://doi.org/10.1126/science.1165401>.
- Driver, Jonathan W., Elisabeth A. Geyer, Megan E. Bailey, L. Rice, and C. Asbury. 2017. "Direct Measurement of Conformational Strain Energy in Protofilaments Curling Outward from Disassembling Microtubule Tips." *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28433>.
- Duellberg, Christian, N. Cade, D. Holmes, and T. Surrey. 2016. "The Size of the EB Cap Determines Instantaneous Microtubule Stability." *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.13470>.
- Dye, R. B., P. F. Flicker, D. Y. Lien, and R. C. Williams. 1992. "End-Stabilized Microtubules Observed in Vitro: Stability, Subunit, Interchange, and Breakage." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 21 (3): 171–86. <https://doi.org/10.1002/cm.970210302>.
- "Dynactin, a Conserved, Ubiquitously Expressed Component of an Activator of Vesicle Motility Mediated by Cytoplasmic Dynein." 1991. *The Journal of Cell Biology* 115 (6): 1639–50.
- Elie-Caille, Céline, Fedor Severin, Jonne Helenius, Jonathon Howard, Daniel J. Muller, and A. A. Hyman. 2007. "Straight GDP-Tubulin Protofilaments Form in the Presence of Taxol." *Current Biology* 17 (20): 1765–70. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.063>.
- Elshenawy, Mohamed M., John T. Canty, Liya Oster, Luke S. Ferro, Zhou Zhou, Scott C. Blanchard, and Ahmet Yildiz. 2019. "Cargo Adaptors Regulate Stepping and Force Generation of Mammalian Dynein-Dynactin." *Nature Chemical Biology* 15 (11): 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0352-0>.
- Fan, Juan, Andrew D. Griffiths, Andrew Lockhart, Robert A. Cross, and Linda A. Amos. 1996. "Microtubule Minus Ends Can Be Labelled with a Phage Display Antibody Specific to Alpha-Tubulin." *Journal of Molecular Biology* 259 (3): 325–30. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0322>.
- Fedorov, Vladimir A., Philipp S. Orekhov, Ekaterina G. Kholina, Artem Zhmurov, Fazoil I. Ataulakhanov, Ilya B. Kovalenko, and Nikita Gudimchuk. 2019. "Mechanical Properties of Tubulin Intra- and Inter-Dimer Interfaces and Their Implications for Microtubule Dynamic Instability." *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007327>.
- Felgner, Harald, Rainer Frank, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, Eckhard Mandelkow, Beat Ludin, Andrew Matus, and Manfred Schliwa. 1997. "Domains of Neuronal Microtubule-Associated Proteins and Flexural Rigidity of Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 138 (5): 1067–75.
- Felgner, Holger, Rainer Dr Frank, and Manfred Schliwa. 1996. "Flexural Rigidity of Microtubules Measured with the Use of Optical Tweezers." *Journal of Cell Science*.
- Forges, Hélène de, Antoine Pilon, Isabelle Cantaloube, Antoine Pallandre, Anne-Marie Haghiri-Gosnet, Franck Perez, and Christian Poüs. 2016. "Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue." *Current Biology: CB* 26 (24): 3399–3406. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.048>.

- Gardner, Melissa K., Marija Zanic, Christopher Gell, Volker Bormuth, and Jonathon Howard. 2011. "Depolymerizing Kinesins Kip3 and MCAK Shape Cellular Microtubule Architecture by Differential Control of Catastrophe." *Cell* 147 (5): 1092–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.037>.
- Gennerich, Arne, Andrew P. Carter, Samara L. Reck-Peterson, and Ronald D. Vale. 2007. "Force-Induced Bidirectional Stepping of Cytoplasmic Dynein." *Cell* 131 (5): 952–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.016>.
- Gerdes, J. M., and N. Katsanis. 2005. "Microtubule Transport Defects in Neurological and Ciliary Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (14): 1556–70. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5007-5>.
- Gibbons, I. R., and A. J. Rowe. 1965. "Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia." *Science (New York, N.Y.)* 149 (3682): 424–26. <https://doi.org/10.1126/science.149.3682.424>.
- Goodson, Holly V., and Erin M. Jonasson. 2018. "Microtubules and Microtubule-Associated Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>.
- Gramlich, Michael W., Leslie Conway, Winnie H. Liang, Joelle A. Labastide, Stephen J. King, Jing Xu, and Jennifer L. Ross. 2017. "Single Molecule Investigation of Kinesin-1 Motility Using Engineered Microtubule Defects." *Scientific Reports* 7 (1): 44290. <https://doi.org/10.1038/srep44290>.
- Gupta, Mohan L., Pedro Carvalho, David M. Roof, and David Pellman. 2006. "Plus End-Specific Depolymerase Activity of Kip3, a Kinesin-8 Protein, Explains Its Role in Positioning the Yeast Mitotic Spindle." *Nature Cell Biology* 8 (9): 913–23. <https://doi.org/10.1038/ncb1457>.
- Hawkins, Taviare, Matthew Mirigian, M. Selcuk Yasar, and Jennifer L. Ross. 2010. "Mechanics of Microtubules." *Journal of Biomechanics*, Special Issue on Cell Mechanobiology, 43 (1): 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.005>.
- Helenius, Jonne, Gary Brouhard, Yannis Kalaidzidis, Stefan Diez, and Jonathon Howard. 2006. "The Depolymerizing Kinesin MCAK Uses Lattice Diffusion to Rapidly Target Microtubule Ends." *Nature* 441 (7089): 115–19. <https://doi.org/10.1038/nature04736>.
- Henrichs, Verena, Lenka Grycova, Cyril Barinka, Zuzana Nahacka, Jiri Neuzil, Stefan Diez, Jakub Rohlena, Marcus Braun, and Zdenek Lansky. 2020. "Mitochondria-Adaptor TRAK1 Promotes Kinesin-1 Driven Transport in Crowded Environments." *Nature Communications* 11 (1): 3123. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16972-5>.
- Hergovich, Alexander, Joanna Lisztwan, Robert Barry, Pia Ballschmieter, and Wilhelm Krek. 2003. "Regulation of Microtubule Stability by the von Hippel-Lindau Tumour Suppressor Protein PVHL." *Nature Cell Biology* 5 (1): 64–70. <https://doi.org/10.1038/ncb899>.
- Hirokawa, Nobutaka. 1998. "Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport." *Science* 279 (5350): 519–26. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.519>.
- Hooikaas, Peter Jan, Maud Martin, Tobias Mühlethaler, Gert-Jan Kuijntjes, Cathelijn A. E. Peeters, Eugene A. Katrukha, Luca Ferrari, et al. 2019. "MAP7 Family Proteins Regulate Kinesin-1 Recruitment and Activation." *J Cell Biol*, February, jcb.201808065. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808065>.
- Howard, Jonathon, and Anthony A. Hyman. 2009. "Growth, Fluctuation and Switching at Microtubule plus Ends." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2713>.
- Hua, Wei, Edgar C. Young, Margaret L. Fleming, and Jeff Gelles. 1997. "Coupling of Kinesin Steps to ATP Hydrolysis." *Nature* 388 (6640): 390–93. <https://doi.org/10.1038/41118>.
- Janke, Carsten, and Maria M. Magiera. 2020. "The Tubulin Code and Its Role in Controlling Microtubule Properties and Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, February, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>.
- Janson, Marcel E., and Marileen Dogterom. 2004. "A Bending Mode Analysis for Growing Microtubules: Evidence for a Velocity-Dependent Rigidity." *Biophysical Journal* 87 (4): 2723–36. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038877>.

- Jaulin, Fanny, and Geri Kreitzer. 2010. "KIF17 Stabilizes Microtubules and Contributes to Epithelial Morphogenesis by Acting at MT plus Ends with EB1 and APC." *The Journal of Cell Biology* 190 (3): 443–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006044>.
- Jiang, Kai, Shasha Hua, Renu Mohan, Ilya Grigoriev, Kah Wai Yau, Qingyang Liu, Eugene A. Katrukha, et al. 2014. "Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition." *Developmental Cell* 28 (3): 295–309. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.001>.
- Kaneko, Taikopaul, Ken'ya Furuta, Kazuhiro Oiwa, Hirofumi Shintaku, Hidetoshi Kotera, and Ryuji Yokokawa. 2020. "Different Motilities of Microtubules Driven by Kinesin-1 and Kinesin-14 Motors Patterned on Nanopillars." *Science Advances* 6 (4): eaax7413. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7413>.
- Kardon, Julia R., Samara L. Reck-Peterson, and Ronald D. Vale. 2009. "Regulation of the Processivity and Intracellular Localization of *Saccharomyces Cerevisiae* Dynein by Dynactin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (14): 5669–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900976106>.
- Kawaguchi, Kenji, and Atsushi Yamaguchi. 2010. "Temperature Dependence Rigidity of Non-Taxol Stabilized Single Microtubules." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402 (1): 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.112>.
- Kellogg, Elizabeth H., Nisreen M. A. Hejab, Simon Poepsel, Kenneth H. Downing, Frank DiMaio, and Eva Nogales. 2018. "Near-Atomic Model of Microtubule-Tau Interactions." *Science (New York, N.Y.)* 360 (6394): 1242–46. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>.
- Kikumoto, Mahito, Masashi Kurachi, Valer Tosa, and Hideo Tashiro. 2006. "Flexural Rigidity of Individual Microtubules Measured by a Buckling Force with Optical Traps." *Biophysical Journal* 90 (5): 1687–96. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055483>.
- "Kinesin Is the Motor for Microtubule-Mediated Golgi-to-ER Membrane Traffic [Published Errata Appear in J Cell Biol 1995 Mar;128(5):Following 988 and 1995 May;129(3):893]." 1995. *The Journal of Cell Biology* 128 (3): 293–306.
- Kollman, Justin M., Andreas Merdes, Lionel Mourey, and David A. Agard. 2011. "Microtubule Nucleation by  $\gamma$ -Tubulin Complexes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (11): 709–21. <https://doi.org/10.1038/nrm3209>.
- Laan, Liedewij, Nenad Pavin, Julien Husson, Guillaume Romet-Lemonne, Martijn van Duijn, Magdalena Preciado López, Ronald D. Vale, Frank Jülicher, Samara L. Reck-Peterson, and Marileen Dogterom. 2012. "Cortical Dynein Controls Microtubule Dynamics to Generate Pulling Forces That Reliably Position Microtubule Asters." *Cell* 148 (3): 502–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.007>.
- Lacroix, Benjamin, Gaëlle Letort, Laras Pitayu, Jérémy Sallé, Marine Stefanutti, Gilliane Maton, Anne-Marie Ladouceur, et al. 2018. "Microtubule Dynamics Scale with Cell Size to Set Spindle Length and Assembly Timing." *Developmental Cell* 45 (4): 496–511.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.022>.
- Lawrence, Carolyn J., R. Kelly Dawe, Karen R. Christie, Don W. Cleveland, Scott C. Dawson, Sharyn A. Endow, Lawrence S.B. Goldstein, et al. 2004. "A Standardized Kinesin Nomenclature." *The Journal of Cell Biology* 167 (1): 19–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408113>.
- Liang, Winnie H., Qiaochu Li, K.M. Rifat Faysal, Stephen J. King, Ajay Gopinathan, and Jing Xu. 2016. "Microtubule Defects Influence Kinesin-Based Transport In Vitro." *Biophysical Journal* 110 (10): 2229–40. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.029>.
- Lindqvist, Lisa M, Kristofferson Tandoc, Ivan Topisirovic, and Luc Furic. 2018. "Cross-Talk between Protein Synthesis, Energy Metabolism and Autophagy in Cancer." *Current Opinion in Genetics & Development, Cancer genomics*, 48 (February): 104–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.11.003>.



- Liverpool, Tanniemola B. 2006. "Active Gels: Where Polymer Physics Meets Cytoskeletal Dynamics." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 364 (1849): 3335–55. <https://doi.org/10.1098/rsta.2006.1897>.
- Lüders, Jens, and Tim Stearns. 2007. "Microtubule-Organizing Centres: A Re-Evaluation." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (2): 161–67. <https://doi.org/10.1038/nrm2100>.
- Ludueña, Richard F. 1997. "Multiple Forms of Tubulin: Different Gene Products and Covalent Modifications." In *International Review of Cytology*, 178:207–75. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62138-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62138-5).
- Magiera, Maria M., and Carsten Janke. 2014. "Post-Translational Modifications of Tubulin." *Current Biology* 24 (9): R351–54. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.032>.
- Mahamdeh, Mohammed, Steve Simmert, Anna Luchniak, Erik Schäffer, and Jonathon Howard. 2018. "Label-Free High-Speed Wide-Field Imaging of Single Microtubules Using Interference Reflection Microscopy." *Journal of Microscopy* 272 (1): 60–66. <https://doi.org/10.1111/jmi.12744>.
- Mandelkow, Eckhard, Roland Schultheiß, Richard H. Rapp, M. Müller, and Eckhard Mandelkow. 1986. "On the Surface Lattice of Microtubules: Helix Starts, Protofilament Number, Seam, and Handedness." *The Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.3.1067>.
- Manka, Szymon W., and Carolyn A. Moores. 2018. "Microtubule Structure by Cryo-EM: Snapshots of Dynamic Instability." *Essays in Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/EBC20180031>.
- Manolagas, S. C. 2000. "Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis." *Endocrine Reviews* 21 (2): 115–37. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>.
- "MAP 1C Is a Microtubule-Activated ATPase Which Translocates Microtubules in Vitro and Has Dynein-like Properties." 1987. *The Journal of Cell Biology* 105 (3): 1273–82.
- Marceiller, Jérôme, Anne Drechou, Geneviève Durand, Franck Perez, and Christian Poüs. 2005. "Kinesin Is Involved in Protecting Nascent Microtubules from Disassembly after Recovery from Nocodazole Treatment." *Experimental Cell Research* 304 (2): 483–92. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.007>.
- Maurer, Sebastian P., Franck J. Fourniol, Gergő Bohner, Carolyn A. Moores, and Thomas Surrey. 2012. "EBs Recognize a Nucleotide-Dependent Structural Cap at Growing Microtubule Ends." *Cell* 149 (2–2): 371–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.049>.
- McIntosh, J. Richard, Mary K. Morphew, Paula M. Grissom, Susan P. Gilbert, and Andreas Hoenger. 2009. "Lattice Structure of Cytoplasmic Microtubules in a Cultured Mammalian Cell." *Journal of Molecular Biology* 394 (2): 177–82. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.033>.
- "Microtubule Dynamics in Interphase Cells." 1986. *The Journal of Cell Biology* 102 (3): 1020–31.
- Miki, Harukata, Mitsutoshi Setou, Kiyofumi Kaneshiro, and Nobutaka Hirokawa. 2001. "All Kinesin Superfamily Protein, KIF, Genes in Mouse and Human." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7004–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145398>.
- Minc, Nicolas, Scott V. Bratman, Roshni Basu, and Fred Chang. 2009. "Establishing New Sites of Polarization by Microtubules." *Current Biology* 19 (2): 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.008>.
- Mitchison, Tim, and Marc Kirschner. 1984. "Dynamic Instability of Microtubule Growth." *Nature* 312 (5991): 237–42. <https://doi.org/10.1038/312237a0>.
- Molines, Arthur T., Virginie Stoppin-Mellet, Isabelle Arnal, and Frédéric M. Coquelle. 2020. "Plant and Mouse EB1 Proteins Have Opposite Intrinsic Properties on the Dynamic Instability of Microtubules." *BMC Research Notes* 13 (1): 296. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05139-6>.
- "Movement of Microtubules by Single Kinesin Molecules | Nature." n.d. Accessed January 29, 2020. <https://www.nature.com/articles/342154a0>.

- Nakata, Takao, Shinsuke Niwa, Yasushi Okada, Franck Perez, and Nobutaka Hirokawa. 2011. "Preferential Binding of a Kinesin-1 Motor to GTP-Tubulin-Rich Microtubules Underlies Polarized Vesicle Transport." *Journal of Cell Biology* 194 (2): 245–55. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104034>.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin. 1999. "AAA+: A Class of Chaperone-like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes." *Genome Research* 9 (1): 27–43.
- Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing. 1998. "Structure of the Alpha Beta Tubulin Dimer by Electron Crystallography." *Nature* 391 (6663): 199–203. <https://doi.org/10.1038/34465>.
- Orbach, Ron, and Jonathon Howard. 2019. "The Dynamic and Structural Properties of Axonemal Tubulins Support the High Length Stability of Cilia." *Nature Communications* 10 (1): 1838. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09779-6>.
- Paschal, Bryce M., and Richard B. Vallee. 1987. "Retrograde Transport by the Microtubule-Associated Protein MAP 1C." *Nature* 330 (6144): 181–83. <https://doi.org/10.1038/330181a0>.
- Peet, Daniel R., Nigel J. Burroughs, and Robert A. Cross. 2018. "Kinesin Expands and Stabilises the GDP-Microtubule Lattice." *Nature Nanotechnology* 13 (5): 386–91. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0084-4>.
- Pilon, Antoine, and Christian Poüs. 2013. "Compartmentation et plasticité du réseau microtubulaire." *médecine/sciences* 29 (2): 194–99. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013292018>.
- Pollard, Thomas D., and Robert D. Goldman. 2018. "Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (7): a030288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288>.
- Portran, D., M. Zoccoler, J. Gaillard, V. Stoppin-Mellet, E. Neumann, I. Arnal, J. L. Martiel, and M. Vantard. 2013. "MAP65/Ase1 Promote Microtubule Flexibility." *Molecular Biology of the Cell* 24 (12): 1964–73. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0141>.
- Portran, Didier, Jeremie Gaillard, Marylin Vantard, and Manuel Thery. 2013. "Quantification of MAP and Molecular Motor Activities on Geometrically Controlled Microtubule Networks." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 70 (1): 12–23. <https://doi.org/10.1002/cm.21081>.
- Pyrpassopoulos, Serapion, Henry Shuman, and E. Michael Ostap. 2020. "Modulation of Kinesin's Load-Bearing Capacity by Force Geometry and the Microtubule Track." *Biophysical Journal* 118 (1): 243–53. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.045>.
- Reck-Peterson, Samara L., Ahmet Yildiz, Andrew P. Carter, Arne Gennerich, Nan Zhang, and Ronald D. Vale. 2006. "Single-Molecule Analysis of Dynein Processivity and Stepping Behavior." *Cell* 126 (2): 335–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.046>.
- Reid, Taylor A., Courtney Coombes, and Melissa K. Gardner. 2017. "Manipulation and Quantification of Microtubule Lattice Integrity." *Biology Open* 6 (8): 1245–56. <https://doi.org/10.1242/bio.025320>.
- Rice, Luke M., Elizabeth A. Montabana, and David A. Agard. 2008. "The Lattice as Allosteric Effector: Structural Studies of A $\beta$ - and  $\gamma$ -Tubulin Clarify the Role of GTP in Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (14): 5378–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801155105>.
- "Rigidity of Microtubules Is Increased by Stabilizing Agents." 1995. *The Journal of Cell Biology* 130 (4): 909–17.
- Roberts, A., N. Numata, Matt L. Walker, Yusuke S. Kato, Bara Malkova, T. Kon, R. Ohkura, et al. 2009. "AAA+ Ring and Linker Swing Mechanism in the Dynein Motor." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.049>.
- Roll-Mecak, Antonina. 2020. "The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding." *Developmental Cell* 54 (1): 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.008>.

- Roll-Mecak, Antonina, and Ronald D. Vale. 2008. "Structural Basis of Microtubule Severing by the Hereditary Spastic Paraplegia Protein Spastin." *Nature* 451 (7176): 363–67. <https://doi.org/10.1038/nature06482>.
- Salmon, E. D., R. J. Leslie, W. M. Saxton, M. L. Karow, and J. R. McIntosh. 1984. "Spindle Microtubule Dynamics in Sea Urchin Embryos: Analysis Using a Fluorescein-Labeled Tubulin and Measurements of Fluorescence Redistribution after Laser Photobleaching." *The Journal of Cell Biology* 99 (6): 2165–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.6.2165>.
- Schaap, Iwan A. T., Pedro J. de Pablo, and Christoph F. Schmidt. 2004. "Resolving the Molecular Structure of Microtubules under Physiological Conditions with Scanning Force Microscopy." *European Biophysics Journal: EBJ* 33 (5): 462–67. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0386-8>.
- Schaedel, Laura, Karin John, Jérémie Gaillard, Maxence V. Nachury, Laurent Blanchoin, and Manuel Th  ry. 2015a. "Microtubules Self-Repair in Response to Mechanical Stress." *Nature Materials* 14 (11): 1156–63. <https://doi.org/10.1038/nmat4396>.
- . 2015b. "Microtubules Self-Repair in Response to Mechanical Stress." *Nature Materials* 14 (11): 1156–63. <https://doi.org/10.1038/nmat4396>.
- Schaedel, Laura, Charlotta Lorenz, Anna V. Schepers, Stefan Klumpp, and Sarah K  ster. 2020. "Vimentin Intermediate Filaments Stabilize Dynamic Microtubules by Direct Interactions." Preprint. Biophysics. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.106179>.
- Schaedel, Laura, Sarah Triclin, Denis Chrétien, Ariane Abrieu, Charlotte Aumeier, Jérémie Gaillard, Laurent Blanchoin, Manuel Th  ry, and Karin John. 2019. "Lattice Defects Induce Microtubule Self-Renewal." *Nature Physics* 15 (8): 830–38. <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0542-4>.
- Schnitzer, M., K. Visscher, and S. Block. 2000. "Force Production by Single Kinesin Motors." *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35036345>.
- Schnitzer, Mark J., and Steven M. Block. 1997. "Kinesin Hydrolyses One ATP per 8-Nm Step." *Nature* 388 (6640): 386–90. <https://doi.org/10.1038/41111>.
- Seetapun, Dominique, Brian T. Castle, Alistair James McIntyre, Phong Thanh Tran, and David J. Odde. 2012. "Estimating the Microtubule GTP Cap Size In Vivo." *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.068>.
- Shima, Tomohiro, Manatsu Morikawa, Junichi Kaneshiro, Taketoshi Kambara, Shinji Kamimura, Toshiki Yagi, Hiroyuki Iwamoto, et al. 2018. "Kinesin-Binding-Triggered Conformation Switching of Microtubules Contributes to Polarized Transport." *The Journal of Cell Biology* 217 (12): 4164–83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201711178>.
- Siahaan, Valerie, Jochen Krattenmacher, Anthony A. Hyman, Stefan Diez, Amayra Hernández-Vega, Zdenek Lansky, and Marcus Braun. 2019. "Kinetically Distinct Phases of Tau on Microtubules Regulate Kinesin Motors and Severing Enzymes." *Nature Cell Biology* 21 (9): 1086–92. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0374-6>.
- Slep, Kevin C., and Ronald D. Vale. 2007. "Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170 and EB1." *Molecular Cell* 27 (6): 976–91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.023>.
- Song, Yuyu, and Scott T. Brady. 2015. "Post-Translational Modifications of Tubulin: Pathways to Functional Diversity of Microtubules." *Trends in Cell Biology* 25 (3): 125–36. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>.
- Spalding, Kirsty L., Erik Arner, P  l O. Westermarck, Samuel Bernard, Bruce A. Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. "Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans." *Nature* 453 (7196): 783–87. <https://doi.org/10.1038/nature06902>.
- Strothman, Claire, Veronica Farmer, G  ker Arpaĝ, Nicole Rodgers, Marija Podolski, Stephen Norris, Ryoma Ohi, and Marija Zanic. 2019. "Microtubule Minus-End Stability Is Dictated by the Tubulin off-Rate." *The Journal of Cell Biology* 218 (9): 2841–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.201905019>.

- Stumpff, Jason, Jeremy Cooper, Sarah Domnitz, Ayana Moore, Kathleen Rankin, Mike Wagenbach, and Linda Wordeman. 2007. "In Vitro and in Vivo Analysis of Microtubule Destabilizing Kinesins." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 392: 37–49.
- Takahashi, Yoshinori, Masaki Edamatsu, and Yoko Y. Toyoshima. 2004. "Multiple ATP-Hydrolyzing Sites That Potentially Function in Cytoplasmic Dynein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (35): 12865–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403429101>.
- Taylor, Edwin W., and Gary G. Borisy. 2000. "Kinesin Processivity." *The Journal of Cell Biology* 151 (5): 27–30.
- Ti, Shih-Chieh, Gregory M. Alushin, and Tarun M. Kapoor. 2018. "Human  $\beta$ -Tubulin Isoforms Can Regulate Microtubule Protofilament Number and Stability." *Developmental Cell* 47 (2): 175–190.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.014>.
- Tilney, Lewis G., Joseph Bryan, Doris J. Bush, Keigi Fujiwara, Mark S. Mooseker, Douglas B. Murphy, and Daniel H. Snyder. 1973. "MICROTUBULES: EVIDENCE FOR 13 PROTOFILAMENTS." *The Journal of Cell Biology* 59 (2): 267–75.
- Toleikis, Algirdas, Nicholas J. Carter, and Robert A. Cross. 2019. "Backstepping Mechanism of Kinesin-1." Preprint. Biophysics. <https://doi.org/10.1101/838433>.
- Tropini, Carolina, Elizabeth A. Roth, Marija Zanic, Melissa K. Gardner, and Jonathon Howard. 2012. "Islands Containing Slowly Hydrolyzable GTP Analogs Promote Microtubule Rescues." *PloS One* 7 (1): e30103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030103>.
- Vale, Ronald D. 2003. "The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport." *Cell* 112 (4): 467–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00111-9).
- Vale, Ronald D., and Ronald A. Milligan. 2000. "The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins." *Science* 288 (5463): 88–95. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.88>.
- Vale, Ronald D., Thomas S. Reese, and Michael P. Sheetz. 1985. "Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility." *Cell* 42 (1): 39–50.
- Vallee, Richard B., John C. Williams, Dileep Varma, and Lora E. Barnhart. 2004. "Dynein: An Ancient Motor Protein Involved in Multiple Modes of Transport." *Journal of Neurobiology* 58 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1002/neu.10314>.
- VanDelinder, Virginia, Peter G. Adams, and George D. Bachand. 2016. "Mechanical Splitting of Microtubules into Protofilament Bundles by Surface-Bound Kinesin-1." *Scientific Reports* 6 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep39408>.
- Varga, Vladimir, Cecile Leduc, Volker Bormuth, Stefan Diez, and Jonathon Howard. 2009. "Kinesin-8 Motors Act Cooperatively to Mediate Length-Dependent Microtubule Depolymerization." *Cell* 138 (6): 1174–83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.032>.
- Vemu, Annapurna, Ewa Szczesna, Elena A. Zehr, Jeffrey O. Spector, Nikolaus Grigorieff, Alexandra M. Deaconescu, and Antonina Roll-Mecak. 2018. "Severing Enzymes Amplify Microtubule Arrays through Lattice GTP-Tubulin Incorporation." *Science* 361 (6404): eaau1504. <https://doi.org/10.1126/science.aau1504>.
- Verhey, Kristen J., Donna L. Lizotte, Tatiana Abramson, Linda Barenboim, Bruce J. Schnapp, and Tom A. Rapoport. 1998. "Light Chain-Dependent Regulation of Kinesin's Interaction with Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 143 (4): 1053–66.
- Vignaud, Timothée, Laurent Blanchoin, and Manuel Théry. 2012. "Directed Cytoskeleton Self-Organization." *Trends in Cell Biology* 22 (12): 671–82. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.012>.
- Visscher, K., M. Schnitzer, and S. Block. 1999. "Single Kinesin Molecules Studied with a Molecular Force Clamp." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/22146>.

- Wakida, Nicole M., Elliot L. Botvinick, Justin Lin, and Michael W. Berns. 2010. "An Intact Centrosome Is Required for the Maintenance of Polarization during Directional Cell Migration." *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015462>.
- Walker, R. A., E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson, and E. D. Salmon. 1988. "Dynamic Instability of Individual Microtubules Analyzed by Video Light Microscopy: Rate Constants and Transition Frequencies." *The Journal of Cell Biology* 107 (4): 1437–48. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1437>.
- Watanabe, T., T. Yanagida, and A. Iwane. 2010. "Single Molecular Observation of Self-Regulated Kinesin Motility†." *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi9021582>.
- Wiese, C., and Y. Zheng. 2000. "A New Function for the Gamma-Tubulin Ring Complex as a Microtubule Minus-End Cap." *Nature Cell Biology* 2 (6): 358–64. <https://doi.org/10.1038/35014051>.
- Wittmann, Torsten, Anthony Hyman, and Arshad Desai. 2001. "The Spindle: A Dynamic Assembly of Microtubules and Motors." *Nature Cell Biology* 3 (1): E28–34. <https://doi.org/10.1038/35050669>.
- Wloga, Dorota, Ewa Joachimiak, and Hanna Fabczak. 2017. "Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102207>.
- Xu, Zhenjie, Laura Schaedel, Didier Portran, Andrea Aguilar, Jérémie Gaillard, M. Peter Marinkovich, Manuel Théry, and Maxence V. Nachury. 2017. "Microtubules Acquire Resistance from Mechanical Breakage through Intralumenal Acetylation." *Science* 356 (6335): 328–32. <https://doi.org/10.1126/science.aai8764>.
- Zanic, Marija, Jeffrey H. Stear, Anthony A. Hyman, and Jonathon Howard. 2009. "EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice." *PLoS ONE* 4 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007585>.
- Zhang, Kai, Helen E. Foster, Arnaud Rondelet, Samuel E. Lacey, Nadia Bahi-Buisson, Alexander W. Bird, and Andrew P. Carter. 2017. "Cryo-EM Reveals How Human Cytoplasmic Dynein Is Auto-Inhibited and Activated." *Cell* 169 (7): 1303-1314.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.025>.
- Zhang, Rui, Johanna Roostalu, Thomas Surrey, and Eva Nogales. n.d. "Structural Insight into TPX2-Stimulated Microtubule Assembly." *ELife* 6. Accessed September 19, 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.30959>.
- Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. "Nucleation of Microtubule Assembly by a Gamma-Tubulin-Containing Ring Complex." *Nature* 378 (6557): 578–83. <https://doi.org/10.1038/378578a0>.

## Résumé

Il est communément admis que le microtubule (MT) s'allonge et se raccourcit à son extrémité, lieu de grande instabilité dynamique. Récemment, nous avons découvert que le MT présentait une dynamique inattendue au niveau de sa paroi (lattice), proposant de nouveaux mécanismes de régulation sur la stabilité du MT. Notre hypothèse était que les défauts structurels de la paroi favorisaient les échanges de dimères de tubuline.

Nous avons développé plusieurs stratégies pour visualiser et quantifier cette dynamique. Nous avons modulé la quantité de défauts dans la paroi du microtubule et mesuré l'impact sur la durée de vie des microtubules ainsi que sur le renouvellement des dimères le long de celui-ci en présence de tubuline. Nous avons ainsi constaté qu'une augmentation de la vitesse d'élongation augmentait la fréquence des défauts et le renouvellement du microtubule.

*In vivo*, le fonctionnement des microtubules est dépendant des protéines qui lui sont associées (MAPs). Les moteurs moléculaires par exemple ont un rôle primordial dans la cellule et ont un fort impact sur la régulation de la dynamique des microtubules à leurs extrémités. Pendant ma thèse j'ai cherché à savoir si ces moteurs pouvaient impacter la dynamique interne au microtubule le long de sa paroi.

J'ai montré que, en se déplaçant sur la paroi non stabilisée du microtubule, les moteurs moléculaires étaient capables de créer et amplifier des défauts préexistants, provoquant la destruction du microtubule, ou son renouvellement en présence de tubuline libre dans le milieu.

Cette découverte nous permet de supposer qu'il existe une dynamique de la paroi des microtubules impliquant des échanges de dimères, ainsi qu'un rajeunissement des microtubules dans les systèmes physiologiques.

## Summary

Common textbook knowledge states that the microtubule elongates and shortens only at the tip, where it displays a dynamic instability. Recently, we discovered that the microtubule shows unexpected dynamics along the lattice region offering new regulatory mechanisms of microtubule stability. Our working hypothesis is that structural defects in the microtubule lattice fosters the exchange of dimers.

We developed strategies to visualize and quantify these dynamics. We modulated the amount of defects in the microtubule lattice, measured the impact on dimer turnover along the microtubule and found that, by increasing the elongation speed, we increase the defects frequency.

*In vivo*, microtubule functions depend on proteins associated to it (MAPs). For instance, molecular motors play a key role inside cells and have a strong impact on microtubule dynamics, especially at their tips. During my thesis, I aimed to understand how such motors could affect the inside dynamics of microtubules all along their lattice.

I have shown that, by walking on an un-stabilized lattice, molecular motors such as kinesines and dyneins are able to create and amplify existing defects, thus provoking fast microtubule collapse, or microtubule renewal if there is free tubulin in the medium.

This finding allows us to assume there is microtubule lattice dynamics, involving dimers exchanges and microtubules rejuvenation, inside physiological systems.

### Résumé version courte vulgarisée

Les microtubules (MT) composent la majeure partie du squelette cellulaire. Ils sont impliqués dans la division et le transport cellulaire, et leur dynamique module la forme et le mouvement de la cellule. Il est communément admis que le MT s'allonge et se raccourcit à son extrémité, lieu de grande instabilité dynamique. Récemment, nous avons découvert que le MT présentait une dynamique inattendue au niveau de ses parois, proposant ainsi de nouveaux mécanismes de régulation de sa stabilité. Notre hypothèse était que les moteurs moléculaires, en grande interaction avec la paroi des microtubules favoriseraient l'apparition de défauts et ainsi les échanges de dimères de tubuline. Nous avons donc testé l'effet de moteurs moléculaires comme les dynéines et kinésines sur la dynamique de la paroi. Nous avons montré qu'en marchant sur un microtubule non stabilisé, les moteurs moléculaires étaient capables de créer et amplifier des défauts préexistants, provoquant la destruction du MT, ou son renouvellement en présence de tubuline libre dans le milieu.

### Short version summary

Microtubules (MT) compose the core skeleton of cells. They are involved in cell division; intracellular transport and their dynamic modulates the shape and movements of the cell. Common textbook knowledge states that the MT elongates and shortens only at the tip, where it displays a dynamic instability. Recently, we discovered that the MT shows unexpected dynamics along its length (lattice), offering new regulatory mechanisms for MT stability. Our working hypothesis was that molecular motors, which are in close interaction with microtubules, might induce structural defects in the MT lattice and foster the exchange of tubulin dimers. We tested the effects of molecular motors, such as Dyneins and Kinesins on lattice dynamics. We have shown that, by walking on an un-stabilized microtubule lattice, molecular motors are able to create and amplify existing defects, thus provoking fast microtubule collapse, or MT renewal with free tubulin in the medium.



