UNIVERSITÉ DE RENNES 1

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par Siou KU

Étude de l'effet des analogues du GTP sur la structure des microtubules

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 21 septembre 2021

Unité de recherche : UMR 6290, IGDR

Rapporteurs avant soutenance :

Andreas Merdes	Directeur de Recherche CNRS au Centre de Biologie Intégrative (CBI) (Université de Paul Sabatier, Toulouse)
Aurélie Bertin	Chargé de recherche à l'institut Curie (Université de la Sorbonne, Paris)

Composition du Jury :

Reynald Gillet	Professeur à l'Université de Rennes 1	Président du jury
Andreas Merdes	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
Aurélie Bertin	Chargé de Recherche à l'institut Curie, Paris	Rapporteur
Manuel Théry	Directeur de Recherche au CEA, Paris	Examinateur
Denis Chrétien	Directeur de Recherche CNRS, Rennes	Directeur de la thèse
Laurence Duchesne	Maître de Conférences à l'Université de Rennes 1	Co-directrice de la thèse

Remerciements

Publications

Determination of Microtubule Lattice Parameters from Cryo-electron Microscope Images Using TubuleJ
Ku S*, Messaoudi C*, Guyomar C, Kervrann C, Chrétien D
Bio-protocol 2020 Nov.
*Co-first authors

Microtubule seeded-assembly in the presence of poorly nucleating nucleotide analogues
Ku S, Heichette C, Duchesne L, Chrétien D
Bio-protocol 2020 Aug.

Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends
Estévez-Gallego J*, Josa-Prado F*, Ku S*, Buey RM, Balaguer FA, Prota AE, Lucena-Agell D, Kamma-Lorger C, Yagi T, Iwamoto H, Duchesne L, Barasoain I, Steinmetz MO, Chrétien D, Kamimura S, Díaz JF, Oliva MA
Elife 2020 Mar.
*Co-first auteurs

Liste des abréviations

AlF_x^- – Fluorure d'Aluminium
BeF_3^- – Fluorure de Béryllium
Cryo-ME – Cryo microscopie électronique
DCX – Doublecortine
EB – Protéines interagissant avec les extrémités des microtubules
E-site – Site hydrolysable du GTP
GDP – Guanosine diphosphate
GTP – Guanosine -5'-triphosphate
GTPγS – Guanosine-5'-O'-[γ-thio]-triphosphate
GMPCPP – Guanosine-5'-[(α,β)-methyleno]-triphosphate
GMPCP – Guanosine-5'-[(α,β)-methyleno]-diphosphate
GMPPCP – Guanosine-5'-[(β,γ)-methyleno]-triphosphate
MAP – protéine associée aux microtubules
MT – Microtubule
MTOC – Centre organisateur des microtubules
PFs – Protofilaments
P_i – phosphate inorganique
N-site – site non-hydrolysable du GTP
SAXS – diffraction des rayons X aux petits angles

Liste des figures

Figure 1. Le cytosquelette de la cellule eucaryote **3**
Figure 2. Différentes organisations du réseau microtubulaire (adapté de Goodson and Jonasson, 2018) **5**
Figure 3. Structure de l'extrémité en croissance **7**
Figure 4. Réseau de type A, B ou mixte AB **9**
Figure 5. Modèle mathématique de l'accommodation de la paroi (Chrétien and Stephen D. Fuller, 2000) **11**
Figure 6. Domaines structuraux du monomère de tubuline. **13**
Figure 7. Nucléation des microtubules (représentations schématiques adaptées de Roostalu and Surrey, 2017) **15**
Figure 8. L'instabilité dynamique du microtubule **16**
Figure 9. Conformation courbée et redressée du dimère de tubuline **17**
Figure 10. Représentation schématique de l'instabilité dynamique **19**
Figure 11. Instabilité dynamique et îlots GTP **20**
Figure 12. Code de la tubuline et dynamique du MT **21**
Figure 13. Impact des MAPs sur la dynamique des microtubule, adapté de **(Brouhard and Rice, 2018)** **23**
Figure 14. Agents pharmacologiques **25**
Figure 15. Analogues lentement hydrolysables du GTP **26**
Figure 16. Conformation de la tubuline selon son état nucléotidique et modèle de compaction-rotation (Zhang et al., 2015) **29**
Figure 17. Suivi de la cinétique d'assemblage et de désassemblage par turbidimétrie selon les différents états nucléotidiques de la tubuline **33**
Figure 18. Paramètres structuraux mesurés lors de l'analyse 2D (Chrétien *et al.* , 1991) **45**
Figure 19. Distribution des types de MTs en fonction du nombre de PFs et de l'état nucléotidique de la paroi. **92**
Figure 20. Variation des paramètres structuraux (α et θ) en fonction des différents états nucléotidiques de la paroi. **93**
Figure 21. Récapitulatif des effets des analogues sur une paroi 13_3 ..... **94**
Figure 22. Distribution des types de microtubules en fonction du nombre de protofilaments (N) et du nombre de départ d'hélices latérales (S) selon les différents états nucléotidiques de la paroi **96**
Figure 23. Distribution des microtubules à 13 et à 14 protofilaments selon l'organisation latérale en hélice des monomères (N_3 et N_4) en fonction des états nucléotidiques de la paroi **96**
Figure 24. Configurations relâchées (N_4R) et stressées (N_4S) des microtubules N_4 ..... **98**
Figure 25. Modification du décalage longitudinal entre deux monomères adjacents (r) en fonction de l'état nucléotidique de la paroi et des configurations N_3, N_4R et N_4S **99**
Figure 26. Nouveau modèle de la coiffe élaboré à partir des effets biochimiques et structuraux sur la paroi des analogues GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- **105**

Table des matières

INTRODUCTION **1**

I. GENERALITES 2

1. Les Microtubules sont des composants essentiels du cytosquelette *2*

2. Les microtubules et la cellule *4*

II. LA STRUCTURE DU MICROTUBULE 6

1. Le microtubule *6*

2. L'hétérodimère de tubuline : brique élémentaire du microtubule *12*

III. LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES 14

1. La nucléation *14*

2. L'instabilité dynamique (élongation et équilibre dynamique) *15*

3. Les régulations de la dynamique du microtubule *17*

IV. COMMENT L'ETAT NUCLEOTIDIQUE DE LA TUBULINE REGULE L'INSTABILITE DYNAMIQUE DES MTS ? 27

V. OBJECTIFS ET STRATEGIES 30

RESULTATS **31**

I. DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES LIES A L'ETUDE 2D DE L'ORGANISATION DE LA PAROI 32

1. Optimisation des conditions d'auto-assemblage des parois analogues nécessaire à l'approche par cryo-EM *32*

2. Analyse des paramètres structuraux de la paroi via TubuleJ *44*

3. Modèle structural du processus de maturation différentiel de la coiffe au niveau des extrémités en croissance *65*

DISCUSSION **101**

CONCLUSIONS **109**

MATERIELS ET METHODES **111**

I. MATERIELS 112

1. Composant chimiques *112*

2. Tampons et Solutions *112*

II. METHODES 114

1. Préparation des microtubules dans différents états nucléotidiques *114*

2. Préparation des grilles pour l'analyse par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) *116*

3. Acquisition des données de cryo-ME *117*

4. Analyses des données 2D *117*

BIBLIOGRAPHIE **118**

Introduction

I. Généralités

Le terme « microtubule » a été employé pour la première fois en 1963 pour nommer les fibres cytoplasmiques, d'environ 20-27 nm de diamètre, observées par microscopie au sein des cellules végétales (Ledbetter and Porter, 1963). Les auteurs ont très vite fait le lien entre ces fibres et celles observées précédemment au sein des cellules animales et désignées sous diverses appellations telles que fibres achromatiques, appareils de la mitose ou fibres cytoplasmiques (Flemming, 1880; Mazia and Dan, 1952; Wada, 1955; Harris, 1962; Roth and Daniels, 1962). Ce terme « microtubule » est aujourd'hui couramment usité pour décrire toutes les fibres composées de tubuline.

1. Les Microtubules sont des composants essentiels du cytosquelette

Le cytosquelette est constitué d'un réseau de filaments protéiques interconnectés hautement dynamique et modulable qui s'étend au sein du cytoplasme des cellules eucaryotes et procaryotes (Figure 1A). Si le cytosquelette joue indéniablement un rôle dans la structure et la morphologie de la cellule, il est également impliqué dans de nombreuses autres fonctions cellulaires telles que le transport, la migration ou la division. En effet, c'est sur ce réseau que repose le transport des organites, des cargos et vésicules. De plus, la robustesse de la cellule et les forces nécessaires à la motilité, à la migration ou à la division de la cellule reposent sur la dynamique du cytosquelette (Fletcher and Mullins, 2010). Au sein d'une cellule eucaryote, le cytosquelette est constitué de trois grandes classes de filaments protéiques : les microfilaments d'actines (FAs), les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (FIs) (Figure 1B). Chacune de ces fibres résulte de la polymérisation de briques élémentaires spécifiques, sous la forme de monomères ou de dimères (Figure 1C) :

- Les FAs sont des fibres de 7 à 9 nm de diamètre qui résultent de la polymérisation de monomères d'actine. Ces filaments, dynamiques, sont impliqués notamment dans l'adhésion et la migration cellulaire, la cytodiérèse et la contraction musculaire.
- Les FIs regroupent différents types de fibres d'environs 10 nm de diamètre qui proviennent de la polymérisation de plusieurs superfamilles de protéines tissu spécifiques. On y retrouve notamment les FIs de type I et II composés de kératines au niveau-des cellules épithéliales, les FIs de type III composés de vimentines au niveaux des cellules mésenchymateuses et 3 autres types de FIs (Leduc and Etienne-Manneville, 2015). Ces filaments, moins dynamiques, ont principalement un rôle de résistance et de soutien.
- Les MTs, sur lesquels se concentre mon projet de thèse, sont des fibres creuses d'environs 25 nm de diamètre qui découlent de l'assemblage d'un hétérodimère constitutif formé des tubulines α et β. Les hétérodimères s'assemblent longitudinalement en protofilaments et latéralement de manière concomitante pour former un tube creux et polarisé (tubuline β à l'extrémité dite « plus » et tubuline α à l'extrémité dite « moins ») (Figure 1D) . Ces filaments sont impliqués dans de

nombreuses fonctions clés de la cellule telles que la division cellulaire, le transport cytoplasmique ainsi que la motilité cellulaire (cils et flagelles) et les mouvements intracellulaires.

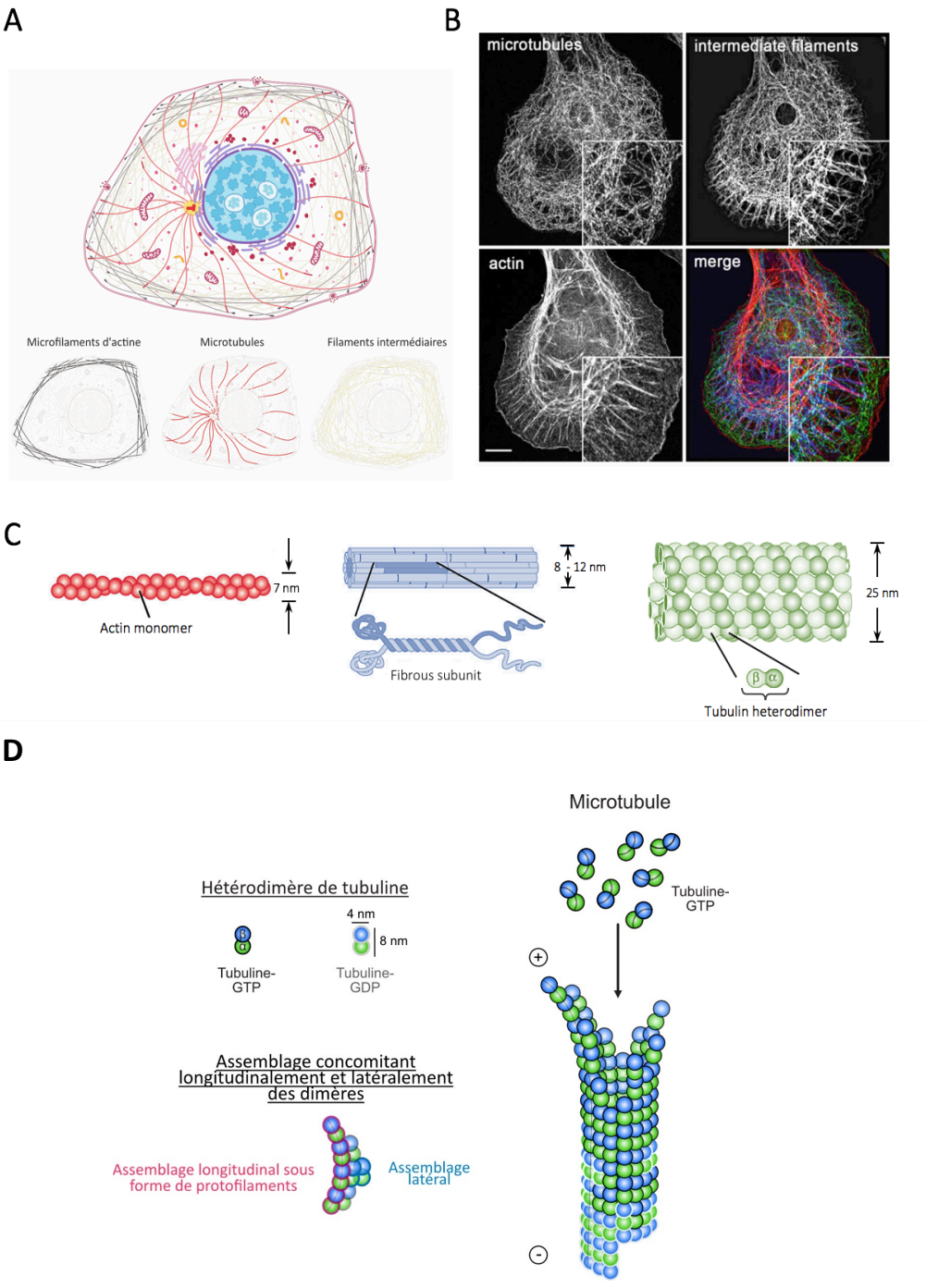


Figure 1. Le cytosquelette de la cellule eucaryote

A. Représentation schématique d'une cellule et de son cytosquelette. Le cytosquelette est constitué des filaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires (extrait de https://www.proteinatlas.org/humanproteome/cell). **B.** Images de microscopie confocale à balayage de fibroblastes cardiaques de rat (extraites de T.D. Hewitson, I.A. Darby (eds.), Histology Protocols, Methods in Molecular Biology 611, figure 4.2, page 43, DOI : 10.1007/978-1-60327-345-9_4). La barre d'échelle correspond à 10 µm. Sur l'image superposée, le réseau de MTs est indiqué en vert, le réseau de FAs en rouge et le réseau de FIs en bleu. **C.** Représentation schématique des fibres cytoplasmiques constitutives du cytosquelette. **D.** Schéma de l'assemblage du MT.

2. Les microtubules et la cellule

A. Les différentes architectures du réseau de MTs

Les microtubules forment un réseau très conservé chez les eucaryotes (levure, champignons, plantes et animaux) (Figure 2). Des homologues des tubulines eucaryotes, impliqués dans la division cellulaire, sont également observés chez les procaryotes tels que FTZ retrouvé chez la plupart des bactéries et archées ainsi que BtubA et BtubB plus récemment identifiés chez *Prosthecobacter* (Pilhofer *et al.*, 2011) (Figure 2G). Selon les espèces, les microtubules adoptent une grande variété d'organisation allant d'une microfibre formée de 4 protofilaments chez la bactérie *Prosthecobacter* à un complexe axonémal regroupant 40 protofilaments au niveau du spermatozoïde de l'insecte *Mantispa perla* (Figure 2F et 2G) (Dallai *et al.*, 2005; Chaaban and Brouhard, 2017). Le réseau microtubulaire est également très diversifié au sein d'un même organisme et ce, en fonction des différents types cellulaires (*cf*. Figure 2A, 2B et 2C). De plus, cette organisation au sein d'un même type cellulaire est évolutive spatialement et temporellement. Pour exemple, durant le cycle cellulaire, le réseau microtubulaire interphasique peut notamment se réarranger très rapidement, et de manière ordonnée, afin de former le fuseau mitotique ou méiotique et de permettre la division cellulaire (Figure 2A). En réponse à un stimulus lumineux, les cellules végétales peuvent modifier complètement l'organisation de leur réseau microtubulaire (Figure 2E ; (Roll-Mecak, 2013; Goodson and Jonasson, 2018)).

B. Fonctions des MTs au sein de la cellule

L'omniprésence des microtubules dans le monde du Vivant et leur grande plasticité au sein des différents types cellulaires et durant le cycle cellulaire leur confèrent de multiples fonctions essentielles au sein de la cellule : formation du fuseau mitotique ou méiotique, ségrégation hautement contrôlée des chromosomes dans les cellules filles lors de la division cellulaire, transport intra- et extracellulaire d'organites, de vésicules et de cargos. Selon le type cellulaire ou tissulaire, des structures microtubulaires très différentes sont retrouvées telles que le réseau axonal des cellules neuronales sur lequel repose la connexion neuronale ou encore les complexes axonémaux et leur mécanique au sein des cils et des flagelles sur lesquels reposent la motilité cellulaire ou le brassage des fluides environnants (Janke and Magiera, 2020).

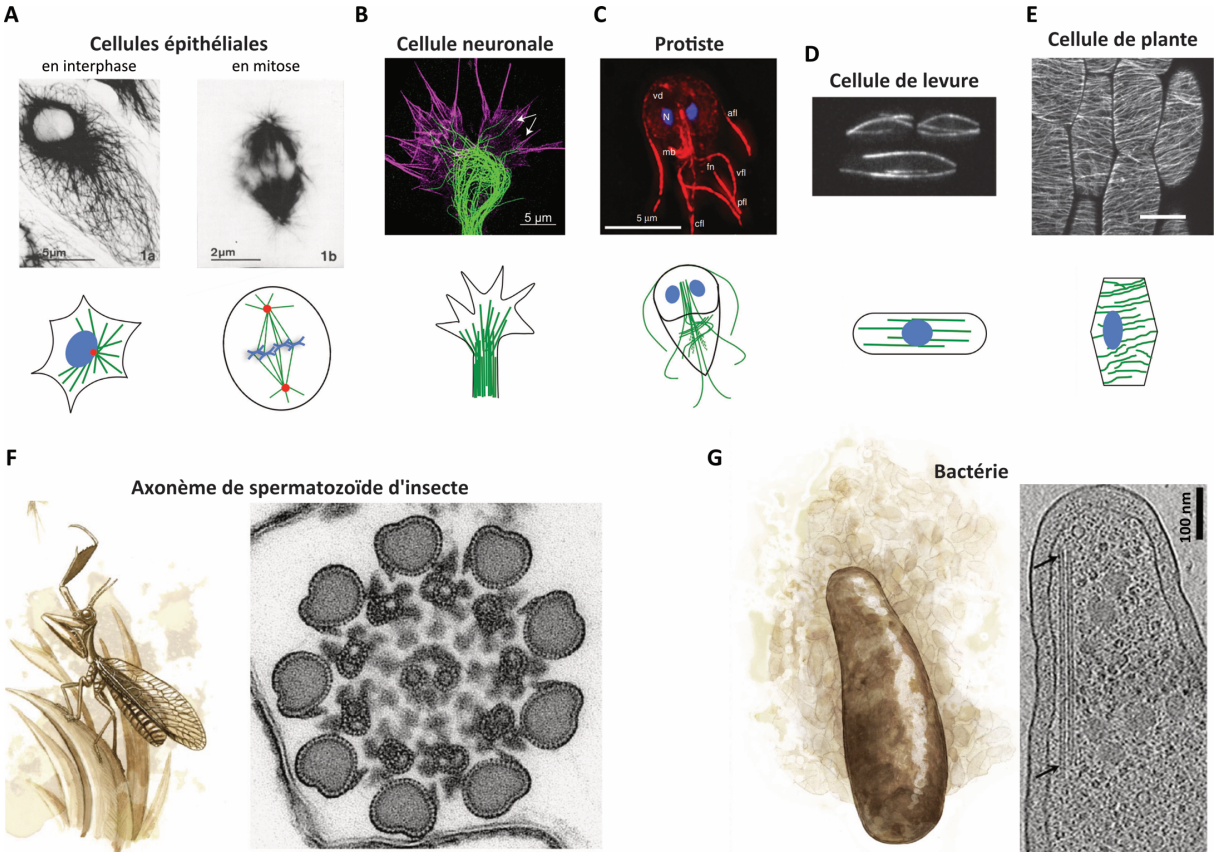


Figure 2. Différentes organisations du réseau microtubulaire (adapté de Goodson and Jonasson, 2018)
A. Organisation du réseau microtubulaire dans les cellules épithéliales PtK_2 en interphase ou en mitose (images extraites de Geuens *et al.*, 1986). **B.** Organisation du réseau microtubulaire d'un cône en croissance d'une cellule neuronale chez le Hamster (images extraites de Biswas and Kalil, 2018). **C.** Réseau microtubulaire chez le protiste *Giardia intestinis*. **D.** Réseau microtubulaire chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* (images C et D. extraites de Goodson *et al.*, 2018) **E.** Réseau cortical de microtubules de cellule de la plante *Arabidopsis thaliana* (image extraite de Elliott and Shaw, 2018). **F.** Micrographe montrant un axonème de spermatozoïde de l'insecte *Mantispa perla*. **G.** Section à travers un tomogramme montrant une forme de microtubule chez la bactérie *Prosthecobacter* (F. et G. extraits de la revue de Chaaban and Brouhard, 2017). Au-dessous des images A-E sont présentés des représentations schématiques du réseau microtubulaire, adaptée de Goodson and Jonasson, 2018.

II. La structure du Microtubule

1. Le microtubule

A. Structure des extrémités du microtubule

Les microtubules sont des fibres polarisées comprenant une extrémité dite « moins » (« - ») exposant les tubulines α et une extrémité dite « plus » (« + ») exposant les tubulines β. La polarité des extrémités du MT et la nomenclature utilisée proviennent des différences de vitesses d'élongation entre les deux extrémités. En effet, la polymérisation est plus rapide à l'extrémité « + » comparée à l'extrémité « – ». Ainsi, le taux d'élongation est environ 3 fois plus important à l'extrémité « + » comparé à l'extrémité « – » (Tran, Walker and Salmon, 1997). La stabilité de l'extrémité « - » est également plus importante que celle de l'extrémité « + ». *In vitro*, sur des microtubules polymérisés à partir de tubuline purifiée, la rupture par un laser du microtubule, soit au niveau de son extrémité « + », soit au niveau de son extrémité « - », n'a pas le même impact. Suite à une rupture au niveau de l'extrémité « + », le microtubule dépolymérise rapidement alors que, suite à une rupture au niveau de l'extrémité « - », le MT reste relativement stable et est capable de re-polymériser (Walker *et al.*, 1988; Tran, Walker and Salmon, 1997). De plus, *in cellulo,* l'extrémité « – » est souvent associée à un MTOC (Microtubule Organizing Center) tel que le centrosome et sa dynamique peut donc être réduite. *In vitro*, les extrémités « – » et « + » libres adoptent toutes deux une grande variété de configurations structurales (des extrémités à bouts franc, de bouts composés d'une à plusieurs extensions en feuillets de longueurs et de courbures variables), ce qui rend complexe l'étude permettant de caractériser et d'assigner des particularités structurales à l'une des extrémités par rapport à l'autre.

La formation de la paroi est un point important dans la définition de la structure des extrémités. Cependant, ce point reste controversé dans la littérature. Deux grandes hypothèses du mécanisme de formation de la paroi sont suggérées. Le premier mécanisme dit bidimensionnel, suggère que l'association latérale et longitudinale des hétérodimères de tubuline conduit à la formation d'un feuillet bidimensionnel au cours de l'assemblage qui se redresse et se referme progressivement avec l'augmentation des contacts latéraux (Figure 4) (Chrétien, Fuller and Karsenti, 1995; Jánosi, Chrétien and Flyvbjerg, 1998; Nogales and Wang, 2006b; Guesdon *et al.*, 2016; Atherton *et al.*, 2018). Ce mécanisme conduit à la formation d'une extrémité en croissance constituée d'un feuillet courbe plus ou moins long (Figure 3A et 3B). Le second mécanisme suggère que la formation du microtubule et son élongation serait permise par l'ajout progressif à l'extrémité en croissance d'hétérodimères de tubuline qui forment des protofilaments (PFs) individuels courbées, sans passer par la formation de « feuillets », ce qui permet l'obtention d'une extrémité évasée composée de PFs individuels courbés (Richard McIntosh *et al.*, 2018) ; (Figure 3C).

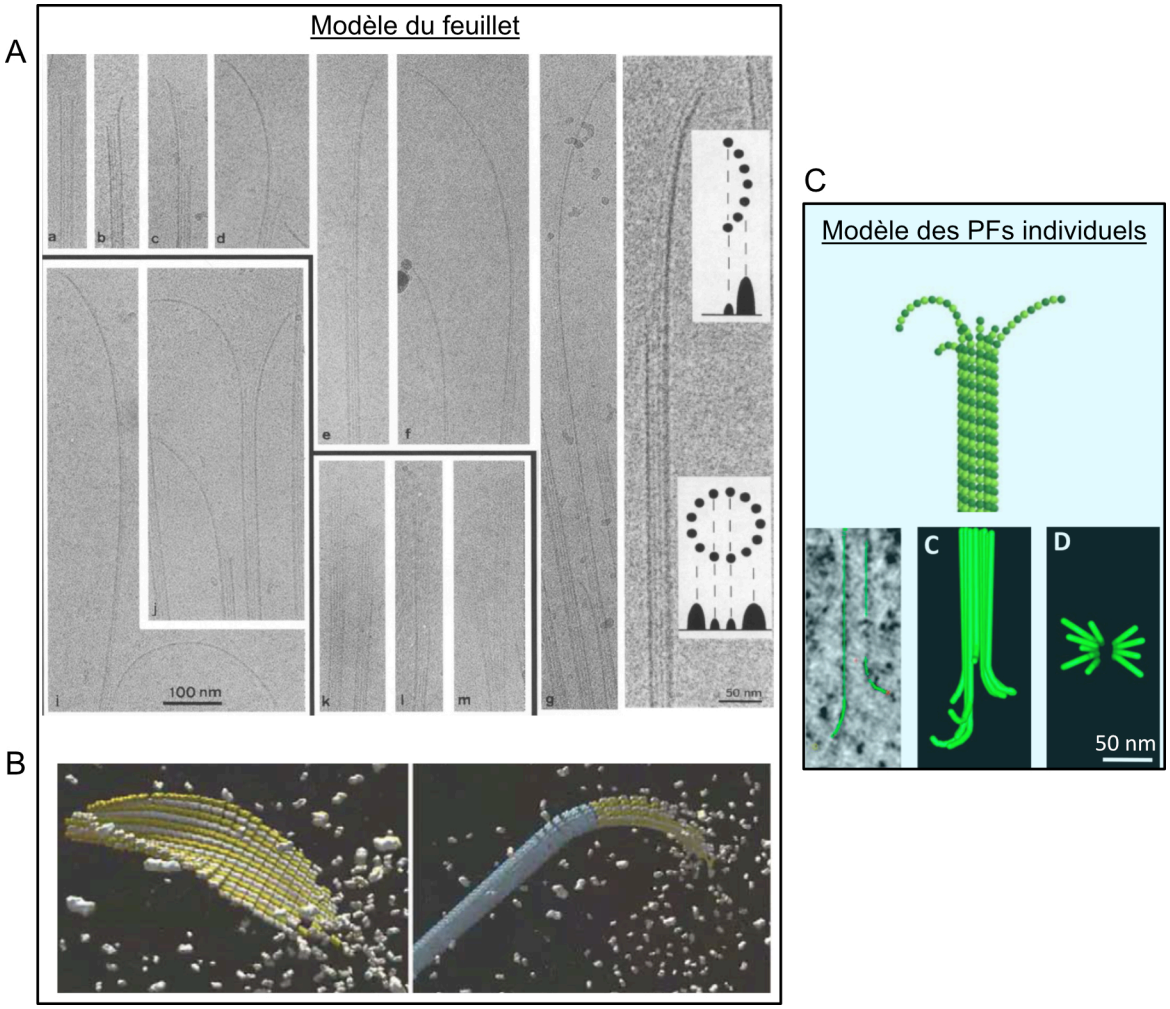


Figure 3. Structure de l'extrémité en croissance

A. Images de cryo-microscopie électronique d'extrémités « + » de microtubules, extraites de (Chrétien, Fuller and Karsenti, 1995). De longs faisceaux courbés constitués par l'association latérale de plusieurs PFs peuvent être observés. **B.** Modèle de la fermeture de la paroi, extrait de (Nogales and Wang, 2006b). **C.** Modèle des extrémités en croissance par la formation de PFs individuels proposé par (Richard McIntosh *et al.*, 2018). Le suivi de chaque PF (indiqué par les lignes vertes au sein du cryotomogramme permet de reconstituer l'organisation structurale de l'extrémité en croissance. Selon (Richard McIntosh *et al.*, 2018), la fermeture de la paroi et la structure des extrémités en croissance ne passent pas par un état de feuillets.

B. Structure et organisation de la paroi

La paroi du microtubule consiste en l'association longitudinale en tête-à-queue des dimères de tubuline sous forme de PFs et en l'association latérale de ces hétérodimères ou PFs pour former un tube creux de 25 nm. La paroi se compose d'un nombre prédominant de 13 protofilaments retrouvés en cellule eucaryote (Tilney *et al.*, 1973; Pierson, Burton and Himes, 1978). Dès 1974, l'analyse des clichés de diffraction d'images de MTs en coloration négative a révélé l'existence d'une organisation en hélice au sein de la paroi, notamment une organisation latérale des monomères de tubuline suivant une hélice à 3-départs (Amos and Klug, 1974; Amos, 1995). Par convention, les configurations structurales de la paroi sont notées N_S : avec N, le nombre de protofilaments, et S le nombre départs d'hélices latérales décrit par les monomères au sein de la paroi. Pour exemple, on notera 13_3 et 14_3 pour définir des parois à 13 PFs et 14 PFs présentant une hélice latérale à 3-départs.

Le manque de résolution sur ces motifs de diffraction de MTs n'a pas permis à l'époque de définir l'organisation exacte des hétérodimères au sein de la paroi et deux principaux modèles ont donc été proposés. Le réseau de surface de type A et le réseau de surface de type B. Le réseau de type A est défini par des contacts latéraux hétérotypiques entre deux protofilaments (α-β, β-α) et les hélices latérales résultantes seraient ainsi constituées d'une alternance de tubuline α-β (Figure 4A). Le réseau de type B est défini par des contacts latéraux homotypiques et un tour d'hélice serait alors soit α soit β (Figure 4B).

Grace à une étude de diffraction électronique sur des MT polymérisés in vitro et décorés par des têtes de kinésines, Song and Mandelkow (1993) ont montré plus tard l'existence d'une organisation des hétérodimères de tubuline selon un réseau de type B. Les têtes de kinésines reconnaissent spécifiquement une région intradimérique située en majorité sur la sous-unité β de la tubuline, ce qui permet de révéler l'organisation des dimères au sein de la paroi (Krebs, Goldie and Hoenger, 2004). Dans une paroi composée de 13 ou 14 PFs en réseau de type B, l'hélice latérale à 3-départs décrite par les monomères impose au moins une transition α-β (ou β-α) par tour, ce qui forme la jointure (Mandelkow *et al.*, 1986) (Figure 4B). Le consensus actuel sur l'organisation de la paroi admet toujours une organisation des hétérodimères de tubuline selon un réseau de type B à jointure unique (Mandelkow *et al.*, 1986; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). Cependant, ce consensus est discuté. Plusieurs observations démontrent l'existence d'un troisième type d'organisation au sein de la paroi. En effet, (McEwen and Edelstein, 1980; Kikkawa *et al.*, 1994; Debs *et al.*, 2020) ont mis en évidence une organisation des hétérodimères de tubuline selon un réseau de type B avec plusieurs jointures, ce qui définit le réseau de surface mixte AB (Figure 4C).

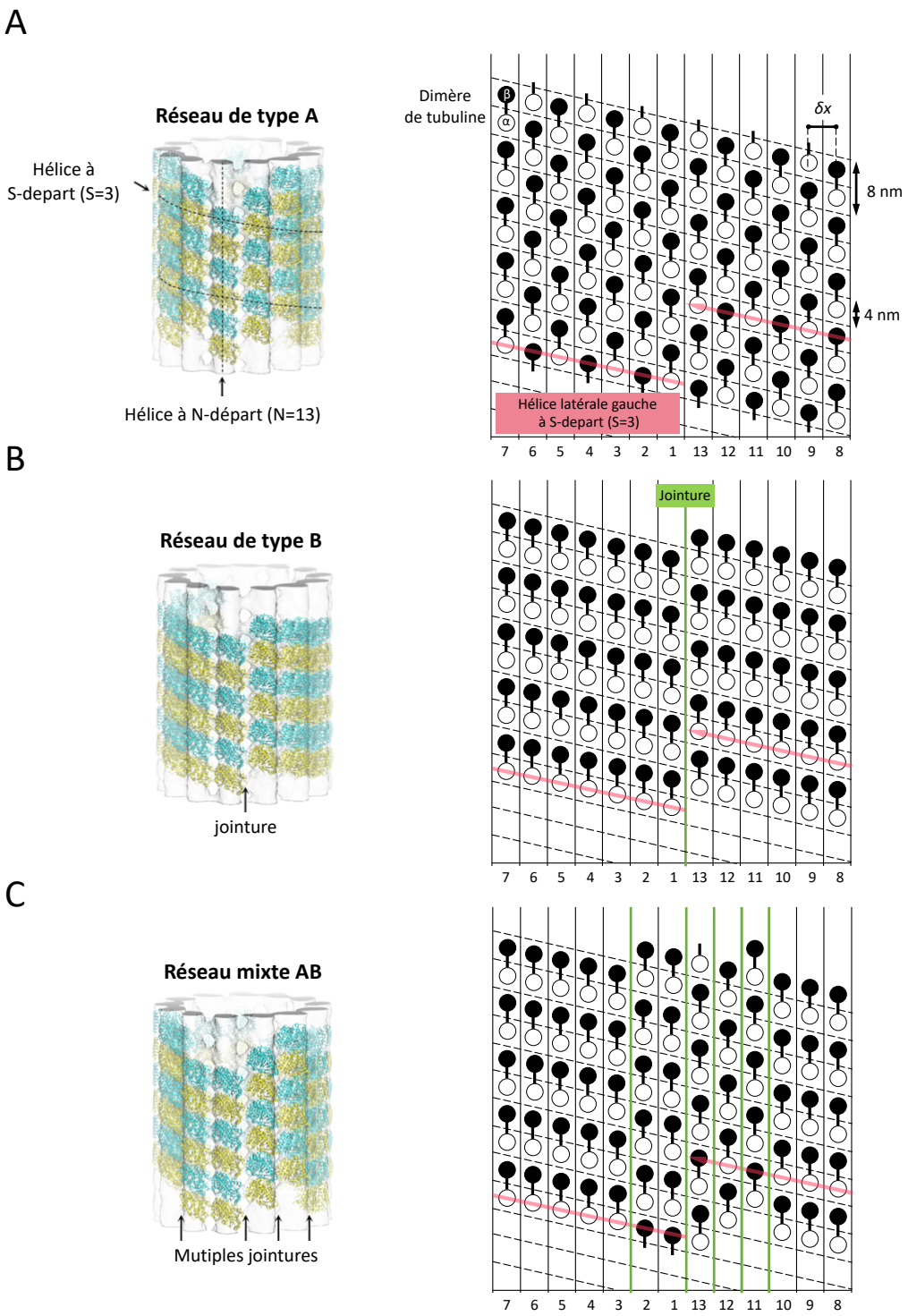


Figure 4. Réseau de type A, B ou mixte AB

A gauche, sont présentées des modélisations 3D à partir de la structure cristallographique de la tubuline (PDB : 1TUB) de réseaux de type A (en A), de type B (en B) ou mixte AB (en C). La tubuline β est représenté en cyan et la tubuline α en jaune. Sur le schéma en haut à gauche, une hélice est indiquée en ligne noire pointillée avec un pas équivalent à 3 monomères de tubuline (S = 3). Par convention nous avons ici une paroi 13_3. A droite, sont présentées des représentations ouvertes de l'organisation des dimères retrouvée au sein de la paroi 13_3, adaptées de (Amos, 1995; Chrétien and Fuller, 2000). Les hétérodimères de tubuline αβ s'assemblent en tête-à queue et alternent le long d'un protofilament. Les interactions latérales au sein d'une hélice à 3-départs (en rose) sont hétérotopiques dans un réseau de type A et homotypiques dans un réseau de type B pour un même tour d'hélice en partant de la jointure. La paroi 13_3 impose dans un réseau de type B la présence d'une jointure unique (en vert) (Mandelkow *et al.*, 1986). Le réseau mixte AB est composé de plusieurs jointures. Par conséquent, il se compose d'une mélange d'interactions latérales de type B et de type A.

C. Modèle de l'accommodation de la paroi

Au-delà des MTs 13_3 retrouvés en cellule, l'assemblage *in vitro* de la tubuline produit une plus grande variétés de configurations, avec un nombre N de protofilaments variant de 10 à 17, et un nombre de départs d'hélices S variant de 2 à 4 (Wade, Chrétien and Job, 1990; Chrétien and Wade, 1991; Chrétien and Fuller, 2000). Selon le nombre de PFs et le type de départs d'hélices, l'axe des PFs va vriller par rapport à l'axe du MT afin d'adopter une conformation thermodynamiquement favorable. C'est le mécanisme d'accommodation de la paroi décrit par (Chrétien and Fuller, 2000) (Figure 5A). Le modèle explique l'interconnexion des différents paramètres structuraux de la paroi par rapport à l'angle de vrillage des PFs θ. Pour exemple, une paroi à 14 PFs a la possibilité de se conformer selon trois types d'hélices latérales à 2-, 3- ou 4-départs (Figure 5B). Pour autant, la forme la plus observée est la forme 14_3 qui présente un angle de vrillage θ thermodynamiquement favorable. Si le départ d'hélice est de 2 ou de 4, l'angle de vrillage est plus prononcé, ce qui est moins favorable d'un point de vue thermodynamique, bien qu'accommodable par le modèle mathématique (Figure 5B). De la même manière, la paroi peut s'accommoder d'une variation du nombre PFs en conservant une hélicité à 3-départs grâce au vrillage de ses PFs qui permet de stabiliser l'ensemble.

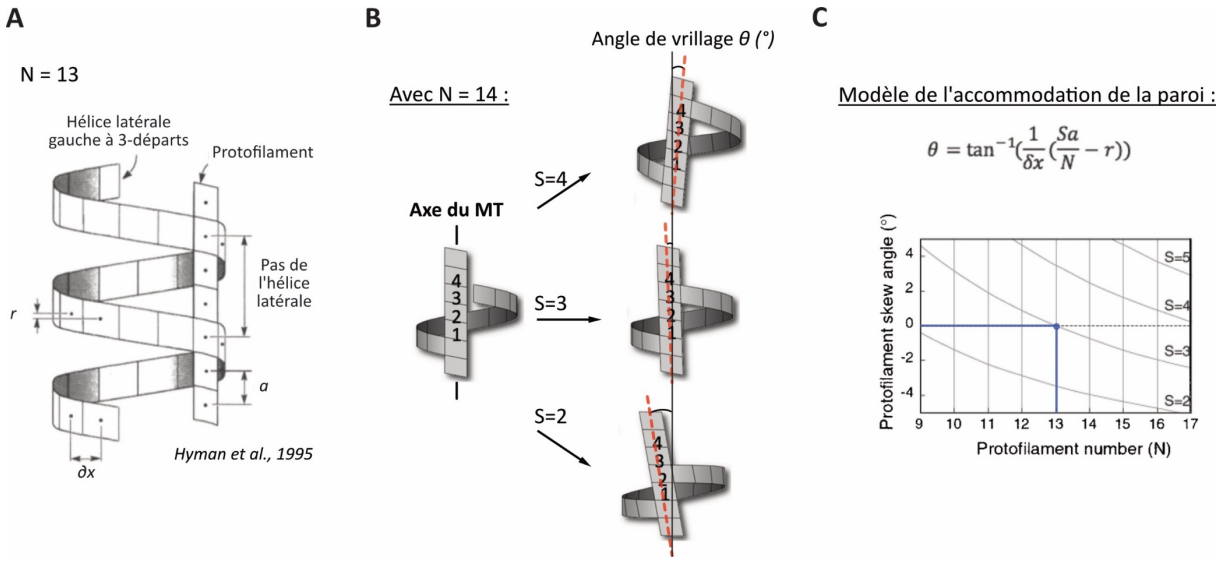


Figure 5. Modèle mathématique de l'accommodation de la paroi (Chrétien and Stephen D. Fuller, 2000)

A. Représentation schématique des différents paramètres de la paroi (voir en C) extraite de (Hyman *et al.*, 1995). B. Représentation schématique des différentes configurations adoptées par une paroi à 14 PFs (N=14) extraite de (Chrétien and Fuller, 2000). Afin de maintenir les interactions latérales, les protofilaments sont vrillés par rapport à l'axe longitudinal du MT, définissant l'angle de vrillage des PFs (θ), indiqué par les lignes discontinues en rouge. C. Modèle de l'accommodation de la paroi établissant le lien entre la valeur de l'angle de vrillage θ (°) et les différents paramètres structuraux du microtubule. N : nombre de protofilaments ; S : nombre de départs de l'hélice latérale décrite par les monomères de tubuline ; a : la distance entre deux monomères d'un même protofilament ; r : décalage longitudinal entre deux monomères adjacents et δx : distance de séparation entre deux protofilaments adjacents. L'application de cette équation permet d'établir la représentation graphique théorique donnée sous l'équation et établissant la relation entre l'angle de vrillage et le nombre de protofilaments pour différents départs d'hélice S.

2. L'hétérodimère de tubuline : brique élémentaire du microtubule

Le microtubule est constitué à partir d'un hétérodimère de 110 kDa, résultant de la dimérisation constitutive de deux protéines globulaires, très proches en termes de séquence et de structure : les tubulines α et β. Il existe différents gènes codant pour chacune des deux tubulines α et β. Les tubulines α et β sont donc présentes en plusieurs isoformes, qui vont varier selon de type cellulaire ou tissulaire. La tubuline utilisée dans notre projet est purifiée à partir de cervelles de porc (*Sus scrofa domesticus*). La cervelle de porc comprend 4 isoformes de la tubuline α et 2 isoformes de la tubuline β (Ludueña, 1997). Ainsi, dans nos conditions d'assemblage *in vitro*, nos microtubules sont constitués d'un mélange d'isoformes d'hétérodimères de tubuline.

La tubuline est une GTPase capable de s'auto-assembler en présence de GTP (guanosine triphosphate) et d'ions magnésium dans des conditions favorables de température et de tampon. La première structure tridimensionnelle à haute résolution (3.8 Å) a été obtenue en 1998 par (Nogales, Wolf and Downing, 1998) par cristallographie électronique à partir des feuillets antiparallèles formés par la tubuline en présence de Zinc et stabilisés par du paclitaxel (Figure 6A). La structure montre que chacun des monomères de tubuline α et β contient trois grands domaines fonctionnels : un domaine N terminal, un domaine intermédiaire et un domaine C-terminal (Figure 6B).

(i) Le domaine N-terminal (résidus de 1 à 205) contient un pli de Rossman, qui est un domaine de liaison au nucléotide, le GTP dans le cas de la tubuline. Ce pli de Rossman est un motif structural résultant de l'alternance de brins β parallèles avec des hélices α (H1 à H7). Les boucles T1 et T6 qui lient les brins β sont également impliquées dans la formation du site de liaison au nucléotide. L'hétérodimère de tubuline comprend donc deux sites de liaisons au nucléotide situés chacun à l'interface entre deux monomères de tubuline. Le site de liaison de la tubuline α est intradimérique, situé entre la sous-unité (SU) α et la SU β de l'hétérodimère. En solution, ce site de liaison au GTP de la SU α est bloqué par la tubuline β et le GTP qui s'y fixe n'est pas hydrolysable. Ce site a ainsi été nommé site N pour « Non-exchangeable». *A contrario*, le site de liaison au GTP de la tubuline β est interdimérique et le nucléotide échangeable/hydrolysable. Ce site a ainsi été nommé site E pour «Exchangeable ». En conséquence, au sein d'un hétérodimère, la SU α est constamment chargée en GTP et la SU β est chargée soit en GTP, soit de la molécule hydrolysée, GDP (guanosine diphosphate) ou de l'intermédiaire GDP.P_i (hydrolyse effectuée mais P_i tous présent au niveau du site catalytique) (Figure 6A).

(ii) Le domaine intermédiaire (I) (résidus de 206 à 381) contient la boucle T7 et l'hélice H8 de la tubuline, qui viennent tous deux compléter le site catalytique E de la SU β de tubuline de l'unité qui précède (Figure 6B et 6C). L'hélice H8 apporte notamment le résidu E254 indispensable à l'activation du site E de la SU β de tubuline. (Roostalu *et al.*, 2020) montre qu'une simple mutation du glutamate par une

alanine (E254A) ou par une aspartate (E254D) suffit à bloquer ou à ralentir l'activité GTPasique, respectivement. Le domaine I contient également la boucle M impliquée dans les interactions latérales entre les protofilaments et qui joue donc un rôle clé dans la stabilisation de la paroi du microtubule.

(iii) Le domaine C-terminal (C-ter) (résidu 382 à 441) est composé des hélices α, H11 et H12 qui se localisent à la surface de la paroi du microtubule. Ce domaine est crucial pour la liaison aux protéines associées aux microtubules (MAPs) dont les moteurs moléculaires (dynéines, kinésines). Cependant, la structure spatiale des derniers résidus du domaine C-ter demeure non-résolue du fait de sa flexibilité. Les variabilités de séquence entre les différentes isoformes de la tubuline et les modifications post-traductionnelles (MPTs) connues de la tubuline se localisent principalement au niveau des derniers résidus de cette queue C-terminale (Janke, 2014; Janke and Magiera, 2020).

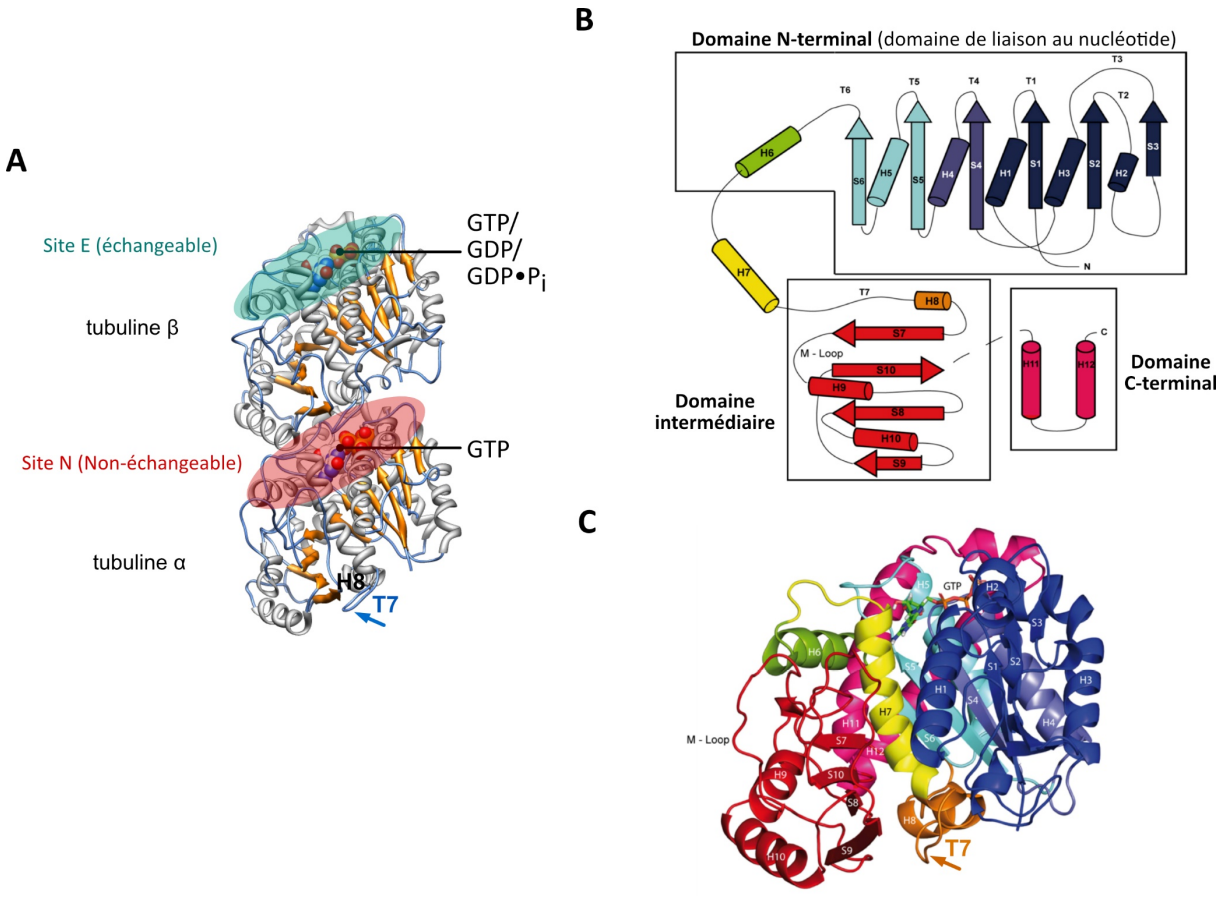


Figure 6. Domaines structuraux du monomère de tubuline.

A. Structure cristallographique de l'hétérodimère de tubuline, structure extraite de la banque de données des protéines (PDB : 1TUB). **B.** Carte topologique montrant les trois grands domaines de la tubuline. Les hélices α (de H1 à H12) sont représentées par des cylindres, les brins β (de S1 à S10) par des flèches et les boucles (T) par un trait continu (Figure adapté de Nogales *et al.*,1998). **C.** Diagramme en ruban de la tubuline α utilisant le même code couleurs que celui utilisé en B. La structure est extraite de la banque de données de protéines (PDB : 6DPV).

III. La dynamique des microtubules

Les différentes architectures et fonctions du réseau microtubulaire reposent sur la propriété très dynamique du MT. Le suivi de la masse totale de polymères néoformés en fonction du temps par turbidimétrie à 350 nm permet d'étudier la cinétique d'assemblage du MT. Cette cinétique montre trois grandes phases : une phase de latence qui correspond à une étape de nucléation, une phase d'élongation et une phase d'équilibre dynamique (plateau).

1. La nucléation

La nucléation désigne la formation et la stabilisation des premiers oligomères de tubuline (noyaux critiques), qui permet d'amorcer la poursuite de l'assemblage du MT. Elle constitue une étape limitante durant la dynamique d'assemblage. *In vitro*, la nucléation peut se dérouler spontanément à partir de tubulines solubles purifiées mises dans les bonnes conditions physico-chimiques : concentration suffisante en tubuline, présence de GTP, d'ions magnésium (Mg^{2+}) et incubation à 35 °C. En condition de nucléation spontanée, la cinétique d'assemblage est caractérisée par une phase de latence entre la mise en condition d'assemblage et l'augmentation de la turbidité (*cf.* Figure 7A et 7B) car cette nucléation spontanée doit s'affranchir d'une barrière énergétique nécessaire à la stabilisation des premiers oligomères. Plus cette phase de latence est longue, plus la formation des noyaux critiques est coûteuse en énergie (Roostalu and Surrey, 2017). La présence de nucléateurs réduit considérablement cette phase de latence (Figure 7C et 7D ; (Roostalu and Surrey, 2017)). En nucléation spontanée, la formation de microtubules nécessite une concentration minimale de 20 µM de tubuline, alors que celle-ci est diminuée à 3-4 µM en présence de centrosomes (Mitchison and Kirschner, 1984b) et à 1 µM à partir de MTs préexistants (Roostalu and Surrey, 2017). La nucléation du microtubule est donc une étape limitante dont la vitesse dépend de plusieurs facteurs : (i) de la concentration de la tubuline disponible en solution, (ii) de la présence de centres nucléateurs (MTOCs : centrosomes, axonèmes, segments de microtubules préexistants) et (iii) de la présence de partenaires protéiques stabilisateurs tels que la protéine XMAP215 qui lie la protéine soluble et aide à son assemblage (Nithianantham *et al.*, 2018)).

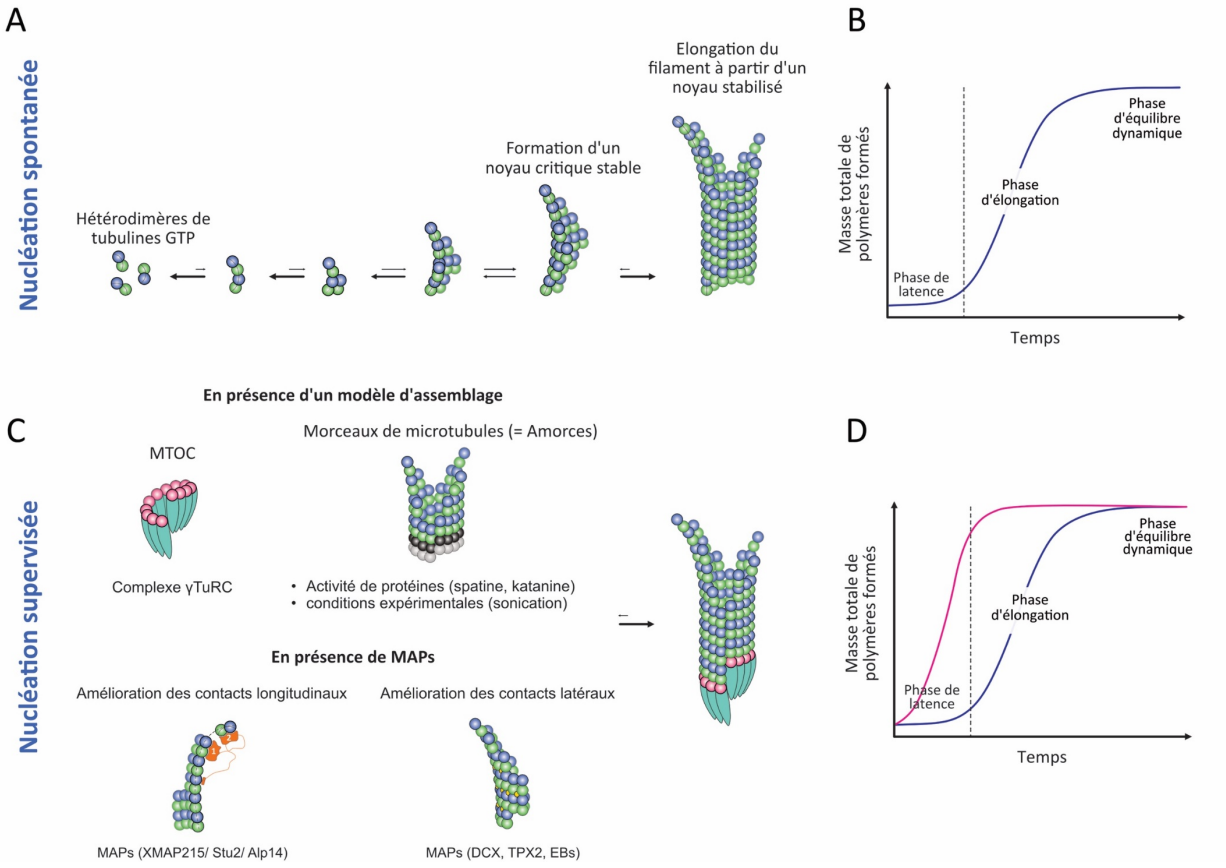


Figure 7. Nucléation des microtubules (représentations schématiques adaptées de Roostalu and Surrey, 2017)
A. Nucléation spontanée. Modèle hypothétique de la nucléation des microtubules. Les dimères de tubulines GTP s'assemblent spontanément en oligomères de plus en plus conséquents. Selon Roostalu and Surrey, un noyau composé au minimum de 5 à 20 hétérodimères de tubulines est nécessaire pour favoriser la polymérisation et engager la phase d'élongation du polymère. B. Cinétique d'auto-assemblage de microtubules issue d'une nucléation spontanée, obtenue par turbidimétrie à 350 nm. L'étape de nucléation qui est limitante se traduit par une phase de latence observée au début de la cinétique C. Nucléation supervisée. La nucléation peut être facilité en présence d'un centre nucléateur (ex : MTOC, segment de MT préexistant) qui a pour rôle de faciliter la formation et la stabilisation des premiers oligomères en servant de patron d'assemblage. D. Cinétique d'assemblage caractéristique de microtubules issue d'une nucléation supervisée, en présence de nucléateurs (en magenta) et non supervisée (en bleu). En présence de nucléateurs, le temps de latence qui correspond à l'étape de nucléation est très fortement diminué.

2. L'instabilité dynamique (élongation et équilibre dynamique)

Suite à la phase de latence, la cinétique d'assemblage est caractérisée par une phase d'élongation où les interactions latérales et longitudinales entre les hétérodimères de tubuline permettent l'élongation des microtubule. Cependant, en turbidimétrie au bout d'un temps variable de polymérisation, la masse globale de polymères formés atteint une valeur maximale définissant un plateau (Figure 7B). Ce plateau reflète un équilibre dynamique des microtubules en constante polymérisation et dépolymérisation. En effet, (Mitchison and Kirschner, 1984a) ont démontré que lors de la phase de plateau, deux populations de MTs coexistent : une population, en majorité en polymérisation, et une autre en dépolymérisation.

Peu après, l'analyse de la dynamique individuelle de chaque microtubule, *in vitro* et *in cellulo* par vidéomicroscopie DIC (Differential interference contrast) a permis de montrer qu'un même microtubule pouvait alterner rapidement et de manière stochastique entre des phases d'assemblage et de désassemblage (Horio and Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988). Cette alternance stochastique entre polymérisation et dépolymérisation pour un même microtubule a également été mise en évidence par la suite par microscopie à fluorescence à l'aide de tubuline fluorescente ou via le marquage spécifique par des protéines liant les extrémités en croissances des MTs telles que les EBs (End binding proteins) (Mimori-Kiyosue, Shiina and Tsukita, 2000; Stepanova *et al.*, 2003; Bieling *et al.*, 2007; Akhmanova and Steinmetz, 2008; Dixit *et al.*, 2008; Maurer *et al.*, 2011, 2012). Cette propriété intrinsèque au microtubule définit la notion d'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984a). Le passage de la polymérisation à la dépolymérisation définit un événement de catastrophe et, à l'inverse, le passage d'une dépolymérisation à une re-polymérisation définit un événement de sauvetage. L'instabilité dynamique, qui est caractérisée par la durée et le taux de croissance ainsi que la fréquence des événements de catastrophe et de sauvetage (Figure 8) est essentielle à la fonction des MTs. Elle permet notamment au réseau microtubulaire de se réarranger très rapidement au sein de la cellule au cours du cycle cellulaire (ex : transition du fuseau interphasique à un fuseau mitotique), ou en réponse à des stimuli chimiques ou mécaniques.

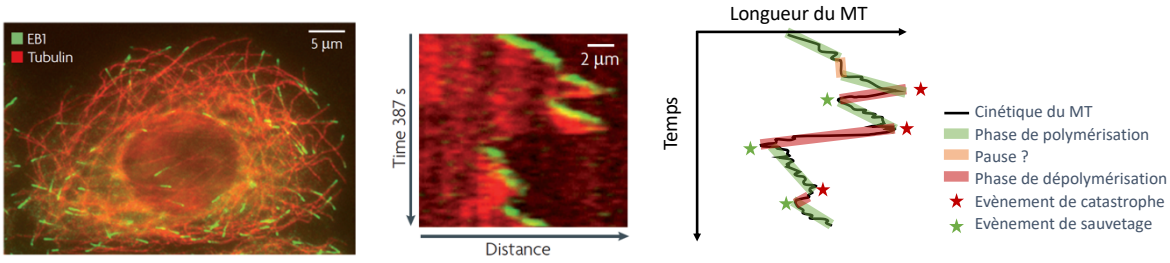


Figure 8. L'instabilité dynamique du microtubule

Le suivi de la dynamique (durées des phases de polymérisation et dépolymérisations) des microtubules est permis par le suivi de deux marquages : celui de la protéine EB3 par la GFP (Green Fluorescent Protein) et celui de la tubuline-α par la mcherry, extrait de (Akhmanova and Steinmetz, 2008). EB3-GFP (vert) se lie exclusivement aux extrémités « + » en croissance des MTs et permet d'observer les évènements de polymérisation. En phase de dépolymérisation, le marquage par EB3-GFP est perdu mais le marquage de la tubuline-α (en rouge) permet le suivi du MT en phase de dépolymérisation. A gauche, une image montrant le réseau de microtubules, en rouge, dans une cellule épithéliale et interphasique de rat. Lorsque les microtubules sont en croissance, la protéine EB3-GFP forme des comètes vertes à leur extrémité. Au milieu, un kymographe montrant le comportement dynamique d'un MT avec l'alternance de phases de polymérisation et de dépolymérisation définissant l'instabilité dynamique des MTs. A droite, une représentation schématique de ce kymographe.

3. Les régulations de la dynamique du microtubule

L'instabilité dynamique est une propriété intrinsèque aux microtubules. Elle est cependant finement régulée *in vivo* à de nombreux niveaux, notamment par des modifications post-traductionnelles et des protéines régulatrices. De nombreuses drogues peuvent également moduler cette instabilité *in vitro* ou *in vivo* en stabilisant ou déstabilisant la structure du MT ou en agissant sur l'activité GTPasique de la tubuline.

A. Régulation intrinsèque

Les extrémités « + » et « - » du microtubule possèdent des propriétés dynamiques différentes ce qui leur confère des fonctions particulières *in cellulo* : une fonction d'amorce de nucléation, de stabilisation et d'ancrage pour l'extrémité « - » exposant la tubuline α dont le GTP est non hydrolysable (Akhmanova and Hoogenraad, 2015; Dogterom and Koenderink, 2019), et une fonction d'adaptation, de génération de forces et d'exploration de l'environnement cellulaire pour l'extrémité « + » exposant la tubuline β et son activité GTPasique. Cette activité GTPasique de la SU β est un élément clef de l'instabilité dynamique des MTs.

1. Transition conformationnelle du dimère de la tubuline, activité GTPasique de la tubuline et coiffe GTP stabilisatrice

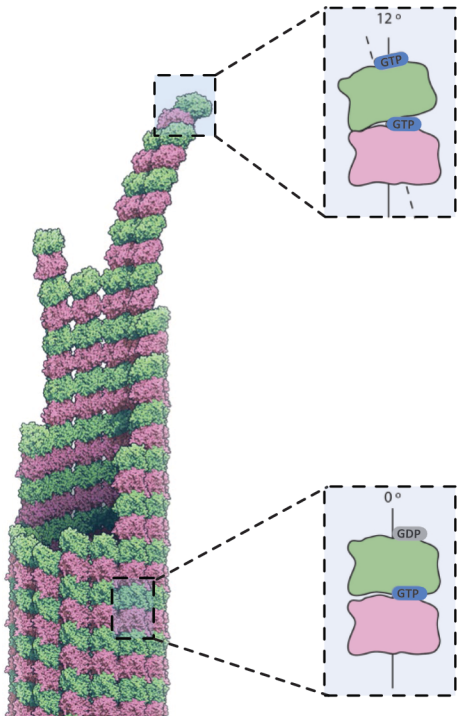


Figure 9. Conformation courbée et redressée du dimère de tubuline

Modèle 3D d'une extrémité en croissance, adapté de (Brouhard and Rice, 2018). Le dimère de tubuline adopte une conformation courbée au sein des feuillets (de 12°) et une conformation redressée au sein de la paroi

L'instabilité dynamique est dépendante de l'activité GTPasique de la tubuline, qui repose sur une maturation et un changement conformationnel séquentiel du dimère de tubuline le long du MT.

L'hétérodimère de tubuline change de conformation lorsqu'il s'incorpore et se dissocie de la paroi. La tubuline soluble, quel que soit son état nucléotidique, adopte une conformation dite courbée (Brouhard and Rice, 2014), et l'étude par diffraction des rayons X aux petites angles (SAXS) montre un angle de ~ 12° entre les monomères de la tubuline αβ (Rice, Montabana and Agard, 2008) (Figure 9). Cependant, lors de son incorporation pour former le MT, cette courbure intrinsèque du dimère est réduite progressivement avec l'augmentation du nombre d'interactions latérales. Cette courbure devient nulle lors de la fermeture de la paroi du microtubule (Nogales and Wang, 2006a; Brouhard and Rice, 2014; Guesdon *et al.*, 2016). Inversement , lorsque le microtubule est en décroissance, les protofilaments s'individualisent et révèlent de nouveau la courbure intrinsèque

des dimères de tubuline, d'où l'apparition des « anneaux de dépolymérisation » ou « phénotype cornu » des extrémités en décroissance (Chrétien, Fuller and Karsenti, 1995). L'incorporation de la tubuline passe donc par une transition conformationnelle de courbée à redressée.

Nous avons vu précédemment que le site catalytique E de la tubuline β est un site interdimérique, qui est donc incomplet en solution. L'activation du site E nécessite *à minima* l'apport de structures secondaires par la SU α de l'unité de tubuline arrivante, notamment avec le résidu E254. Cependant, l'activité GTPasique de la tubuline n'est pas immédiate. En 1981, Marie France Carlier et ses collaborateurs montrent ainsi que le relargage du P_i provenant de l'hydrolyse du GTP de la SU β de la tubuline est retardé par rapport à l'incorporation de nouvelles unités de tubuline au cours du processus d'assemblage (Carlier and Pantaloni, 1981). Une configuration spatiale optimale serait donc requise pour activer le site E (Nogales and Wang, 2006a). La transition conformationnelle de la tubuline courbée à redressée induit par l'augmentation des contacts latéraux participerait-elle à l'activation du site catalytique E ? la question reste ouverte.

Au cours de l'assemblage et la formation de la paroi, la tubuline est donc contrainte dans un état redressé. Les dimères de tubulines redressés au sein de la paroi agissent tous comme des systèmes ressort en surtension, prêts à libérer leurs contraintes mécaniques. Qu'est-ce qui permet à la paroi de se stabiliser ? La mise en évidence du retard entre le relargage du P_i issu de l'hydrolyse qui a lieu au cours de l'assemblage de la tubuline et l'incorporation des nouvelles unités de tubuline suggère une accumulation de tubulines β-GTP (non hydrolysées) et/ou GDP.P_i (hydrolysées sans relargage du P_i) au niveau de l'extrémité « + » en croissance. Cette région de tubulines β-GTP (non hydrolysées) et/ou GDP.P_i définit la coiffe « GTP ». Cette coiffe GTP serait stabilisatrice et permettrait de préserver l'état métastable de la paroi. (Mitchison and Kirschner, 1984a) postulent ainsi que la perte de la coiffe GTP déclencherait les évènements de catastrophe et la phase de dépolymérisation du microtubule (Figure 10). La perte de la coiffe GTP stabilisatrice exposerait la paroi-GDP, dont les interactions latérales fragilisées ne seraient plus capables de maintenir l'énergie mécanique en surtension emmagasinée au sein de la paroi. A la manière d'un système ressort, les PFs individuels libèrent alors les contraintes mécaniques et le MT entre dans une phase de dépolymérisation (Mandelkow, Mandelkow and Milligan, 1991; Caplow, Ruhlen and Shanks, 1994)).

A quel moment du processus d'assemblage et de redressement, l'activité GTPasique est-elle activée ? quelle est la longueur d'extrémité en croissance restant sous forme GTP / GDP.P_i ? Comment la coiffe GTP est-elle perdue ? S'il apparait clair aujourd'hui que le cycle conformationnel et le cycle GTPasique de la tubuline sont intimement liés et constituent la première ligne de régulation de l'instabilité dynamique, de nombreux points restent à être élucidés afin de comprendre le(s) mécanisme(s) à la base de cette instabilité.

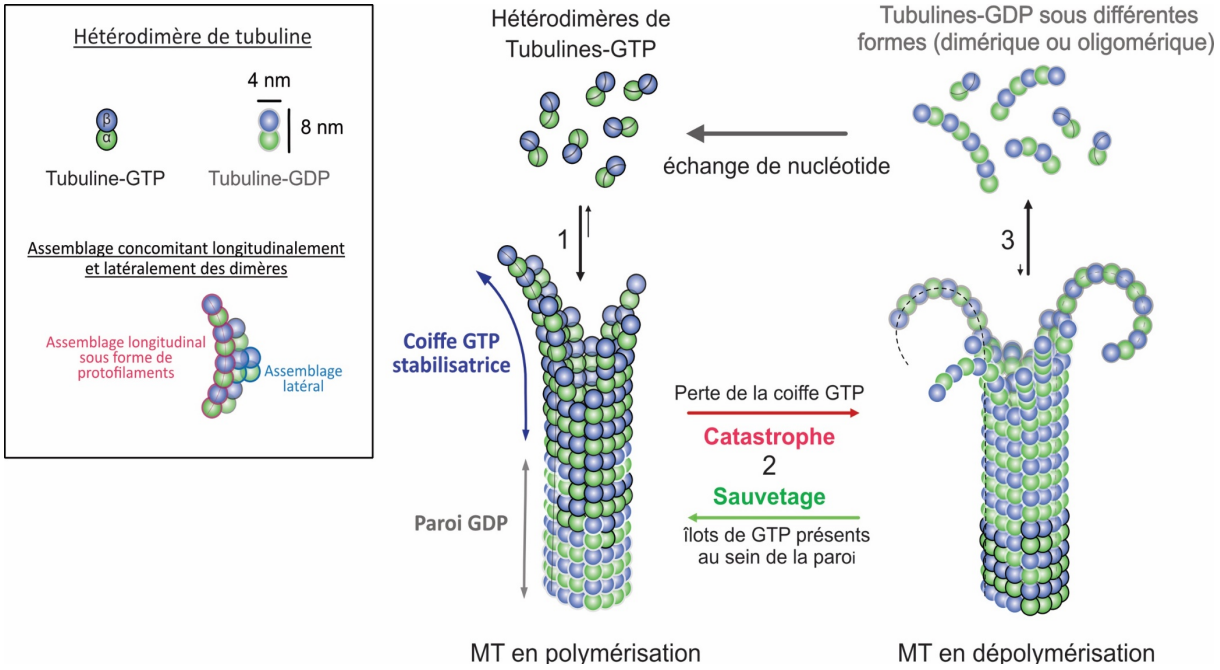


Figure 10. Représentation schématique de l'instabilité dynamique

Représentation schématique adaptée de (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Brouhard and Rice, 2014). Les hétérodimères de tubuline α et β liés au GTP s'assemblent longitudinalement en protofilament et latéralement pour former des noyaux critiques stables, indispensables à la phase d'élongation. **1)** Incorporation des dimères de tubuline-GTP lors de l'élongation. De manière concomitante, les interactions latérales et longitudinales, permettent la formation d'un feuillet qui se referme lorsque les interactions sont suffisantes. L'hydrolyse du GTP de la SU β étant différée par rapport à l'incorporation de l'hétérodimère, le microtubule est principalement constitué de tubuline-GDP au sein de sa paroi fermée et de tubuline-GTP au niveau de l'extrémité en croissance. Cette coiffe GTP à l'extrémité serait stabilisatrice. **2)** Les microtubules sont caractérisés par une instabilité dynamique, l'alternance rapide et stochastique entre les phases de dépolymérisation et de re-polymérisation. La perte de la coiffe GTP induit la déstabilisation de la paroi, qui se traduit par un événement de catastrophe : le MT entre dépolymérisation. A l'inverse, suite à un événement de catastrophe, la paroi est capable de re-polymériser, ce qui définit un événement de sauvetage. Cet événement de sauvetage pourrait être dû à la présence des îlots de tubuline-GTP présents au sein de la paroi. **3)** Relargage des anneaux ou des oligomères de dépolymérisation.

2. Les îlots de tubuline-GTP

Si la paroi redressée et fermée est principalement constituée de tubuline-GDP, des patchs de tubuline-GTP (dits îlots de GTP), qui seraient impliqués dans la régulation de l'instabilité dynamique, sont également retrouvés au sein de cette paroi (Chretien *et al.*, 1992; Dimitrov *et al.*, 2008). L'origine des îlots GTP est un sujet en cours de discussion. Deux hypothèses non exclusives existent. La première hypothèse explique que la conservation de la tubuline-GTP au sein de la paroi fait suite à un défaut de l'hydrolyse. En d'autres termes, lors de la formation du microtubule, certaines tubulines ne sont pas hydrolysées et se retrouvent coincées au niveau de la paroi sous forme GTP (Dimitrov *et al.*, 2008). La seconde hypothèse explique que la présence de défauts dans la paroi permettrait l'incorporation de nouvelles tubulines-GTP en solution au niveau de ces défauts (Chretien *et al.*, 1992; Schaedel *et al.*, 2015; de Forges *et al.*, 2016; Atherton *et al.*, 2018). Schaedel et collaborateurs ont notamment démontrés l'incorporation de nouvelles tubulines-GTP au sein de la paroi au niveau de défauts induits par l'application d'une force mécanique (Schaedel *et al.*, 2015) et Vemu et collaborateurs observent la même chose lorsque les défauts sont induits

par des MAPs endommageantes telles que la katanine et la spastine (Vemu *et al.*, 2018). L'origine des îlots de GTP reste donc méconnu.

Cependant, plusieurs auteurs suggèrent déjà leur rôle dans l'instabilité dynamique et, plus particulièrement, lors des évènements de sauvetage (Figure 11). En utilisant de la tubuline chargée en GMPCPP, un analogue non hydrolysable du GTP (Schaedel *et al.*, 2015; de Forges *et al.*, 2016) ont démontré que la dépolymérisation de la paroi s'arrête au niveau des îlots de GMPCPP et observent que la re-polymérisation est initiée au niveau de ces îlots (Schaedel *et al.*, 2015; de Forges *et al.*, 2016). Les îlots de tubulines-GMPCPP non hydrolysables sont donc capable d'initier des événements de sauvetage. Par extension, cela suggèrerait que les évènements de sauvetage de l'instabilité dynamique reposeraient sur la présence d'îlots de tubulines non-hydrolysées au sein de la paroi (Dimitrov *et al.*, 2008; Schaedel *et al.*, 2015, 2019; Aumeier *et al.*, 2016; de Forges *et al.*, 2016).

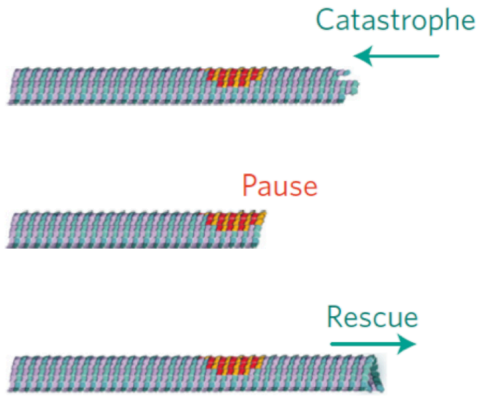


Figure 11. Instabilité dynamique et îlots GTP
Représentations schématiques du mécanisme de sauvetage, extrait de (Aumeier *et al.*, 2016). Suite à un évènement de catastrophe, la dépolymérisation massive du microtubule pourrait être stoppée par la présence d'un îlot de tubuline-GTP (indiqué en rouge). La tubuline-GTP au sein de ce patch favoriserait par la suite la reprise de la polymérisation. Les îlot-GTP seraient donc impliqués dans la régulation des évènements de sauvetage.

3. Isoformes et modifications post-traductionnelles

Si l'instabilité dynamique est une propriété intrinsèque des microtubules, elle est également régulée par la variabilité des isoformes de l'hétérodimère de tubuline α-β, et par les différentes modifications post-traductionnelles (MPTs) s'opérant au niveau de la queue C-terminale de chaque monomère localisée en surface de la paroi. Cette combinaison d'isoformes de la tubuline et des MPTs constitue le code de la tubuline. Celui-ci est modulable au cours de la vie de l'organisme, de la cellule et spécifique d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaire à un autre (*The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, 2008). Pour un grand nombre d'organismes eucaryotes du règne animal et végétal, la tubuline α et la tubuline β sont encodées par différents gènes, ce qui donne lieu à une multitude d'isoformes qui varient selon le genre phylogénétique. Chez *Sus* (le porcin), on retrouve 4 isoformes de la tubuline α et 2 isoformes de la tubuline β alors que chez *Homo*, on retrouve 8 isoformes de la tubuline α et 8 isoformes de la tubuline β (*Chapter 6 by Luduena and Banerjee*, *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, 2008). De même, l'expression des différents

isoformes varie selon le tissu et le type cellulaire. (Leandro-García *et al.*, 2010) ont mené une étude mesurant l'expression des différents isoformes de la tubuline β dans différents tissus chez l'Homme. Ils montrent par exemple que le gène TUBB2A codant pour la tubuline βIIa et TUBB4 (la tubuline βIVa) sont exprimés abondamment au niveau du cerveau (soit 30% et 46% par rapport à l'expression des 8 autres isotypes de la tubuline β) et que dans un autre tissu, le tissu testiculaire, c'est le gène TUBB2C (tubuline βIVb), qui est le plus exprimé.

Exemple de l'influence de la nature de l'isoforme et la dynamique des MT

(Banerjee *et al.*, 1990) ont montré que la dynamique d'assemblage est impactée par la nature des isoformes de la tubuline β. En déplétant la tubuline β3 d'une solution de tubuline purifiée à partir de cerveaux bovins, les auteurs ont démontré ainsi que l'assemblage en MTs est augmenté. Cette même équipe a montré que les propriétés dynamiques d'une solution de tubuline sont dépendantes de l'isoforme ou du mélange d'isoformes utilisé. Les solutions constituées de tubulines αβ2 ou de αβ4 montrent ainsi une polymérisation plus efficace qu'une solution de tubulines αβ3 avec un phase de latence plus courte (nucléation plus efficace) et un plateau plus élevé (Lu and Luduena, 1994). En 2016, des expériences sur des tubulines recombinantes humaines ont confirmé ces précédentes observations. Les MTs assemblées à partir de tubulines recombinantes α1B-β2B sont plus stables et moins enclin à la dépolymérisation que les MTs assemblées à partir de tubulines recombinantes α1B-β3 (Pamula, Ti and Kapoor, 2016). D'une certaine manière, la présence de tubuline β3 rendrait ainsi les MTs plus dynamiques (Figure 12). En considérant que la tubuline β3 est fortement exprimée dans les neurones, ces observations suggèrent que les MTs des neurones pourraient être plus dynamiques que les MTs provenant d'autres types cellulaires.

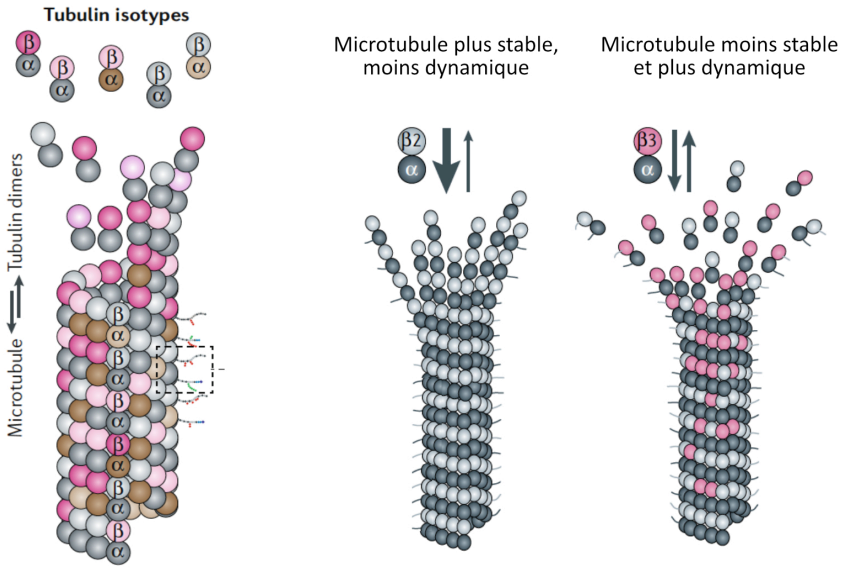


Figure 12. Code de la tubuline et dynamique du MT

Représentation schématique du code de la tubuline, extraite de (Janke and Magiera, 2020). Les isoformes de la tubulines peuvent impacter la dynamique des MTs. Les MTs composées de tubulines β3 sont plus dynamiques que les MTs composée de tubulines β2.

En plus de l'hétérogénéité des isoformes et leur expression différentielle selon le tissu ou le type cellulaire, les propriétés dynamiques de la tubuline peuvent être davantage régulées par des MPTs.

Exemple de l'impact de MPTs sur la dynamique d'assemblage-désassemblage des MT

Le nombre d'études décrivant l'impact direct des MPTs sur la dynamique d'assemblage-désassemblage du MT sont peu nombreuses. A titre d'exemple, Lieuvin et collaborateurs montrent que la phosphorylation sur la Ser172 de la tubuline β, médiée par la kinase CDK1 (cyclin-dependant kinase 1), empêche l'incorporation de la tubuline au sein des microtubules. Les tubulines β-Ser172 phosphorylées sont incapables de s'assembler, ce qui régulerait de manière négative la polymérisation des microtubules dans la cellule (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006). En parallèle, certaines MPTs sont indispensables au recrutement ou au non-recrutement de MAPs capables de réguler la dynamique des MTs comme la détyrosination qui réduit la liaison de la protéine CLIP170, connue pour stimuler l'assemblage de la tubuline (Peris *et al.*, 2009) ou la polyglutamination qui promeut le recrutement des protéines endommageantes, telle que la spastine, qui modifient la masse de MTs et la dynamique des MTs dans la cellule (Lacroix *et al.*, 2010).

B. Régulation extrinsèque : protéines régulatrices et agents chimiques.

In vivo, l'instabilité dynamique est finement régulée par des protéines associées aux microtubules (MAPs), et peut également être modulée par l'utilisation de diverses drogues pharmacologiques.

1. Les protéines associées aux MTs (MAPs)

Parmi les MAPs pouvant réguler l'instabilité dynamique des microtubules, il y a celles qui se fixent sur la paroi fermée et redressée afin de la stabiliser ou à l'inverse de la déstabiliser. Pour exemple, la protéine Tau et la protéine DCX (doublecortine) ont pour rôle de stabiliser la paroi du microtubule (Samsonov *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2017; Manka and Moores, 2018, 2019; Barbier *et al.*, 2019). L' hyperphosphorylation de la protéine Tau diminue son affinité pour les microtubules ce qui provoque la déstabilisation du réseau microtubulaire et favorise également l'agrégation des protéines Tau. Ces agrégats particuliers sont associés à de nombreuses maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer. A l'inverse, il existe des protéines, telles la katanine et la spastine capables de déstabiliser, de segmenter ou d'endommager la paroi (Figure 13 ; (Vemu *et al.*, 2018)).

Il existe également des MAPs pouvant réguler l'instabilité dynamique et qui s'associent préférentiellement aux extrémité « + » ou « - » des microtubules. Ces MAPs sont appelées TIPs pour « end tracking proteins ». Les TIPs regroupent plus de 20 familles de protéines très différentes qui se départagent en deux grandes catégories (Figure 13) : celles qui s'associent à l'extrémité « + », les + TIPs,

et celles qui s'associent à l'extrémité « - » , les – TIPs (Akhmanova and Steinmetz, 2008, 2019; Akhmanova and Hoogenraad, 2015). Les TIPs impactent plusieurs aspects de l'instabilité dynamique. Il existe des TIPs stabilisatrices comme le facteur d'assemblage du fuseau mitotique TPX2 (Zhang *et al.*, 2017) pour l'extrémité « + » et les CAMSAPs (calmodulin-regulated spectrin-associated proteins) pour l'extrémité « - ». A l'inverse, Il y a des TIPs dites déstabilisatrices comme MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) ou encore KIF18A et 13A (moteurs moléculaires de la famille des kinésines 8 et 13, respectivement) (Asenjo *et al.*, 2013; Benoit, Asenjo and Sosa, 2018). Il y a également des TIPs comme XMAP215 (microtubule associated protein from *Xenopus laevis* of 215 kDa) et les protéines EBs (End Binding proteins) qui vont réguler la dynamique globale de la fibre en permettant par exemple le renouvellement de la paroi ou encore la formation d'une paroi sans défauts, ce qui conduira à la formation d'un microtubule plus stable (Brouhard *et al.*, 2008; Al-Bassam and Chang, 2011; Nithianantham *et al.*, 2018).

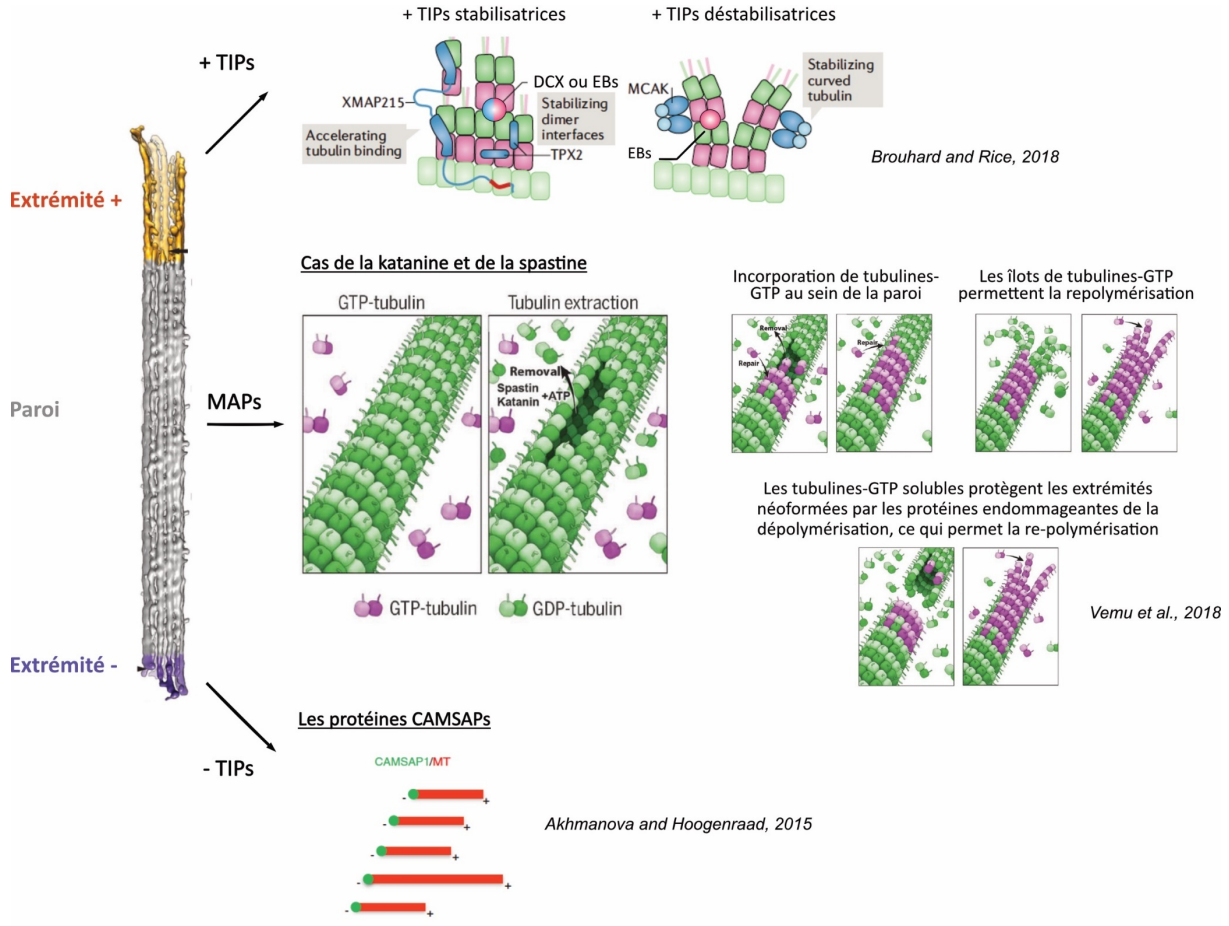


Figure 13. Impact des MAPs sur la dynamique des microtubule, adapté de **(Brouhard and Rice, 2018)**
Parmi les MAPs impactant la dynamique des MTs, on retrouve les TIPs, se liant préférentiellement aux extrémités et des protéines qui se fixent sur la paroi. Certains +TIPs stabilisent les MTs comme les protéines DCX, TPX2 ou EB1. D'autres, comme le moteur moléculaire MCAK, déstabilisent les MTs. Il existe également des protéines capables d'endommager la paroi comme la katanine et la spastine, ce qui permet l'incorporation de tubulines-GTP. L'incorporation de tubulines-GTP est suggéré comme étant un élément clé dans la régulation de l'instabilité dynamique en stoppant la dépolymérisation et favorisant le sauvetage (Vemu *et al.*, 2018). Il existe également des TIPs liant spécifiquement l'extrémité « - » des MTs telles que les protéines CAMSAPs.

Dans le domaine de l'étude de l'instabilité dynamique et des +TIPs, les protéines End-binding suscitent un grand intérêt. En effet, ces protéines, telle EB1, sont capables de reconnaitre spécifiquement l'extrémité « + » en croissance des microtubules et d'y recruter de nombreuses autres +TIPs et protéines. En microscopie à fluorescence, en présence d'EB marquée (ex, EB1-GFP), cela se traduit par la visualisation de comètes fluorescentes à l'extrémité « + » en croissance des MTs. Ces comètes disparaissent suite à un évènement de catastrophe et réapparaissent suite à un évènement de sauvetage (Figure 8, (Mimori-Kiyosue, Shiina and Tsukita, 2000; Stepanova *et al.*, 2003; Bieling *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2011)). La découverte de ces protéines capables de se lier, avec une forte affinité (Kd ~30 nM), avec l'extrémité « + » des MTs mais très faiblement à la paroi du MT (affinité dix fois plus faible, (Maurer *et al.*, 2011)) ou à l'hétérodimère de tubuline libre suggère la présence d'un état conformationnel particulier de la tubuline assemblée aux extrémités. Entre 2009 et 2012, plusieurs études *in vitro*, réalisées en présences d'analogues structuraux lentement hydrolysables du GTP et mimant l'état GTP ou GDP.P_i de la tubuline, ont révélé que la reconnaissance spécifique de l'extrémité « + » par les EBs était notamment liée à l'état nucléotidique de la tubuline assemblée (Zanic *et al.*, 2009; Maurer *et al.*, 2011, 2012). Pour exemple, Maurer et al, en 2011 ont montré que la protéine Mal3, homologue d'EB1 chez la levure (fission yeast) liait avec une forte affinité l'ensemble des MTs (paroi + extrémité) assemblés à partir de tubuline GTPγS (analogue du GTP). Cet analogue étant peu hydrolysable, il se retrouve présent au niveau de la paroi fermée et des extrémités, et dans ce cas Mal3 lie l'ensemble du MT. Des résultats similaires, avec une moindre affinité, ont été observés par cette même équipe pour des microtubules assemblés en présence de GDP-BeF_3^- qui permettrait de mimer de manière stable l'état GDP.P_i de la tubuline.

Les EBs, impliquées dans la régulation de la dynamique des MTs seraient donc capables de reconnaitre l'état GTP et GDP.P_i de la tubuline indépendamment de la conformation courbée ou redressée de celle-ci.

4. Agents chimiques impactant la dynamique du microtubule

Il existe de nombreux agents chimiques capables d'impacter la dynamique des microtubules en les stabilisant ou en les déstabilisant. Ces agents sont d'un grand intérêt dans le domaine médical. Leur action sur la dynamique des microtubules impacte le mécanisme de la division cellulaire et certaines de ces molécules sont de puissantes drogues anti-inflammatoire ou anticancéreuses. De plus, dans le domaine de la recherche fondamentale, ils sont un outil précieux. L'instabilité dynamique des microtubules rend très difficile l'étude structurale de la paroi et la recherche des partenaires d'interaction. L'utilisation d'agents notamment stabilisateurs permet l'accès à de nombreuses données qu'il aurait été impossible d'obtenir en leur absence.

Agents pharmacologiques

Parmi les agents pharmacologiques stabilisateurs, les taxanes, dérivés de l'If d'Europe, tels que le paclitaxel et le docetaxel, ont été découverts dans les année 60 et sont employés depuis plusieurs décennies comme agent chimiothérapeutique contre de nombreux cancers (Figure 14, revue dans (Jordan and Wilson, 2004)). Découverts plus récemment dans les années 2000, les pelorusides (Hood *et al.*, 2002), dérivés d'une éponge marine de Nouvelle Zélande sont, de par leur rôle stabilisateur, des candidats potentiels très sérieux au développement de nouvelles drogues chimiothérapeutiques. Il existe également des agents déstabilisateurs utilisés en pharmacologie pour leur action anti-inflammatoire (ex : colchicine utilisée contre la goutte), (Wallace, 1961; Weisenberg, Borisy and Taylor, 1968)) ou antitumorale (ex : la vinblastine et plus récemment, l'éribuline), (Hamel, 1992; Gigant *et al.*, 2005; Doodhi *et al.*, 2016)).

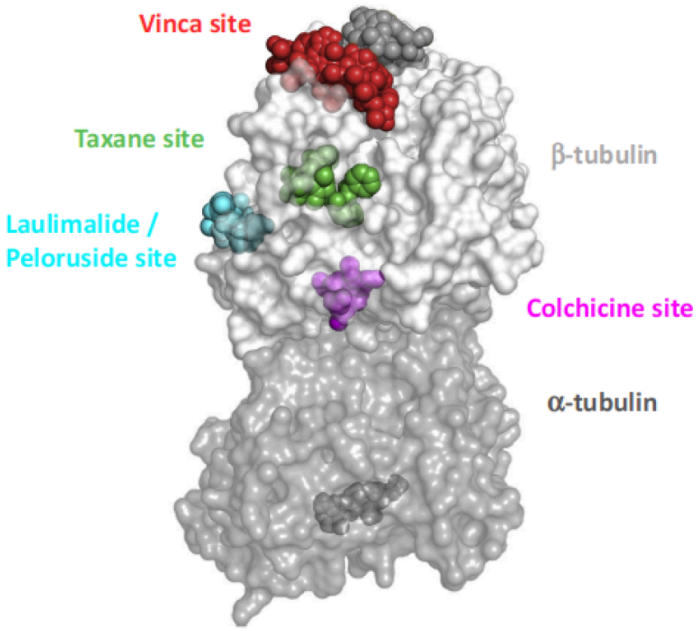


Figure 14. Agents pharmacologiques
Représentation de surface du dimère de tubuline αβ adaptée de (Steinmetz and Prota, 2018), mettant en évidence les sites de liaison de la Vinblastine (en rouge), des taxanes (en vert), du péloruside (en cyan) et de la colchicine (en fuchsia).

Analogues lentement hydrolysables du GTP

Les analogues du GTP, lentement ou non hydrolysables sont utilisés depuis de nombreuses années en recherche fondamentale afin de bloquer ou ralentir l'activité GTPasique du site échangeable E de la SU β de la tubuline et d'aider à la nucléation, l'élongation *in vitro* des microtubules et/ou limiter les évènements de catastrophe. Ces analogues sont également d'une aide précieuse afin d'étudier la structure à haute résolution de la tubuline assemblée au sein de la paroi des MTs (Hamel and Lin, 1984; Bigay *et al.*, 1987; Carlier *et al.*, 1989; Combeau and Carlier, 1989; Mandelkow, Mandelkow and Milligan, 1991; Hyman *et al.*, 1995; Mickey and Howard, 1995; Müller-Reichert *et al.*, 1998; Nogales and Wang, 2006a; Alushin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018) et d'étudier les modifications conformationnelles liées à l'état nucléotidique de la tubuline. Parmi ces analogues utilisés par de nombreux laboratoires, dont le nôtre, on trouve le GMPCPP et le GTPγS qui sont des analogues

lentement hydrolysables du GTP mimant un état proche de la tubuline GTP ou GDP.P_i (GTP hydrolysé mais P_i toujours présent avec le GDP au niveau du site actif). Il existe également des analogues du phosphate inorganique, tels que le fluorure de béryllium (BeF_3^-) ou le fluorure d'aluminium (AlF_x^-). Ces analogues se complexent de manière électrostatique à la molécule de GDP, formant ainsi des nucléotides fluorés (Bigay *et al.*, 1987) supposés mimer l'état GDP.P_i (Figure 15). L'utilisation de ces analogues permet de limiter la dynamique des MTs et l'obtention d'une paroi et des extrémités dans un seul état nucléotidique, un état s'apparentant plutôt à l'état GTP de la tubuline ou à un état transitoire GDP.P_i, et donc de réduire l'hétérogénéité conformationnelle due à l'état nucléotidique. L'utilisation de ces analogues ouvre donc la porte à une étude comparative des différentes parois mononucléotidiques afin d'extraire les caractéristiques structurales propre à chaque état nucléotidique étudié.

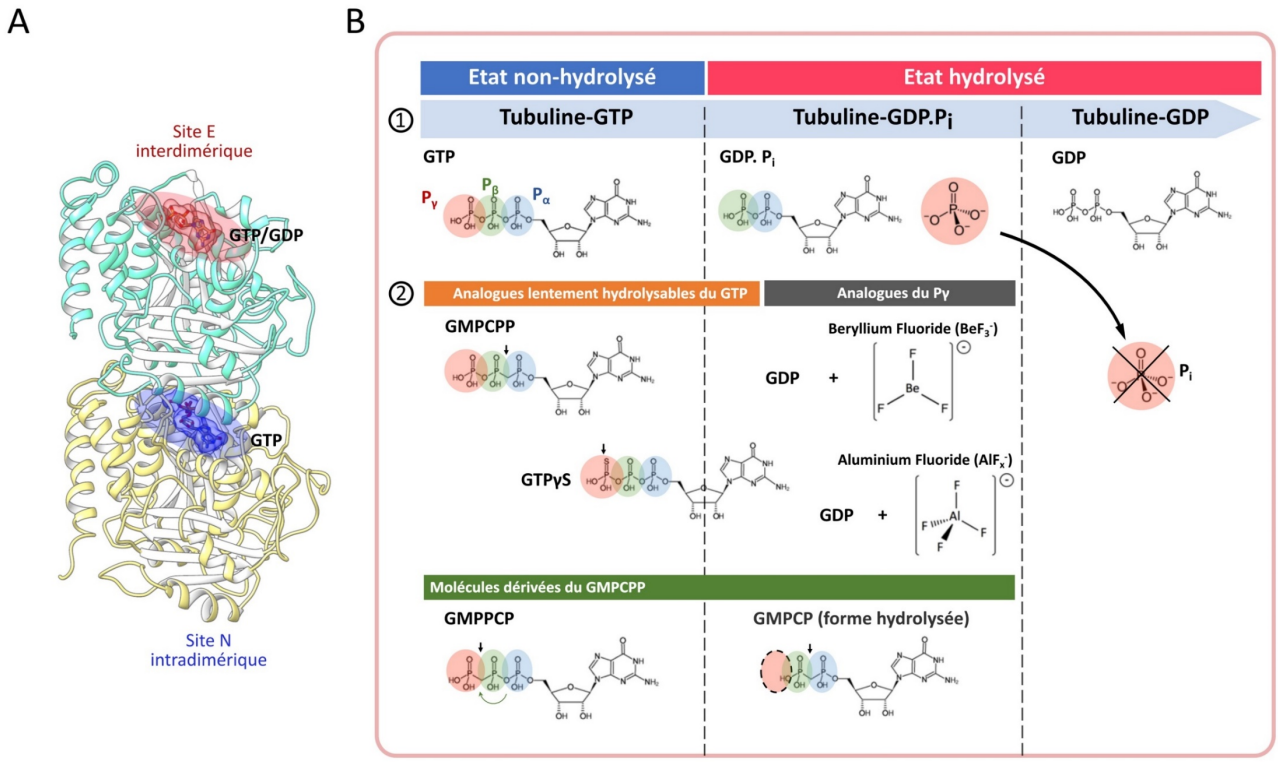


Figure 15. Analogues lentement hydrolysables du GTP

A. Structure de l'hétérodimère de tubuline obtenue par cristallographie électronique (PDB : 1TUB, Nogales and Downing, 1998). L'hétérodimère est orienté avec la tubuline β (en cyan) vers le haut et la tubuline α (en jaune) vers le bas. Le site E interdimérique de la tubuline β liant le GTP est indiqué en rouge et le site intradimérique N de la tubuline α est indiqué en bleu. **B.** Structure des analogues du GTP ou du P_i capables de se fixer au site E. On retrouve la structure des analogues lentement hydrolysables du GTP. C'est le cas du GMPCPP, dont l'oxygène entre le phosphate α (P_α) et phosphate β (P_β) a été substitué par un groupement méthylène (-CH_2-) et du GTPγS, dont un des oxygènes porté par le P_γ est remplacée par un sulfure. Ces modifications sont indiquées par des flèches. On retrouve les analogues du phosphate γ (Pγ) avec le BeF_3^- et l'AlF_x^-. Les analogues fluorés du P_i viennent se complexer au GDP du site E de la tubuline β pour former des nucléotides fluorés (GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-) mimant l'état GDP.P_i. Au cours de ma thèse, j'ai également utilisé des dérivés de l'analogue GMPCPP : le GMPCP (forme hydrolysée du GMPCPP) et le GMPPCP (groupement méthylène déplacé entre le P_β et le P_γ) pour mieux comprendre le mode d'action du GMPCPP.

IV. Comment l'état nucléotidique de la tubuline régule l'instabilité dynamique des MTs ?

Nous avons pu voir que le mécanisme d'assemblage des microtubules repose sur la constitution de noyaux critiques, étape limitante permise par l'état GTP de la tubuline, suivi d'une phase d'élongation maintenue par la présence d'une coiffe GTP stabilisatrice. La perte de cette coiffe GTP serait l'évènement clé déclencheur d'une catastrophe. Quelles sont les particularités structurales de la tubuline GTP au sein de cette coiffe qui confère son rôle stabilisateur ? Quels sont les changement structuraux et conformationnels qui s'opèrent lors de l'hydrolyse du GTP ? Il est nécessaire de répondre à ces questions afin de comprendre les mécanismes moléculaires à la base de l'instabilité dynamique des microtubules. Les études adressant ces différentes questions se sont multipliées ces dernières années mais la tâche s'avère difficile. La coiffe GTP est une région hétérogène et très dynamique. Une approche structurale à haute résolution sans artifice est actuellement inconcevable. Dans ce contexte, la découverte des EBs capables de reconnaître spécifiquement l'extrémité « + », et plus particulièrement de discriminer différents états nucléotidiques de la tubuline a été une révolution (Maurer *et al.*, 2012). En cela, elles constituent des marqueurs idéaux de la coiffe GTP et sont un outil précieux pour la compréhension du lien entre la ou les structure(s) générale(s) de la coiffe avec l'état nucléotidique correspondant et l'influence de ces structures sur la dynamique des MTs.

Structure générale de la coiffe GTP : En combinant l'utilisation de la protéine EB1 marquée avec des nanoparticules d'or à une étude par cryo-tomographie électronique, l'équipe de Denis Chrétien a montré en 2016, avant mon arrivée en thèse, que la région du MT reconnue par EB1 s'étend de l'extrémité « + » constituée de feuillets courbes à la région de la paroi refermée et redressée proche de cette extrémité en croissance. Les résultats de cette étude suggèrent ainsi que la région de la coiffe GTP s'étend sur plusieurs centaines de nm et inclue une partie de la paroi fermée et redressée du MT. Ces résultats sont également cohérents avec l'existence d'un état de transition GDP.P_i significatif (Hamel and Lin, 1984; Maurer *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). L'étude confirme le modèle des extrémités en croissance sous forme de feuillets courbes, qui se redressent lorsque le nombre de PFs en contact latéral est suffisant, soit entre 5 à 7 PFs. Ce modèle précédemment proposé par (Chrétien, Fuller and Karsenti, 1995) a été récemment conforté par (Atherton *et al.*, 2018). Cependant, la mise en évidence d'extrémités en croissance formées de protofilaments unitaires courbes et évasés (Richard McIntosh *et al.*, 2018) remet en discussion le modèle des feuillets. Ces résultats contradictoires pourraient tout simplement être le reflet de la grande hétérogénéité et dynamicité de cette structure. Cela reste à être confirmé.

*Conformation de la tubuline selon son état nucléotidique : Avant mon arrivée en thèse, plusieurs études structurales avaient déjà été menées sur les parois de MTs formés en présence d'analogues lentement hydrolysable du GTP, notamment le GMPCPP et le GTPγS (Hyman *et al.*, 1995; Müller-Reichert *et al.*, 1998;

Rice, Montabana and Agard, 2008; Maurer *et al.*, 2012; Yajima *et al.*, 2012; Alushin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). Des différences structurales ont ainsi pu être observées entre l'hétéromère de tubuline lié à des analogues non hydrolysable du GTP (GMPCPP ou GTPγS) et celui lié au GDP. Une première étude réalisée en 1995 par Hyman et collaborateurs a ainsi montré une augmentation de 3 Å de la longueur longitudinale de l'hétérodimère de tubuline liée au GMPCPP comparé à l'hétérodimère lié au GDP. Cette allongement en présence de GMPCPP a été confirmé ultérieurement par des expériences de cryo-microscopie électronique (Alushin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). Les résultats montrent ainsi une augmentation de la distance entre monomères d'environ 2 Å en présence de GMPCPP (42,4 Å dans les parois-GMPCPP *vs* 40,3 Å dans les parois-GDP), alors que celle-ci reste inchangée entre une paroi-GTPγS et une paroi-GDP (40,4 Å vs 40,3 Å, respectivement) (figure 16A). Les études de (Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018) décrivent un changement conformationnel additionnel. Les auteurs montrent ainsi une modification de l'angle de vrillage des protofilaments par rapport à l'axe des microtubules à 13 protofilaments pour les parois-GMPCPP et -GTPγS par rapport aux parois-GDP. En effet, les protofilaments sont vrillés de + 0,2°, de + 0,08° et de – 0,12° par rapport à l'axe du microtubule, au sein des parois GMPCPP, GDP et GTPγS, respectivement (Figure 16A). Ces résultats ont conduit à proposer un modèle, dit de « compaction-rotation », établissant le lien entre l'état nucléotidique de la tubuline et sa conformation et expliquant en partie le mécanisme d'hydrolyse du GTP. Pour ce modèle, la conformation de la tubuline étendue et vrillée observée en présence de GMPCPP constituerait la conformation *bona fide* de la tubuline-GTP caractéristique de la coiffe GTP. L'hydrolyse conduirait dans un premier temps à une compaction de la tubuline qui serait responsable de la fragilisation des contacts latéraux. La conformation compactée et vrillée retrouvée en présence de GTPγS suggère la présence d'un état hydrolysé transitionnel qui correspondrait à l'état GDP-P_i de la tubuline. Le relargage du P_i permettrait alors dans un second temps une rotation intradimérique afin de rétablir le vrillage nul des protofilaments retrouvé dans la paroi GDP (Figure 16B).

Cependant, le modèle de la compaction-rotation repose fondamentalement sur l'assomption que la présence du GMPCPP mime parfaitement l'état GTP de la tubuline et le GTPγS celui de la tubuline GDP.P_i. Or, des différences ont été observées entre la tubuline GTP et la tubuline GMPCPP. Par exemple, la tubuline-GMPCPP promeut bien plus efficacement la nucléation spontanée (fort pouvoir nucléateur) que la tubuline GTP. Dans les mêmes conditions d'assemblage, la tubuline GMPCPP montre 2 fois voire plus de polymérisation qu'en présence de tubuline-GTP (Sandoval *et al.*, 1977; Hyman *et al.*, 1992). De plus, alors qu'il est admis que les EBs reconnaissent l'état GTP de la tubuline et probablement l'état GDP.P_i, les EBs ont une faible affinité pour les parois formées à partir de GMPCPP (Maurer *et al.*, 2011). La correspondance entre la tubuline-GMPCPP et tubuline-GTP ne semble donc pas parfaite. De nombreuses zones d'ombre subsistent donc quant à la conformation de la tubuline adopté au sein de la

coiffe GTP stabilisatrice et aux modifications subies lors de l'hydrolyse du GTP à la base de l'instabilité dynamique des microtubules.

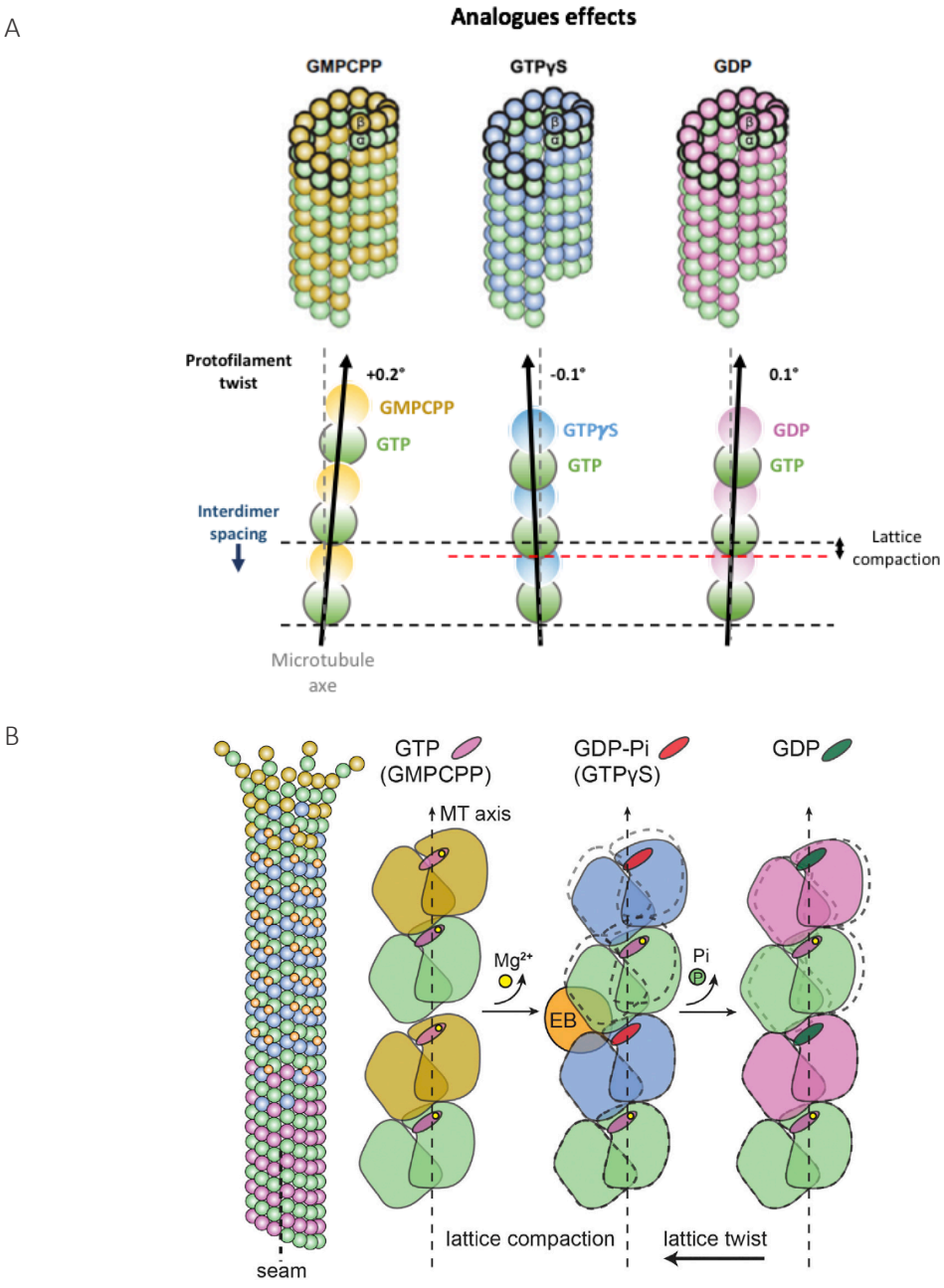


Figure 16. Conformation de la tubuline selon son état nucléotidique et modèle de compaction-rotation (Zhang et al., 2015)

A. Représentation schématique adaptée de (Zhang, LaFrance and Nogales, 2018) illustrant les effets des analogues non-hydrolysables du GTP (GMPCPP et GTPγS) sur la paroi du microtubule (sur la distance entre les hétérodimères de tubuline et sur l'angle de vrillage des protofilaments). La ligne noire discontinue modélise la distance longitudinale interdimérique observée en présence de GMPCPP (distance de 42,4 Å) et la ligne rouge montre la distance longitudinale interdimérique retrouvée en présence de GTPγS et GDP (distance d'environ 40,4 Å). B. Modèle de l'hydrolyse du GTP suivant une compaction-rotation de la tubuline au sein de la paroi du microtubule extraite de (Zhang *et al.*, 2015). Le modèle se déroule en deux principales étapes : la compaction de la tubuline au sein de la paroi au cours de la l'hydrolyse du GTP puis la rotation de la sous-unité α au sein de l'hétérodimère qui permet de rétablir le vrillage des protofilaments induit par l'état GTP et GDP.P_i. Cette dernière rotation serait permise par le relargage du phosphate inorganique P_i

V. Objectifs et stratégies

Dans ce contexte, mon objectif de thèse a été d'aider à la compréhension des mécanismes moléculaires à la base de l'instabilité dynamique des microtubules en me focalisant plus particulièrement sur le rôle du GTP et de son hydrolyse sur l'organisation et la conformation de la tubuline au sein de la paroi. Nous avons notamment voulu tester le modèle de compaction-rotation de la paroi, proposé par (Zhang *et al.*, 2015).

Pour cela, nous avons entrepris une étude structurale par cryo-ME sur les parois assemblées en présence d'une gamme élargie d'analogues stables du GTP. Nous avons ainsi utilisé le GMPCPP et GTPγS ainsi que des dérivés du GMPCPP (GMPCP et GMPPCP) afin de de vérifier si la conformation étendue de la tubuline précédemment observée en présence de GMPCPP était bien une conséquence directe de l'état « GTP-like » et non un biais causé par le GMPCPP en lui-même. Selon le modèle de compaction-rotation de (Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018), le GTPγS permettrait de mimer parfaitement l'état GDP.P_i de la tubuline. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons également réalisé notre étude structurale en présence de BeF_3^- et AlF_x^-, deux analogues du P_i supposés mimer un état stable GDP.P_i. Ces deux analogues, bien caractérisés d'un point de vue biochimique (Bigay *et al.*, 1987; Carlier *et al.*, 1989) sont rarement utilisés jusque-là dans le cadre de l'étude de la dynamique des microtubules et l'étude structurale des parois de MT. Dans le cadre de cette étude, nous avons pu collaborer avec les équipes de Fernando Diaz et de Michel Steinmetz et corréler leurs données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X et diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) avec les nôtres. Nos résultats ont fait l'objet d'une publication (Estévez-Gallego, Josa-Prado, Ku *et al*., 2020, elife) présentée dans la partie résultats.

L'étude sur les parois assemblées en présence d'analogues a nécessité également un certain nombre de mises au point, ce qui a conduit au développement de deux protocoles qui ont fait chacun l'objet d'une publication. Le premier développement (Ku, Heichette, *et al.*, 2020) concerne la conception d'amorces personnalisées permettant l'obtention de parois mono-nucléotidiques pour les analyses en cryo-ME. Le second développement (Ku, Messaoudi, *et al.*, 2020) concerne l'amélioration de l'interface graphique du logiciel d'analyse TubuleJ, développé précédemment dans l'équipe (Blestel, Kervrann and Chrétien, 2009a). Ces mises à jour du logiciel TubuleJ permettent une analyse moins chronophage des images de MTs obtenues par cryo-ME.

Résultats

I. Développements méthodologiques liés à l'étude 2D de l'organisation de la paroi

L'analyse structurale en 2D par cryo-ME des parois auto-assemblées en présence de nombreux analogues réalisée au cours de ma thèse a nécessité de nombreuses mises au points techniques : il nous a fallu optimiser les conditions d'auto-assemblage de la tubuline en présence des différents analogues afin d'obtenir des microtubules uniquement constitués d'un seul analogue et nous avons également implémenté le logiciel TubuleJ développé par l'équipe de D. Chrétien et C. Kervrann (Blestel, Kervrann and Chrétien, 2009b) afin de semi-automatiser certaines procédures et de réduire le temps de chaque analyse. Ces développement méthodologiques feront l'objet de la première partie de mes résultats.

1. Optimisation des conditions d'auto-assemblage des parois analogues nécessaire à l'approche par cryo-EM

La turbidité du milieu est directement liée à la formation de polymères dans la solution d'assemblage. Ainsi, l'activité d'assemblage de la tubuline peut-être suivi par turbidimétrie à 350 nm (Straube, 2011), ce qui permet l'obtention des cinétiques d'assemblage et de désassemblage de la tubuline.

Lors d'expériences *in vitro* en présence de tubuline purifiée, les analogues non-hydrolysables tels que le GMPCPP, GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- confèrent à la tubuline un pouvoir nucléateur différent. Autrement dit, la phase de nucléation de la tubuline est impactée par l'utilisation de ces différents nucléotides (Figure 17).

En présence de GTP ou de GMPCPP et de tubuline purifiée, les microtubules s'auto-assemblent sans ajout de centres nucléateurs ou d'amorces de microtubules. Pour exemple, en présence de GTP et à une concentration finale à 40 µM de tubuline, la variation de la densité optique (ΔDO) est évaluée en moyenne à 0,45 au plateau de polymérisation en turbidimétrie. Dans ces conditions expérimentales, lorsque 4 µL de ce mélange est utilisé pour la réalisation d'une grille pour une étude en cryo-EM, la densité de microtubules varie de trois à une dizaine de microtubules par champs d'acquisitions de 905.23 nm^2. Cette densité de microtubule est optimale et constitue ainsi la densité à atteindre pour chacune de nos conditions. Dans les mêmes conditions, en présence de GMPCPP, la ΔDO est mesurée en moyenne à 1.2 (non-montré), ce qui est trop élevé, mais en diminuant la concentration de tubuline à 10 µM nous pouvons obtenir une densité de microtubules comparable à la densité optimale. Cependant, à une concentration finale de 40 µM de tubuline et même en la doublant à 80 µM aucune polymérisation n'a pu être observée en présence de GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- (données non-montrées). Il nous a donc

fallu développer une stratégie afin de permettre la nucléation et l'élongation en présence de ces analogues.

Nous avons alors testé l'auto assemblage de la tubuline en présence de ces différents analogues et de plusieurs concentrations de glycérol (de 5% à 25%), le glycérol étant connu pour aider la polymérisation *in vitro* des microtubules. En présence de 25 % de glycérol (soit une solution à 3,4 M de glycérol) et de 40 µM de tubuline-GMPCP, -GMPPCP,- GTPγS, -GDP-BeF_3^- ou -GDP-AlF_x^- nous avons ainsi réussi à obtenir un auto assemblage avec une variation de DO d'environ 0,45 au plateau de polymérisation (données non-montrées). Cependant, la concentration de 25% en glycérol est incompatible avec les acquisitions en cryo-ME, du fait d'une détérioration observée du rapport signal sur bruit proportionnelle à la concentration de glycérol. Des analyses non-publiées par D. Chrétien recommande une concentration maximale en glycérol d'environ 5% pour minimiser cette détérioration.

Il nous fallait donc minimiser le pourcentage de glycérol dans la solution de polymérisation finale.

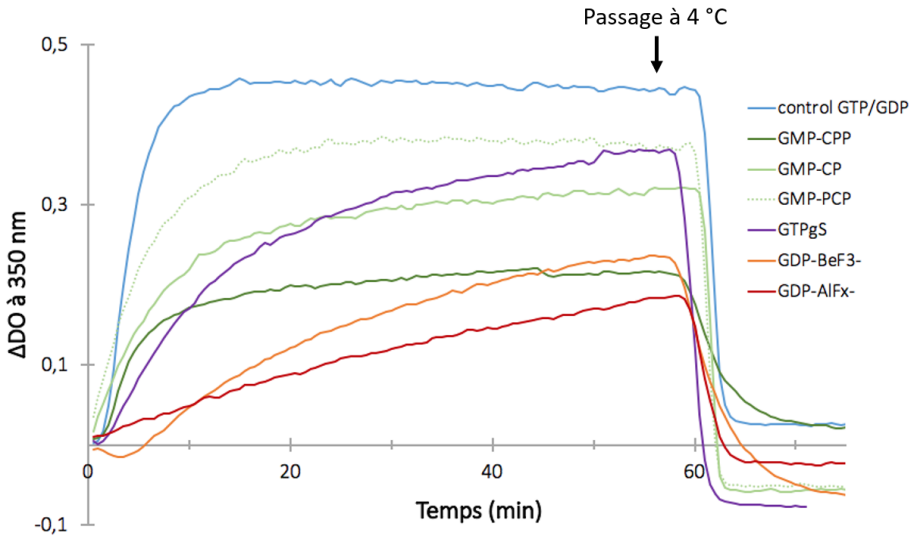


Figure 17. Suivi de la cinétique d'assemblage et de désassemblage par turbidimétrie selon les différents états nucléotidiques de la tubuline
L'assemblage de la tubuline est induit à 35 °C et le désassemblage par un passage rapide à 4°C dans une cuvette thermostatée. La concentration de tubuline utilisée est de 40 µM finale pour chacune des conditions, excepté en présence de GMPCPP, où la concentration en tubuline est de 10 µM.

Une alternative au glycérol régulièrement utilisé en laboratoire pour favoriser l'auto assemblage de la tubuline *in vitro* est l'utilisation de centres nucléateurs (centrosomes purifiés) ou d'amorces (petits fragments de microtubules pré-existants) qui favorisent l'étape limitante de nucléation. En routine, les amorces utilisées sont fréquemment des microtubules-GMPCPP fragmentés, du fait de leur stabilité. Nous nous sommes alors inspirés de cette stratégie afin de permettre l'auto-assemblage des tubulines-GTPγS,

-GDP-BeF_3^-et -GDP-AlF_x^- en présence de 40 µM de tubuline tout en réduisant la concentration de glycérol nécessaire dans la solution finale de polymérisation.

Notre objectif consiste à étudier l'organisation de la paroi propre à un unique état nucléotidique. Notre analyse nécessite donc, *in fine,* l'obtention de parois mono-nucléotidiques. Nous ne pouvions par conséquent pas utiliser des amorces hétérologues (ex : amorce tubuline-GMPCPP pour obtenir des microtubules-GTPγS) mais peut-être pouvions nous créer nos propres amorces avec nos nucléotides d'intérêt en présence de 25% de glycérol et utiliser ensuite ces amorces pour aider à l'auto-assemblage en présence d'une concentration réduite en glycérol. En effet, pourquoi ne pas utiliser ces lots de microtubules-GMPCP, -GMPPCP, -GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-, auto-assemblés dans un milieu à forte concentration de glycérol (25%) comme amorces ?

Nous avons ainsi réalisé *in vitro* une préparation de microtubules à partir de tubuline purifiée en présence de GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- ou GDP-AlF_x^- et de 25 % de glycérol afin de surpasser l'étape limitante de nucléation. Ces analogues étant lentement hydrolysables, les microtubules obtenus sont stables. Ces microtubules sont alors fragmentés par sonication, ce qui permet d'obtenir de petits fragments de microtubules -GMPCP, -GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-. Ces fragments sont par la suite utilisés, dilués au dixième, comme amorces dans une solution d'assemblage dépourvue de glycérol afin d'obtenir des microtubules avec une paroi propre à un unique état nucléotidique. Cette stratégie des amorces personnalisées a ainsi permis de restaurer la capacité de polymérisation de la tubuline (à 40 µM) en présence de GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- ou GDP-AlF_x^-, avec une variation de DO mesurée entre 0,2 et 0,4 ΔOD (Figure 17), et ainsi de réduire la concentration de glycérol à 2,5 % dans la solution finale d'assemblage. Lors de la mise au point de cette approche, un passage à 4 °C a été régulièrement effectué au bout d'1 à 2 heures de polymérisation afin d'induire la dépolymérisation des microtubules, et ainsi de vérifier si l'augmentation de turbidité est bien due à une polymérisation et non à une formation d'agrégats de tubuline (qui ne sont pas capable de dépolymériser). En présence de GMPCPP et de GTP, une grande partie de la tubuline assemblée dépolymérise. Le retour à la turbidité initiale n'est pas complet dû à une petite proportion d'agrégats de tubuline qui se forment automatiquement lors d'un assemblage effectué sur une longue durée à 35 °C. En présence de GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, une dépolymérisation en-deçà de la valeur basale initiale est observée. Cette dépolymérisation additionnelle s'explique par la dépolymérisation supplémentaire des amorces utilisées. Dans ces cas, la proportion d'agrégats formés ne peut être évaluée. Le protocole détaillé de la stratégie de nucléation par des amorces personnalisées est reporté dans l'article méthodologique présenté ci-dessous.

L’obtention de ces parois mono-nucléotidiques en présence d’analogues non-hydrolysables du GTP nous a donc permis de poursuivre notre étude visant à caractériser les particularités structurales des différentes parois analogues (GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-) par cryo-ME.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e3714 Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

Microtubule Seeded-assembly in the Presence of Poorly Nucleating Nucleotide Analogues

Siou Ku, Claire Heichette, Laurence Duchesne and Denis Chrétien*

Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes) - UMR 6290, F-35000 Rennes, France
*For correspondence: denis.chretien@univ-rennes1.fr

[Abstract] Microtubule dynamic instability is driven by the hydrolysis of the GTP bound to the β-subunit of the α-β tubulin heterodimer. Nucleotide analogues are commonly used to mimic the different steps of the tubulin GTPase cycle, but most of them are poor microtubule nucleators. Usually, microtubule assembly is seeded by guanylyl-(α, β)-methylene-diphosphonate (GMPCPP) or glycerol that can be limiting factors in monitoring the effect of other nucleotide analogs on their polymerization. Here, we describe a protocol that allows the assembly of microtubules in the presence of nucleotide analogues without the need of heterogeneous seeds and at a low final glycerol concentration. Microtubules are first assembled in the presence of the analogue of interest and glycerol to promote assembly. These microtubules are then sonicated to produce seeds that will be used to assemble microtubules in the absence of glycerol. This strategy produces homogeneous nucleotide-bound microtubules that can be further analyzed by biochemical or structural methods such as cryo-electron microscopy.
Keywords: Tubulin, Microtubules, GTP analogues, Microtubule nucleation, Seeded microtubule assembly, Spectrophotometry, Cryo-electron microscopy

[Background] Nucleotide analogues are commonly used to investigate the conformational changes that the α-β tubulin heterodimer undergoes during microtubule assembly and hydrolysis of the GTP bound to its exchangeable (E) site. However, apart from GMPCPP, most analogues are poor microtubule nucleators. To overcome this difficulty, GMPCPP-stabilized seeds are classically used to elongate microtubules in the presence of other analogues (Maurer *et al.*, 2011 and 2014; Zhang *et al.*, 2015), resulting in the assembly of mixed nucleotide-bound lattices. Alternatively, glycerol at relatively high concentration (*e.g.*, 25%) can be added to the reaction mix to stimulate tubulin self-assembly. However, high glycerol concentrations might not be desirable, for instance to analyze microtubule structure by cryo-electron microscopy, since this compound matches the protein density and reduces the image contrast.

To avoid the use of GMPCPP-seeds or high glycerol concentrations in the final reaction mix, we have developed a protocol that uses seeds assembled in the presence of the same nucleotides that will be used to assemble the microtubules. As a first step, glycerol is used to polymerize microtubules in the presence of the nucleotide analogue. These microtubules are then fragmented by sonication to produce seeds, which are further diluted in the tubulin mix in the absence of glycerol. Microtubules elongated onto these seeds can be analyzed by cryo-electron microscopy without the risk to mistake microtubules assembled in the presence of GMPCPP with those assembled in the presence of the nucleotide

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

analogue of interest.

Our protocol describes the step-by-step preparation of the seeds and the assembly of microtubules, which is monitored by turbidimetry at 350 nm. It includes a cooling step at the end of the assembly process to assess the presence of depolymerizing microtubules. These conditions were used to assemble GDP-BeF_3^--microtubules, whose lattices were further characterized by cryo-electron microscopy (Estévez-Gallego *et al*., 2020). We have successfully applied this protocol to microtubules assembled in the presence of other analogues such as GTPγS, GDP-AlF_3, GMPPCP and GMPCP, all of them being poor microtubule nucleators.

Materials and Reagents

1. Pipette tips
2. Open-top thinwall polypropylene centrifuge tubes, 175 µl, 5 x 20 mm (Beckman Coulter, catalog number: 342630)
3. Beryllium sulfate ($BeSO_4 \cdot 4H_2O$) (Sigma-Aldrich, catalog number: 14270)
4. Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma-Aldrich, catalog number: E3889)
5. Glycerol (Sigma-Aldrich, catalog number: G5516)
6. Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (GTP) (Sigma-Aldrich, catalog number: G8877)
7. Magnesium chloride solution ($MgCl_2$) (Sigma-Aldrich, catalog number: 63069)
8. Piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) (Sigma-Aldrich, catalog number: P6757)
9. Potassium hydroxide (KOH) (Sigma-Aldrich, catalog number: 30603)
10. Sodium Fluoride (NaF) (Sigma-Aldrich, catalog number: S7920)
11. BRB80 buffer solution 5x (see Recipes)
12. GDP solution (see Recipes)
13. Tubulin stocks (see Recipes)
14. NaF solution (see Recipes)
15. $BeSO_4$ solution (see Recipes)
16. G-BRB80-BeF_3^- (see Recipes)
17. BRB80-BeF_3^- solution (see Recipes)

Equipment

1. Pipetman Classic P100, P20, P10 (Gilson, catalog numbers: F123615, F123600, F144802)
2. Airfuge Air-Driven (Beckmann Coulter, catalog number: 340401)
3. Fixed-angle rotor A-110 (Beckman Coulter, catalog number: 347596)
4. Refrigerator MEDIKA 100 ECT-F (fiocchetti)
5. Compressed air cooler BEKOBLITZZ LC12 (Beko Technologies, catalog number: 4020103)
6. Compressed air filter Clearpoint, 1 µm (Beko Technologies, catalog number: S040SWT)

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

7. Membrane dryer Drypoint M plus (Beko Technologies, catalog number: 4007626)
8. Condensate drain ECD model ED12
9. B2000 Ultrasonic Cleaner (Branson)
10. Dri-Block heater DB-2D (Techne)
11. Spectrophotometer Uvikon XS (Secomam, Bio-Tek Instruments)
12. Quartz cuvette Ultra-Micro cells (Hellma, catalog number: 105-201-15-40)
13. Julabo F30-C (Julabo) with Thermal HY fluid, -60 °C to +65 °C, (Julabo, catalog number: 8940104)
14. Julabo MP-5 (Julabo) with Thermal HY fluid, -60 °C to +65 °C, (Julabo, catalog number: 8940104)
15. Three-way valves, PFTE (Bürkle, catalog number: 8610-0006)

Software

1. LabPower v3.50 (Secomam, Bio-Tek Instruments)
2. Excel (Microsoft)
3. Affinity Designer (Serif Ltd)

Procedure

A. Spectrophotomer preparation

1. Switch on the spectrophotometer and make sure that it uses the UV lamp at 350 nm.
   Note: The default value to switch from the UV (D2) to the halogen lamp is 340 nm on the Uvikon XS. This value must be changed to, e.g., 360 nm, since the UV lamp must be used with the Ultra-Micro-cell quartz cuvettes at 350 nm.
2. Select the autorate mode at 350 nm.
3. Switch on the warm water bath, set the temperature to 35 °C and let equilibrate for 15 min.
   Note: The temperatures of the warm and cold circulating baths must be adjusted using a small thermocouple inside the quartz cuvette filled with water. The goal is to reach 35 °C and 4 °C for polymerization and depolymerization conditions, respectively. Variations in ambient temperature (e.g., between summer and winter) may require periodic control and adjustment of these settings. Do not exceed 35 °C during polymerization, since tubulin denaturates easily above this temperature (Weis et al., 2010).
4. Switch on the cold water bath, set the temperature to 2 °C and let equilibrate for 30 min.
5. Circulate the 35 °C fluid inside the spectrophotometer thermostated cell holder (Figure 1).

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

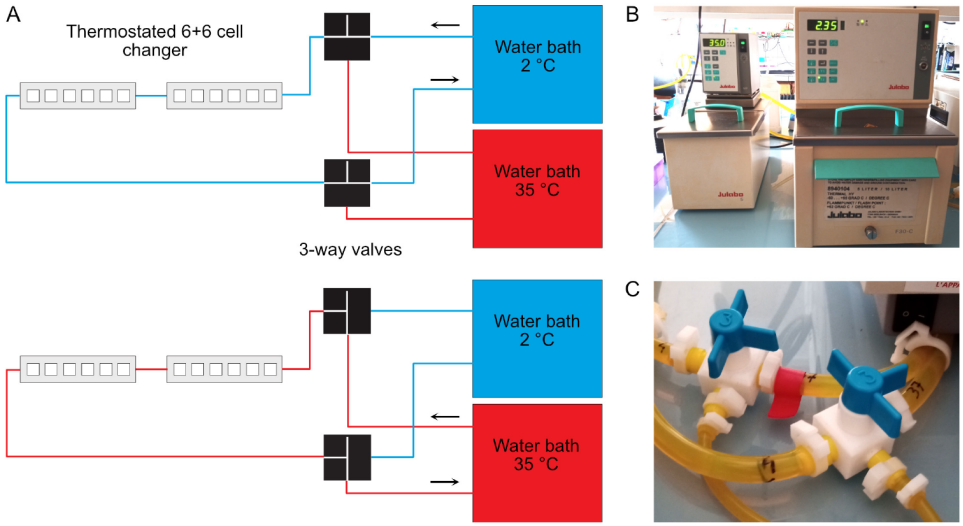


Figure 1. Temperature control of the spectrophotometer. A. Two water baths regulated at 35 °C and 2 °C are connected to the thermostated 6+6 cell changer of the spectrophotometer. Three-ways valves allow rapid switch of the temperature from 35 °C (bottom) to 4 °C (top). The temperature of the cold water bath must be set below 4 °C due to warming up of the fluid in the tubing system. The actual warm and cold temperatures must be checked regularly inside the cell holder using a small thermocouple. B. Warm (left) and cold (right) bather baths. C. Three-way valves. These must be switched simultaneously.

B. Microtubule seeds preparation (for 30 µl)

1. Thaw rapidly between fingers a 10 µl aliquot of tubulin (initial concentration 22 mg/ml) and keep at 4 °C until use.

   Note: Tubulin was purified from porcine brains by two cycles of assembly in a high-molarity buffer (Castoldi and Popov, 2003), followed by a cycling step to obtain tubulin liganded with GDP at the E-site (Ashford et al., 1998). Cycled tubulin is commercially available, e.g., from PurSolution (https://puresoluble.com/cycled-tubulin/).Tubulin at a final concentration of 22 mg/ml was aliquoted in 100 µl and 10 µl aliquots, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. Once tubulin has been defrost, try to minimize all steps until polymerization since it will rapidly denaturates if kept in its unassembled form, even at 4 °C.
2. Add 5.5 µl of the tubulin solution to 24.5 µl of G-BRB80-BeF_3^- in a polypropylene centrifuge tube.
3. Centrifuge the tube in the Airfuge at 141,000 *x g* (A-110 rotor, 22 psig), 5 min, 4 °C (Figure 2).

   Note: The airfuge is not regulated in temperature. It must be placed in a cold room, or alternatively in a freezer such as in Figure 2. In both cases, the incoming air flow must also be cooled, otherwise the rotor will warm up (see manufacturer's instructions if installed in a cold room).
4. Incubate the supernatant in the dry block heater, 1 h, 35 °C.
5. Sonicate the microtubules in the ultrasonic cleaner, 1 min.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

6. Keep microtubule seeds at 35 °C until use in the following step.

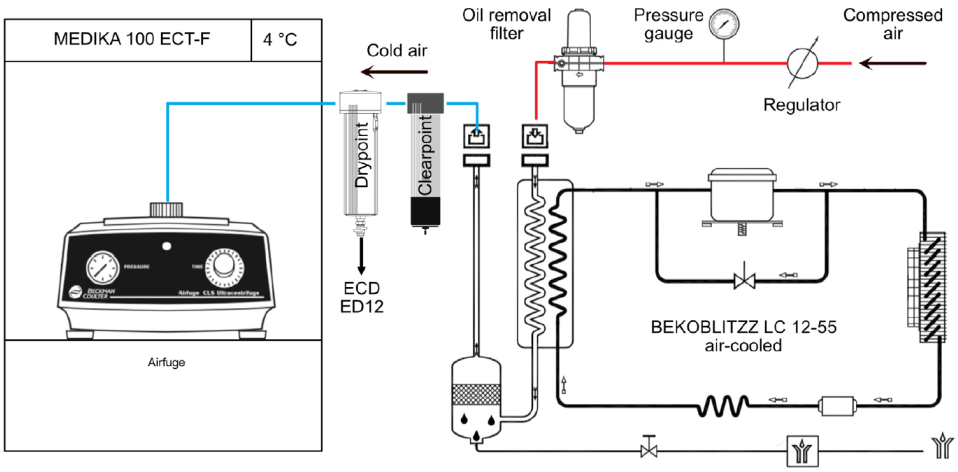


Figure 2. Temperature control of the Airfuge. The Airfuge is maintained at 4 °C inside a refrigerator. The incoming compressed air must also be cooled before reaching the centrifuge to avoid warming-up of the rotor during centrifugation.

C. Microtubule seeded assembly followed by spectrophotometry at 350 nm (for 100 µl)
1. Thaw rapidly a 20 µl aliquot of tubulin (initial concentration 22 mg/ml).
2. Add 18 µl of this tubulin solution to 82 µl of BRB80-BeF_3^- in a polypropylene centrifuge tube.
3. Centrifuge the tube in the Airfuge at 141,000 *x g* (A-110 rotor, 22 psig), 5 min, 4 °C.
4. Incubate the supernatant in the dry block heater, 5 min, 35 °C.
5. Pipet 90 µl of the pre-warmed tubulin solution and add 10 µl of pre-warmed seeds.
6. Transfer the mix to the quartz cuvette and place it inside the spectrophotometer.
7. Press autozero and start recording at 2 points/min.
8. After about 1 h of polymerization, switch the fluid to the 2 °C thermostated bath to induce microtubule depolymerization (Figure 1).
9. Stop recording when the OD baseline trace remains stable.
10. Save data in Excel format (.xls) and plot the variation in optical density at 350 nm (ΔOD 350 nm, a.u.) *versus* time (min) in Excel (Figure 3).

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(16): e3714.
DOI:10.21769/BioProtoc.3714

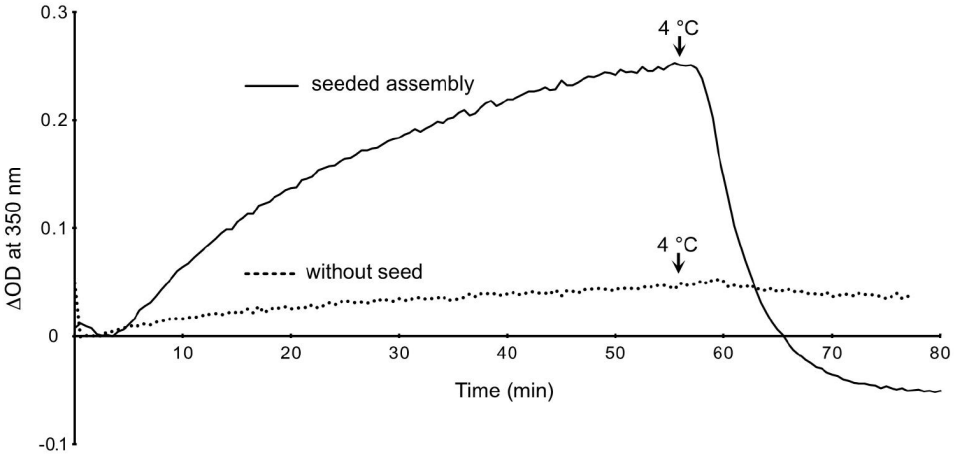


Figure 3. Assembly of GDP-BeF_3^--microtubules in the presence and absence of seeds. The OD decreases below zero after cold depolymerization of the microtubules assembled in the presence of seeds (plain line), since these latter contributed to the initial turbidity of the specimen. In the absence of seeds (dotted line), the OD remains almost stable after switching to 4 °C. This indicates that the small increase in OD was essentially due to the formation of tubulin aggregates.

Data analysis

The LabPower software was used to control the Uvikon XS spectrophotometer and acquire data in autorate mode, which were further saved in Excel (.xls) format. Data were imported into Excel for visualizing the variations in optical density *versus* time plots. Figures were prepared in Affinity Designer.

Recipes

1. BRB80 buffer solution 5x
   0.4 M PIPES, adjusted to pH 6.8 with KOH
   5 mM $MgCl_2$
   5 mM EGTA
   Store at 4 °C for up to one month
2. GDP solution
   20 mM in BRB80 1x
   Split into 20 µl aliquots
   Store at -20 °C for up to one year
3. Tubulin stocks
   22 $mg \cdot ml^{-1}$ purified porcine brain tubulin
   Store at -80 °C for up to one year

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

4. NaF solution
   200 mM in BRB80 1x
   Store at 4 °C for up to one month
5. $BeSO_4$ solution
   20 mM in BRB80 1x
   Store at 4 °C for up to one month
6. G-BRB80-BeF_3^-
   1x BRB80
   20 mM NaF
   5 mM $BeSO_4$
   1 mM GDP
   25% Glycerol
   Keep at 4 °C until use.
7. BRB80-BeF_3^- solution
   1x BRB80
   20 mM NaF
   5 mM $BeSO_4$
   1 mM GDP
   Keep at 4 °C until use.
   Note: Prepare fresh BRB80-BeF_3^- solution since BeF_3^- salts are not stable.

Acknowledgments

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-C11-0017-01). This protocol was derived from Estévez-Gallego *et al.*, 2020.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Ashford, A. J., Anderson, S. S. L. and Hyman, A. A. (1998). *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* 2nd edition. Vol 2. In: Celis, J. E. (Ed.). Academic Press, 205-212.
2. Castoldi, M. and Popov, A. V. (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr Purif* 32(1): 83-88.
3. Estévez-Gallego, J., Josa-Prado, F., Ku, S., Buey, R. M., Balaguer, F. A., Prota, A. E., Lucena-Agell, D., Kamma-Lorger, C., Yagi, T., Iwamoto, H., Duchesne, L., Barasoain, I., Steinmetz, M. O., Chrétien, D., Kamimura, S., Díaz, J. F. and Oliva, M. A. (2020). Structural model for

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

differential cap maturation at growing microtubule ends. *eLife* 9: e50155.

4. Maurer, S. P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A. and Surrey, T. (2011). GTPγS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10): 3988-3993.
5. Maurer, S. P., Fourniol, F. J., Hoenger, A. and Surrey, T. (2014). Seeded microtubule growth for cryoelectron microscopy of end-binding proteins. *Methods Mol Biol* 1136: 247-260.
6. Weis, F., Moullintraffort, L., Heichette, C., Chrétien, D. and Garnier, C. (2010). The 90-kDa heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J Biol Chem* 285(13): 9525-9534.
7. Zhang, R., Alushin, G. M., Brown, A. and Nogales, E. (2015). Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell* 162(4): 849-859.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

2. Analyse des paramètres structuraux de la paroi via TubuleJ

L'analyse 2D des parois dans différents états nucléotidiques par cryo-ME nécessite de pouvoir individualiser les microtubules présents dans chaque image. Cette individualisation et l'analyse des parois individualisées sont effectuées à l'aide du logiciel TubuleJ afin d'extraire des caractéristiques structurales et organisationnelles propre à chacune des parois. Les paramètres structuraux de la paroi extraits à partir de l'analyse 2D correspondent au nombre de protofilaments (N), au nombre-départ de l'hélice latérale décrit par les monomères (S), à la distance moyenne longitudinale inter-monomère (a), à la distance moyenne latérale interprotofilament (δx), au décalage longitudinal entre les monomères adjacents d'une même hélice latérale (r) et à la période de Moiré (L). La mesure de l'ensemble de ces paramètres permet le calcul de l'angle de vrillage des PFs (θ) par rapport l'axe du MT ainsi que le sens du vrillage (- ou +) (Figure 18).

Le programme TubuleJ a été conçu dans l'équipe afin d'offrir une interface graphique dont chaque étape d'analyse ou de traitement de l'image est guidée et expliquée aux utilisateurs (GUI) afin de faciliter l'analyse des données structurales de la paroi. Les différentes procédures d'analyse et de traitement de l'image ont été implémentées durant notre projet pour permettre une semi-automatisation de certaines procédures afin de réduire le temps de chaque analyse. Les différentes étapes de notre analyse et les données brutes générées par le programme TubuleJ sont expliquées de manière détaillée dans le protocole publié, présenté ci-dessous (Ku *et al*. , 2020).

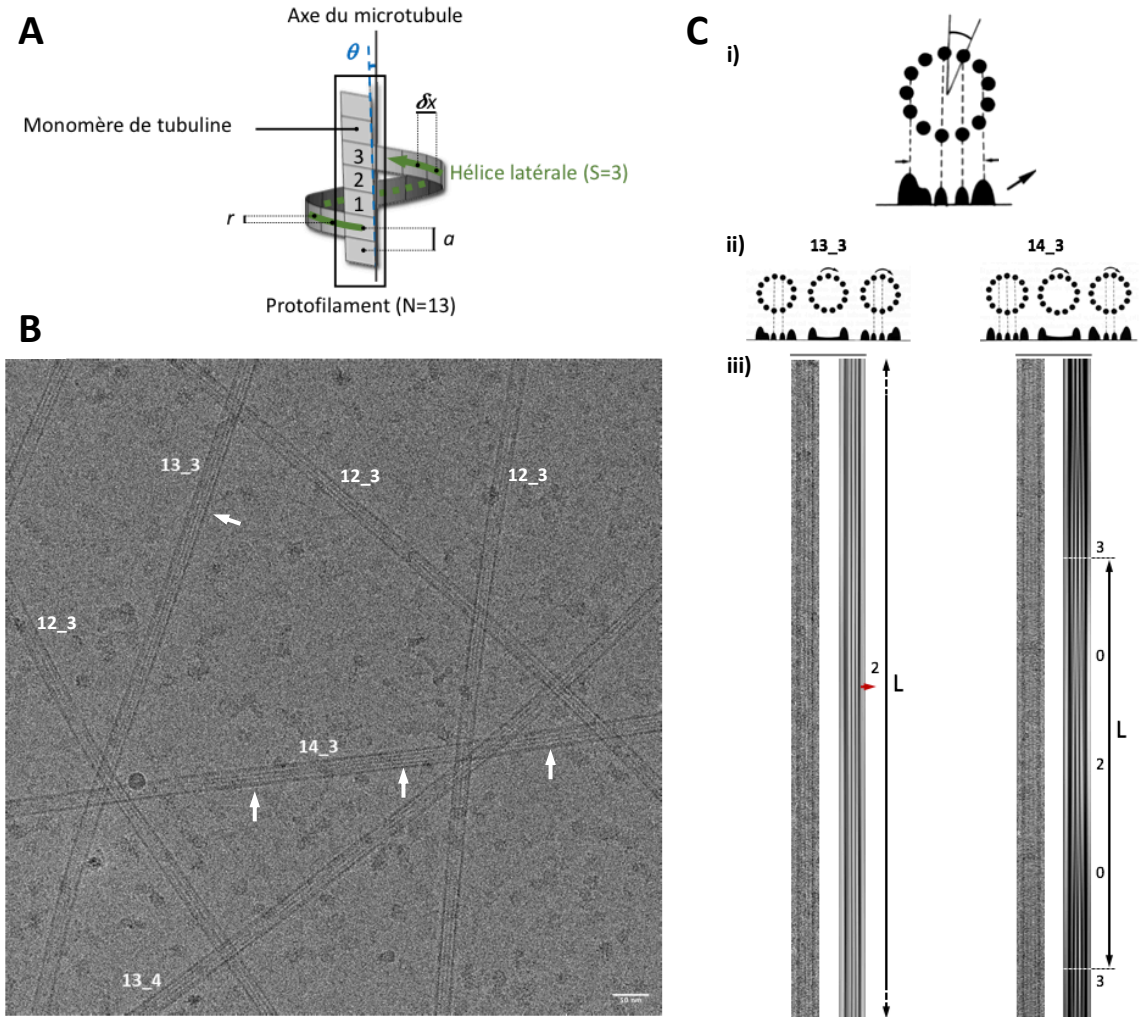


Figure 18. Paramètres structuraux mesurés lors de l'analyse 2D (Chrétien *et al.* , 1991)
A. Paramètres structuraux de la paroi d'un microtubule. L'analyse des images 2D obtenues par cryo-EM nous permet d'accéder au nombre de protofilament (N), au nombre-départ de l'hélice latérale définie par les monomères (S), à la distance moyenne latérale entre protofilament (δx en Å), à la distance moyenne longitudinale inter-monomère (a en Å), au décalage longitudinal entre les monomères adjacents (r en Å) et à l'angle de vrillage des protofilaments (θ en °) par rapport à l'axe du microtubule **B.** Image obtenue par cryo-microscopie électronique montrant plusieurs microtubules. Des franges (lignes) sont visibles le long de l'axe des microtubules, indiquées par les flèches. Ces franges sombres et claires forment un motif de Moiré qui résulte de la superposition des PFs situé en premier plan et en arrière-plan. La barre d'échelle indiquée représente 50 nm. **C.** Les caractéristiques de chaque microtubule peuvent-être mesurées par une analyse individualisée reposant sur les motifs de Moiré qui sont propres à chaque configuration N_S. (i) Schéma d'une section d'un microtubule à 13 protofilaments et image du profil d'intensité correspondant résultant de la projections 2D des protofilaments de la face arrière et de la face avant du microtubule. (ii) Figure montrant les profils d'intensités représentatifs d'un microtubule 13_3 et un microtubule 14_3. L'axe des protofilaments étant vrillé par rapport à l'axe du microtubule, le profil d'intensité va évoluer le long du microtubule. (iii) Image 2D représentative d'un microtubule 13_3 et d'un microtubule 14_3 tels que représentés en (ii) et image filtrée correspondante. Les motifs de Moiré observés ici se traduisent par la répétition de motifs à franges sombres le long du microtubule. Le nombre de franges est indiqué par les numéros présentés sur l'image filtrée obtenue par le logiciel TubuleJ. Par exemple, pour le microtubule 14_3 montré nous pouvons observer que les franges présentent une symétrie et que leur nombre évolue : 3 franges puis une zone floue (0) puis 2 franges (2) puis une zone floue, puis de nouveau 3 franges (3). Ceci caractérise une période de Moiré (L en Å).

bio-protocol www.bio-protocol.org/e3814 Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

Determination of Microtubule Lattice Parameters from Cryo-electron Microscope Images Using TubuleJ

Siou Ku[1, #], Cédric Messaoudi[2, 3, #], Charlotte Guyomar[1], Charles Kervrann[4] and Denis Chrétien[1, *]

[1]Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes) - UMR 6290, F-35000 Rennes, France; [2]Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMS 2016, F-91401 Orsay, France; [3]Université Paris-Saclay, INSERM US43, F-91401 Orsay, France; [4]Inria-Centre de Rennes Bretagne Atlantique, Campus Universitaire de Beaulieu, 35042 Rennes, France
*For correspondence: denis.chretien@univ-rennes1.fr
[#]Contributed equally to this work

[Abstract] The α-β tubulin heterodimer undergoes subtle conformational changes during microtubule assembly. These can be modulated by external factors, whose effects on microtubule structure can be characterized on 2D views obtained by cryo-electron microscopy. Analysis of microtubule images is facilitated if they are straight enough to interpret and filter their image Fourier transform, which provide useful information concerning the arrangement of tubulin molecules inside the microtubule lattice. Here, we describe the use of the TubuleJ software to straighten microtubules and determine their lattice parameters. Basic 3D reconstructions can be performed to evaluate the relevance of these parameters. This approach can be used to analyze the effects of nucleotide analogues, drugs or MAPs on microtubule structure, or to select microtubule images prior to high-resolution 3D reconstructions.
Keywords: Tubulin, Microtubules, Microtubule lattice parameters, Microtubule polarity, Cryo-electron microscopy, Image analysis, Helical assemblies, Three-dimensional reconstructions

[Background] Microtubules are polymers of the α-β tubulin heterodimer that form tubes of about 25 nm in diameter and several μm in length. Tubulin binds two molecules of guanosine triphosphate (GTP), one of which is hydrolyzed to GDP during assembly. GTP-hydrolysis is key to microtubule dynamics, since it destabilizes their lattice and allows their fast rearrangements and turn-over during cell activity. Works with GTP analogues such as guanylyl-(α, β)-methylene-diphosphonate (GMPCPP) or guanosine 5 -(γ-thio)-triphosphate (GTPγS) gave rise to a model in which GTP-tubulin undergoes a compaction and rotation between its subunits during assembly and GTP-hydrolysis (Zhang *et al.*, 2015). This model was recently challenged by a study that involved a range of nucleotide analogues and structural approaches, including X-ray crystallography, small angle X-ray diffraction and cryo-electron microscopy (Estévez-Gallego *et al.*, 2020). This study led to the proposal that if tubulin sustains an expansion-compaction conformational change, this would occur after GTP-hydrolysis to facilitate inorganic phosphate release.

Other factors have been shown to modulate the tubulin compaction state or the protofilament skew angle of microtubules (Manka and Moores, 2018). End-binding proteins (EBs) that bind in-between protofilaments have been proposed to accelerate GTP-hydrolysis by compacting tubulin and to induce

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

a left-handed lattice twist (Zhang *et al.*, 2018). Taxol has been reported to give rise to an expanded state similar to that found in GMPCPP microtubules (Vale *et al.*, 1994; Estévez-Gallego *et al.*, 2020), suggesting that this state reflects a stable conformation of tubulin in microtubules.

While high-resolution analysis of microtubules is prone to describe these conformational changes at the near-atomic level, it requires a careful selection of homogeneous types of microtubules. When reassembled *in vitro* from pure tubulin, microtubules form a range of structures that differ in terms of protofilament and/or lateral helical start numbers (Chrétien and Fuller, 2000). To accommodate these variations, the protofilaments skew relative to the microtubule longitudinal axis (Langford, 1980). This produces moiré patterns in 2D projection views obtained by cryo-electron microscopy, which provide a direct measure of their protofilament skew angle (Chrétien and Wade, 1991). Moreover, this moiré pattern has an arrowhead shape that reflects microtubule polarity, providing that the protofilament handedness has been unambiguously determined (Chrétien *et al.*, 1996; Sosa and Chrétien, 1998). The compaction state of tubulin can be accurately measured on diffraction patterns of the microtubule images (Vale *et al.*, 1994; Hyman *et al.*, 1995), and the helical rise of the tubulin subunits, which reflects how they interact laterally, can be deduced when all other parameters are known (Chrétien and Fuller, 2000; Estévez-Gallego *et al.*, 2020).

To facilitate analysis of microtubule images obtained by cryo-electron microscopy, we have developed TubuleJ as a plugin to the multi-platform ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012). The basic principles of TubuleJ were originally described in (Blestel *et al.*, 2009). The current version has been updated with new routines, and incorporates TomoJ (Messaoudi *et al.*, 2007) to perform fast 3D reconstructions of microtubules. The workflow of TubuleJ is presented in Figure 1.

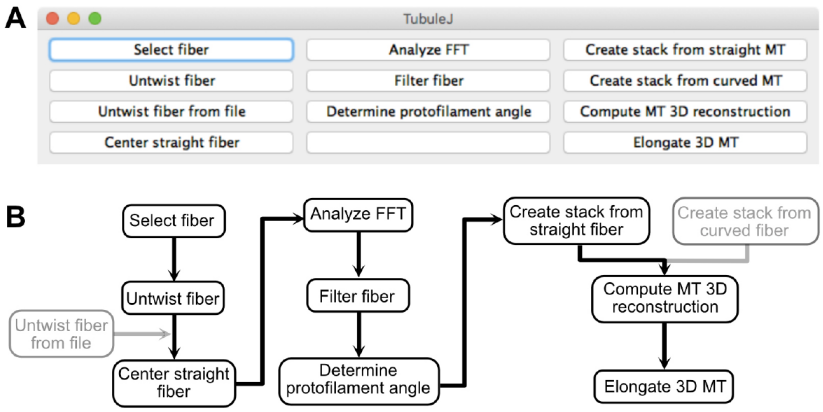


Figure 1. TubuleJ workflow. A. TubuleJ menu. B. TubuleJ processing routines. Only the steps in black are described in this protocol. The steps 'Untwist fiber from file' and 'Create stack from curved fiber' are not described in this protocol. TubuleJ is divided in three "modules". Module 1 (left) can be used with any type of fiber, while modules 2 (middle) and 3 (right) are specific to microtubules. Module 2 allows determination of microtubule lattice parameters, while module 3 allows basic 3D reconstructions, without differentiating the α-β tubulin monomers.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

Equipment

1. Mac-Pro (mi-2010), 2 x 3.46 GHz, 2 x 6-Core Intel Xeon, 96 Go 1333 MHz DDR3 RAM, SSD 1 To, 3 x 6 To Sata disks, 2 x NVIDIA Quadro K5000 graphic cards, macOS version 10.13.6 (Apple Inc.)
   Notes:
   a. *With the current configuration, determination of microtubule lattice parameters and calculation of a 3D reconstruction can be performed in less than 10 min.*
   b. *Since ImageJ is multi-platform, the TubuleJ plugin can be installed and run on any computer equipped with compatible operating systems (MacOs, Linux, Windows). TubuleJ takes advantage of parallel processing (fast Fourier transforms with parallel FFTJ, 3D reconstructions with TomoJ). Therefore, mutli-core processors will speed up the calculations. Allocate a sufficient amount of RAM to ImageJ depending on your configuration and make sure it uses parallel processing ('Edit -> Options -> Memory & Threads…').*

Software

1. ImageJ software: https://imagej.nih.gov/ij/
2. TubuleJ plugin to ImageJ: https://igdr.univ-rennes1.fr/TubuleJ/
3. FFTJ (implemented in TubuleJ):
   https://sites.google.com/site/piotrwendykier/software/parallelfftj
   Parallel FFTJ is a multithreaded Fast Fourier Transform plugin for ImageJ.
4. TomoJ (implemented in TubuleJ): https://sourceforge.net/projects/tomoj/
   TomoJ allows the preprocessing and registration of tilt series before performing 3D reconstructions.
5. UCSF Chimera: https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/

Procedure

A. TubuleJ install
   1. Download TubuleJ and the test image from https://igdr.univ-rennes1.fr/TubuleJ/.
   2. Unzip TubuleJ.zip and install the TubuleJ folder inside the plugin folder of ImageJ.

B. Microtubule selection
   1. Open the electron microscope image in ImageJ.
   2. Select 'Plugins -> TubuleJ -> TubuleJ'. The interface of TubuleJ opens (Figure 1A).
   3. Click on 'Select fiber' and create a folder named 'MTa'. Select this folder as your working directory.
      Note: Several microtubules are frequently present in a single image, which requires creating a

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

separate folder for each microtubule that will be analyzed.

4. Fix the pixel size to 2.16 Å (Figure 2A) and press 'OK'.
   Note: The pixel size is automatically recovered from the header if present. If absent or inaccurate, it must be set at this stage. In the present case, the image header proposes 2.21 Å, but the actual magnification was calibrated using Tobacco Mosaic Virus, which gave a pixel size of 2.16 Å. If one aims to analyze the compaction state of tubulin (Hyman et al., 1995), it is important to calibrate precisely the images at the working magnifications, since changes in subunit monomer repeats are on the order of a few Å.
5. Draw a line on the fiber of interest (Figure 2B) and press 'OK'. This defines the rotation angle of the image.
6. Draw a box around the fiber of interest (Figure 2C) and press 'OK'. An image named 'image_orig.tif' is presented (Figure 2D). Select the whole image (Edit->Select All) and resize the image to, *e.g.*, 189 in height, to minimize background (Image->Crop; Figure 2E). Save this image in the working directory.
   Notes:
   a. *The procedure from microtubule selection (B) to 3D reconstruction (I) is provided in Video 1.*
   b. *As the plugins starts with the current image opened in ImageJ, any file format that can be opened in ImageJ can be used with TubuleJ. It includes classical formats such as tiff. With the install of TomoJ, formats dedicated to electron microscopy such as dm3, mrc, spider or mrc.bz2 are also accepted.*

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

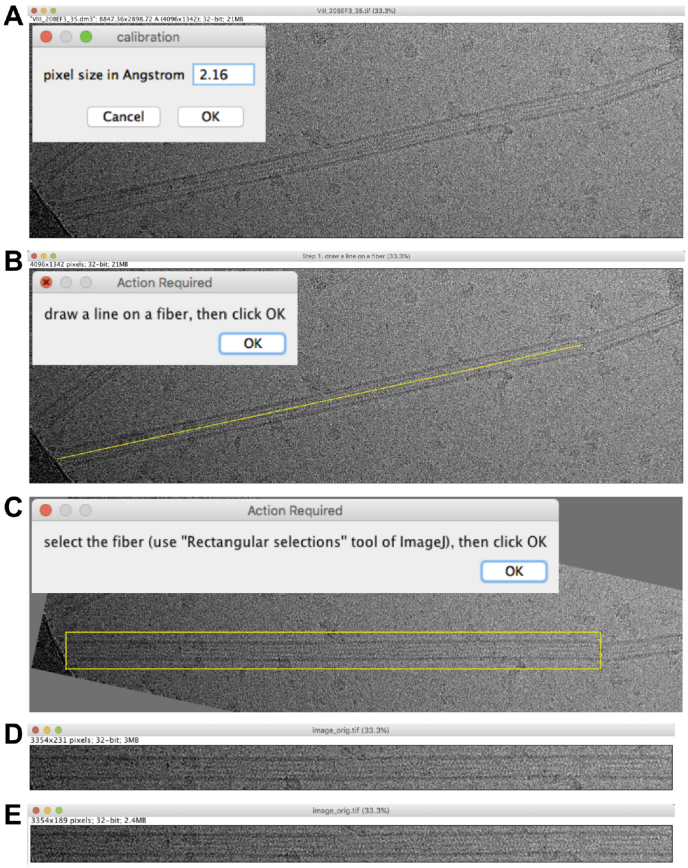
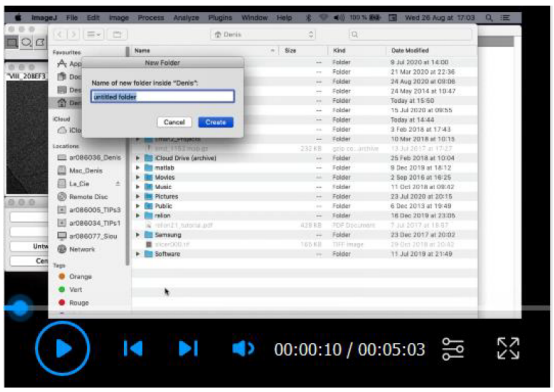


Figure 2. Microtubule selection. A. Pixel size setting. B. Rotation of the microtubule image. C. Microtubule image boxing. D. Extracted region. E. Extracted region cropped to minimize background.



Video 1. Microtubule image analysis and 3D reconstruction

C. Microtubule straightening

1. Select ‘image_orig.tif’ and click on ‘Untwist fiber’. Set the following parameters (Figure 3A): ‘Enter the width of the sub-images (pixels): 384’; ‘Enter the step size (pixels): 192’; ‘Enter the

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

height of the straight fiber image (pixels): 185". Let checked 'Correct contrast'; 'radius: 60', let unchecked 'Display middle step images' and press 'OK'. Orientations of the microtubule sub-regions with respect to the horizontal are indicated in the log window. The extracted image corrected for contrast variations is presented (Figure 3B), together with the first sub-region from the left roughly aligned horizontally (Figure 3C), and a line profile of the equator of the microtubule sub-region Fourier transform (Figure 3D).

Notes:

a. *The width of the sub-regions will depend on the pixel size and the signal/noise ratio present in the images. We commonly use sub-image lengths comprised between 50 and 100 nm at the specimen level. The step size can be set to half the width size, and the height of the straight fiber about 65% larger than the width of a microtubule image (in pixels). Use an odd value for the width size to allow a proper centering of the microtubule image.*

   Note: Grey gradients are essentially due to variations in ice thickness, e.g., from the border to the center of the carbon holes. These must be corrected for proper filtering of the microtubule images. The 'radius' option corresponds to the value of the Gaussian filter in ImageJ, which is used to produce a background image that is subtracted from the original image.

b. *The option 'Display middle step images' presents all the extracts (image named 'Horizontal and centered windows'), as well as an image showing the local centers (white crosses) connected with a dark line. Analysis of these images can be useful to determine why the algorithm failed during the local determination of microtubule centers.*

2. Click at the level of the second large peak starting from the left (around 10 in frequency, Figure 3D). The progress of local center calculation can be followed in the log window. A straightened image corrected for contrast variations named 'image_orig-straight' is presented (Figure 3E).

   Notes:

   a. *TubuleJ uses the phase of the J_0 Bessel function to center the microtubule image (Blestel et al., 2009), which correspond to the 3 to 4 first large peaks in Figure 3D. The higher resolution peaks may overlap with J_N (N = number of protofilaments, here N = 15). Selection of the second large peak at ~10 in frequency limits the contribution of the J_N term that could corrupt the centering process.*

   b. *The straightened image is shorter than the original image, since point centers are taken from the middle of the first sub-region to that of the last sub-region. A procedure to straighten the entire image is provided in the TubuleJ manual. This procedure uses the 'Untwist fiber from file' routine not described in this protocol. This routine can also be used to adjust mis-centered points.*

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

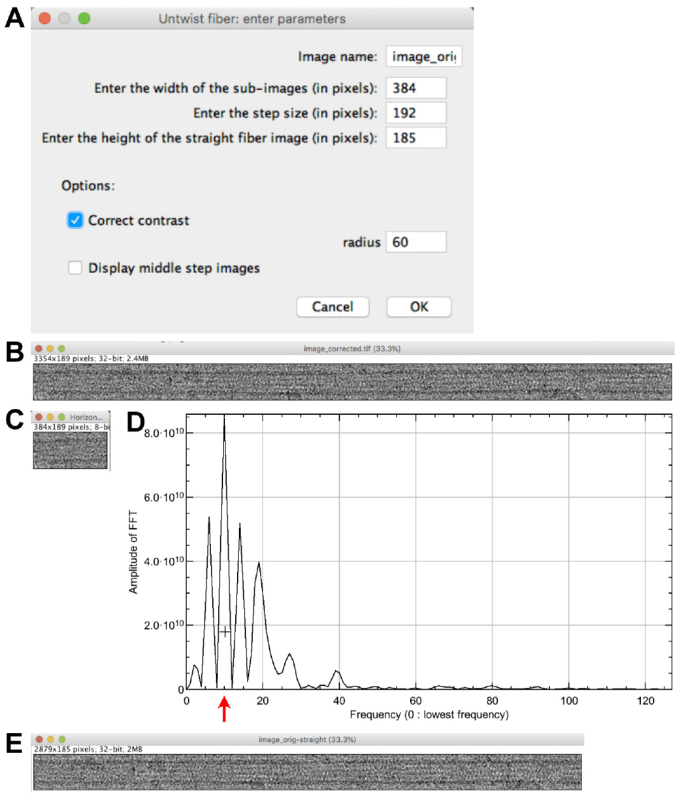


Figure 3. Microtubule straightening. A. Straightening parameters. B. Contrast corrected image. C. First sub-region from the left. D. Line profile of the equator of the microtubule sub-region Fourier transform. The cross is placed at the level of the second large peak of the J_0 Bessel term (red arrow). E. Straightened microtubule image.

D. Microtubule centering

1. Select 'image_orig-straight' and click on 'Center straight fiber', set the max width of the FFT to 2048 pixels (Figure 4A) and press 'OK'. The Fourier transform of the image is presented (not shown) together with a profile on the equator of the microtubule image FFT (Figure 4B).
2. Click at the level of the third large peak starting from the left (around 55 in frequency). An image named 'image_orig-straight-Centered' is presented' (Figure 4C), and the translation along the 'Y-axis' is indicated in the log window. It should be minimal (less than 1 pixel) if the 'image_orig-straight' image has not been cropped.

   Notes:

   a. *When protofilaments are skewed with respect to the longitudinal axis of the microtubule, the profile plot of the equator should be composed only of J_0, without contribution of J_N (see the power spectra in Figures 5A-5B and 6A). Hence, it is safe to click on a peak at higher resolution than in the straightening process.*

   b. *We have limited the size of the Fourier transform to 4,096 x 4,096 pixels since the centering procedure is computationally intensive. This process can take time, wait until it is finished.*

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

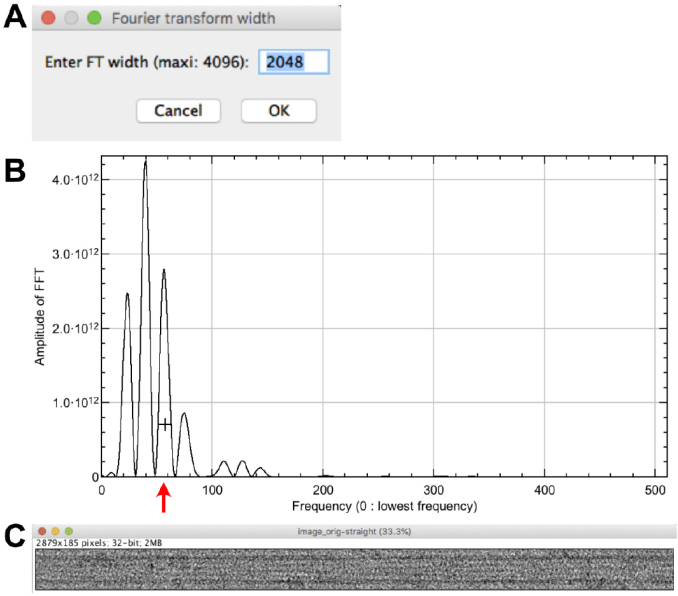


Figure 4. Microtubule centering. A. Setting of the FFT size. B. Line profile of the equator of the straightened microtubule image Fourier transform. The cross is placed at the level of the third large peak of the J_0 Bessel term (red arrow). C. Centered image.

E. Determination of protofilament handedness and tubulin subunit repeat along protofilaments

1. Select 'image_orig-straight-Centered' and click on 'Analyze FFT'. The Fourier transform of the image is presented together with a horizontal line crossing the power spectrum. Select the FFT window and zoom in until the diffraction pattern fills the image. Adjust the contrast to emphasize the layer-line pattern (*e.g.*, from 0 to ~3.0E13 in the B&C window).
2. Move the yellow line to cross the J_S layer line (Figure 5A) and press 'OK'.
3. Move the yellow line to cross the J_{N-S} layer line (Figure 5B) and press 'OK'. Line profiles of J_S and J_{N-S} are presented (Figures 5C-5D).
4. In the window 'Analyze FFT parameters' (Figure 5E), let the default values ('approximate size in Å: 40.0', and 'range of search (in Å): 10'), and press 'OK'. This sets the interval for searching peaks in the FFT. A window opens asking if you want to close intermediate windows. Press 'OK'. Results are provided in the log window: The 'monomer repeat' is 40.87 Å and the protofilament skew angle 'theta' is positive. These values will be used to determine the protofilament skew angle (G) and to build image stacks suitable for 3D reconstruction (H).

   Notes:

   a. *The Fourier transform of a helical fiber is characterized by layer lines that correspond to the different helical families present in this fiber. These layer lines are mathematically described by Bessel functions. In the case of microtubules, the Bessel function of order '0' (J_0) is due to the tubular nature of microtubules. It lies on the 'equator' of the Fourier transform, and is used to precisely center microtubule images (see Blestel et al., 2009, for details). The Bessel function of order 'N' (J_N) arises from the linear arrangement of the tubulin molecules*

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

along the N protofilaments. Since the protofilaments are almost parallel to the microtubule longitudinal axis, J_N lies close to J_0 (Figure 5A). The Bessel function of order 'S' is due to the lateral interactions between tubulin monomers around the microtubule lattice. A full turn of this helix includes S monomers in height (between S = 2 and S = 4 in most microtubule types). J_S lies close to the 'meridian' of the Fourier transform of microtubule images (Figure 5A, the meridian is perpendicular to the equator). The Bessel function of order 'N-S' is geometrically related to J_N and J_S. J_{N-S} is further away from the meridian than J_S (Figure 5A).

b. *Determination of the protofilament skew angle sign is based on the following rule (Chrétien et al., 1996): When J_S is farther away from the equator than J_{N-S}, theta is negative, and when J_S is closer to the equator than J_{N-S}, theta is positive.*

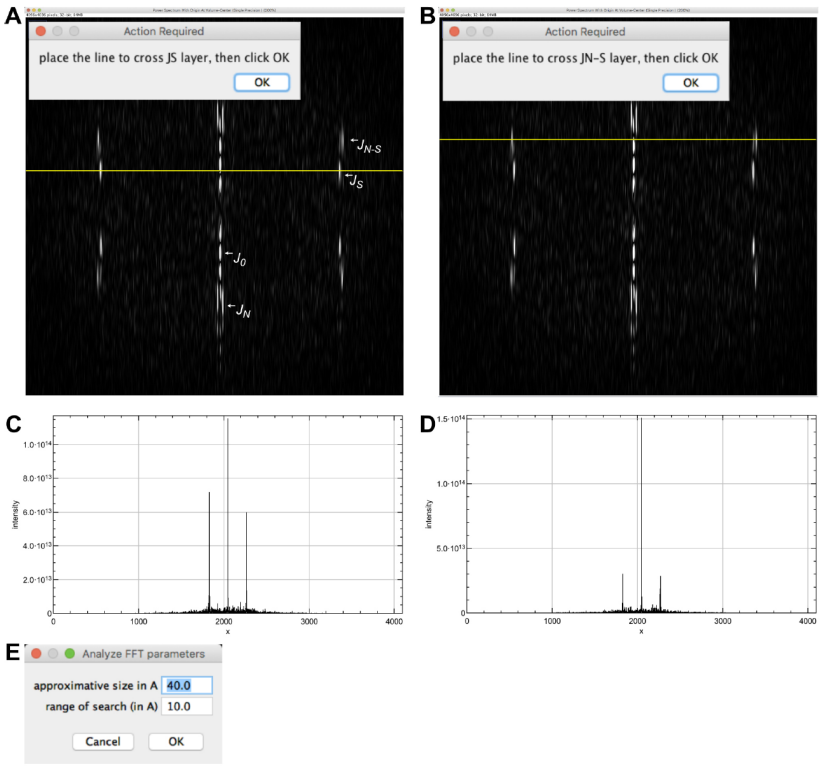


Figure 5. Analysis of the microtubule Fourier transform. A. Selection of the J_S layer line. The main layer lines are indicated. J_0 lies on the equator of the Fourier transform. J_S is closer to the equator than J_{N-S}, indicating that the microtubule has right-handed protofilaments. B. Selection of the J_{N-S} layer line. C. Line profile along J_S. D. Line profile along J_{N-S}. E. Peak search interval.

F. Microtubule image filtering and determination of microtubule polarity

1. Select 'image_orig-straight_Centered' and click on 'Filter fiber'.
2. Select the FFT window (Figure 6A) and zoom in until the diffraction pattern fills the image.
3. Select the rectangular tool of ImageJ and draw a rectangle that incorporate the J_0 and the first

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

peak of the J_N term on each side of the equator and press 'OK'.

4. Enter 21 lines and press 'OK'. Click 'Yes' to accept the selected region and answer 'No' in the window 'Do you want to select other layer lines?'. An image named 'filtered image' is presented (Figure 6B), which emphasizes the moiré pattern originating from the skewed protofilaments imaged in projection.
5. The moiré pattern has an 'arrowhead' shape pointing to the left of the image. Since the protofilaments are right-handed (theta is positive), the microtubule is oriented with its plus end pointing to the left.

   Note: The arrowhead pattern is due to the asymmetric shape of tubulin when viewed along the microtubule axis (see Figures 9D and 10). The directionality of this pattern reverses when protofilament have opposite chirality (Chrétien et al., 1996; Sosa and Chrétien, 1998). The rule to determine microtubule polarity is the following: The fringe pattern points towards the plus end of microtubules with right-handed protofilaments (θ > 0), and towards the minus end of microtubules with left-handed protofilaments (θ < 0).

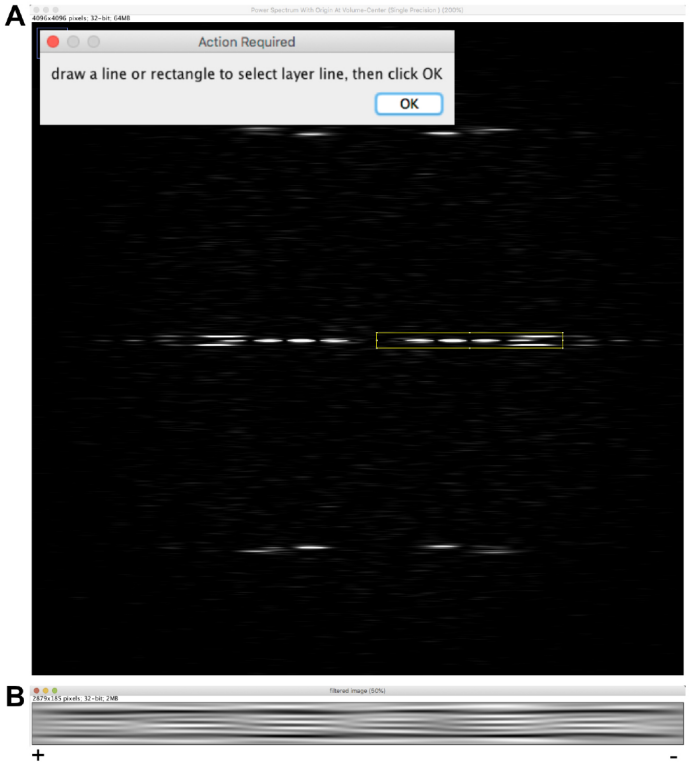


Figure 6. Microtubule image filtering. A. Selection of J_0 and of the first peak J_N. B. Filtered image. The moiré pattern displays an arrowhead shape that points toward the left of the image.

G. Determination of the protofilament skew angle

1. Select 'filtered image' and click on 'Determine protofilament angle'. Select the 'filtered image' (Figure 7A) and move the line with the arrow key so that it crosses minima and maxima of the

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

fringe pattern (6 pixels up) and press 'OK'.

Note: In the case of a microtubule with an even protofilament number, the line should be adequately placed in the middle of the filtered image. Here, the protofilament number is odd (N = 15), which necessitates moving the line slightly off center to cross maxima and minima of the moiré pattern.

2. Three line plots open corresponding to the line profile ('line intensities', Figure 7B), a smoothed version to attenuate local variations if present (not shown), and the absolute value of the smoothed line profile ('line intensities after abs()' Figure 7C). A window opens providing the measured period (in pixels, Figure 7D), the pixel size and the protofilament separation (set as default to 48.95 Å). Let the 'negative pf angle' unchecked since it has been previously determined to be positive and press 'OK'. A window opens to close intermediate windows, press 'OK'.
3. Close the filtered image.

   The moiré period *L* (1906.56 Å) and the protofilament skew angle theta (+1.47 Å) are given in the log window.

   Note: The protofilament skew angle θ is calculated according to the following formula:

$$\theta = sin^{-1}\left(\frac{\delta x}{L}\right)$$

where δx denotes the separation between adjacent protofilaments. The separation between protofilaments δx is difficult to retrieve from individual images. If several types of microtubules are present in the specimen, this can be estimated by measuring the change in image width with protofilament number (Chrétien and Wade, 1991). The default value of 48.95 Å was derived from medium-resolution 3D maps of microtubules with from 11 to 16 protofilaments (Sui and Downing, 2010).

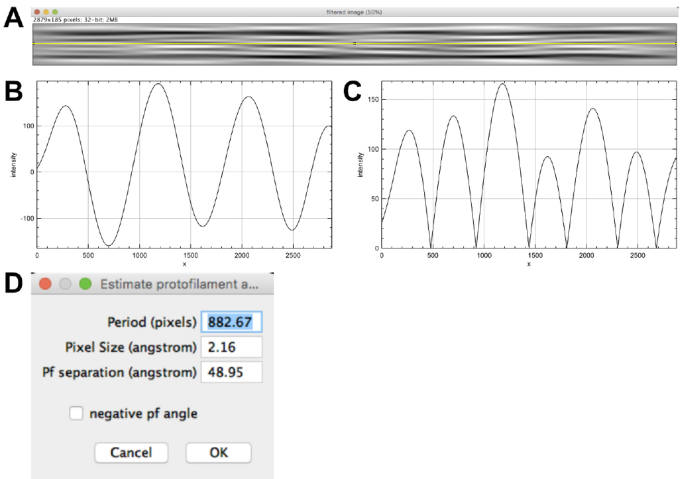


Figure 7. Determination of the protofilament skew angle. A. Selection of the moiré profile. B. Line profile revealing the moiré period (distance between two maxima or minima). C. Absolute

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

value of the moiré period. This strategy has been implemented to measure low protofilament skew angles where only half the moiré repeat is present (like in most 13_3 microtubules).

H. Stack generation

1. Select 'image_orig-straight_Centered' and press 'Create stack from straight MT'. Fix the protofilament number to 15 and the helical-start number to 4 (Figure 8A). Let the other parameters as provided and press 'OK'.

   Notes:

   a. *A 'Create stack from curved MT' routine is provided to extract stack images from the original (contrast corrected) microtubule image (saved as 'orig_corrected.tif' in the working directory). This option can be useful if one wishes to process the image stack with other 3D reconstruction software.*

   b. *A rigorous determination of N and S would require a detailed analysis of the positions and phases of the layer lines in the Fourier transform of the images (Stewart, 1988), which goes beyond the scope of this protocol. The parity of N can be determined from the symmetry of the fringe pattern: it is centered for even protofilament numbers, and off-center for odd protofilament numbers. The value of N can then be estimated by comparing the microtubule diameter with that of other microtubules present in the specimen, and also by comparing the fringe pattern with published images of microtubules with different N_S configurations (Chrétien and Fuller, 2000). The helical start number S can be estimated from the sign of the protofilament skew angle (Table 1). In the present case, N = 15 and θ is positive, hence S = 4.*

Table 1. Sign of *θ* for the main microtubule types assembled *in vitro* from purified tubulin (taken from Chrétien and Fuller, 2000), n. o.: not observed. These latter N_S configurations require protofilament skew angles > ± 4°, which may represent a limit in the twist that the tubulin molecule can accommodate.

N	10	11	12	13	14	15	16
S = 2	-	-	-	-	-	n. o.	n. o.
S = 3	+	+	+	+/-	-	-	-
S = 4	n. o.	n. o.	n. o.	+	+	+	+

2. A window opens asking the approximate MT length (86 pixels; Figure 8B). Let this value and press 'OK'. The incremental 'Z-shift '(1.26 pixels) and 'Angular shift' (-95.966°) assigned to the stack images are given in the result window.

   Notes:

   a. *The 'Helical rise' (r = 9.64 Å) corresponds to the longitudinal stagger between tubulin monomers in adjacent protofilaments. It is calculated according to the following formula:*

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

$$r = \frac{Sa}{N} - \frac{\delta x^2}{L\sqrt{1-\left(\frac{\delta x}{L}\right)^2}}$$

where S denotes the monomer helical start number, 'a' the tubulin subunits repeat along protofilaments, N the protofilament number, δx the separation between protofilaments, and L the moiré period (with the sign of θ).

b. The 'approximate MT length' value determines the height of the volume that will be calculated at the following step so that it encompasses at least 4 monomer helical starts.

3. A histogram opens showing the angle distribution assigned to the images of the stack ('Angle distribution'), Figure 8C. A stack is presented ('image_orig-straight_Centered_angle_-95.966', Figure 8D), which is composed of 2214 images corresponding to views extracted at each subunit monomer position along the microtubule image.

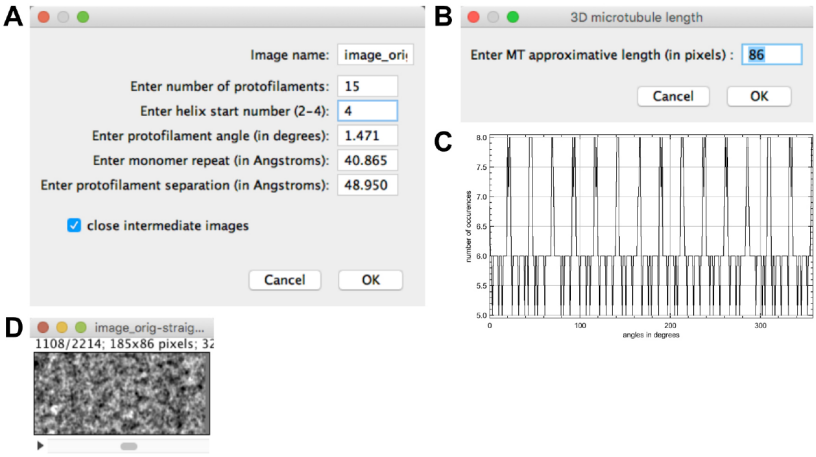


Figure 8. Stack generation. A. Stack generation parameters. B. Stack height. C. Angular distribution of the stack images. D. Image stack.

4. Table 2 summarizes the microtubule lattice parameters derived from this analysis:

Table 2. Microtubule lattice parameters. Polarity is from plus end (left) to minus end (right) in the original image.

N	*S*	*a* (Å)	*r* (Å)	□*θ* (°)□□	Polarity
15	4	40 .87	9.64	+1.47	+ / -

I. 3D reconstruction

1. Click on 'Compute MT 3D reconstruction'. Let 'Invert intensities?' checked and the 'weighting radius' to 0.0 (Figure 9A), then press 'OK'.

Notes:

a. Images taken on a camera under defocused conditions display protein as dark. Contrast

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

inversion is thus necessary to examine these data in UCSF Chimera (J). Scanned images recorded on negatives display the protein density as white. In that case, uncheck the 'Invert intensities?' button.

b. *The weighting radius can be set to higher values (between 0 and 0.5) in order to attenuate the contribution of low frequencies, which are amplified during back projection (Radermacher, 1992). Yet, this is done at the expense of increasing the noise in the final 3D reconstruction.*

2. A 'Progression…' window opens (Figure 9B): wait until the 'stack_straight_3dReconstruction' is calculated (Figure 9C). Scroll through this volume, the tubulin subunits (shown in white) are clearly visible in the volume. Select 'Image -> Stacks -> Reslice [/]…' then select 'Start at: top' and press 'OK' (Figure 9D). The asymmetry of the tubulin subunits indicates that we are looking at this map from the plus end (Chrétien *et al.*, 1996; Sosa and Chrétien, 1998; see also (J)). The top-to-bottom orientation of the 3D map corresponds to the left-to-right orientation in the original image, which indicates that the polarity was well assigned.
3. Select 'stack_straight_3dReconstruction' and click on 'Elongate 3D MT' (Figure 9E). Let the 3 first parameters as default, fix the final length to 1024 and press 'OK'. This generates an elongated version of the microtubule where the protofilament skew and its handedness can be observed (Figure 9F).

   Note: The z shift and angle shift used to elongate the microtubule correspond to the parameters of the basic one start helix that join all the tubulin subunits within the microtubule lattice. These values are also used to perform the 3D reconstruction of the microtubule, see Blestel et al. (2009) for deeper details.

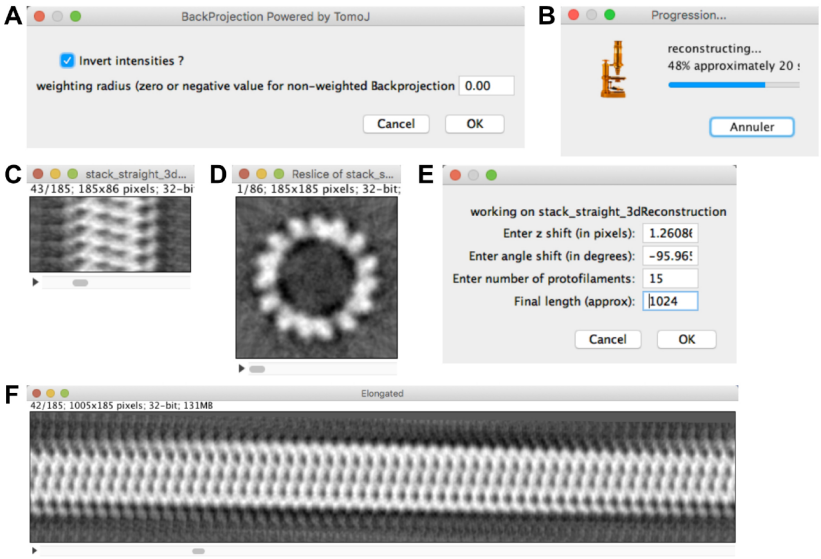


Figure 9. Microtubule 3D reconstruction. A. 3D reconstruction parameters. B. Progression bar. C. 3D reconstruction. D. 3D reconstruction observed from the top. E. Elongation parameters.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

F. Elongated version of the microtubule. The right-handed skew of the protofilaments is clearly visible.

4. Examine the working directory, several files have been created (listed in chronological order):
   a. calibration.cvs: pixelSize, the pixel size in Å.
   b. image_orig.tif: the region extracted from the original image.
   c. image_corrected.tif: the region extracted from the original image corrected for contrast variations.
   d. centers.txt: number of local centers and their x, y coordinates.
   e. straight_image.tif: the straightened image.
   f. image_orig-straight_Centered.tif: the straight image centered.
   g. analyzeFFT.csv: pixelSize, the pixel size in Å; monomerRepeat, the monomer repeat along protofilaments (in Å); thetaSign, the sign of theta (1 positive, -1 negative).
   h. filtered image.tif: the filtered image.
   i. protofilament.csv: l(pixel), the moiré period in pixels; pixelSize, the pixel size (in Å); L(angstrom), the moiré period (in Å), Pf separation(angstrom); the protofilament separation (in Å); theta, the protofilament skew angle (in °).
   j. angle_distribution.csv: the number of views assigned in the stack for each angle (Y), from 0° to 359° (X).
   k. angles.txt: the angular orientation assigned to the images of the stack.
   l. elongation.csv: zshift, the Z-rise of tubulin monomers with respect to the longitudinal axis of the microtubule; angleshift, the angular increment of tubulin monomers around the microtubule Z axis; nbProtofilaments, the protofilament number; helicalRise, the helical rise of tubulin subunits along adjacent protofilaments.
   m. stack_straight.tif: the image stack used for 3D reconstruction.
   n. stack_straight_3dreconstruction.tif: the 3D reconstruction of the microtubule.
   o. 3dReconstruction_elongated.tif: the elongated version of the 3D reconstruction.

J. Observation of the 3D reconstructions with UCSF Chimera
   1. Open the ‘stack_straight_3dreconstruction.tif’ volume saved in the working directory into UCSF Chimera.
   2. Display the command line: ‘Menu->Favorites->Command line’.
   3. Open the camera viewer: ‘Menu->Tools->Viewing Controls->Camera’ and select ‘orthographic’.
   4. Open the Volume viewer: ‘Menu->Tools->Volume Data->Volume Viewer’, and in the ‘Features’ menu, check ‘Brightness and Transparency’, ‘Coordinates’, and ‘Threshold and Color’.
   5. Adjust the ‘Level’ to enlarge tubulin densities (*e.g.*, to ‘Level = 300’) and set the ‘Transparency’ to 0.50.
   6. In the command line, enter ‘turn x 90 1’.
   7. Set the voxel size to 2.16 Å and press center.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

8. Select the 'Side View' tab of the 'Viewing window' and press 'View All'.
9. Open the tubulin map 1tub: 'Menu->File->Fetch by ID…', check the 'PDB' button, enter 1tub and press 'Fetch'.
10. In the command line, enter 'move 62,-30,-30 mod #1; turn y 90 1 mod #1 center #1'. The tubulin map is oriented with its plus end viewed from the top (Figure 10A). Comparison of the overall shape of the 1tub model with that of the microtubule map confirms that the plus end points towards the top of the reconstruction.
11. In the command line, enter 'move -45,-110,0 mod #0'. Select 'Volume Viewer->Tools->Fit in Map' and fit '1tub (#1) in map 'stack_straight_3dreconstruction.tif (#0)'. Inspect the fit of the 1tub model inside the 3D density of the microtubule (Figures 10B-10F).
    Notes:
    a. *The good agreement between the overall shape of the 1tub model and the 3D reconstruction, including the correspondence of structural motifs such as densities corresponding to the lateral interactions, the H1-S2-loop pointing inward and the C-terminal α-helices pointing outward (Figure 10B), give a fair confidence that the parameters derived from the analysis were adequately determined.*
    b. *The original image has not been corrected for the effect of the Contrast Transfer Function. This can be performed before processing the images in TubuleJ in order to improve the quality of the final reconstruction.*
12. Save the session in the working directory as 'MTa.py'.
13. Close the session and open '3dReconstruction_elongated.tif'.
14. Set the step size to 2 and adjust the 'Level' to 300. The right-handed skew of the protofilaments is clearly visualized in this elongated version of the microtubule 3D reconstruction (Figure 10G).
15. Save the session as 'MTa_Elongated.py'.
    Note: The visualization procedure using UCSF Chimera is provided in Video 2.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Bio-protocol 10(21): e3814.
DOI:10.21769/BioProtoc.3814

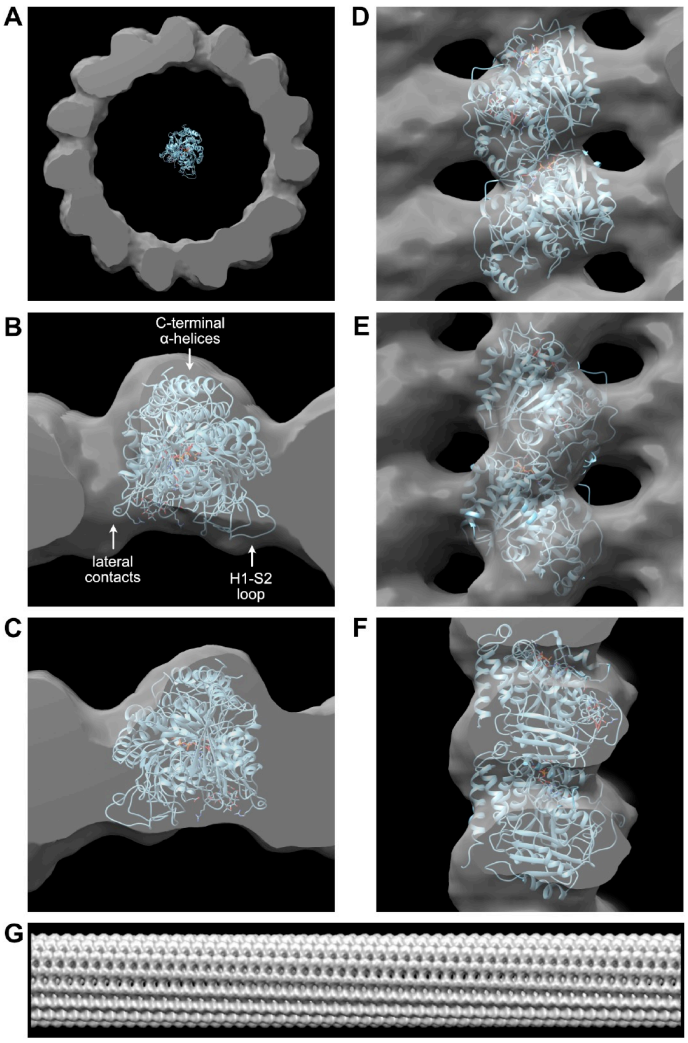
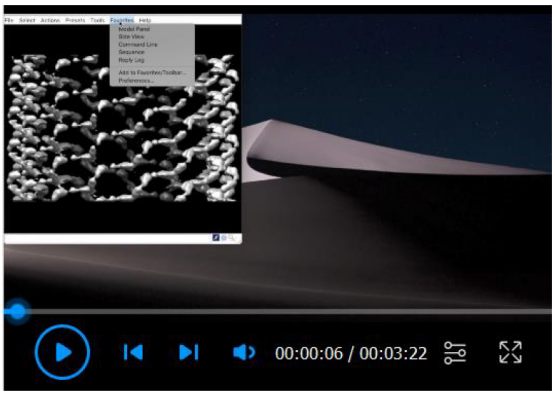


Figure 10. Visualization of the 3D reconstruction with UCSF Chimera. A. Comparison of the 3D reconstruction with the 1tub tubulin model. B. Fit of 1tub into the 3D reconstruction. Plus end view. Structural features that allow a good match between the tubulin model and the 3D reconstruction are indicated. C. Minus end view. D. Inside view. E. Outside view. F. Side view. G. Elongated version of the 3D reconstruction.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).



Video 2. Observation of the 3D reconstruction using UCSF Chimera

Acknowledgments

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-C11-0017-01). We thank S. Blestel who wrote the original version of TubuleJ. The determination of microtubule centers used in TubuleJ was published in Blestel *et al.* (2009). TubuleJ was used in Estévez-Gallego *et al.* (2020) to analyze the structure of microtubules assembled in the presence of GTP, GMPCPP and GDP-BeF_3^-.

Competing interests

TubuleJ was deposited to the Agency for the Protection of programs (APP) under the code number IDDN.FR.001.240023.000.S.P.2011.000.21000.

References

1. Blestel, S., Kervrann, C. and Chrétien, D. (2009). A Fourier-based method for detecting curved microtubule centers: Application to straightening of cryo-electron microscope images. *Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Boston. 2009, June 28-July 1*. 298-301.
2. Chrétien, D. and Fuller, S. D. (2000). Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation. *J Mol Biol* 298(4): 663-676.
3. Chrétien, D., Kenney, J. M., Fuller, S. D. and Wade, R. H. (1996). Determination of microtubule polarity by cryo-electron microscopy. *Structure* 4(9):1031-1040.
4. Chrétien, D. and Wade, R. H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell* 71(1-2): 161-174.
5. Hyman, A. A., Chrétien, D., Arnal, I. and Wade, R. H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha, beta)-methylene-diphosphonate. *J Cell Biol* 128(1): 117-125.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

6. Estévez-Gallego, J., Josa-Prado, F., Ku, S., Buey, R. M., Balaguer, F. A., Prota, A. E., Lucena-Agell, D., Kamma-Lorger, C., Yagi, T., Iwamoto, H., Duchesne, L., Barasoain, I., Steinmetz, M. O., Chrétien, D., Kamimura, S., Díaz, J. F. and Oliva, M. A. (2020). Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends. *eLife* 9: e50155.
7. Langford, G. M. (1980). Arrangement of subunits in microtubules with 14 protofilaments. *J Cell Biol* 87(2 Pt 1): 521-526.
8. Manka, S. W. and Moores, C. A. (2018). Microtubule structure by cryo-EM: snapshots of dynamic instability. *Essays Biochem* 62(6):737-751.
9. Messaoudi, C., Boudier, T., Sanchez Sorzano C. O. and Marco S. (2007). TomoJ: tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinformatics* 8: 288-296.
10. Radermacher, M. (1992). Weighted Back-Projection Methods. In: Frank, J. (Ed.). *Electron Tomography.* Springer, Boston, MA: 91-115.
11. Stewart, M. (1988). Computer image processing of electron micrographs of biological structures with helical symmetry. *J Electron Microsc Tech* 9:325-358.
12. Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
13. Sosa, H. and Chrétien, D. (1998). Relationship between moire patterns, tubulin shape, and microtubule polarity. *Cell Motil Cytoskeleton* 40(1): 38-43.
14. Sui, H. and Downing, K. H. (2010). Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure* 18:1022-1031.
15. Vale, R. D., Coppin, C. M., Malik, F., Kull, F. J. and Milligan, R. A. (1984). Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport of microtubules. *J Biol Chem* 269(38): 23769-23775.
16. Zhang, R., Alushin, G. M., Brown, A. and Nogales, E. (2015). Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell* 162(4): 849-859.
17. Zhang, R., LaFrance, B. and Nogales, E. (2018). Separating the effects of nucleotide and EB binding on microtubule structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(27): E6191-E6200.

Copyright Ku et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

3. Modèle structural du processus de maturation différentiel de la coiffe au niveau des extrémités en croissance

Il est établi aujourd'hui que l'instabilité dynamique des MTs est régulée par l'activité GTPasique de la tubuline : les changements de conformation de la tubuline lors de l'hydrolyse différée de la tubuline-GTP en tubuline-GDP déstabilisent la paroi du microtubule qui serait alors maintenue dans un état métastable grâce, notamment, à la coiffe GTP de l'extrémité en croissance, constituée de tubuline non encore hydrolysée. Cependant, accéder à la structure /conformation de la tubuline-GTP assemblée et de cette coiffe reste difficile à cause de la grande dynamique des microtubules et en raison de l'hydrolyse rapide du GTP. Une telle étude nécessite l'utilisation d'analogues non ou lentement hydrolysable du GTP.

Le modèle de compaction-rotation publié en 2015 considère que les analogues GMPCPP et GTPγS utilisés pour cette étude miment parfaitement l'état GTP et GDP.P_i respectivement de la tubuline. Si ce modèle est d'un grand intérêt, il n'est pas en accord avec le fait que les EBs qui reconnaitraient l'état GTP de la tubuline ne reconnaissent pas les parois GMPCPP.

Afin de résoudre la conformation de la tubuline-GTP et également de caractériser plus en détails le mécanisme d'action des analogues du GTP et de l'état GDP.P_i, nous avons donc entrepris une étude structurale par cryo-ME sur les parois assemblées en présence d'une gamme élargie d'analogues stables du GTP. Nous avons ainsi utilisé le GMPCPP et GTPγS ainsi que des dérivés du GMPCPP (GMPCP et GMPPCP) afin de vérifier si la conformation étendue de la tubuline précédemment observée en présence de GMPCPP était bien une conséquence directe de l'état « GTP-like » et non un biais causé par le GMPCPP en lui-même. Selon le modèle de compaction-rotation de Zhang et al, 2015, le GTPγS permettrait de mimer parfaitement l'état GDP.P_i de la tubuline. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons également réalisé notre étude structurale en présence de BeF_3^- et AlF_x^-, deux analogues du P_i permettant de mimer un état stable GDP.P_i. Ces deux analogues, bien caractérisés d'un point de vue biochimique (Bigay *et al.*, 1987; Carlier *et al.*, 1989), n'avaient été que très peu utilisés jusque-là dans le cadre de l'étude de la dynamique des microtubules.

Une première partie de mon travail, réalisé en cryo-ME sur des parois GDP, GMPCPP et GDP-BeF_3^-, a fait l'objet d'une collaboration avec les équipes de Fernando Diaz et de Michel Steinmetz. Nous avons ainsi pu corréler leurs données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X et diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) avec les nôtres. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Estévez-Gallego, Josa-Prado, Ku *et al*., 2020, elife) présentée en A) et sont brièvement présentés après.

Après cette publication, j'ai poursuivi et complété mon travail par l'étude structurale en cryo-ME des parois assemblées en présence des dérivés du GMPCPP (GMPCP et GMPPCP) et du GDP-AlF_x^-. Ces résultats sont présentés dans la partie B.

eLIFE elifesciences.org

RESEARCH ARTICLE

Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends

Juan Estévez-Gallego[1†], Fernando Josa-Prado[1†], Siou Ku[2†], Ruben M Buey[1,3], Francisco A Balaguer[1], Andrea E Prota[4], Daniel Lucena-Agell[1], Christina Kamma-Lorger[5], Toshiki Yagi[6], Hiroyuki Iwamoto[7], Laurence Duchesne[2], Isabel Barasoain[1], Michel O Steinmetz[4,8], Denis Chrétien[2], Shinji Kamimura[9], J Fernando Díaz[1], Maria A Oliva[1]*

[1]Structural and Chemical Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain; [2]Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) – UMR 6290, Rennes, France; [3]Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca-Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain; [4]Division of Biology and Chemistry, Laboratory of Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland; [5]ALBA synchrotron, CELLS, Cerdanyola del Vallès, Spain; [6]Department of Life Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima, Hiroshima, Japan; [7]Diffraction and Scattering Division, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Hyogo, Japan; [8]University of Basel, Biozentrum, Basel, Switzerland; [9]Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Chuo University, Tokyo, Japan

***For correspondence:** marian@cib.csic.es

[†]These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 21

Received: 12 July 2019
Accepted: 25 January 2020
Published: 10 March 2020

Reviewing editor: Andrew P Carter, MRC Laboratory of Molecular Biology, United Kingdom

© Copyright Estévez-Gallego et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Microtubules (MTs) are hollow cylinders made of tubulin, a GTPase responsible for essential functions during cell growth and division, and thus, key target for anti-tumor drugs. In MTs, GTP hydrolysis triggers structural changes in the lattice, which are responsible for interaction with regulatory factors. The stabilizing GTP-cap is a hallmark of MTs and the mechanism of the chemical-structural link between the GTP hydrolysis site and the MT lattice is a matter of debate. We have analyzed the structure of tubulin and MTs assembled in the presence of fluoride salts that mimic the GTP-bound and GDP•P_i transition states. Our results challenge current models because tubulin does not change axial length upon GTP hydrolysis. Moreover, analysis of the structure of MTs assembled in the presence of several nucleotide analogues and of taxol allows us to propose that previously described lattice expansion could be a post-hydrolysis stage involved in P_i release.

Introduction

Microtubules (MTs) are ubiquitous cytoskeletal polymers built from α/β-tubulin heterodimers that assemble into a pseudo-helical cylinder. They are responsible for essential processes during cell growth and division, including chromosome segregation, intracellular transport, cell support and motility (***Desai and Mitchison, 1997***). MTs perform these functions by serving as scaffolds for other proteins and engaging mechanical forces through their dynamic behavior (***Gigant et al., 2000***; ***Koshland et al., 1988***). Due to its central role in cell biology, tubulin is a reference target for antitumor drugs that modulate protein dynamics. Therefore, understanding the molecular mechanisms of tubulin activation and deactivation is crucial to designing more effective compounds that overcome cell resistance and lower the toxicity of compounds in clinical use.

Tubulin exists in two different conformations related to its polymerization state: curved (depolymerized) and straight (assembled into MTs) (***Buey et al., 2006***; ***Gigant et al., 2000***;

Nawrotek et al., 2011; Rice et al., 2008). The binding and hydrolysis of guanosine nucleotides rule the polymerization-depolymerization of tubulin through chemical-linked conformational stages. GDP-tubulin remains inactive in the cytoplasm and the GTP exchange at the exchangeable site (E) on β-tubulin activates the α/β-heterodimers, providing interacting surfaces prone to the addition onto growing bent sheets or protofilaments (PFs) at the MT end (Chrétien et al., 1995; McIntosh et al., 2018). The formation of lateral contacts between PFs at the MT tip contributes to tubulin straightening (Nogales and Wang, 2006), which is key to creating a hydrolysis competent state (Nogales et al., 1998; Oliva et al., 2004). GTP hydrolysis at the E-site in β-tubulin induces conformational changes (Alushin et al., 2014) driving the 'peeling-off' disassembly of MTs (Chrétien et al., 1995; Mandelkow et al., 1991). MTs' continuous growth and shrinkage generate the motion of these filaments, which is known as dynamic instability (Mitchison and Kirschner, 1984a) and involves transient polymer intermediates adopting various nucleotide and conformational states, of which we are getting the first structural glimpses (Alushin et al., 2014; Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2018). The GDP-bound tubulin forming the body of the MT has a compact, straight and regular lattice, whereas the tip of the MT contains GTP- and GDP•P_i-bound tubulin molecules, and is known as the GTP-cap. This growing MT end varies in size (Duellberg et al., 2016b) and decreases in stability with age due to GTP hydrolysis and/or P_i release (Carlier et al., 1984; Duellberg et al., 2016b; Duellberg et al., 2016a; Gardner et al., 2011; Mitchison and Kirschner, 1984a; Padinhateeri et al., 2012). The GTP-cap prevents MT depolymerization but its lattice pattern is poorly understood. It has been described as having a tapered shape (Mandelkow et al., 1991) or as outwardly curved sheets (Atheton et al., 2018; Chrétien et al., 1995; Guesdon et al., 2016), although a recent study suggests flared, curved PFs at growing MT ends (McIntosh et al., 2018). It is believed that when GTPase activity reaches the tip and no new capping tubulins are added, MTs switch from growing to shrinking in a multi-step process (Schek et al., 2007; Walker et al., 1991) required for the GTP-cap to disappear.

Insight into the nature of the GTP-cap is fundamental to understanding the mechanisms governing MT dynamics and developing new modulating compounds targeting MTs. Here, we address this question using a combination of high- and low-resolution structural techniques with a biochemically controlled in vitro system applied to tubulin and MTs. The use of multiple γ-phosphate analogues (BeF_3^-, AlF_x) and nucleotides (GMPCPP, GMPPCP, GMPCP) allows us to develop systems that model MTs in their GTP-bound, transitional (GDP•P_i) and metastable (GDP-bound) states. In this model, all tubulin states would be compacted, which contrast with the widely accepted model of an expanded GTP-lattice that would compact after GTP hydrolysis (Alushin et al., 2014). We further propose that if previously observed lattice expansion actually occurs during cap maturation, it happens at a post-hydrolysis stage, between the transitional (GDP•P_i) and the metastable GDP-bound states, being an expanded intermediate conformational stage required for P_i release.

Results

Phosphate analogues mimic activation and transition states at the hydrolytic E-site

AlF_x and BeF_x are small inorganic molecules that mimic the chemical structure of phosphate (Bigay et al., 1987) and can bind and activate GDP-bound proteins (Díaz et al., 1997; Mittal et al., 1996). BeF_x complexes are strictly tetrahedral due to the sp3 orbital hybridization, whereas AlF_x is hexacoordinate (Coleman et al., 1994; Martin, 1988) and closely resembles the bipyramidal transition state of phosphate. We combined structural and biochemical studies to validate and correlate the complexes of GDP-tubulin with these γ-phosphate analogues, in both GTP-activated (BeF_3^-) and GDP•P_i transition (AlF_4^-/AlF_3) states.

To determine the crystal structure of GDP-tubulin bound to each of the γ-phosphate analogues, we used a tubulin complex with RB3 and TTL (Figure 1A), referred to T_2R-TTL (Prota et al., 2013a). We included a GDP exchange step during sample preparation (Díaz and Andreu, 1993) to ensure the GDP's presence at the E-site. Before setting crystallization plates, we incubated the GDP-T_2R-TTL complexes with either BeF_3^- or AlF_x (prepared in situ from mixtures of $AlCl_3$ and HKF_2 to avoid Al precipitation) to produce GDP-T_2R-TTL-BeF_3^- and GDP-T_2R-TTL-AlF_x complexes, respectively. We noticed that BeF_3^- and AlF_x cleared easily from the nucleotide-binding pocket during crystals

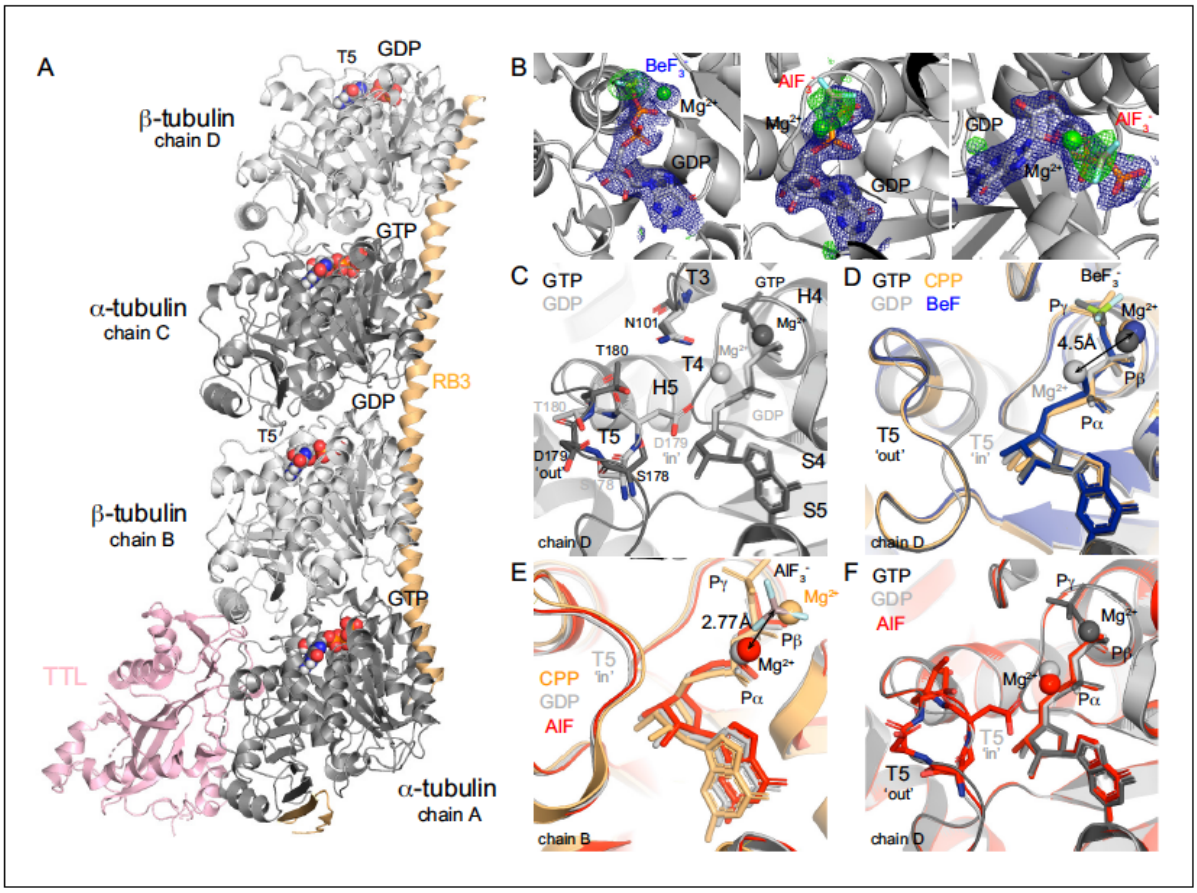


Figure 1. Structure of tubulin bound to GDP-phosphate analogues. (**A**) The T_2R-TTL complex includes one RB3 molecule (orange), one TTL molecule (pink) and two tubulin heterodimers: α-tubulin (dark gray, GTP-bound, chains A and C), β-tubulin (light gray, GDP-bound, chains B and D). (**B**) Composite omits maps of BeF_3^- (*left*) and AlF_3 (*middle* and *right*): mFo-DFc maps (blue, contour level 1.0) of nucleotide and Mg^{2+} ions combined with 2mFo-DFc maps (green, contour level 3.0) of the related phosphate analogues. (**C**) GTP (PDB 5xp3, black) and GDP- (PDB 4i55, gray) bound β-tubulin highlighting the localization of secondary structural elements surrounding the nucleotide-binding site according to ***Löwe et al. (2001)*** and alternative positions of T5 loop depending on the nucleotide-bound state. (**D**) Chain D alignment of GDP-BeF_3^- structure (blue) with CPP-bound (PDB 3ryh, orange), GTP-bound (black) and GDP-bound (gray) structures showing BeF_3^-/γ-phosphates co-localization, differences on the position of Mg^{2+} ions depending on the nucleotide-bound state (4.5 Å apart), and T5 loop in a GTP-like ('out') conformation. (**E**) Chain B alignment of GDP-AlF_3 (red) structure with CPP-bound (orange) and GDP-bound (gray) structures highlighting that AlF_3 sits out of the γ-phosphate site at 2.77 Å from the Mg^{2+} ion (in a position equivalent to that on the GDP-bound structure). (**F**) Chain D alignment of GDP-AlF_3 (red) structure with GTP-bound (black) and GDP-bound (gray) structures showing the dual conformation of T5 loops.

manipulation, which could be related to their low binding affinity to soluble curved tubulin (see below). After several attempts, we found the BeF_3^- and AlF_3 moieties at the E-site of chains D and B (***Figure 1A–B***), respectively.

The GDP-BeF_3^- structure (***Table 1***, data collection and refinement statistics), shows the phosphate analogue in a tetrahedral state at a distance from the β-phosphate that is similar to the distance observed between the β- and γ-phosphate atoms in the GTP-bound state (***Figure 1D***), and not further as expected for the transitional GDP•P_i state (***Wittinghofer, 1997***). Consistent with reported GTP- and GMPCPP-bound tubulin structures, one Mg^{2+} ion coordinates both the β-phosphate and the BeF_3^- in a position clearly different than that of GDP-bound tubulin structures (~4.5 Å apart,

Table 1. Data collection and refinement statistics.

	Native T_2R-TTL-AlF_3 (PDB 6s9e)	Native T_2R-TTL-BeF_3^- (PDB 6gZe)
Data collection		
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	104.999, 157.357, 180.261	104.176, 156.744, 180.587
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	48.003–2.25	49.458–2.49
R_{merge}	0.075 (1.222)	0.071 (1.159)
R_{pim}	0.025 (0.417)	0.028 (0.473)
I/σI	16.5 (1.8)	7.1 (0.6)
Completeness (%)	99.0 (99.0)	100 (100)
Redundancy	9.6 (9.2)	7.1 (7.0)
CC_{half}	0.979 (0.635)	0.999 (0.993)
Refinement		
Resolution (Å)	48.003–2.25	49.458–2.49
No. of reflections	140102	103915
R_{work}/R_{free}	0.2029/0.2278	0.2121/0.2565
No. of atoms	17701	16799
Protein	17279	16572
Ligand	223	175
Water	199	52
B-factors		
Protein	64.0	80.4
Ligand	59.5	73.0
Water	45.7	67.5
Wilson B	48.90	64.70
r.m.s deviation		
Bond lengths (Å)	0.002	0.003
Bond angles (°)	0.526	0.557
Ramachandran %		
Favor/allow/out	97.88/2.12/0.00	97.52/2.48/0.00

*Data were collected from a single crystal.
**Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Figure 1D). The GDP-BeF_3^- complex is stabilized via hydrogen bonds and salt bridges contacts with loops T1, T4, T6 (GDP) and T3 and T4 (BeF_3^-, *Table 2*). Importantly, loop T5 is in a 'flipped-out' conformation, leaving D179 exposed to the solvent and putting T180 closer to N101 in loop T3 (*Figure 1C–D*) as shown previously in GTP-bound tubulin (*Nawrotek et al., 2011*). Thus, our results suggest that BeF_3^- is a γ-phosphate analogue that mimics tubulin's GTP-bound state in the curved conformation, and not a GDP•P_i or intermediate transition state of hydrolysis.

The $AlCl_3$/HKF_2 mixtures we used produce roughly ~50% AlF_3 and ~50% AlF_4^- (*Goldstein, 1964*), and the related moiety was modeled as AlF_3 (*Table 1*, *Figure 1B*). Strikingly, this analogue did not occupy the position equivalent to the γ-phosphate as observed in other 'classic' GTPase structures of the GDP-AlF_3 complex (e.g. PDB 2ngr, 1grn, 2b92, 2g77, 4jvs and 4iru). Instead, we found the AlF_3 density beside the Mg^{2+} ion (at a distance of 2.77 Å, *Figure 1B*), which was simultaneously coordinating α- and β-phosphates (i.e., GDP coordination, *Figure 1E*, comparison with Mg^{2+}

Table 2. PDBePISA analysis of nucleotide-hydrogen bonding at the E-site.

	Curved conformation					Straight conformation				
	GTP (5xp3)	CPP (3ryh)	GDP (4i55)	BeF (6gze)	AlF (6s9e)	CPP (3jat)	CP (3jal)	GDP (3jar)	Gγs (3jak)	GDP•P_i (6evx)
Base and ribose	Q11 S140 N206 N228	S140 N228	Q15 N206 N228	N206 N228	N206 N228	N206 Y224 N228	S140 N206 Y224	Q15 S140 N206 Y224	Q15 S140 N206 Y224 N228	S140, N206 N228
Pα	Q11 C12	Q11 C12 S140	C12	C12	C12	Q11 C12	Q11 C12 S140	Q11 C12	C12	C12
Pβ	Q11 G144 T145 G146	Q11 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146	Q11 G144 T145 G146
Pγ/ BeF_3^-/ AlF_3/ P_i/	A99 G100 N101 G144 T145	A99 G100 N101 G144 T145	-	A99 G100 N101 T145	E71 N101 Pα	A99 G100 G144 T145	-	-	G144 T145	T145
Mg^{2+}	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no	no	no	no

positioning of GMPCPP (orange) and GDP (gray) structures). AlF_3 was further stabilized through interactions with loops T2 and T3 and α-phosphate. We hypothesize that this configuration likely represents a transitional stage of P_i release, where the Mg^{2+} ion removes the γ-phosphate while moving to a new coordination position between α- and β-phosphates. Loop T5 in chain B is blocked due to tubulin axial contacts (***Figure 1A***); however, at chain D, this loop refined in a dual conformation during the structure model-building: 57% in GTP-like 'flip-out' and 43% in GDP-like 'flip-in' conformations (***Figure 1F***, comparison with GTP- (black) and GDP-bound (gray) structures). Since, we did not find any extra density at this chain denoting the presence of the analogue, we presume that very likely the AlF_3 or AlF_4^- washed out and we captured loop T5 on its way back to the GDP-bound conformation.

Phosphate analogues induce tubulin activation upon assembly into MTs

We analyzed the effect of γ-phosphate analogues on tubulin activation through time-course turbidity experiments in which we measured the assembly of MTs from fully substituted calf-brain GDP-tubulin in the presence of increasing BeF_3^- or AlF_x concentrations (37˚C, no GTP added). Notice that our experiments were performed in MES buffer to avoid any competition effect of the commonly used phosphate buffer with the analogues (***Díaz and Andreu, 1993***). In this buffer condition, tubulin assembly requires glycerol under GTP (control experiments) or γ-phosphate analogues conditions, although GMPCPP does not require glycerol to induce assembly. In the presence of BeF_3^- GDP-tubulin activation occurred at analogue concentrations above 1 mM (***Figure 2A***), suggesting a binding constant on the scale of mM. The polymerization curves also revealed that longer lag times occur with BeF_3^- compared to GTP, indicating that nucleation is less efficient in the presence of GDP-BeF_3^-. This finding is also supported by the observation of fewer and longer MTs than in GTP control experiments (***Figure 2—figure supplement 1A***). However, we found that the equilibrium constant of addition of a tubulin dimer to the MT end is conserved as is shown by the fact that critical concentration (Cr) values (***Figure 2B***, 3.2 ± 0.4 μM vs. 2.9 ± 0.4 μM in GTP) remained similar across various BeF_3^- concentrations. Also, increasing Mg^{2+} concentration had a similar effect on the assembly under GDP-BeF_3^- and GTP conditions, displaying similar slopes in the Wyman plot (0.37, ***Figure 2C***). Thus, GDP-BeF_3^- behaves like a GTP-bound state with slower MT kinetics. Likewise, AlF_x induced tubulin activation with a binding constant in the mM range (***Figure 2D***, ***Figure 2—figure supplement 1B***), which might reflect the fact that part of the molecules had their loop T5 in a GTP-bound conformation according to the crystal structure of AlF_3 tubulin complexes. Previous studies showed similar equilibrium binding constants of addition to the MT, regardless of AlF_x concentration and the clear competition between both AlF_x and BeF_3^- for the same site on MTs (***Carlier et al., 1988***). These findings suggest that, (i) both γ-phosphate analogues likely display equivalent biochemical properties and; (ii) AlF_x might occupy the γ-phosphate site on the straight tubulin conformation.

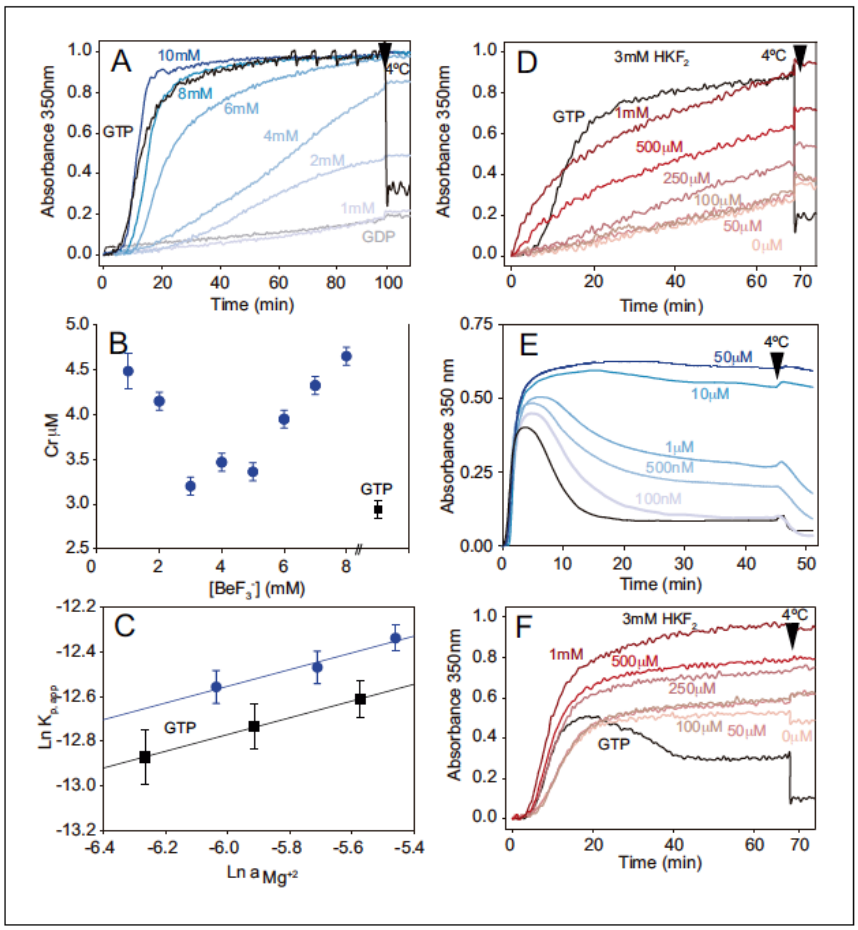


Figure 2. Phosphate analogues sustain tubulin activation and MT stabilization. **(A)** Time course assembly of 30 µM GDP-tubulin (gray line) with either 1 mM GTP (black line) or 1 mM GDP and increasing BeF_3^- concentrations (1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM and 10 mM; from light to dark blue). **(B)** Critical concentration (Cr) measurements of GDP-tubulin with 1 mM GTP (black square) or 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM and 8 mM BeF_3^- (blue circles). **(C)** Wyman plots showing the effect of increasing Mg^{2+} concentrations (4 mM, 5 mM, and 6 mM) on tubulin assembly (37˚C) in the presence of 1 mM GTP (black squares) or 1 mM GDP plus 3 mM BeF_3^- (blue circles). Positive slopes indicate that at increasing Mg^{2+} concentrations the ion incorporation into the filament is higher, and similar slope values (under BeF_3^- and GTP) indicate a similar Mg^{2+} dependency of the polymerization. **(D)** Time course assembly of 30 µM GDP-tubulin with either 1 mM GTP (black line) or 1 mM GDP, 3 mM HKF_2 and increasing concentrations of $AlCl_3$ (0 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1 mM; from light to dark red). **(E)** Time course assembly of 30 µM tubulin in the absence of free GTP (black line) and in the presence of increasing concentrations of BeF_3^- (100 nM, 500 nM, 1 µM, 10 µM and 50 µM; from light to dark blue) showing the stabilization effect of the analogue. **(F)** Time course assembly of 30 µM tubulin in the absence of free GTP and 0 mM HKF_2 (black line) or in the absence of free GTP with 3 mM HKF_2 and increasing concentrations of $AlCl_3$ (0 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1 mM from light to dark red). Aluminum contamination in nucleotides and glass induce MT stabilization even when no $AlCl_3$ was added (light red). Arrows in graphs **(A)**, **(D)**, **(E)**, and **(F)** indicate when samples were incubated at 4˚C.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. **(A)** Electron micrograph of MTs grown in the presence of GDP-tubulin and 6 mM BeF_3^-. The inset shows length estimations of MTs (units are µm, n > 50) from samples containing 30 µM GDP-tubulin with 2 mM, 4 mM, and 6 mM BeF_3^- (blue circles), or 1 mM GTP (black square). **(B)** Electron micrograph of MTs grown in the presence of GDP-tubulin with 3 mM HKF_2 and 1 mM $AlCl_3$. Bar is 200 nm.

Finally, we verified the effect of these γ-phosphate analogues on the stabilization of MTs assembled in the presence of 30 µM GTP. BeF_3^- inhibits MT disassembly at concentrations between 100 and 500 nM (*Figure 2E*) and hence, we estimate that the affinity of this γ-phosphate analogue for straight tubulin in assembled MTs (nM range, *Figure 2E*) is about three orders of magnitude higher than that for the curved GDP-bound, soluble protein (mM range, *Figure 2A*). These values correlate with those previously observed for Ras-like small GTPases where the binding affinity of BeF_3^- is in the mM range (*Díaz et al., 1997*), but increases to the µM range with the addition of the GTPase activating protein (GAP, *Mittal et al., 1996*). Interestingly, MTs were far more stable at BeF_3^-concentrations > 10 µM (i.e. the depolymerizing effect of non-physiological low temperatures disappeared, *Figure 2E*) likely because BeF_3^- is retained at the γ-phosphate pocket, providing a stable MT conformation in the absence of P_i release. When performing similar experiments to discern AlF_x affinity to straight polymerized tubulin, we found that it is at least two orders of magnitude higher than this for the curved state because MTs were fully stabilized at the lower $AlCl_3$ concentration we used, 50 µM (*Figure 2F*) and tubulin activation upon assembly still required 0.5 mM $AlCl_3$ (*Figure 2D*). Unfortunately, Al^{3+} contamination in the glass and nucleotides solutions (*Sternweis and Gilman, 1982*) prevented us from determining the strength of the interaction (*Figure 2F*).

Phosphate analogues reveal lattice features for the GTP/GDP•P_i-bound states

We used X-ray fiber diffraction of aligned filaments in solution to determine the structural details of MTs in various nucleotide-bound states, which gave us the direct correlation between biochemical and structural data. We performed quick shear-flow alignment using methylcellulose (*Sugiyama et al., 2009*) at a constant, physiological temperature of 37˚C, which allowed us to avoid temperature-related variations in axial repeat and filament diameter (*Kamimura et al., 2016*). We chose this technique because of the swiftness of getting results related to both the boundaries of the MT wall from the equatorial diffraction, and the axial repeats from the meridional diffraction (*Figure 3—figure supplement 1*; *Amos and Klug, 1974*; *Andreu et al., 1992*). Importantly, in these experiments, the signal-to-noise (S/N) ratio for the equatorial signals is very high because data includes the average of tens of millions of individual MTs. Therefore, we have estimated for the first time, the fraction of MT subpopulations according to their number of PFs (*Figure 3—figure supplement 1*, Materials and methods) using the J_{04} + J_{N1} signals.

We first studied MTs polymerized in the presence of either 1 mM GTP (GDP-MTs, due to GTPase activity) or 1 mM GTP + 100 µM taxol (GDP-Px-MTs) to analyze two known lattice conformations; compacted and expanded (*Alushin et al., 2014*; *Kellogg et al., 2017*). Under both experimental conditions, we found an axial tubulin repeat of 4 nm (*Figure 3A*, lines gray and brown and *Figure 3—figure supplement 2*). However, the 1 nm layer line, which is an harmonic of the 4 nm layer line, showed variations on their peaks distribution (*Figure 3A*, *inset*) indicating differences on the average monomer axial spacing between GDP-MTs and GDP-Px-MTs. The existence of a second weaker set of ~8 nm layer lines on GDP-Px-MTs further confirmed variations on the axial spacing between α- and β-tubulin. These experiments did not distinguish between intra-dimer (α-β) and inter-dimer (β-α) distances, but the averaged estimations of monomer lengths are similar to cryo-EM measurements (*Figure 4E*) and published cryo-EM structures (*Alushin et al., 2014*; *Kellogg et al., 2017*): 4.06 nm vs. 4.01 nm for GDP-MTs and 4.18 nm vs. 4.08 nm for GDP-Px-MTs. Otherwise, the analysis of the equatorial diffraction showed similar diameters for GDP- and GDP-Px-MTs (*Table 3*, *Figure 3B*), although we calculated a slightly different fraction of MT subpopulations according to the number of PFs (*Figure 3C*). The PF number has no effect on the longitudinal spacing (*Alushin et al., 2014*; *Zhang et al., 2015*), but does affect the MT helical twist (*Chrétien and Wade, 1991*). Notice that in our fiber diffracting images the 4 nm layer line is slightly curved, which could be related to the super-twist existing in MTs with skewed PFs (*Chrétien and Fuller, 2000*). However, we relate this effect to a partial (2–3˚) misalignment by shearing. Despite such differences, GDP- and GDP-Px-MTs displayed very alike PFs lateral spacing (*Table 3*), supporting the equivalent lateral contacts found in the aforementioned cryo-EM structures.

Second, we measured the main features of MTs polymerized in the presence of BeF_3^- or AlF_x. We analyzed both, MTs polymerized using γ-phosphate analogues (*Figure 2A and D*) as well as MTs assembled from GTP and stabilized by these same salts (*Figure 2E and F*), and found no substantial

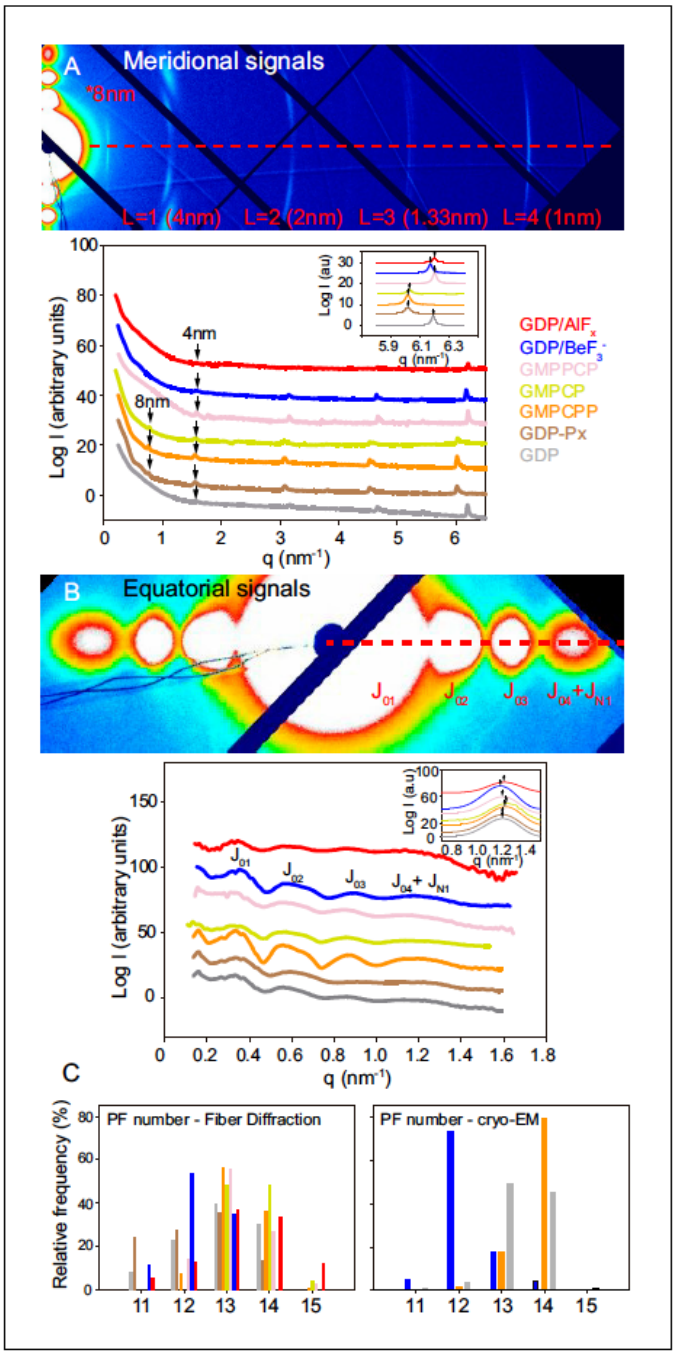


Figure 3. Fiber diffraction of MT models systems. GDP-BeF_3^--MT (blue), GDP-AlF_x-MT (red), CPC-MT (salmon), CP-MT (yellow), CPP-MT (orange), GDP-Px-MT (brown) and GDP-MT (gray). (**A**) *Top*; representative image (CCP-MTs) of meridional diffraction displaying the meridional plane from L = 1 (4nm) layer line and related harmonics (L = 2 to 4) for longitudinal metric calculations. *Bottom*; meridional intensity patterns, where arrows indicate the 4

Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

nm and 8 nm peaks. The inset shows the best fit of 1 nm band experimental intensities in a Lorentzian normal distribution, highlighting positional differences between all tested MT growing conditions (peaks maxima, arrows). (**B**) *Top*; representative image (CPP-MTs) of equatorial diffraction highlighting the equatorial plane (L = 0) for lateral metric calculations. *Bottom*; equatorial intensity patterns showing the corresponding Bessel functions from J_{01} to $J_{04}+J_{N1}$. The inset shows the J_{N1}, calculated as described in M and M, displaying the differences in peak maxima (arrows) that occur under various nucleotide polymerization conditions. The red dash line on (**A**) and (**B**) top images shows planes used for intensity line plotting in q_x space and further metric calculations. (**C**) Estimation of the number of PFs per MT and percentage of each subpopulation within the solution from fiber diffraction experiments (*left*) and cryo-EM images (*right*).

The online version of this artide includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. Shear-flow aligned fiber diffraction experiments.
Figure supplement 2. Shear-flow aligned fiber diffraction images.
Figure supplement 3. Shear-flow aligned fiber diffraction images of BeF_3^-- and AlF_x-MTs in the presence of taxol.

differences (***Table 3***). Our experiments support that GDP-BeF_3^- mimics the GTP-bound state. In addition, MTs stoichiometrically incorporate Be^7 (***Carlier et al., 1988***) so, all the subunits within BeF_3^--MTs must be in the GDP-BeF_3^- state. Strikingly, these MTs did not show the 8 nm layer line (***Figure 3A***, line blue), denoting similar intra-dimer and inter-dimer interfaces (***Table 3***), a clear opposition to the expanded-lattice model of the GTP-bound state displayed by the widely accepted GTP-like analogue, GMPCPP. The fitting of the 1 nm layer line revealed very subtle differences at peak maximum when compared to GDP-MTs, which could suggest minor differences on the axial spacing. The equatorial signals revealed that BeF_3^--MTs had a slightly smaller diameter and contained fewer average number of PFs than GDP-MTs (***Table 3***), mainly due to the lack of 14- and 15-PF MTs within the estimated population (***Figure 3C***).

AlF_x-MTs showed both, close intra-dimer and inter-dimer distances and roughly similar diameters to BeF_3^--MTs (***Table 3***), suggesting that there is not much of a difference between the GTP- and transition states, either in overall MT dimensions or at the axial interactions. However, AlF_x-MTs displayed an additional PF on average (***Table 3***) due to the presence of 14- and 15-PFs MTs.

Tubulin twist in MTs is a consequence of subtle changes in lattice parameters

Cryo-EM was used to get additional details on GDP-, BeF_3^-- and CPP-MTs. Since glycerol at high concentrations is incompatible with cryo-EM and that MT nucleation is difficult in BRB80 buffer in the absence of glycerol, we adopted a seeded assembly strategy. To avoid confusion between CPP- and BeF_3^- lattices, we eluded the use of heterogeneous seeds such as those classically prepared in the presence of GMPCPP. Instead, we first prepared BeF_3^--MT seeds in the presence of 25% glycerol, which were further diluted 1/10 in tubulin without glycerol. MT assembly was found to be efficient under these conditions (***Figure 4—figure supplement 1***), providing suitable conditions for cryo-EM observations. Importantly, depolymerization at 4°C showed a slower rate with respect to GDP-MTs, comparable to that observed with CPP-MTs, further confirming that BeF_3^- stabilizes MTs (even in a non MES-glycerol buffer, ***Figure 2E***).

Consistent with the X-ray diffraction analysis, we found that BeF_3^--MTs revealed a majority of 12-PFs MTs (73.1%, ***Figure 3C***), GDP-MTs contained essentially a mixed population of 13- and 14-PFs MTs (49.4% and 45.3%, respectively) and CPP-MTs showed mainly 14-PFs MTs (79.2%), which is consistent with precious observations (***Hyman et al., 1995***). Strikingly, in the presence of BeF_3^-, 14-PFs MTs were arranged according to 4-start monomer lattices (14_4), and 13-PFs MTs displayed a mixed population of 13_3 and 13_4 MTs (to be reported elsewhere). While 13_3 GDP-MTs had their PFs essentially parallel to the MT axis (***Figure 4A***, left), both BeF_3^-- (***Figure 4A***, middle) and CPP-MTs (***Figure 4A***, right) displayed systematically moiré patterns, implying that their PFs are skewed relative to the MT axis. Determination of the axial spacing of tubulin monomers from the position of the nominal '4 nm layer line' on the Fourier transform (FFT) of straightened MT images (***Figure 4B***) confirmed that GDP- and BeF_3^--MTs displayed compacted lattices (40.95 Å and 40.65 Å for the MTs in ***Figure 4A***, respectively), while CPP-MTs displayed an extended lattice (42.13 Å for the 13_3 CCP-MT in ***Figure 4A***). Further analysis of the '4 nm layer line' of these MTs (***Figure 4C–D***) and tilting

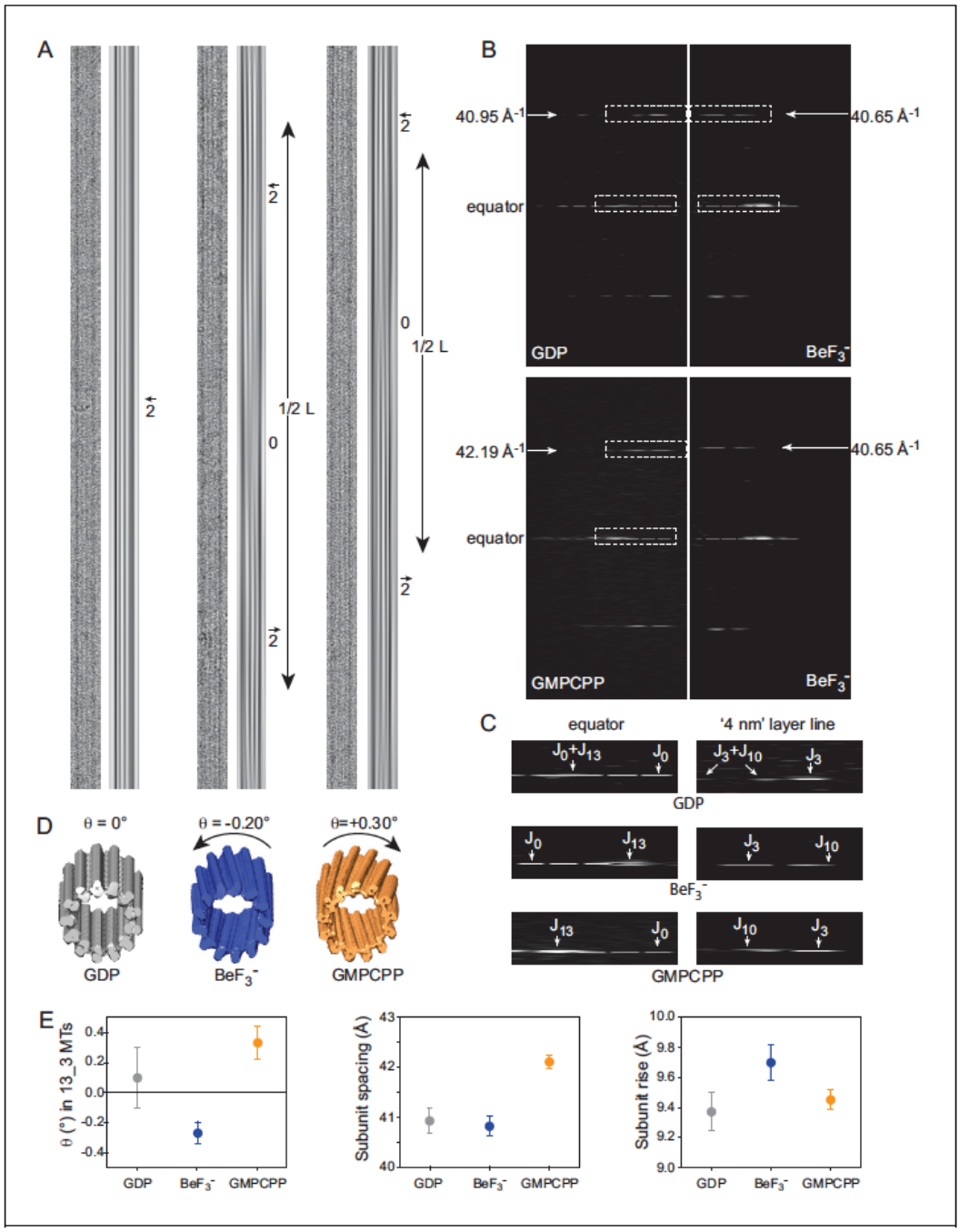


Figure 4. Cryo-EM of GDP-, BeF_3^--and CPP-MTs. (**A**) Straightened images of microtubules with 13 PFs (N) and 3-start monomer helices (S), denoted 13_3 (*N_S*) MTs. For each condition: raw image (*left*) and filtered image using the J_0 and J_N layer lines in the FFT of the microtubules (*right*). Filtered images of 13_3 GDP-MTs display 2 dark inner fringes running parallel to the MT axis and slightly offset from it (arrow), which correspond to PFs from the top and bottom surfaces superposed in projection. In BeF_3^-- and CPP-MTs, the 2 fringes make moiré patterns offset from the MT axis on one side

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

and the other separated by blurred regions (noted '0' for no internal fringes). The periodicity (L) of these moiré patterns provides a direct measure of their PF skew angle θ (***Equation 8***). (**B**) Comparison between the FFTs of the 13_3 GDP- *vs.* the 13_3 BeF_3^--MT (*top*), and the 13_3 CPP- *vs.* the 13_3 BeF_3^--MT (*bottom*) in A. The monomer spacing along PFs (*a* in ***Equation 9***) is given by the position of the J_3 layer line in Fourier space, that is 40.95 Å, 40.65 Å, and 42.19 Å for the 13_3 GDP-, BeF_3^-- and CPP-MTs in A, respectively. (**C**) Blow up of the equator and '4 nm layer lines' in 13_3 GDP- (*top*), BeF_3^-- (*middle*) and CPP-MTs (*bottom*), corresponding to the boxed regions in B. In 13_3 GDP-MTs, J_0 and J_N overlap on the equator, and J_3 and J_{10} overlap on the '4 nm layer line' since the PFs are parallel to the MT axis. In 13_3 BeF_3^-- and CPP-MTs, J_{13} is away from the equator due to the PF skew. In BeF_3^--MTs, J_{10} is closer to the equator than J_3, indicating that the PFs are left-handed (negative skew), while in CPP-MTs, J_{10} is farther apart from the equator than J_3, indicating that the PFs are right-handed (positive skew), (***Chrétien et al., 1996***). (**D**). 3D reconstructions of the 13_3 MTs in A using TubuleJ (***Blestel et al., 2009***). The 3D reconstructions were elongated to the same size as the original images and presented front face at a slight angle with respect to the MT longitudinal axis to emphasize the PF handedness in 13_3 GDP-MT (θ = 0˚), BeF_3^--MT (θ = - 0.20˚), and CPP-MT (θ = + 0.30˚). (**E**) *Left*: average PF skew angles of 13_3 GDP-MTs (θ = + 0.10 ± 20˚, n = 15), BeF_3^--MTs (θ = - 0.27 ± 0.07˚, n = 9), and CPP-MTs (θ = + 0.33 ± 0.11˚, n = 12). The average PF skew angle of 13_3 GDP_MTs must be lower since a majority of MTs did not show long enough moiré patterns that could be measured at the high magnification used. Therefore, their average PF skew angle is likely closer to 0˚. *Middle*: average monomer spacing along PFs in GDP-MTs (*a* = 40.93 ± 0.24 Å, n = 66), BeF_3^--MTs (*a* = 40.82 ± 0.20 Å, n = 103), and CPP-MTs (*a* = 42.10 ± 0.13 Å, n = 25). All *N_S* microtubule types were included in the analysis. *Right*: inter-PF monomer tubulin rise in GDP-MTs (*r* = 9.37 ± 0. 13 Å, n = 64), BeF_3^--MTs (*r* = 9.70 ± 0. 12 Å, n = 83), and CPP-MTs (*r* = 9.45 ± 0. 07 Å, n = 24) determined using ***Equation 9***. MTs with modified lateral interactions (essentially observed in 13_4 and 14_4 MTs in BeF_3^- conditions) were not included in this analysis (***Chrétien and Fuller, 2000***).
The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. additional cryo-EM data.

experiments (not shown) revealed that BeF_3^--MTs have left-handed PFs (J_{10} is closer to the equator than J_3), while CPP-MTs have right handed PFs (J_{10} is farther apart from the equator than J_3 [***Chrétien et al., 1996***]). The average PF skew angles of 13_3 GDP-, BeF_3^--, and CPP-MTs was found to be +0.10 ± 0.20˚, −0.27˚±0.17˚, and +0.33 ± 0.07˚, respectively (***Figure 4E***). These data can be interpreted in light of the lattice accommodation model (***Chrétien and Fuller, 2000***; ***Chrétien and Wade, 1991***) that describes how the MT lattice accommodates changes in PF and/or helical start numbers, as well as modifications of MT lattice parameters. The theoretical PF skew angle (θ_{the}) of any MT type can be calculated according to ***Equation 9*** (***Table 4***). While 13_3 GDP-MTs are predicted to have a PF skew close to 0˚, an increase of the tubulin monomer spacing *a* from 40.9 Å to 42.1 Å induces a positive skew of +0.37˚ similar to that found in CPP-MTs. Likewise, a slight modification of the inter-PF subunit rise *r* (***Equation 10***) from 9.37 Å (GDP-MTs) to 9.70 Å (BeF_3^--MTs) is sufficient to account for the negative PF skew (−0.31˚) observed in 13_3 BeF_3^--MTs. These features were observed in almost all MTs analyzed in this study (see the 12_3 and 14_3 MTs in ***Figure 4—figure supplement 1B–E***), although we note that MTs with large changes in inter-PF rise were also observed in the presence of BeF_3^- (essentially 13_4 and 14_4 MTs ***Chrétien and Fuller, 2000***). This analysis tells us that the positive PF skew observed in CPP-MTs with respect to GDP-MTs is a simple consequence of the increase in tubulin spacing, most likely due to the presence of the methylene group between the α and β phosphates of GMPCPP (see below), and not a conformational change induced by GMPCPP on tubulin.

Table 3. Fiber diffraction analysis of MTs in various nucleotide-bound states.

	GDP	GDP-Px	GDP-BeF_3^-	GTP-BeF_3^-	GDP- AlF_x	GTP-AlF_x	CPP	PCP	CP
radius (nm)	11.42 ± 0.10	10.87 ± 0.10	11.21 ± 0.25	11.16 ± 0.10	11.25 ± 0.84	11.18 ± 0.12	11.63 ± 0.10	11.62 ± 0.59	11.75 ± 0.53
avg. PF number	12.91 ± 0.10	12.37 ± 0.10	12.29 ± 0.20	12.23 ± 0.10	13.43 ± 1.12	13.35 ± 0.13	13.29 ± 0.08	13.03 ± 0.91	13.55 ± 0.45
inter-PF distances (nm)	5.50 ± 0.03	5.45 ± 0.01	5.67 ± 0.09	5.67 ± 0.02	5.21 ± 0.46	5.22 ± 0.05	5.45 ± 0.03	5.55 ± 0.38	5.40 ± 0.02
avg. monomer length (nm)	4.06 ± 0.01	4.18 ± 0.01	4.07 ± 0.01	4.07 ± 0.01	4.05 ± 0.05	4.05 ± 0.01	4.18 ± 0.01	4.06 ± 0.01	4.17 ± 0.01
1 nm band peak position (nm^{-1})	6.19 ± 0.01	6.02 ± 0.01	6.17 ± 0.01	6.17 ± 0.01	6.20 ± 0.05	6.20 ± 0.01	6.02 ± 0.01	6.20 ± 0.01	6.03 ± 0.01

*Values are Avg ± StdErr.

Table 4. Comparison between experimental and theoretical PF skew angles.

	Gdp		BeF_3^-		Gmpcpp	
MT type	**13_3**	**14_3**	**12_3**	**13_3**	**13_3**	**14_3**
θ_{exp}	+0.10 ± 0.21 (n = 15)	−0.62 ± 0.05 (n = 27)	+0.60 ± 0.05 (n = 52)	−0.27 ± 0.07 (n = 9)	+0.33 ± 0.11 (n = 12)	−0.51 ± 0.04 (n = 12)
θ_{the}	+0.05	−0.74	+0.61	−0.31	+0.37	−0.44

Theoretical PF skew angles (θ_{the}) were calculated according to ***Equation 9***, using a = 40.9 Å, r = 9.4 Å, and δx = 48.95 Å for GDP-MTs. For GMPCPP MTs, the monomer spacing a was increased to 42.1 Å, and for BeF_3^- the inter-PF subunit rise was increased to 9.7 Å.

MT lattice expansion is not related to its GTP-bound state

GMPCPP has traditionally been considered a good approximation of the GTP-bound state (CPP-MTs) (***Alushin et al., 2014***; ***Hyman et al., 1992***; ***Kamimura et al., 2016***; ***Zhang et al., 2015***), which led to a model in which GTP-tubulin is in an expanded state at the tip of the MTs, and undergoes a compaction followed by rotation between the α and β subunits upon GTP hydrolysis and P_i release, respectively (***Zhang et al., 2015***). Our results suggest that the GTP-state (GDP-BeF_3^-) is compacted (***Figure 1 and 3***), and that the twist of tubulin in CPP-MTs is a simple consequence of the accommodation of the lattice to the increase in size of CPP-tubulin (***Figure 4***, ***Table 4***). We then asked what was the origin of the increase in size in CPP-tubulin. To address this question, we analyzed the structure of MTs assembled in the presence of GMPPCP (PCP-MTs) that is similar to GMPCPP, but with the methylene group sitting between β and γ phosphates instead of α and β phosphates and GMPCP (CP-MTs), which is the hydrolyzed version of GMPCPP. X-ray fiber diffraction analysis of CPP-MTs and PCP-MTs (***Table 3***) highlighted that both GTP analogues generated a similar overall cylinder structure showing equivalent PF number composition in which there were no 11-PF MTs and in which 13- and 14-PF MTs prevailed over 12-PF MTs (***Figure 3C***). CPP-MTs displayed a second set of ~8 nm layer lines (***Figure 3A***, ***Figure 3—figure supplement 2***), indicating differences between α- and β-tubulin axial spacing, with a monomer repeat that nicely correlates with corresponding measurements from cryo-EM and recently published nude-MT cryo-EM structures (***Zhang et al., 2018***): 4.18 nm vs. 4.22 nm. By contrast, PCP-MTs diffracting images did not show the ~8 nm layer lines (***Figure 3A***, ***Figure 3—figure supplement 2***) and a non-expanded lattice and hence, a MT structure equivalent to the BeF_3^-- and GDP-MTs (***Table 3***). Strikingly, the diffraction pattern of CP-MTs was similar to that of CPP-MTs, showing the 8 nm layer line and an expanded state (***Figure 3***, ***Table 3***). Taken all together, these data tell us that: (i) lattice expansion is not related to the presence of γ-phosphate (i.e. a GTP-bound state) and (ii) the methylene in between the α and β phosphates in CPP- and CP-MTs is likely responsible for increasing the size of the tubulin molecule.

We further found that MTs polymerized in the presence of 0.1 mM GTP + 100 µM taxol showed a nucleotide content of GTP(α):GDP(β), 1.08 ± 0.02: 1.04 ± 0.01, similar to other taxane site agents (***Alushin et al., 2014***; ***Field et al., 2018***). Since GTP hydrolysis requires a close intra-dimer distance to fulfill the catalytic pocket (***Nogales et al., 1998***; ***Oliva et al., 2004***), this result suggests that taxol-induced expansion may happen after GTP hydrolysis. Interestingly, we found that BeF_3^-- and AlF_x-MTs assembled in the presence of 100 µM taxol displayed compact lattices (***Figure 3—figure supplement 3***, ***Table 5***), bringing up that this drug cannot induce lattice expansion when the interplay between loop T7 and any of these γ-phosphate analogues is retained at the inter-dimer interface.

Table 5. Taxol bound BeF_3^-- and AlF_x-MTs.

	GDP-BeF_3^-	GTP-BeF_3^-	GDP- AlF_x	GTP-AlF_x
Average monomer length (nm)	4.03 ± 0.01	4.03 ± 0.01	4.04 ± 0.05	4.04 ± 0.01
1 nm band peak position (nm^{-1})	6.24 ± 0.01	6.24 ± 0.01	6.22 ± 0.05	6.22 ± 0.01

Discussion

The functions of MTs during cell proliferation and development require continuous rescue and catastrophe events that give rise to motion through dynamic instability. Microtubule-associated proteins (MAPs) finely regulate MT function by stabilizing, guiding and destabilizing MT formation, as well as mediating both MT-MT and MT-protein interactions. Plus-end-tracking proteins (+TIPS) are a type of MAP that stabilize or balance MTs; their functions rely on unique structural determinants at the lattice of the MT tip (**Maurer et al., 2011**; **Maurer et al., 2012**; **Zanic et al., 2009**). Thus, understanding these specific structural features is crucial to gain insight into both the mechanisms of MT stabilization and the process of catastrophe.

Incorporation of tubulin dimers into the MT tip forms a cap of not yet hydrolyzed GTP subunits that re-arrange from a naturally bent state to a straight conformation for GTP hydrolysis. The region where this transitions occurs is called the GTP-cap, an uneven structure that can extend along hundreds of nanometers (**Duellberg et al., 2016b**) and ends in an open sheet or flared PFs at the tip (**Chrétien et al., 1995**; **McIntosh et al., 2018**). Recent data point to the formation of one lateral contact as the key interaction favoring length-wise PF growth (**Mickolajczyk et al., 2019**), which occurs 10–50 nm from the growing tip of the PF (~1–7 tubulin heterodimers (**Erickson, 2019**; **McIntosh et al., 2018**). Tubulin straightening is not a single step change but a gradual process (**Figure 5A**), proportional to the increasing formation of lateral interactions in PFs (**Brouhard and Rice, 2018**; **Guesdon et al., 2016**; **Jánosi et al., 1998**). In this process, GTPase activity occurs upon tubulin fully-straighten because this unique conformation allows the interplay of the α-tubulin catalytic loop (T7) and the γ-phosphate at the E-site in β-tubulin (**Nogales et al., 1998**; **Oliva et al., 2004**), meaning the curled tip might be on the GTP-bound state. However, the transitional nature of GTP-cap architecture is difficult to overcome experimentally. Common approaches include the use of homogeneous model states of the MTs. In this work, we used a broad range of nucleotide-bound model MTs to understand their structure throughout the GTPase cycle (**Figure 5A**): active upon assembly GTP-bound (GDP-BeF_3^- and GMPPCP), transitional GDP•P_i (GDP-AlF_x), metastable GDP (GTP-assembled MTs), and expanded (GMPCPP, GMPCP and GDP-Px, see below). Our results merge into a cap model (**Figure 5B**) in which each modeled MT mimics the structural transformations of the filament during elongation, according to the natural biochemical changes caused by GTPase activity.

The existing cap model is based on the commonly accepted GMPCPP analogue as a *bona fide* model of the GTP-bound state and proposes an initial right-handed, expanded lattice (**Alushin et al., 2014**) that rapidly shrinks and changes twist direction upon hydrolysis during the transition state (exemplified by nude GTP-γ-S-MTs (**Zhang et al., 2018**) or doublecortin-bound GDP•P_i-MTs **Manka and Moores, 2018**). GMPCPP induces a far stronger assembly than that from GTP (**Hyman et al., 1992**), and MTs are stable because this GTP analogue is not easily hydrolysable, despite of a normal oxygen link between β and γ-phosphates. Whether the enhanced activity is due to the lower GTPase rate or the presence of a methylene link between α and β-phosphates is not clear, though it might be related to the expansion because taxol is also a strong tubulin assembly inducer and produces lattice expansion.

Our approach included γ-phosphate analogues that mimic the chemical structure of phosphates on the activation and transitional states, which we structurally and biochemically analyzed on our tubulin system. These data support that, instead of the commonly accepted model, MTs in the GTP-bound state display a compact configuration (**Figure 5B**, blue). Control experiments with the GTP analogue GMPPCP and with the GDP-analogue GMPCP, confirmed that expansion is due to the presence of the methylene link between α and β-phosphates rather than because of the presence of the γ-phosphate. In our proposed model, the lattice during the transition state of hydrolysis (**Figure 5B**, red) remains unchanged, despite a possible modification at the inter-PF angle. The GDP•P_i state likely sits between the tapered end and the fully closed, cylindrical end. Its average length is difficult to determine but is considered long according to cap-length estimations made using EB proteins (**Duellberg et al., 2016b**; **Seetapun et al., 2012**). Meanwhile, the only difference observed between BeF_3^-- and GDP-MTs (**Figure 5B**, gray) is a slight modification of the PF skew (**Figure 4D–E**). Therefore, no substantial lattice changes occur between the cap and the MT core apart from subtle modifications of the PF skew or the displacement of Mg^{2+} ion coordination across β-γ and α-β phosphates.

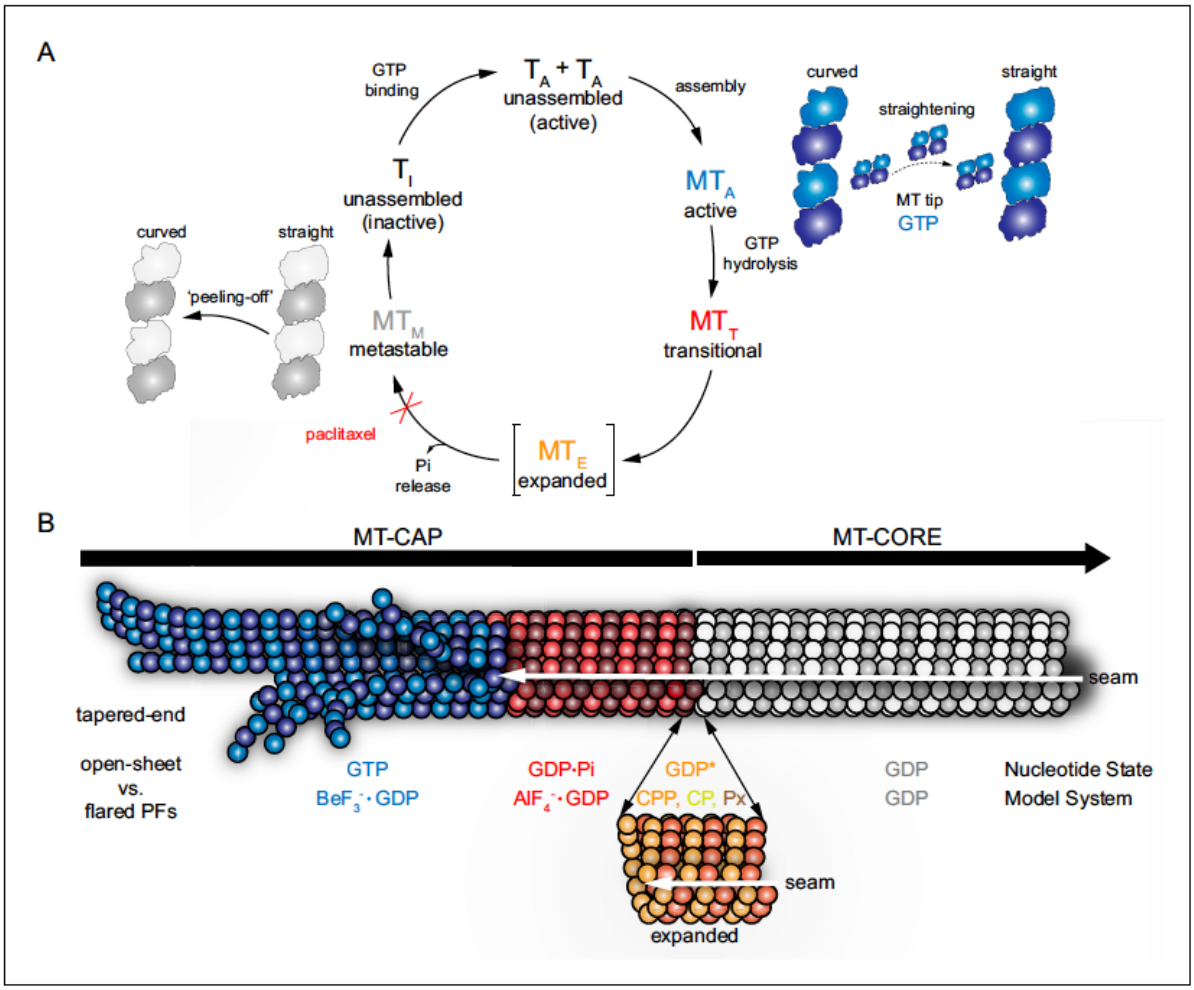


Figure 5. Cap model derived from MT model systems. GTP-bound state (BeF_3^-, blue), transition state (AlF_x, red), expanded state (GMPCPP, GMPCP, GDP-Px, orange), and GDP-bound state (gray). (**A**) Schematic GTPase related conformational changes within the MT lattice. Tubulin activation upon GTP binding (T_A) induces polymerization. During assembly (MT_A), the formation of lateral contacts favors tubulin straightening, which allows GTP hydrolysis. GTPase activity drives MT through a transitional state (MT_T), where the P_i is at the nucleotide-binding site before it is released. Expansion (orange) may be an intermediate transient step between GDP•P_i and GDP states, which may facilitates P_i release (MT_E) and would be blocked in the presence of taxol. GDP-MT (MT_M) shrinks through a 'peeling-off' disassembly in which tubulin reverts to the curved conformation, which is inactive (T_i) in the GDP-bound state. (**B**) MT model illustrating specific lattice features of the GTPase cycle. This mosaic structure shows that: (i) the GTP-bound tip (blue) contains curved PFs/sheets that come together into a straight lattice due to the formation of lateral contacts, (ii) the post-hydrolysis GDP•P_i lattice (red) retains overall MT structure, (iii) hypothetically, lattice undergoes an energy-consuming expansion phase (orange) that contributes to P_i release, and (iv) in the GDP state (gray) subtle changes on the PF skew distinguish the metastable compact lattice or, (v) lattice reverts into its previous lower energy state (compaction), preventing the structure from returning to the cap architecture.

It should be mention that the expanded conformation is not limited to mammalian CPP-, CP- and GDP-Px-MTs. It also has also been captured in GDP-MTs from yeast and worm (***Chaaban et al., 2018***; ***Howes et al., 2017***; ***von Loeffelholz et al., 2017***), suggesting that this lattice state might not be an artifact. Hence, when or where does this conformational change occur? We propose a plausible explanation considering data arising from the interaction of EB proteins with MTs and recent results on taxanes-binding to the MT cap. EB proteins interact with both, curved and straight regions

at MT ends (*Guesdon et al., 2016*), likely recognizing the MT compact lattice, because they bind preferentially to MTs in the presence of GDP-BeF_3^- and GTP-γ-S over GMPCPP (*Maurer et al., 2011*; *Zhang et al., 2015*). Besides, EB proteins form an extended 'comet' that decays exponentially with increasing distance from the tip (*Seetapun et al., 2012*), which highlights their gradual release from the MT wall, with no clue about the structural-chemical determinant inducing such pattern of release. Additionally, it has been shown that fluorescent taxanes bind to the MT region behind the EB 'comet' (*Rai et al., 2019*). From the thermodynamical point of view, if a drug induces a specific conformation, it will bind with higher affinity to this kind of structure, because none of the free energy of binding will be required to induce such conformational change. This implies that taxanes should bind preferentially to expanded lattices because they do induce lattice expansion (*Alushin et al., 2014*). Similarly, EBs might induce lattice compaction (their favored lattice state) in CPP-MTs, causing nucleotide hydrolysis (*Zhang et al., 2018*). Hence, it could be possible that the MT region behind EB-binding site would be expanded, favoring taxanes binding and EBs release. We show that MT lattice is compact among the tubulin GTPase cycle. Therefore, lattice expansion, if existing, might be between two of the main nucleotides bound states (GTP, GDP•P_i and GDP). Since the presence of γ-phosphate analogues (BeF_3^- or AlF_x) reverts taxol-induced expansion (*Figure 5A–B*, orange), we speculate that expansion might be an intermediate state between the MT's cap (GDP•P_i) and core (GDP) regions, able to facilitate P_i release (*Figure 5B*). Note that, on the stabilization experiments, the γ-phosphate analogues immediately replace the released P_i and so, no expansion of the compact GDP lattice is needed to justify the biochemical stabilization observed.

Considering the narrow region labeled by these taxanes (*Rai et al., 2019*), it could be argued that lattice expansion might involve only few tubulin molecules likely randomly distributed, which has precluded the detection of expansion on cryo-EM images of the MTs tips. If existing, lattice expansion would be likely the point of no return for the GTP-cap as a stabilizing structure. Thereby, once the MT compacts and returns to the GDP-bound state (*Figure 5B*, gray), the remaining energy stored in the lattice would be enough to exert the peeling-off disassembly of PFs, but below the threshold for the MT to revert to the expanded state. Notice that the 'peeling-off' disassembly is highly efficient and uses only 25% of the energy from the GTPase activity (*Driver et al., 2017*) *Brouhard and Rice, 2018*).

The GTP-cap is a unique structure that governs MT dynamics; our model depicts a mosaic architecture that undergoes various maturation steps according to tubulin GTPase activity. While GTP binding activates assembly, GTP hydrolysis produces energy, part of which could be used for P_i release, and limits the length of the cap. The presence of an expanded lattice in GDP-MTs of yeast and worm might be a consequence on the delay or inability to return to the compact state, which could be related to the differences observed on lateral contacts between PFs (*Chaaban et al., 2018*). At the moment, we do not know how is the GTP-MT lattice on these organisms and additional studies are necessary to confirm a compact-to-expanded conformational change upon P_i release, although we cannot rule out that MT lattice could be more expanded in other organisms different than mammals. Beyond this study, high-resolution structural studies will be crucial to analyze the exact nature of protein-protein interactions at the tip of the cap and to fully understand the feedback between structural modifications driven by partner proteins that otherwise are regulating MT dynamics.

Accession codes

Data deposition: Atomic coordinates and structure factors for the reported crystal structures have been deposited at the Protein Data Bank under the accession code 6gze (BeF_3^-) and 6s9e (AlF_3).

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Biological Sample	Tubulin alpha	Uniprot	P81947	purified from calf-brain
Biological Sample	Tubulin beta	Uniprot	Q6B856	purified from calf-brain
Gene (*Rattus norvergicus*)	Stathmin-4	Uniprot	P63043	Overexpression in *E. coli*
Gene (*Gallus gallus*)	Tubulin-Tyrosine Ligase	Uniprot	E1BQ43	Overexpression in *E. coli*
Chemical compound, nucleotide	GMPCPP	Jena Bioscience	Jena Bioscience: GpCpp- NU405	
Chemical compound, nucleotide	GMPPCP	Jena Bioscience	Jena Bioscience: GppCp NU-402	
Chemical compound, nucleotide	GMPCP	Jena Bioscience	Jena Bioscience: GpCp NU-414	
Chemical compound, drug	paditaxel	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich:T7191	
Software, algorithm	XDS	http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/	RRID:SCR_015652	
Software, algorithm	AIMLESS	https://www.ccp4.ac.uk/	RRID:SCR_015747	
Software, algorithm	PHASER	https://www.phenix-online.org/documentation/reference/phaser.html	RRID:SCR_014219	
Software, algorithm	PHENIX	https://www.phenix-online.org/	RRID:SCR_016736	
Software, algorithm	COOT	https://www.ccp4.ac.uk/	RRID:SCR_014222	
Software, algorithm	PDBePISA	https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/	RRID:SCR_015749	
software, algorithm	ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/	RRID:SCR_003070	
Software, algorithm	XRTools	BM26-DUBBLE, ESRF		
Software, algorithm	TubuleJ	https://team.inria.fr/serpico/software/tubulej/		

GDP-, GMPCP and GMPPCP-tubulin preparation

Purified calf brain tubulin, and chemicals were as described (***Díaz and Andreu, 1993***). Placlitaxel was from Sigma-Aldrich. GMPCP, GMPCPP and GMPPCP were from Jena Biosciences (Jena, Germany). Nucleotides were analyzed by HPLC as described (***Smith and Ma, 2002***). GMPCP was found to be free of GMPCPP and GTP, and GMPPCP was free of GTP. Fully substituted GDP-tubulin was prepared by a two-step interchange procedure; trehalose, Mg^{+2} and free GTP were removed by size exclusion chromatography in a drained centrifuge column of Sephadex G-25 medium (6 × 1 cm), equilibrated in MEDTA buffer (100 mM MES, 1 mM EDTA, pH 6.7) with 1 mM GDP, at 4˚C. GDP up to 10 mM was added to the protein, which was incubated for 30 min on ice. Tubulin was freed of nucleotide excess and equilibrated in MEDTA buffer with 1 mM GDP by a second chromatography in a cold Sephadex G-25 column (15 × 0.9 cm). The nucleotide content of the protein was quantified

by protein precipitation and HPLC as described (*Díaz and Andreu, 1993*) and was found to be 0.98 ± 0.07 mol GTP/mol tubulin, and 0.99 ± 0.06 mol GDP/mol tubulin. Alternatively fully substituted GDP-tubulin was obtained from GTP-tubulin by hydrolysis. GDP tubulin was equilibrated in a 20 × 1 cm Sephadex G-25 column equilibrated in MEDTA buffer with 3.4 M Glycerol. The nucleotide content of the protein was measured as above and was found to be 0.24 ± 0.02 mol GDP/mol tubulin and 1.75 ± 0.06 mol GTP/mol tubulin. The protein was diluted to 30 µM and supplemented with 6 mM Mg^{+2} (final pH 6.5) to induce polymerization into MTs by incubating at 37˚C. The assembly was monitored turbidimetrically at 350 nm. Protein assembled into MTs (as checked by electron microscopy) and rapidly disassembled after hydrolysis of the bound nucleotide. Samples were taken at the peak of assembly (Sample A) and after complete disassembly (Sample B). The nucleotide content of the protein was measured as above and was found to be 1.01 ± 0.02 mol GDP/mol tubulin and 0.99 ± 0.03 mol GTP/mol tubulin (Sample A) and 0.96 ± 0.04 mol GDP/mol tubulin and 1.00 ± 0.03 mol GTP/mol tubulin (Sample B). Prior to assembly, tubulin samples were centrifuged at 100,000 *g*, 4˚C, for 10 min using TL100.2 or TL100.4 rotors in a Beckman Optima TLX centrifuge to remove aggregates. GMPCP and GMPPCP tubulin preparation were performed by a two-step protocol based on *Mejillano et al. (1990)*. First, 20 mg of lyophilized calf brain tubulin were resuspended in PM buffer (80 mM K-PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol 0.2 mM Tris, pH 6.8) containing 2 mM GTP and 1.5 mM $MgCl_2$, in order to get the GDP bound to the protein substituted by GTP due to its higher affinity in the presence of Mg^{+2} ions (*Correia et al., 1987*). Then, the free Mg^{+2} and GTP were removed by chromatography in a drained column of Sephadex G-25 (GE Healthcare) (6 × 1 cm), equilibrated in PM buffer containing 50 nM of the desired analogue, two times washing steps by filtration using Amicon MWCO 50 (Merck-Millipore), and concentrated to 700–800 µl. The protein was then passed through 0.45 µm cellulose acetate microfuge column filters (Costar) to remove aggregates. Then 5 mM of the desired nucleotide analogue was added to displace the GTP bound (due to its lower affinity in the absence of Mg^{+2}) and the protein was incubated for 30 min at 25˚C. The protein was washed and concentrated as before to 600–700 µl and filtered again on a 0.45 µm cellulose acetate microfuge column filter to a final concentration 100–150 µM. After filtration, the protein was HPLC analyzed as described (*Smith and Ma, 2002*) and was found to be 90% loaded with the desired nucleotide at the E-site. In order to induce MT assembly, tubulin was supplemented with 2 mM GMPCPP, GMPCP or GMPPCP and 3 mM $MgCl_2$ prior to polymerization.

Crystallization and crystal structure determination

The stathmin-like domain of RB3 and the chicken TTL protein preparations were done as described previously (*Prota et al., 2013b*; *Ravelli et al., 2004*). For the T_2R-TTL complex, tubulin (8 mg/mL), TTL (17 mg/mL) and RB3 (26 mg/mL) were mixed and concentrated (Amicon MWCO 10) at 4˚C to a final complex concentration of 20 mg/ml. The concentrated mixture was supplemented with 10 mM DTT, 0.1 mM GDP, 1 mM AMPCPP and 5 mM BeF_3^- (in T_2RT- BeF_3^- complex), or 1.5 mM $AlCl_3$ and 2 mM HKF_2, or 500 µM $AlCl_3$, 2 mM HKF_2 (in T_2RT- AlF_x complex), before setting crystallization experiments. Initial crystallization conditions were determined from previous structures (*Prota et al., 2014*; *Prota et al., 2013a*; *Prota et al., 2016*) using the sitting-drop vapor diffusion technique with a reservoir volume of 200 µl and a drop volume of 1 µl of complex and 1 µl of reservoir solution at 20˚C. Crystal-producing conditions were further optimized using the hanging drop vapor diffusion method with a reservoir volume of 500 µl and a drop volume of 1 µl of complex and 1 µl of reservoir solution. Native T_2R-TTL-BeF_3^- complex was crystallized in 0.1 M MES/0.1 M Imidazole pH 6.5, 0.03 M $CaCl_2$/0.03 M $MgCl_2$, 5 mM L-tyrosine, 8.8% glycerol, 5.5% PEG4000. T_2R-TTL-AlF_x complex was crystallized in 0.1 M MES/0.1 M Imidazole pH 6.5, 0.03 M $CaCl_2$/0.03 M $MgCl_2$, 5 mM L-tyrosine, 5% glycerol, 5.5% PEG4000 500 µM $AlCl_3$, 2 mM HKF_2 (alternatively 1.5 mM $AlCl_3$ and 2 mM HKF_2 were used). Plates were kept at 20˚C and crystals appeared within the next 24 hr. Prior flash-cooling in liquid nitrogen, crystals were cryo-protected using 10% PEG4000, increasing glycerol concentrations (16% and 20%), and were supplemented with 7.7 mM BeF_3^- or 500 µM $AlCl_3$ and 2 mM HKF_2 or 1.5 mM $AlCl_3$ and 2 mM HKF_2 depending on the growing conditions. X-ray diffraction data were collected on beamline ID23-1 of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) and beamline XALOC of ALBA Synchrotron. Diffraction intensities were indexed and integrated using XDS (*Kabsch, 2010*), and scaled using AIMLESS (*Winn et al., 2011*). Molecular replacement was performed with PHASER (*McCoy et al., 2007*) using the previously determined structure (PDB 4o2b) as

a search model. Structures were completed with cycles of manual building in COOT (**Emsley et al., 2010**) and refined in PHENIX (**Adams et al., 2010**), which allowed the determination of alternative conformations on different residues at main chains. Data collection and refinement statistics are summarized in **Table 1**. The ligand interfaces of this structure and other tubulin structures in the curved (PDBs 5xp3, 3ryh, 4i55) or straight (PDBs 3jat, 3jal, 3jar, 3jak, 6ecx) conformations were analyzed using PDBe PISA (**Krissinel and Henrick, 2007**). Omit maps were calculated in PHENIX using Cartesian annealing and harmonic retrains on the omitted atoms (BeF_3^- or AlF_3).

Microtubule assembly and Cr determination

Tubulin (calf brain purified or fully GDP- exchanged as described above) was exchanged into MEDTA buffer and mixed at a 60:40 ratio with a 8.5 M glycerol, 100 mM MES, 1 mM EDTA buffer pH 6.7 (final buffer concentrations 100 mM MES, 3.4 M glycerol, 1 mM EDTA, 0.6 mM GDP, pH 6.7). These samples were supplemented with $MgCl_2$ and increasing concentrations of BeF_3^-, 3 mM HKF_2 plus increasing concentrations $AlCl_3$, 30 µM GTP plus increasing concentrations of BeF_3^- or 30 µM GTP plus 3 mM HKF_2 plus increasing concentrations of $AlCl_3$. The solutions were warmed up to 37˚C, and incubated as long as needed to reach polymerization equilibrium. The assembly was monitored by turbidity at a wavelength of 350 nm. Alternatively, the polymers formed were sedimented at 100,000 *g* for 20 min in a TLA 100 rotor equilibrated at 37˚C. Supernatants were separated by aspiration, and pellets were resuspended in a 1% SDS, 10 mM phosphate buffer. Tubulin concentration in pellets and supernatants was measured spectrofluorometrically by excitation at 280 nm and emission at 320 nm (**Buey et al., 2005**) employing a Shimadzu RF-540 fluorometer (excitation and emission slits, 5 nm) calibrated with standards of known concentration prepared from the same tubulin. Apparent polymer growth equilibrium constants were estimated as the reciprocal of the critical concentrations for polymerization determined at several total protein concentrations (**Oosawa, 1975**).

MT shear-flow alignment and X-ray fiber diffraction experiments

X-ray fiber diffraction data were collected on beamlines BL11-NDC-SWEET and BL40XU of ALBA (Spain) and SPring-8 (Japan) synchrotrons. Purified bovine brain tubulin (5 mg) was diluted in 500 µL to a final concentration of 100 µM on PM buffer containing 3 mM $MgCl_2$ and either 2 mM GTP, 0.5 mM GMPCPP, 5 mM GMPCP, 5 mM GMPPCP, 2 mM GTP + 10 mM BeF_3^-, 2 mM GTP + 500 µM $AlCl_3$ + 2 mM HKF_2, 2 mM GTP + 200 µM taxol, 2 mM GTP + 10 mM BeF_3^- + 200 µM taxol or 2 mM GTP + 500 µM $AlCl_3$ + 2 mM HKF_2 + 200 µM taxol. GDP-tubulin was obtained from GTP-tubulin by hydrolysis as described above, and then supplemented with 1 mM GDP + 10 mM BeF_3^- or 1 mM GDP + 500 µM $AlCl_3$ + 2 mM HKF_2. All samples were incubated for 20 min at 37˚C to induce the maximum fraction of polymerized tubulin, and then were mixed in a 1:1 vol ratio with PM buffer at 3 mM $MgCl_2$ containing 2% methylcellulose (MO512; Sigma-Aldrich). Final concentration of nucleotides, salts and drugs were 1 mM GTP, 0.25 mM GMPCPP, 2.5 mM GMPCP/GMPPCP, 1 mM GTP + 10 mM BeF_3^-, 1 mM GTP + 500 µM $AlCl_3$ + 2 mM HKF_2 (salts were not diluted because methylcellulose was further supplemented) and 100 µM taxol. Samples were centrifuged 10 *s* at 2000 *g* to eliminate air bubbles and were transferred to the space between a mica disc and a copper plate with a diamond window in the shear-flow device (**Figure 3—figure supplement 1**, (**Kamimura et al., 2016**; **Sugiyama et al., 2009**). The device was kept at 37˚C during measurements and the mica disc spun at 10 rps to achieve the shear flow alignment. Several experiments were recorded using different sample-to-detector distances and wavelengths, collecting 150 *s* exposure time images on a PILATUS3S-1M detector. Background images were acquired in the same conditions, using PM buffer containing 3 mM $MgCl_2$ with 1% methylcellulose without tubulin. A total of 16–24 diffraction images were averaged for each condition and background subtracted using ImageJ (version 1.51j8; Wayne Rasband, National Insitutes of Health, Bethesda). Angular image integrations were performed using the XRTools software (obtained upon request from beamline BM26-DUBBLE of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)), where the spatial calibration was obtained from Ag-Behenate powder diffraction. For data analysis, we considered MTs as cylinders with a three-start helical pattern. The diffraction pattern of MTs comprises layer lines (*l*) each defined by a group of Bessel functions of order *n*. Their structural factor F in the reciprocal space (R) is described by **Equation 1** (**Klug et al., 1958**):

$$F_{l,n}(R) = J_n(2\pi r_m R) f(R) \quad (1)$$

where J_n is the n^{th} Bessel function, r_m is the radius of a MT with m PFs and $f(R)$ is the structural factor of the sphere defined by **Equation 2** (**Malinchik et al., 1997**):

$$f(R) = 4\pi r_t^3 \frac{\sin(2\pi r_m R)\cos(2\pi r_m R)}{(2\pi r_m R)^3} \quad (2)$$

This expression is used to include the structural factor of the tubulin wall in the calculation where r_t is the radius of the tubulin monomer considered as a sphere, with a value of 2.48 nm (**Kamimura et al., 2016**). For radial structural parameters (average MT radius, r_m; average PF number, m_a; and average PF distances, d_m), we analyzed the central-equatorial intensity profile (l = 0) (**Figure 3—figure supplement 1** blue line). The relationship between diffraction intensity and the structural factor is represented in the expression **Equation 3** (**Amos and Klug, 1974**; **Cochran et al., 1952**):

$$<I_{l,n}(R)> = \left|F_{l,n}(R)\right|^2 \quad (3)$$

The intensity of this layer line $I(R)$ at a reciprocal distance (R) results from a MT mixed population with different PF numbers (m), often from 10 to 15. Considering w_m as the fraction of MTs with m PFs, the resulting intensity was deconvolved as the sum of intensities of individual structure functions $F_{l,n}$ (**Equation 4**)

$$_{l,n}(R)> = \sum_m w_m\left(\sum_n |F_{o,n}(R)|^2\right) \quad (4)$$

In the l = 0 layer line, diffraction intensity is explained by J_0 and J_n where $n = m$ (**Oosawa, 1975**). Therefore, from **Equation 4** we obtain the following expression (**Equation 5**):

$$<\mathrm{I_{l,m}(R)}> = \sum_m \mathrm{w_m}\left(\left|\mathrm{F_{0,0}(R)}\right|^2 + \left|\mathrm{F_{0,m}(R)}\right|^2\right) \quad (5)$$

From **Equation 1** and **Equation 5** we derive the **Equation 6**:

$$<I_{l,m}(R)> = \sum_m w_m\left((f(R)J_0(2\pi r_m R))^2 + (f(R)J_m(2\pi r_m R))^2\right) \quad (6)$$

This equation was used for iterative fitting by least squares of the experimental intensities using the Solver function in Excel (Microsoft, 2010 version). For inter-PF distance determination (d_m), r_m was used as the apothem of an m-apex MT in which the linear distance between them is calculated according to **Equation 7**:

$$d_m(r) = 2r_m \sin\left(\frac{\pi}{m_a}\right) \quad (7)$$

The standard error of these calculated values was determined from the ratio between the experimental maximum intensities values of J_0 and J_n and their standard deviation. For the determination of the average monomer lengths, we analyzed the intensity profile of the central-meridional signals (**Figure 3—figure supplement 1**, red line). The 4th harmonic of the first layer-line (l = 4)) was fitted to a single-peaked Lorentzian function using Sigma-Plot software (version 12.0), in which the position of the maximum of intensity corresponds to ¼ of the average monomer length at the reciprocal space. The standard error was obtained from the standard deviation of the regression applied.

Negative-staining and cryo-electron microscopy

For negative-stain experiments, samples of the assembled tubulin were routinely adsorbed to carbon-coated Formvar films on 300-mesh copper grids, stained in 2% uranyl acetate and observed with a JEOL JEM-1230 at 40,000 K magnification with a digital camera CMOS TVIPS TemCam-F416.

For cryo-EM experiments, tubulin was isolated from porcine brain by two cycles of assembly disassembly (**Castoldi and Popov, 2003**), followed by a final cycle in the absence of free GTP (**Mitchison and Kirschner, 1984b**). GDP-tubulin was obtained in BRB80 and stored at −80˚C before use. Spectrophotometry was used to determine suitable conditions for cryo-EM. GDP-MTs were polymerized at a final tubulin concentration of 40 µM in BRB80 (80 mM K-Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM

AEI/FEDER, UE); Ministerio de Ciencia e Innovación RYC-2011–07900 to MAO; European Union H2020-MSCA-ITN-ETN/0582 ITN TublnTrain to FDP and AEP; Swiss National Science Foundation (31003A_166608) to MOS; JSPS KAKENHI (16K07328/17H03668) to SK; (FSE) ANR-16-CE11-0017-01 to DC and LD. JE-G was supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deporte FPU15-03140 and SK by French Ministry of Higher Education of Research and Innovation (IGDR). Cryo-EM data were adquired on the MRic platform (Univ. Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT-UMS 3480, US_S 018, F-35000 Rennes, France). The authors acknowledge networking contribution by the COST Action CM1407 "Challenging organic syntheses inspired by nature - from natural products chemistry to drug discovery".

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Ministerio de Economía y Competitividad	BFU2013-47014P	Maria A Oliva
Ministerio de Economía y Competitividad	BFU2016-75319-R	J Fernando Díaz
H2020 European Research Council	H2020-MSCA-ITN-ETN/0582	Andrea E Prota J Fernando Díaz
Ministerio de Economía y Competitividad	RYC-2011-07900	Maria A Oliva
Swiss National Science Foundation	31003A_166608	Michel O Steinmetz
Japan Society for the Promotion of Science	KAKENHI 16K07328/17H03668	Shinji Kamimura
FSE	ANR-16-C11-0017-01	Denis Chrétien

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Juan Estévez-Gallego, Formal analysis, Investigation, Methodology; Fernando Josa-Prado, Isabel Barasoain, Validation, Investigation; Siou Ku, Ruben M Buey, Francisco A Balaguer, Daniel Lucena-Agell, Toshiki Yaggi, Hiroyuki Iwamoto, Formal analysis, Investigation; Andrea E Prota, Funding acquisition, Investigation; Christina Kamma-Lorger, Resources, Investigation; Laurence Duchesne, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition; Michel O Steinmetz, Resources, Funding acquisition, Project administration; Denis Chrétien, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Writing - review and editing; Shinji Kamimura, Funding acquisition, Investigation, Methodology; J Fernando Díaz, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Writing - review and editing; Maria A Oliva, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Juan Estévez-Gallego http://orcid.org/0000-0003-3889-8488
Fernando Josa-Prado http://orcid.org/0000-0002-6162-3231
Ruben M Buey http://orcid.org/0000-0003-1263-0221
Maria A Oliva http://orcid.org/0000-0002-2215-4639

Decision letter and Author response

Decision letter https://doi.org/10.7554/eLife.50155.sa1
Author response https://doi.org/10.7554/eLife.50155.sa2

Additional files

Supplementary files

- Transparent reporting form

Data availability

Diffraction data have been deposited in PDB under the accession codes 6gze and 6s9e.

The following datasets were generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Oliva MA, Diaz JF	2018	Tubulin-GDP.BeF complex	http://www.rcsb.org/structure/6GZE	RCSB Protein Data Bank, 6GZE
Oliva MA, Estevez-Gallego J, Diaz JF, Prota AE, Steinmetz MO, Balaguer FA, Lucena-Agell D	2020	Tubulin-GDP.AlF complex	http://www.rcsb.org/structure/6s9e	RCSB Protein Data Bank, 6s9e

The following previously published datasets were used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Prota AE, Bargsten K, Zurwerra D, Field JJ, Diaz JF, Altmann KH, Steinmetz MO	2012	Crystal structure of tubulin-stathmin-TTL complex	https://www.rcsb.org/structure/4i55	RCSB Protein Data Bank, 4i55
Nawrotek A, Knossow M, Gigant B	2011	GMPCPP-Tubulin: RB3 Stathmin-like domain complex	https://www.rcsb.org/structure/3ryh	RCSB Protein Data Bank, 3ryh
Wang Y, Yang J, Wang T, Chen L	2017	Crystal structure of apo T2R-TTL	https://www.rcsb.org/structure/5xp3	RCSB Protein Data Bank, 5xp3
Zhang R, Nogales E	2015	Cryo-EM structure of GMPCPP-microtubule (14 protofilaments) decorated with kinesin	https://www.rcsb.org/structure/3jat	RCSB Protein Data Bank, 3jat
Zhang R, Nogales E	2015	Cryo-EM structure of GMPCPP-microtubule co-polymerized with EB3	https://www.rcsb.org/structure/3jal	RCSB Protein Data Bank, 3jal
Zhang R, Nogales E	2015	Cryo-EM structure of GDP-microtubule co-polymerized with EB3	https://www.rcsb.org/structure/3jar	RCSB Protein Data Bank, 3jar
Zhang R, Nogales E	2015	Cryo-EM structure of GTPgammaS-microtubule co-polymerized with EB3 (merged dataset with and without kinesin bound)	https://www.rcsb.org/structure/3jak	RCSB Protein Data Bank, 3jak
Manka SW	2017	Cryo-EM structure of GDP.Pi-microtubule rapidly co-polymerised with doublecortin	https://www.rcsb.org/structure/6evx	RCSB Protein Data Bank, 6evx
Nassar N, Hoffman G, Clardy J, Cerione R	1998	TRANSITION STATE COMPLEX FOR GTP HYDROLYSIS BY CDC42: COMPARISONS OF THE HIGH RESOLUTION STRUCTURES FOR CDC42 BOUND TO THE ACTIVE AND CATALYTICALLY COMPROMISED FORMS OF THE CDC42-GAP.	https://www.rcsb.org/structure/2ngr	RCSB Protein Data Bank, 2ngr
Nassar N, Hoffman GR, Clardy JC, Cerione RA	1998	CRYSTAL STRUCTURE OF THE CDC42/CDC42GAP/ALF3 COMPLEX	https://www.rcsb.org/structure/1grn	RCSB Protein Data Bank, 1grn
Ghosh A, Praefcke GJK, Renault L, Wittinghofer A, Herrmann C	2005	Crystal-structure of the N-terminal Large GTPase Domain of human Guanylate Binding protein 1 (hGBP1) in complex with GDP/AlF3	https://www.rcsb.org/structure/2b92	RCSB Protein Data Bank, 2b92

Pan X, Eathiraj S, Munson M, Lambright DG	2007	Crystal Structure of Gyp1 TBC domain in complex with Rab33 GTPase bound to GDP and AlF3	https://www.rcsb.org/structure/2g77	RCSB Protein Data Bank, 2g77
Yu Q, Yao Q, Wang D-C, Shao F	2013	Crystal structure of LepB GAP domain from Legionella drancourtii in complex with Rab1-GDP and AlF3	https://www.rcsb.org/structure/4jvs	RCSB Protein Data Bank, 4jvs
Mishra AK, Delcampo CM, Collins RE, Roy CR, Lambright DG	2013	Crystal Structure of lepB GAP core in a transition state mimetic complex with Rab1A and ALF3	https://www.rcsb.org/structure/4iru	RCSB Protein Data Bank, 4iru

References

Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. 2010. *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **66**:213–221. DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444909052925, PMID: 20124702

Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, Nogales E. 2014. High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in αβ-Tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* **157**:1117–1129. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.053

Amos L, Klug A. 1974. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *Journal of Cell Science* **14**:523–549. PMID: 4830832

Andreu JM, Bordas J, Diaz JF, García de Ancos J, Gil R, Medrano FJ, Nogales E, Pantos E, Towns-Andrews E. 1992. Low resolution structure of microtubules in solution. synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *Journal of Molecular Biology* **226**:169–184. DOI: https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90132-4, PMID: 1352357

Atheton J, Stouffer M, Francis F, Moores CA. 2018. Microtubule architecture in vitro and in cells revealed by cryo-electron tomography. *Acta Crystallographica Section D* **74(Pt 6)**:572–584. DOI: https://doi.org/10.1107/S2059798318001948

Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M. 1987. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP. *The EMBO Journal* **6**:2907–2913. DOI: https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02594.x, PMID: 2826123

Blestel S, Kervrann C, Chrétien D. 2009. A Fourier-Based Method for Detecting Curved Microtubule Centers: Application to Straightening of Cryo-Electron Microscope Images. Proceedings / IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: from nano to macro. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging. DOI: https://doi.org/10.1109/ISBI.2009.5193043

Brouhard GJ, Rice LM. 2018. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**:451–463. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y, PMID: 29674711

Buey RM, Barasoain I, Jackson E, Meyer A, Giannakakou P, Paterson I, Mooberry S, Andreu JM, Díaz JF. 2005. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chemistry & Biology* **12**:1269–1279. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.09.010, PMID: 16356844

Buey RM, Díaz JF, Andreu JM. 2006. The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry* **45**:5933–5938. DOI: https://doi.org/10.1021/bi060334m, PMID: 16681364

Carlier MF, Hill TL, Chen Y. 1984. Interference of GTP hydrolysis in the mechanism of microtubule assembly: an experimental study. *PNAS* **81**:771–775. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.771, PMID: 6583675

Carlier MF, Didry D, Melki R, Chabre M, Pantaloni D. 1988. Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogs, the fluoride complexes of aluminum and beryllium. *Biochemistry* **27**:3555–3559. DOI: https://doi.org/10.1021/bi00410a005

Castoldi M, Popov AV. 2003. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expression and Purification* **32**:83–88. DOI: https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00218-3, PMID: 14680943

Chaaban S, Jariwala S, Hsu C-T, Redemann S, Kollman JM, Müller-Reichert T, Sept D, Bui KH, Brouhard GJ. 2018. The structure and dynamics of *C. elegans* Tubulin Reveals the Mechanistic Basis of Microtubule Growth. *Developmental Cell* **47**:191–204. DOI: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.023

Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E. 1995. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *The Journal of Cell Biology* **129**:1311–1328. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.129.5.1311, PMID: 7775577

Chrétien D, Kenney JM, Fuller SD, Wade RH. 1996. Determination of microtubule polarity by cryo-electron microscopy. *Structure* **4**:1031–1040. DOI: https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00110-4, PMID: 8805589

Chrétien D, Fuller SD. 2000. Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation. *Journal of Molecular Biology* **298**:663–676. DOI: https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3696, PMID: 10788328

Chrétien D, Wade RH. 1991. New data on the microtubule surface lattice. *Biology of the Cell* **71**:161–174. DOI: https://doi.org/10.1016/0248-4900(91)90062-R, PMID: 1912942

Cochran W, Crick FH, Vand V. 1952. The structure of synthetic polypeptides. I. the transform of atoms on a Helix. *Acta Crystallographica* **5**:581–586. DOI: https://doi.org/10.1107/S0365110X52001635

Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. 1994. Structures of active conformations of gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**:1405–1412. DOI: https://doi.org/10.1126/science.8073283, PMID: 8073283

Correia JJ, Baty LT, Williams RC. 1987. Mg2+ dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* **262**:17278–17284. PMID: 2826416

Desai A, Mitchison TJ. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**:83–117. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83, PMID: 9442869

Díaz JF, Sillen A, Engelborghs Y. 1997. Equilibrium and kinetic study of the conformational transition toward the active state of p21Ha^{-ras}, induced by the binding of BeF3- to the GDP-bound state, in the absence of GTPase-activating proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:23138–23143. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23138, PMID: 9287316

Díaz JF, Andreu JM. 1993. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* **32**:2747–2755. DOI: https://doi.org/10.1021/bi00062a003, PMID: 8096151

Driver JW, Geyer EA, Bailey ME, Rice LM, Asbury CL. 2017. Direct measurement of conformational strain energy in protofilaments curling outward from disassembling microtubule tips. *eLife* **6**:e28433. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.28433, PMID: 28628007

Duellberg C, Cade NI, Surrey T. 2016a. Microtubule aging probed by microfluidics-assisted tubulin washout. *Molecular Biology of the Cell* **27**:3563–3573. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.e16-07-0548, PMID: 27489342

Duellberg C, Cade NI, Holmes D, Surrey T. 2016b. The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLife* **5**:e13470. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.13470, PMID: 27050486

Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **66**:486–501. DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444910007493, PMID: 20383002

Erickson HP. 2019. Microtubule assembly from single flared Protofilaments-Forget the cozy corner? *Biophysical Journal* **116**:2240–2245. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.05.005, PMID: 31122668

Field JJ, Pera B, Gallego JE, Calvo E, Rodríguez-Salarichs J, Sáez-Calvo G, Zuwerra D, Jordi M, Andreu JM, Prota AE, Ménchon G, Miller JH, Altmann KH, Díaz JF. 2018. Zampanolide binding to tubulin indicates Cross-Talk of taxane site with colchicine and nucleotide sites. *Journal of Natural Products* **81**:494–505. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00704, PMID: 29023132

Gardner MK, Zanic M, Gell C, Bormuth V, Howard J. 2011. Depolymerizing kinesins Kip3 and MCAK shape cellular microtubule architecture by differential control of catastrophe. *Cell* **147**:1092–1103. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.037, PMID: 22118464

Gigant B, Curmi PA, Martin-Barbey C, Charbaut E, Lachkar S, Lebeau L, Siavoshian S, Sobel A, Knossow M. 2000. The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* **102**:809–816. DOI: https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00069-6, PMID: 11030624

Goldstein G. 1964. Equilibrium distribution of Metal-Fluoride complexes. *Analytical Chemistry* **36**:243–244. DOI: https://doi.org/10.1021/ac60207a074

Guesdon A, Bazile F, Buey RM, Mohan R, Monier S, García RR, Angevin M, Heichette C, Wieneke R, Tampé R, Duchesne L, Akhmanova A, Steinmetz MO, Chrétien D. 2016. EB1 interacts with outwardly curved and straight regions of the microtubule lattice. *Nature Cell Biology* **18**:1102–1108. DOI: https://doi.org/10.1038/ncb3412, PMID: 27617931

Howes SC, Geyer EA, LaFrance B, Zhang R, Kellogg EH, Westermann S, Rice LM, Nogales E. 2017. Structural differences between yeast and mammalian microtubules revealed by cryo-EM. *The Journal of Cell Biology* **216**:2669–2677. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201612195, PMID: 28652389

Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. 1992. Role of GTP hydrolysis in Microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell* **3**:1155–1167. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155, PMID: 1421572

Hyman AA, Chrétien D, Arnal I, Wade RH. 1995. Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *The Journal of Cell Biology* **128**:117–125. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.128.1.117

Jánosi IM, Chrétien D, Flyvbjerg H. 1998. Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *European Biophysics Journal* **27**:501–513. DOI: https://doi.org/10.1007/s002490050160, PMID: 9760731

Kabsch W. 2010. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr D* **66(Pt 2)**:125–132. DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444909047337

Kamimura S, Fujita Y, Wada Y, Yagi T, Iwamoto H. 2016. X-ray fiber diffraction analysis shows dynamic changes in axial tubulin repeats in native microtubules depending on paditaxel content, temperature and GTP-hydrolysis. *Cytoskeleton* **73**:131–144. DOI: https://doi.org/10.1002/cm.21283, PMID: 26873786

Kellogg EH, Hejab NMA, Howes S, Northcote P, Miller JH, Díaz JF, Downing KH, Nogales E. 2017. Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and Non-Taxane microtubule stabilizers from Cryo-EM structures. *Journal of Molecular Biology* **429**:633–646. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.001, PMID: 28104363

Klug A, Crick FHC, Wyckoff HW. 1958. Diffraction by helical structures. *Acta Crystallographica* **11**:199–213. DOI: https://doi.org/10.1107/S0365110X58000517

Koshland DE, Mitchison TJ, Kirschner MW. 1988. Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization in vitro. *Nature* **331**:499–504. DOI: https://doi.org/10.1038/331499a0, PMID: 3340202

Krissinel E, Henrick K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* **372**:774–797. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022, PMID: 17681537

Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution. *Journal of Molecular Biology* **313**:1045–1057. DOI: https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5077, PMID: 11700061

Malinchik S, Xu S, Yu LC. 1997. Temperature-induced structural changes in the myosin thick filament of skinned rabbit psoas muscle. *Biophysical Journal* **73**:2304–2312. DOI: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78262-6, PMID: 9370427

Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan RA. 1991. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *The Journal of Cell Biology* **114**:977–991. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.114.5.977, PMID: 1874792

Manka SW, Moores CA. 2018. The role of tubulin-tubulin lattice contacts in the mechanism of microtubule dynamic instability. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**:607–615. DOI: https://doi.org/10.1038/s41594-018-0087-8, PMID: 29967541

Martin RB. 1988. Ternary hydroxide complexes in neutral solutions of Al3+ and F-. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **155**:1194–1200. DOI: https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81266-X, PMID: 3178801

Maurer SP, Bieling P, Cope J, Hoenger A, Surrey T. 2011. GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *PNAS* **108**:3988–3993. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1014758108, PMID: 21368119

Maurer SP, Fourniol FJ, Bohner G, Moores CA, Surrey T. 2012. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell* **149**:371–382. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.049, PMID: 22500803

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. 2007. *Phaser* crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* **40**:658–674. DOI: https://doi.org/10.1107/S0021889807021206, PMID: 19461840

McIntosh JR, O'Toole E, Morgan G, Austin J, Ulyanov E, Ataullakhanov F, Gudimchuk N. 2018. Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. *The Journal of Cell Biology* **217**:2691–2708. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201802138, PMID: 29794031

Mejillano MR, Barton JS, Nath JP, Himes RH. 1990. GTP analogues interact with the tubulin exchangeable site during assembly and upon binding. *Biochemistry* **29**:1208–1216. DOI: https://doi.org/10.1021/bi00457a017, PMID: 2108723

Mickolajczyk KJ, Geyer EA, Kim T, Rice LM, Hancock WO. 2019. Direct observation of individual tubulin dimers binding to growing microtubules. *PNAS* **116**:7314–7322. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1815823116, PMID: 30804205

Mitchison T, Kirschner M. 1984a. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**:237–242. DOI: https://doi.org/10.1038/312237a0, PMID: 6504138

Mitchison T, Kirschner M. 1984b. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**:232–237. DOI: https://doi.org/10.1038/312232a0

Mittal R, Ahmadian MR, Goody RS, Wittinghofer A. 1996. Formation of a transition-state analog of the ras GTPase reaction by Ras-GDP, Tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science* **273**:115–117. DOI: https://doi.org/10.1126/science.273.5271.115, PMID: 8658179

Nawrotek A, Knossow M, Gigant B. 2011. The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. *Journal of Molecular Biology* **412**:35–42. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.029, PMID: 21787788

Nogales E, Downing KH, Amos LA, Löwe J. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Structural Biology* **5**:451–458. DOI: https://doi.org/10.1038/nsb0698-451, PMID: 9628483

Nogales E, Wang HW. 2006. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Current Opinion in Cell Biology* **18**:179–184. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.009, PMID: 16495041

Oliva MA, Cordell SC, Löwe J. 2004. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**:1243–1250. DOI: https://doi.org/10.1038/nsmb855, PMID: 15558053

Oosawa FA. 1975. *Thermodynamics of the Polymerization of Protein*. New York and London: Academic Press.

Padinhateeri R, Kolomeisky AB, Lacoste D. 2012. Random hydrolysis controls the dynamic instability of microtubules. *Biophysical Journal* **102**:1274–1283. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.059, PMID: 22455910

Prota AE, Bargsten K, Zurwerra D, Field JJ, Díaz JF, Altmann KH, Steinmetz MO. 2013a. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **339**:587–590. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1230582, PMID: 23287720

Prota AE, Magiera MM, Kuijpers M, Bargsten K, Frey D, Wieser M, Jaussi R, Hoogenraad CC, Kammerer RA, Janke C, Steinmetz MO. 2013b. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *The Journal of Cell Biology* **200**:259–270. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201211017, PMID: 23358242

Prota AE, Bargsten K, Northcote PT, Marsh M, Altmann KH, Miller JH, Díaz JF, Steinmetz MO. 2014. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angewandte Chemie International Edition* **53**:1621–1625. DOI: https://doi.org/10.1002/anie.201307749, PMID: 24470331

Prota AE, Setter J, Waight AB, Bargsten K, Murga J, Diaz JF, Steinmetz MO. 2016. Pironetin binds covalently to αcys316 and perturbs a major loop and Helix of α-Tubulin to inhibit microtubule formation. *Journal of Molecular Biology* **428**:2981–2988. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.023, PMID: 27395016

Rai A, Liu T, Glauser S, Katrukha EA, Estévez-Gallego J, Rodríguez-García R, Fang W-S, Díaz JF, Steinmetz MO, Altmann K-H, Kapitein LC, Moores CA, Akhmanova A. 2019. Taxanes convert regions of perturbed microtubule growth into rescue sites. *Nature Materials* **13**. DOI: https://doi.org/10.1038/s41563-019-0546-6

Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M. 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **428**:198–202. DOI: https://doi.org/10.1038/nature02393

Rice LM, Montabana EA, Agard DA. 2008. The lattice as allosteric effector: structural studies of alphabeta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *PNAS* **105**:5378–5383. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0801155105, PMID: 18388201

Schek HT, Gardner MK, Cheng J, Odde DJ, Hunt AJ. 2007. Microtubule assembly dynamics at the nanoscale. *Current Biology* **17**:1445–1455. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.011, PMID: 17683936

Seetapun D, Castle BT, McIntyre AJ, Tran PT, Odde DJ. 2012. Estimating the microtubule GTP cap size in vivo. *Current Biology* **22**:1681–1687. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.068, PMID: 22902755

Smith SJ, Ma RK. 2002. *Preparation of GTPases for Structural and Biophysical Analysis*. Humana Press.

Sternweis PC, Gilman AG. 1982. Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *PNAS* **79**:4888–4891. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4888, PMID: 6289322

Sugiyama T, Miyashiro D, Takao D, Iwamoto H, Sugimoto Y, Wakabayashi K, Kamimura S. 2009. Quick shear-flow alignment of biological filaments for X-ray fiber diffraction facilitated by methylcellulose. *Biophysical Journal* **97**:3132–3138. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.041, PMID: 20006950

Sui H, Downing KH. 2010. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure* **18**:1022–1031. DOI: https://doi.org/10.1016/j.str.2010.05.010, PMID: 20696402

von Loeffelholz O, Venables NA, Drummond DR, Katsuki M, Cross R, Moores CA. 2017. Nucleotide- and Mal3-dependent changes in fission yeast microtubules suggest a structural plasticity view of dynamics. *Nature Communications* **8**:2110. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-017-02241-5, PMID: 29235477

Walker RA, Pryer NK, Salmon ED. 1991. Dilution of individual microtubules observed in real time in vitro: evidence that cap size is small and independent of elongation rate. *The Journal of Cell Biology* **114**:73–81. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.73, PMID: 2050742

Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **67**:235–242. DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444910045749, PMID: 21460441

Wittinghofer A. 1997. Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Current Biology* **7**:R682–R685. DOI: https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00355-1, PMID: 9382787

Zanic M, Stear JH, Hyman AA, Howard J. 2009. EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PLOS ONE* **4**:e7585. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007585, PMID: 19851462

Zhang R, Alushin GM, Brown A, Nogales E. 2015. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell* **162**:849–859. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.012, PMID: 26234155

Zhang R, LaFrance B, Nogales E. 2018. Separating the effects of nucleotide and EB binding on microtubule structure. *PNAS* **115**:E6191–E6200. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1802637115, PMID: 29915050

Nos résultats montrent que les analogues GMPCPP et le GDP-BeF_3^- modifient le nombre de protofilament (N) avec une majorité de la population à 14 PFs (80%) pour les MTs-GMPCPP et 12 PFs (65%) pour le GDP-BeF_3^-, contre 49% de 13 PFs et 45 % de 14 PFs pour les parois-GDP. Ils confirment également l'état étendu de la tubuline-GMPCPP alors que la tubuline-GDP et celle assemblée en présence du BeF_3^- et de l'AlF_x^- est retrouvée sous un état compacté. Les angles de vrillages des PFs mesurés pour chacune de ces parois sont différents. L'étude des caractéristiques structurales des différentes parois analogues en lumière du modèle de l'accommodation précise que le vrillage des PFs n'est pas une conséquence directe de l'hydrolyse du GTP, ni du relargage du P_i mais résulte du phénomène d'accommodation de la paroi qui s'adapte aux modifications structurales (changement du nombre de PF et de la conformation de la tubuline) causées par chacun des analogues. L'étude par cristallographie à haute résolution a permis de montrer également que le GDP-BeF_3^- possède les même propriétés structurales au sein du site E que celles attendues pour le GTP, alors que le GDP-AlF_x^- se rapproche de celui attendu pour l'état GDP.P_i. Le GDP-BeF_3^- serait donc un analogue structural du GTP et non du GDP.P_i, alors que le GDP-AlF_x^- permettrait effectivement de mimer l'état GDP.P_i. De manière étonnante, la tubuline-GMPCP (forme hydrolysée du GMPCPP) présente une configuration étendue, similaire à celle observée en présence de GMPCPP. La tubuline GMPPCP (méthylène déplacé) présente une configuration compactée de l'hétérodimère, ce qui suggère que l'état étendu serait la conséquence du groupement méthylène de cet analogue et non de l'état « GTP-like » permis par cet analogue qui semble plus éloigné du GTP d'un point de vue structural que le GDP-BeF_3^-.

Suite à ces travaux, nous avons décidé de compléter ce travail en cryo-ME afin de caractériser plus en détail les dérivés du GMPCP (GMPPCP et GMPC), le GTPγS et le GDP-AlF_x^-.

B. Caractéristiques structurales et organisationnelles des parois analogues (GMPCP, GMPPCP, GTPγS et GDP-AlFx-) obtenues par cryo-ME

1. Effets des analogues GMPCP, GMPPCP, GTPγS et GDP-AlFx- sur le nombre de PFs

En présence de GMPPCP (liaison méthylène déplacée), les parois de MTs sont équi-répartis entre les configurations à 13 et 14 PFs (58% et 42%, respectivement), ce qui permet de définir un nombre moyen en PFs (N_{moy}) à 13.4, similaire à la condition GTP (Figure 19). En présence de GMPCP (forme hydrolysé du GMPCPP), ce sont les formes à 14 PFs qui sont favorisées (72% contre 26 % de formes à 13 PFs), ce qui s'apparente aux résultats en présence de GMPCPP. Le N_{moy} de la condition GMPCP est 13.8, similaire au N_{moy} de la condition GMPCPP. Comme pour la condition en présence de GDP-BeF_3^-, le GTPγS et le GDP-AlF_x^- favorisent les formes à 12 PFs et à 13 PFs, 50% et 40% en présence de GTPγS, respectivement, et 39% et 59% en présence de GDP-AlF_x^-, respectivement. Leur N_{moy} est évalué à 12.6. Nos données de cryo-ME suivent la même distribution en population de MTs que les données obtenues en SAXS par nos

collaborateurs bien que quelques différences soient observées en proportion dans chacune des conditions (Figure 19). Cette étude confirme que chacun des analogues impacte l'organisation de la paroi en terme du nombre de PFs.

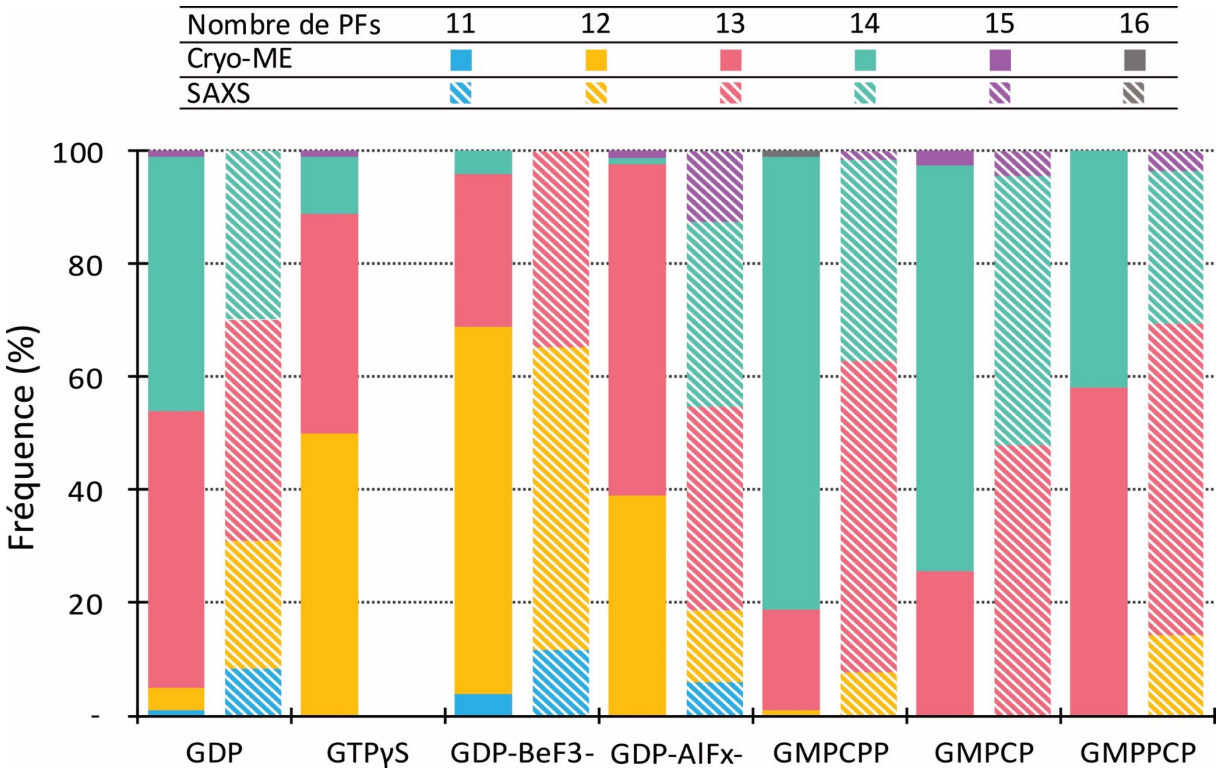


Figure 19. Distribution des types de MTs en fonction du nombre de PFs et de l'état nucléotidique de la paroi. Distribution des microtubules en fonction du nombre de protofilaments et des différents états nucléotidiques de la paroi (GDP, GTPγS, GDP-BeF3-,GDP-AlFx-, GMPCPP, GMPCP, GMPPCP obtenue en cryo-ME et par SAXS).

2. Effets du GMPCP, GMPPCP, GTPγS et GDP-AlF$_x^-$ sur la distance longitudinale inter-monomères (a) et l'angle de vrillage des PFs (θ) au sein de la paroi des MTS

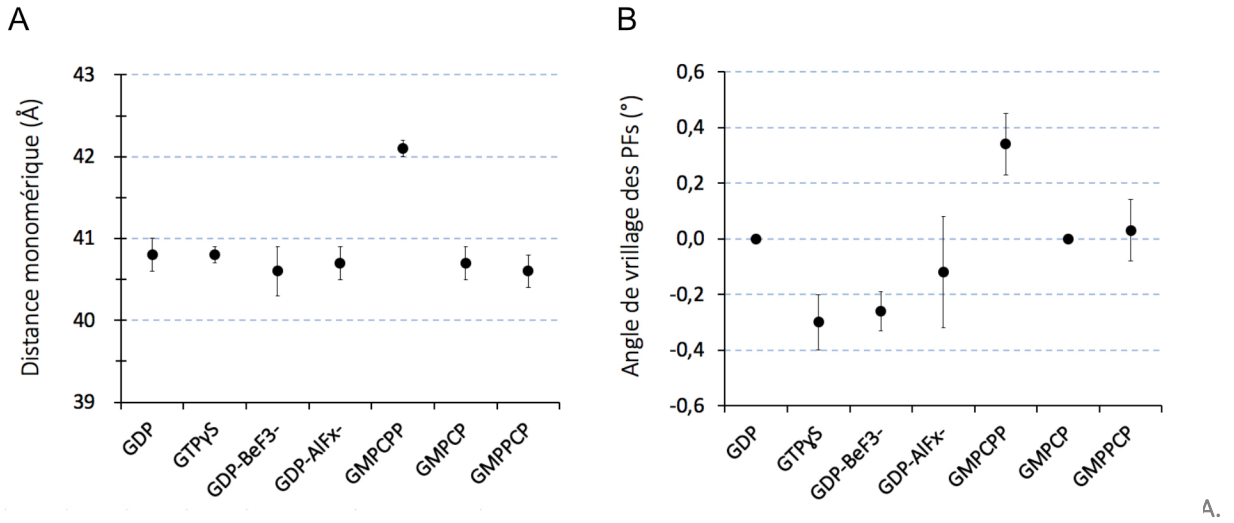


Figure 20. Variation des paramètres structuraux (a et θ) en fonction des différents états nucléotidiques de la paroi.
Variation de la distance longitudinale inter-monomère (a) en fonction des différents états nucléotidiques de la paroi. **B.** Variation de l'angle de vrillage des PFs (θ) en fonction des différents états nucléotidiques d'une paroi 13_3.

Les résultats obtenus par cryo-ME montrent une distance longitudinale inter-monomère mesurée au sein des parois-GMPCP, -GMPPCP, -GTPγS, et -GDP-AlF$_x^-$ d'environ 40,7 Å, similaire aux distances mesurées au sein des parois -GDP-BeF$_3^-$ et –GDP. Seules les parois-GMPCPP présentent une distance longitudinale augmentée à 42,2 Å. A l'exception de la tubuline-GMPCPP, qui est retrouvée dans un état étendu, l'étude par cryo-ME suggère donc une conformation compactée de la tubuline pour l'ensemble des autres analogues testés, y compris pour le GMPCP (forme hydrolysée de GMPCPP) et le GMPPCP (groupement méthylène déplacé par rapport au GMPCPP). Ces résultats diffèrent des résultats précédents obtenus par cristallographie montrant que la tubuline-GMPCP conserverait une sa configuration étendue similaire à la tubuline GMPCPP.

La mesure de l'angle de vrillage des PFs par rapport à l'axe du MT (paramètre θ) a été effectué pour les différents analogues sur des paroi 13_3 afin de pouvoir comparer l'influence des différents analogues sur ce paramètre (le nombre de PFs pouvant influencer également sur ce paramètre). Un angle de vrillage moyen (θ_{moy}) proche de 0° a été mesuré pour les parois assemblées en présence de GMPCP et GMPPCP, ce qui est comparable au θ_{moy} d'une paroi GDP 13_3. L'angle de vrillage observé en présence de GMPCPP est toujours d'environ + 0,3. Les parois-GTPγS présentent un angle de vrillage à θ_{moy} à environ - 0,26 ° ce qui est proche du résultats obtenus précédemment pour le GDP-BeF$_3^-$ et les parois-GDP-AlF$_x^-$ modifient l'angle de vrillage des PFs avec des θ_{moy} à environ – 0,12 °. Trois principaux effets sont donc recensés au sein des parois 13_3 en présence des analogues : (i) un vrillage des PFs suivant une hélice gauche pour les parois-GTPγS, -GDP-BeF$_3^-$ et -GDP-AlF$_x^-$, (ii) un vrillage des PFs suivant une hélice droite

pour les parois-GMPCPP ou aucune modification de l'angle de vrillage par rapport aux parois-GDP pour les parois-GMPCP et -GMPPCP (angle de vrillage proche de 0).

En résumé, en Cryo-ME et dans nos conditions, on observe un état compacté et non vrillé de la tubuline au sein des parois-GDP, -GMPCP et -GMPPCP, un état compacté et vrillé suivant une hélice gauche de la tubuline au sein des parois-GDP-BeF_3^- et -GTPγS (- 0,3°) et -AlF_x^- (- 0,1°) et enfin, comme observé précédemment, un état étendu et vrillé suivant une hélice droite de la tubuline en présence GMPCPP (+ 0,3°) (Figure 21).

De la même manière que pour le vrillage des PFs induit par le GMPCPP, en lumière du modèle de l'accommodation de la paroi, si l'on remplace le paramètre (*r*) correspondant au décalage longitudinal entre deux monomères adjacents, de 9,4 Å par 9,7 Å tel que calculé expérimentalement au sein des parois GTPγS, -GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, l'angle de vrillage des PFs est prédit à - 0,31 °, ce qui correspond au θ_{exp} moyen mesuré dans une paroi 13_3 -GDP-BeF_3^- et -GTPγS. Pour la condition AlF_x^-, le modèle prédit ainsi le sens du vrillage des PFs, soit un vrillage gauche des PFs par rapport à l'axe du MT.

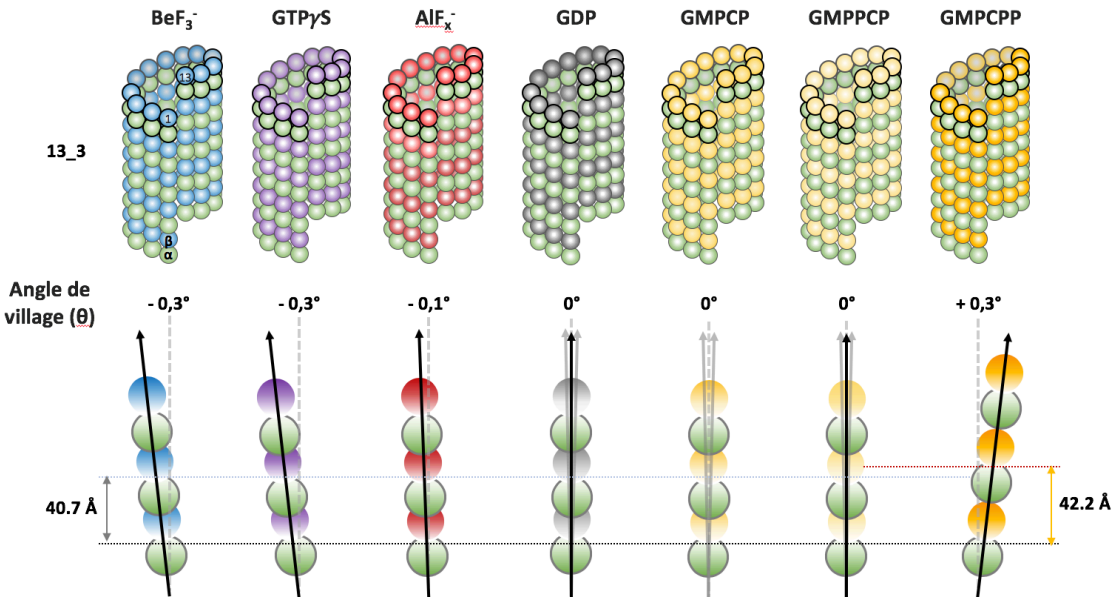


Figure 21. Récapitulatif des effets des analogues sur une paroi 13_3
L'étude structurale en cryo-ME des parois analogues (GDP-BeF_3^-, GDP-AlF_x^-, GMPCP, GMPPCP et GMPPCP) nous révèle un état de compaction de la tubuline et un vrillage des PFs suivant une hélice gauche dans les parois 13_3 GDP-BeF_3^-, GTPγS et GDP-AlF_x^-, un état compacté sans vrillage dans les parois 13_3 GDP, GMPCP et GMPPCP. Seule la paroi 13_3 GMPCPP montre un état étendu de la tubuline et un vrillage des PFs suivant une hélice droite.

3. Effets du GMPCP, GMPPCP, GTPγS et GDP-AlF_x^- sur le nombre de départs d'hélice (S)

Dans les paragraphes précédents, nous avons pu mettre en évidence l'impact des différents analogues sur le nombre de PFs (N), la distance longitudinale inter-monomère (*a*) et l'angle de vrillage des PFs (θ) , qui décrivent l'organisation de la paroi. L'analyse par cryo-ME permet l'accès au paramètre (S) (Fig 18 A) qui décrit l'hélicité latérale des monomères au sein de la paroi. Il est ainsi possible d'identifier les configurations N_S les plus représentées et les plus stables dans chacune des conditions, nommées configurations d'équilibre.

Nous avons donc évalué l'impact des différents nucléotides (GTP/GDP, GTPγS, GDP-BeF_3^-, GDP-AlF_x^-, GMPCPP, GMPCP et GMPPCP) sur la distribution des configurations d'équilibre.

Modification des configurations d'équilibre de la paroi

Le paroi GDP s'accommode de manière équiprobable en MTs 13_3 et 14_3 (49,4 % et 45,3%, respectivement). Ces deux configurations constituent donc les configurations d'équilibre de la paroi-GDP (Figure 22).

Ces deux configurations, 13_3 et 14_3 sont celles retrouvées de manière prédominante pour le GMPCPP et ses dérivés mais dans des proportions qui peuvent varier. La même équi-répartition, 13_3 et 14_3 est retrouvée pour les parois GMPPCP (58,3% et 41,7 %, respectivement) mais la forme 14_3 est favorisée pour les parois-GMPCPP (17,7 % contre 80%, respectivement) et -GMPCP (25,8 % contre 71,7 %, respectivement) (Figure 22).

Pour les autres analogues utilisées, le GTPγS, le GDP-BeF_3^- et le GDP-AlF_x^-, les configurations d'équilibre ne sont pas les mêmes. On note notamment l'apparition de formes à 12 PFs (12_3) et également à 4-départ d'hélice (N_4), supposées être coûteuses en énergie. Les MTs N_4 sont rarement observées lors d'un assemblage en présence de GTP (seulement 0,7%). En présence de GTPγS, les parois se répartissent entre les configurations à 12_3 et 13_3 avec 50,6 % et 32,1%, respectivement mais on recense également 17 % de configurations N_4 (comprenant les formes 13_4, 14_4 et 15_4). En présence de GDP-BeF_3^-, les parois se conforment préférentiellement en MTs 12_3 (avec plus 73 % des parois analysées) et comptent 15,4 % de formes N_4 (13_4 et 14_4), alors que les parois-GDP-AlF_x^- se répartissent entre les MTs 12_3, 13_3 et 13_4 avec 39,1 %, 23,3 % et plus de 35,3%, respectivement. On observe ainsi plus d'un tiers de formes N_4 (13_4 et 14_4) en présence de GDP-AlF_x^- (Figure 22).

L'utilisation des analogues lentement hydrolysables tels que le GTPγS, le GDP-BeF_3^- et le GDP-AlF_x^-) peut donc impacter l'hélicité latérale de la paroi conduisant à l'apparition d'une proportion significative de parois organisées en hélices latérales à 4-départs. Si on ne considère que les microtubules à 13 ou 14 PFs, en présence de GTPγS 34 % des parois s'organisent en hélice latérale à 4-départs, en présence des

GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, une proportion encore plus élevée soit à plus 60 % de configurations à hélice à 4-départs (Figure 23).

Les modifications des configurations N_S d'équilibre observées reflète très certainement l'effet stabilisateur du GTPγS, de GDP-BeF_3^- et de GDP-AlF_x^- qui, de par leur caractère lentement hydrolysable, permettent l'apparition et/ou la stabilisation de formes peu communes, énergétiquement défavorables (formes 12_3 ou N_4).

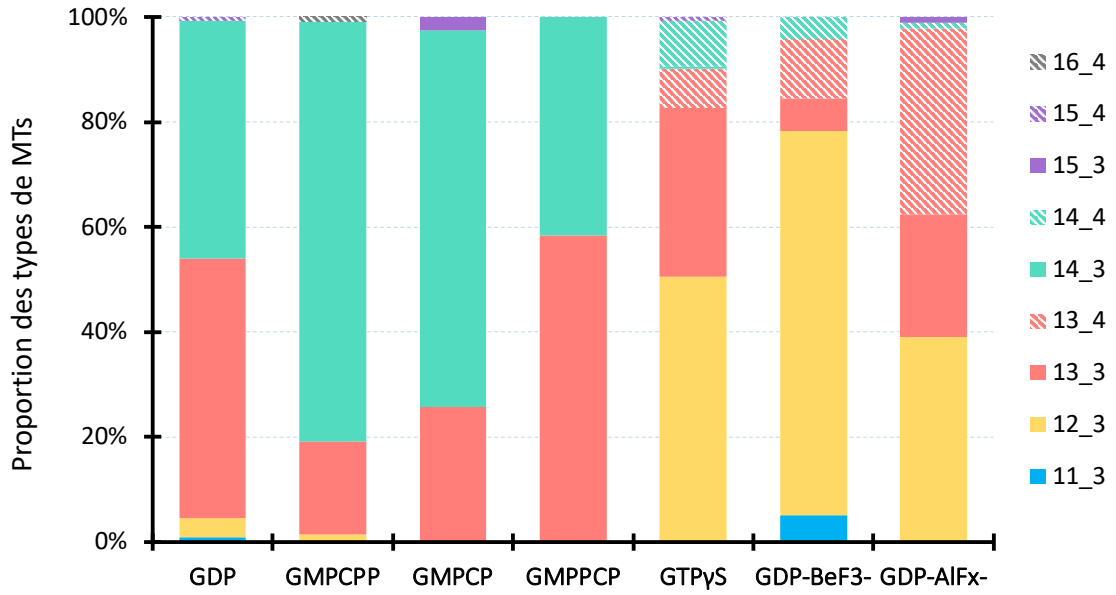


Figure 22. Distribution des types de microtubules en fonction du nombre de protofilaments (N) et du nombre de départ d'hélices latérales (S) selon les différents états nucléotidiques de la paroi

Distribution des configurations d'équilibre (N_S) retrouvées pour des parois mononucléotidiques assemblées en présence de GDP, GMPCPP, GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF3- et GDP-AlFx-. Les longueurs totales en MTs observées sont de 108,5 µm pour les parois-GDP, 101,9 µm pour les parois-GMPCPP, 58 µm pour les parois-GMPCP, 248 µm pour les parois-GMPPCP, 258 µm pour les parois-GTPγS-, 40,1 µm pour les paroi-GDP-BeF3—et 272 µm pour les parois- GDP-AlFx-.

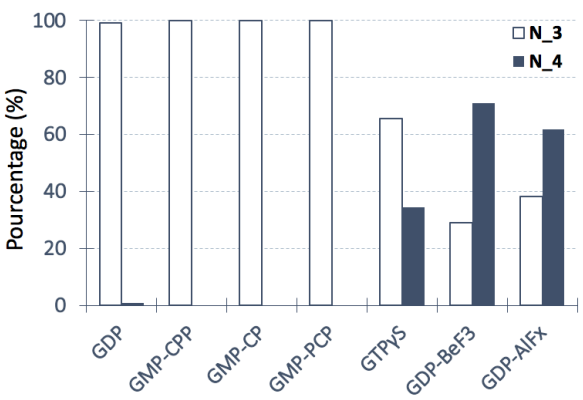


Figure 23. Distribution des microtubules à 13 et à 14 protofilaments selon l'organisation latérale en hélice des monomères (N_3 et N_4) en fonction des états nucléotidiques de la paroi

Les longueurs totales analysées de microtubules 13_3, 13_4, 14_3 et 14_4 en présence de GDP, GMPCPP, GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF3- and GDP-AlFx- sont de 104 µm, 99 µm, 58 µm, 248 µm, 128 µm, 9 µm et 166 µm, respectivement.

Les configurations N_4 relâchées et stressées : mécanisme de relaxation de la paroi

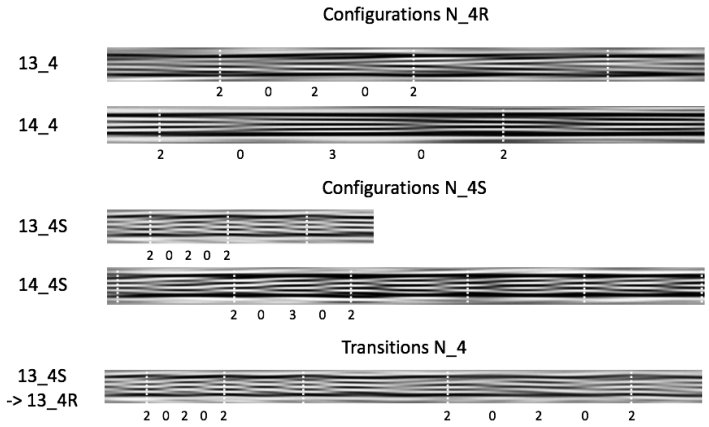
L'analyse détaillée de la longueur des périodes de Moiré pour les microtubules 13_4 et 14_4 a permis de révéler deux modalités d'accommodation des hélices latérales à 4-départs :

- Une conformation stressée, notée N_4S, qui se traduit par une période de Moiré *L* plus courte, et par conséquent, un angle de vrillage des PFs plus important. Les parois N_4S ont des PFs plus vrillés par rapport à l'axe du MT.
- Une conformation relâchée, notée N_4R, qui se traduit par une période de Moiré *L* plus longue, et donc un angle de vrillage plus faible (Figure 24A). Les parois N_4R ont donc des PFs moins vrillés par rapport à l'axe du MT.

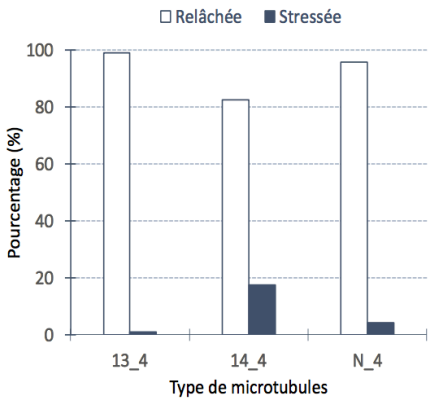
Le modèle de l'accommodation de la paroi ne prédit que la conformation stressée (N_4S), dont les angles de vrillage théoriques sont estimés à + 3,7° et de + 2,6° pour les formes 13_4S et 14_4S respectivement. Les valeurs expérimentales des angles de vrillage (Figure 24B) qui sont calculées à + 3,5 ° et à + 2,3 ° au sein de parois-GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-, 13_4S et 14_4S, respectivement, confirment les valeurs prédites par le modèle mathématique. Cependant, expérimentalement, cette conformation stressée ne représente que 4% de la population. La majorité des formes N_4 observées (96%) sont relâchées (N_4R) avec des angles de vrillage expérimentaux calculés à + 1,4 ° et à + 0,7 ° au sein de parois-GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-, 13_4R et 14_4R, respectivement. Les parois N_4 constituées de GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- révèlent donc un mécanisme de relaxation du vrillage des PFs (Figure 24C). La forme stressée N_4S, avec son angle de vrillage de 3 °, est peu favorable au maintien des interactions latérales et est rarement observé en présence de GTP, GMPCPP, GMPCP et GMPPCP. La relaxation des angles de vrillage des formes N_4 d'un angle de 3° à un angle de 1°, observée lors d'un assemblage en présence de GTP, GMPCPP, GMPCP ou GMPPCP permettrait le maintien des interactions latérales dans ces conditions (Figure 24B).

Si l'on compare le paramètre *r* (décalage longitudinale entre deux monomères adjacents), on observe un *r* moyen dans les conditions GDP, GMPCPP, GMPCP, GMPPCP au sein de parois N_3 d'environ 9,4 $\pm$ 0,1 Å. En présence de GTPγS, de GDP-BeF_3^- et de GDP-AlF_x^-, ce décalage longitudinal est mesuré à 9,6 $\pm$ 0,2 Å pour les formes N_3 et N_4S mais, augmenté à 11,3 $\pm$ 0,2 Å pour la forme N_4R (Figure 25). Cet augmentation du décalage des interactions latérales entre deux dimères d'environ 2 Å observé pour la forme relaxée (N_4R) décrirait le mécanisme de relaxation à l'origine de la stabilisation de la paroi.

A



C



B

Equation (2)

$$\theta = \sin^{-1}\left(\frac{\delta x}{L}\right)$$

	Longueurs moyennes des périodes de Moiré L (Å)	Angles de vrillage moyens expérimentaux θ_{exp} (°)	Angles de vrillage moyens théoriques $\theta_{théo}$ (°)
13_4S	847	+ 3,48	+ 3,69
13_4R	1952 ± 80,3	+ 1.39 ± 0,11	.
14_4S	1244 ± 10,9	+ 2,26 ± 0,02	+ 2,64
14_4R	4070 ± 730,9	+ 0,71 ± 0,12	.

Figure 24. Configurations relâchées (N_4R) et stressées (N_4S) des microtubules N_4

A. Images filtrées de microtubules N_4. Les images filtrées ont été obtenues par la sélection des lignes de diffraction J_0 et J_N. Les lignes en pointillé blanches indiquent la longueur de la période de Moiré L correspondant à chaque configuration. **B.** Tableau récapitulatif des paramètres de la paroi pour les configurations N_4 observés en A. Le tableau indique ainsi la longueur les périodes de Moiré L moyennes mesurées, les angles de vrillage expérimentaux moyens calculés à l'aide de l'équation (2) et la valeur théorique des angles de vrillages. Les angles de vrillage théoriques sont calculés à partir du modèle mathématique de l'accommodation de la paroi (cf. équation (1), (Chrétien and Fuller, 2000)) avec a = 40,8 Å, r = 9,4 Å et δx = 48,95 Å. **C.** Histogramme des distribution des formes N_4 relâchées et stressées des configurations 13_4, 14_4 et au sein de l'ensemble des configurations N_4 observées au sein des parois analogues (GTPγS, GDP-BeF_3^- and GDP-AlF_x^-). Les longueurs totales analysées sont de 274,6 µm pour les configurations 13_4, de 66,9 µm pour les configurations 14_4 et de 341,5 µm pour l'ensemble des configurations N_4.

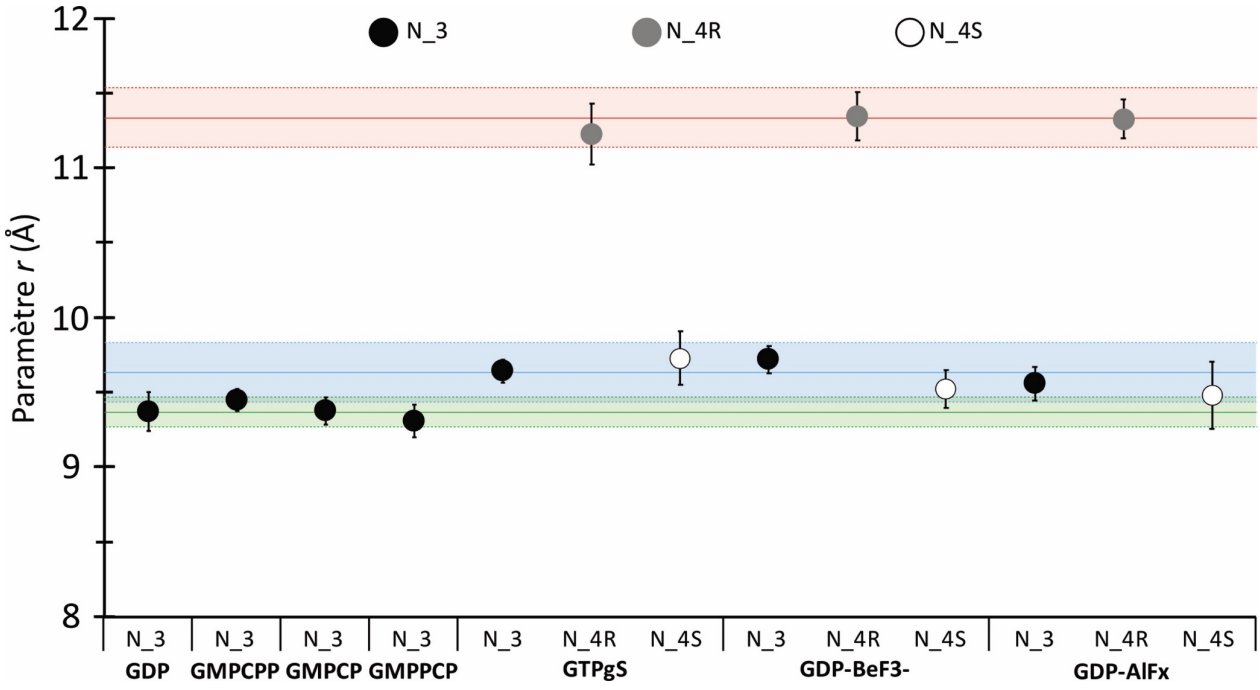


Figure 25. Modification du décalage longitudinal entre deux monomères adjacents (*r*) en fonction de l'état nucléotidique de la paroi et des configurations N_3, N_4R et N_4S

Le graphe représente l'évolution du décalage longitudinal entre les monomères adjacents (*r*) en fonction des différents états nucléotidiques de la paroi (GDP, GMPCPP, GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-) et en fonction des différentes configurations N_3, N_4R et N_4S présentes pour chaque condition. Le *r* moyen observé dans les parois GDP, GMPCPP, GMPCP et GMPPCP N_3 est de 9,4 Å, indiqué par la ligne continue en vert. La moyenne est délimitée par la déviation standard calculé à 0.1 Å. Le *r* moyen observé dans les parois N_3 et N_4S assemblées en présence de GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- est de 9,6 ± 0,2 Å, indiqué par la ligne continue et la délimitation en bleu. Le *r* moyen observé des formes N_4R des parois GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- est de 11,3 ± 0,2 Å, indiqué par la ligne continue et la délimitation en rouge.

Discussion

La coiffe GTP du microtubule est une structure très hétérogène qui présente plusieurs états nucléotidiques (GTP et GDP.P_i). L'hétérogénéité chimique résulte du retard de l'hydrolyse du GTP par rapport à l'incorporation de nouvelles unités de tubuline lors du processus d'assemblage (Carlier and Pantaloni, 1981). La coiffe est reconnue spécifiquement par des MAPs telles que des EBs. L'organisation de la paroi et la structure de la tubuline au niveau de la coiffe diffèrent donc de celles retrouvées au sein de la paroi hydrolysée GDP. Cette organisation et les différentes conformations de la tubuline au sein de la coiffe jouent un rôle fondamental dans la régulation de la dynamique du MT car elle vient protéger la paroi de la dépolymérisation par un mécanisme stabilisateur, qui est mal connu (Mitchison and Kirschner, 1984a; Brouhard and Rice, 2018). Pour pouvoir étudier les caractéristiques de la coiffe GTP, il est nécessaire d'associer un état conformationnel à la tubuline aux états GTP et GDP.P_i. Dans notre étude, nous avons utilisé des analogues lentement hydrolysables du GTP pour bloquer l'activité GTPasique de la tubuline qui a lieu au cours de l'assemblage. Cela permet ainsi de maintenir les parois dans les états non-hydrolysé GTP ou hydrolysé GDP.P_i. Conventionnellement, en structure, les analogues lentement hydrolysables employés sont le GMPCPP et le GTPγS. Si tous deux sont capables de ralentir l'hydrolyse du GTP, les précédentes études démontrent que ces derniers analogues, GMPCPP et GTPγS, impactent différemment la fonction d'assemblage de la tubuline et l'organisation des parois respectives. Le GMPCPP confère à la tubuline un fort pouvoir de nucléation, plus efficace que la molécule de GTP, alors que la tubuline liée au GTPγS est incapable de nucléer sans l'ajout d'un élément nucléateur (des centrosomes, des amorces ou des MAPs). Additionnellement, cette différence de fonction est associée à une différence de structure, la paroi GMPCPP est dans un état étendu, alors que la paroi GTPγS est dans un état compacté. De même, ces deux analogues affectent le vrillage des PFs de la paroi. Dans une paroi à 13 PFs, le vrillage des PFs d'une paroi hydrolysée est nulle. En présence de GMPCPP, le vrillage suit une hélice droite avec un angle moyen de 0,3 ° et en présence de GTPγS, celui-ci suit une hélice gauche avec angle de -0,3 °. Ces différences structurales entre les parois -GMPCPP, -GTPγS et la paroi hydrolysée GDP sont également supportées par la reconnaissance différentielle des parois analogues par les protéines EBs. En cellule, les EBs se lient spécifiquement aux extrémités en croissance des MTs, ce qui coïncide avec la région où se localise la coiffe GTP (Bieling *et al.*, 2007; Dixit *et al.*, 2009; Zanic *et al.*, 2009). De manière intéressante, Maurer et ses collaborateurs ont démontré que les EBs ont la même affinité pour l'extrémité en croissance que pour les parois GTPγS alors que celles-ci démontrent une moins bonne affinité pour les parois GMPCPP. Il paraît donc clair que ni le GMPCPP ni le GTPγS ne miment intégralement les propriétés de la forme GTP de la tubuline. Qui, du GMPCPP ou du GTPγS, est un meilleur analogue de l'état GTP de la tubuline ?

En se reposant sur le fort pouvoir de nucléation de la tubuline-GMPCPP, le modèle actuel de la coiffe GTP prend parti que le GMPCPP serait le meilleur analogue du GTP et par conséquent, la paroi GMPCPP constituerait le modèle *bona fide* d'une paroi non-hydrolysée GTP. En parallèle, la

reconnaissance des EBs pour la paroi GTPγS, suggère que la paroi GTPγS est capable de reproduire structurellement la région reconnue par les EBs, qui se localise au niveau de la coiffe GTP. Le modèle propose donc que l'analogue GTPγS mimerait un état transitoire GDP.Pi, post-hydrolyse de la paroi, ce qui expliquerait sa faible capacité à nucléer la tubuline et la présence de la région reconnue par les EBs au niveau de la coiffe. Dans ce scénario, l'hydrolyse du GTP de la tubuline induirait deux changements conformationnels majeurs : dans un premier temps un mécanisme de compaction, qui permettrait le passage de l'état étendu GTP mimé par la paroi GMPCPP à l'état compacté transitoire GDP.P_i retrouvé dans les parois GTPγS. Et dans un second temps, l'hydrolyse provoquerait un mécanisme de rotation de la SU alpha par rapport à la SU beta du dimère de tubuline, qui expliquerait le changement du vrillage des PFs observé au sein des parois GMPCPP, GTPγS et GDP. Nous avons donc dans un premier temps vérifié les caractéristiques structurales des parois GMPCPP, GTPγS et GDP observées dans l'étude de Zhang et collaborateurs (Zhang *et al.*, 2015; Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). Nos résultats montrent donc les mêmes caractéristiques. Les parois GMPCPP, GTPγS et GDP constituent donc nos parois de référence.

Pour tester le modèle, nous avons ensuite analysé les particularités structurales des parois -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-. Le BeF_3^- et l'AlF_x^- sont connus comme des analogues structuraux du phosphate inorganique P_i. En effet, Carlier et Pantaloni montrent que le BeF_3^- et l'AlF_x^- sont tous deux capables de remplacer le P_i, après hydrolyse du GTP de la tubuline (Bigay *et al.*, 1987; Carlier *et al.*, 1989), qui a lieu au cours de l'assemblage. Outre leur faible pouvoir de nucléation, les auteurs montrent que les tubulines -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^- sont capables de former des MTs et de rendre plus stables leurs parois que les parois auto-assemblées en présence de GTP. De plus, Maurer et ses collaborateurs démontrent que les EBs sont également capables de reconnaître les parois-GDP-BeF_3^- (Maurer *et al.*, 2011). Les parois GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- regroupent donc au moins deux caractéristiques de l'état GTP de la tubuline : l'activation de la tubuline à l'assemblage et la stabilisation de la paroi. Nos collaborateurs en cristallographie aux rayons X ont montré tout d'abord que les nucléotides fluorés se localisent bien au niveau du site catalytique E et au sein du complexe RB3-T_2R-TTL. La tubuline liée au GDP-BeF_3^- se conforme de la même manière que la tubuline liée au GTP, et la tubuline liée au GDP-AlF_x^- se présente sous deux conformations entre les formes GTP et GDP de la tubuline, probablement un état intermédiaire GDP.P_i. Nos résultats en cryo-ME et ceux de nos collaborateurs en SAXS montrent que les parois -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^- sont toutes deux dans un état compacté, avec une distance monomérique moyenne similaire à celles rencontrées au sein des parois GTPγS et GDP. Récemment, Roostalu et ses collaborateurs montrent que la région de liaison aux EBs est retrouvé sur l'entièreté de la paroi en présence d'un mutant de la tubuline où l'hydrolyse est bloquée (E254A) et que cette région s'agrandit, s'étend en présence d'un mutant de la tubuline, où l'hydrolyse est ralentie (E254D) (Roostalu *et al.*, 2020). Ces résultats indiquent que les changements conformationnels de la tubuline reconnus par les EBs sont directement liés à la cinétique de l'hydrolyse du GTP au cours de l'assemblage et aux états nucléotidiques GTP ou GDP.P_i de la

paroi. La reconnaissance spécifique des EBs pour les parois composées de tubulines E254A, de tubulines E254D, de tubulines- GTPγS et de tubulines-GDP-BeF_3^-, montre que les mutants de la tubuline et les analogues (GTPγS, GDP-BeF_3^-) reproduisent les conformations de la tubuline retrouvées au niveau de la coiffe GTP. Ensemble, nos résultats et les résultats récents sur la reconnaissance spécifique des EBs s'accordent par conséquent sur une paroi GTP au niveau de l'extrémité en croissance dans un état compacté, ce qui expliquerait l'affinité des EBs pour la coiffe GTP.

Pour ce qui est du vrillage des PFs, nos résultats en cryo-ME sur les parois -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^- vérifient un impact des analogues du GTP sur le vrillage des PFs. Au sein de la configuration à 13 PFs, la modification du vrillage des PFs induite par les nucléotides fluorés est similaire à la modification du vrillage des PFs induite en présence de GTPγS : le vrillage des PFs suit ainsi une hélice gauche. En présence du GDP-AlF_x^-, cette modification du vrillage des PFs est cependant moins marquée. Nos résultats et ceux de nos collaborateurs sur les parois GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- suggèrent un modèle différent de l'hydrolyse du GTP avec une paroi non-hydrolysée GTP mimé par le GDP-BeF_3^-, un état GDP.P_i mimé par le GDP-AlF_x^- (Figure 26). Ce modèle fait l'état d'une hydrolyse du GTP de la tubuline au cours de l'assemblage sans mécanisme de compaction mais ne dément pas un effet de l'hydrolyse sur le vrillage des PFs. Comme le suggèrent Zhang et collaborateurs, la modification du vrillage des PFs aurait pour origine une rotation interne au sein du dimère de tubuline, de la SU alpha par rapport à la SU beta (Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). Dans nos conditions, nous manquons de résolution pour vérifier le mécanisme de rotation.

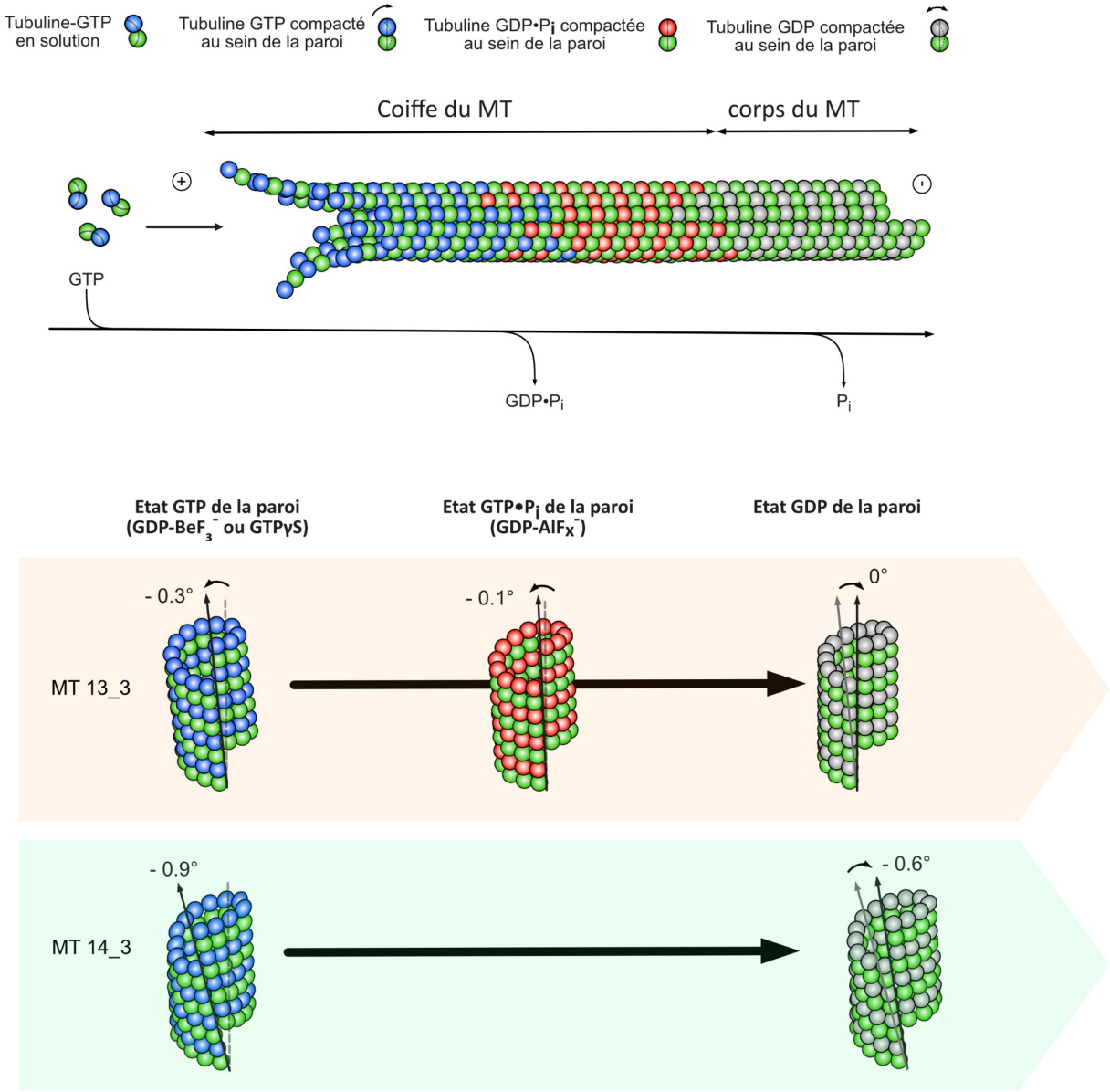


Figure 26. Nouveau modèle de la coiffe élaboré à partir des effets biochimiques et structuraux sur la paroi des analogues GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-

Le nouveau modèle montre un processus de maturation de la paroi induit par l'hydrolyse du GTP. L'hydrolyse du GTP implique la modification des interactions latérales inter-protofilaments. Le modèle fait l'état que la paroi non-hydrolysée GTP se conforme de manière préférentielle selon un vrillage gauche des PFs. Lors de l'hydrolyse du GTP, les contacts latéraux s'affaibliraient et provoqueraient une réduction du vrillage des PFs vers un état métastable moins vrillé retrouvé au sein des parois hydrolysées GDP.

Nous avons également voulu clarifier l'origine de l'état étendu de la tubuline induit par le GMPCPP et ce, en utilisant des dérivés du GMPCPP (GMPCP et GMPPCP). Nos analyses structurales révèlent que la tubuline adopte un état compacté quel que soit le nucléotide (GMPCP et GMPPCP) et que les parois GMPCP et GMPPCP montrent un vrillage quasi-nul des PFs. Cependant, nos résultats sont différents de ceux mis en évidence par nos collaborateurs. En effet, nos collaborateurs montrent que la forme hydrolysée GMPCP de la tubuline est dans un état étendu alors que la forme avec la liaison méthylène déplacé GMPPCP de la tubuline adopte un état compacté. Dans les futures expériences, ce point doit être éclairci. En effet, si nos données s'accordent avec les observations de Zhang *et al*., 2015 ,2018, à savoir que l'hydrolyse de la tubuline GMPCPP provoque une compaction, les résultats de nos collaborateurs suggèrent plutôt que l'hydrolyse du GMPCPP au sein de la paroi ne s'accompagne pas d'un mécanisme de compaction et que l'état étendu n'est qu'une conséquence de la position de la liaison méthylène entre Pβ et Pα, au lieu d'être entre le Pβ et le Pγ. L'origine de l'état étendu de la tubuline induit par le GMPCPP dans nos observations reste donc une question ouverte.

L'analyse approfondie en cryo-ME montre qu'en présence de GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, des configurations énergétiquement défavorables sont maintenues telles que les MT 12_3 ou les formes N_4. L'apparition des formes N_4 est remarquable, premièrement, car les parois N_4 montrent un vrillage important des PFs de +1,5° à plus de 3,7°, alors que les vrillages des PFs des parois GDP sont limités à -0,6°. Le maintien de ces formes plus vrillées suggère un renforcement des contacts latéraux. En analysant les formes N_4, nos résultats montrent la présence de deux classes de MTs : une forme vrillée dite stressée, N_4S, prédite par le modèle de l'accommodation de la paroi, et une forme moins vrillée, dite relaxée, N_4R, où le vrillage des PFs est relaxé par rapport aux angles prédits par le modèle. Nos résultats vérifient donc un mécanisme stabilisateur, qui passe par une relaxation du vrillage des PFs. En d'autres termes, la paroi préfère maintenir les interactions latérales propres à une configuration N_4 par un mécanisme de relaxation plutôt que de corriger les interactions N_4 coûteuses en énergie via une dépolymérisation de la paroi. Un mécanisme similaire a déjà été soulevé auparavant dans la littérature. En phase d'élongation, lors du début de la phase de polymérisation, les parois dynamiques GTP/GDP sont plus flexibles et se conforment selon une plus grande variété de configurations, comprenant des formes énergétiquement défavorables N_4. Dans ces conditions, Chrétien et Fuller (2000) ne décrivent à cette époque que la présence des formes N_4R relaxées. Les auteurs proposent que les formes N_4S ne soient pas observées du fait d'un mécanisme de relaxation, qui s'effectuerait de façon homogène par un léger décalage longitudinal entre deux monomères adjacents, calculé au niveau du paramètre *r*. Dans nos expériences, nous avons pu comparer les paramètres *r* d'une paroi N_4S et N_4R directement et nos résultats vérifient les hypothèses prédites auparavant : les formes relaxées montrent bien une augmentation du décalage longitudinal, d'environ 2 Å. En revanche, il nous manque de l'information pour montrer que ce décalage est homogène. Cette question reste ouverte. Pour mieux comprendre cet aspect,

des expériences supplémentaires visant à détailler l'organisation 3D des monomères au sein de la paroi sont nécessaires.

La mise en évidence des formes N_4S suscite un autre point. Il est couramment admis qu'en cellule la paroi se conforme préférentielle selon une configuration 13_3. Cette configuration implique dans un réseau de type B une unique zone de discontinuité par des interactions de type A, ce qui permet de proposer le modèle communément admis de la paroi, d'un réseau de type B composé d'une unique jointure. Cette jointure est proposée comme zone de faiblesse de par sa nature biochimique (Mandelkow *et al.*, 1986; Nogales and Wang, 2006a). Récemment, Zhang et ses collaborateurs ont démontré que la jointure se définirait par une distance inter-protofilament plus importante (Zhang, LaFrance and Nogales, 2018). La mise en évidence d'une hélicité de type N_4 suggère l'absence de jointure au sein de la paroi (Mandelkow *et al.*, 1986), ce qui pourrait expliquer la stabilisation des formes N_4, coûteuses en énergie. L'absence de la jointure au sein des parois N_4 serait-elle à l'origine de la stabilisation des formes N_4 ? De futures expériences sont donc nécessaires pour détailler l'organisation 3D des hétérodimères de tubulines au sein de parois analogues N_4.

Conclusions

Les conclusions de notre étude sur les parois analogues sont :

- Le GDP-BeF_3^- mime l'état GTP de la tubuline, et le GDP-AlF_x^- l'état GDP.P_i de la tubuline.
- Le GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^- activent la capacité d'élongation de la tubuline mais ne sont pas capables d'initier la nucléation.
- Ni l'état étendu de la tubuline ni le vrillage des PFs suivant une hélice droite, induits par le GMPCPP ne sont retrouvés au sein des parois GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-.
- L'étude sur les dérivées du GMPCPP, le GMPCP (forme hydrolysée) et le GMPPCP (liaison méthylène déplacée) ne permet pas encore de clarifier l'origine de l'état étendu de la tubuline induit par le GMPCPP, la question reste ouverte.
- Le GTPγS, le GDP-BeF_3^- et le GDP-AlF_x^- sont capables de stabiliser la paroi des MTs. Cela s'illustre par le maintien et la favorisation des configurations énergétiquement défavorables N_4.
- La stabilisation des formes N_4 par ces derniers analogues passerait par un phénomène de relaxation au niveau des interactions latérales.

Les résultats sur les parois analogues GDP-BeF_3^-, GDP-AlF_x^- suggèrent que le mécanisme d'hydrolyse du GTP au cours de l'assemblage ne serait pas lié à un phénomène de compaction. Le phénomène de rotation et de vrillage des PFs au sein du mécanisme de l'hydrolyse du GTP n'est pas démenti et il pourrait jouer un rôle dans le cycle GTPasique de la tubuline (hydrolyse du GTP ou relargage du P_i).

Matériels et méthodes

I. Matériels

1. Composant chimiques

Produits	Référence
$AlCl_3$	Sigma-Aldrich #1010841000
BeSO4	Sigma-Aldrich #14270
EGTA	Sigma-Aldrich #E3889
GDP	Sigma-Aldrich #G7127-1G
Glycerol	Sigma-Aldrich #G5516
GMPCPP	JenaBioscience #NU-405S
GMPCP	JenaBioscience #NU-414-5
GMPPCP	JenaBioscience #NU-402-5
GTP	Sigma-Aldrich #G8877
GTPγS	JenaBioscience #NU-412-10
HKF_2	Honeywell#60344-250G
KOH	Sigma-Aldrich #30603
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich #63069
NaF	Sigma-Aldrich #S7920
Nanoparticules d'or colloïdal, 10 nm de diamètre	BBiSolutions #EMGC10
PIPES	Sigma-Aldrich #P6757

2. Tampons et Solutions

Bringley BR buffer 1980 (BRB80) 5X
400 mM K-PIPES (acide 1,4-Piperazinediethane sulfonique, pH ajusté avec du KOH)
5 mM $MgCl_2$
5 mM EGTA
pH ajusté à 6,8 avec KOH

Tampon d'auto-assemblage de la tubuline
- En présence de GTP :

40 µM de tubuline (4 $mg.ml^{-1}$)
1 mM GTP
Dans du BRB80 1X

- En présence de GMPCPP :

10 µM de tubuline
0,1 mM GMPCPP
Dans du BRB80 1X

Tampon des solution-amorce de tubuline

- En présence de GMPCP

40 µM de tubuline
2 mM GMPCP
3,4 M glycérol
Dans du BRB80 1X

- En présence de GMPPCP

40 µM de tubuline
2 mM GMPCP
3,4 M glycérol
Dans du BRB80 1X

- En présence de GTPγS :

40 µM de tubuline
1 mM GTPγS
3,4 M de glycérol (25%)
Dans du BRB80 1X

- En présence de GDP-AlF_x^-

40 µM de tubuline
1 mM GDP
2 mM HKF_2
1,5 mM $AlCl_3$
3,4 M de glycérol
Dans du BRB80 1X

- En présence de GDP-BeF_3^-

40 µM de tubuline
1 mM GDP
20 mM NaF
5 mM $BeSO_4$
3,4 M de glycérol
Dans du BRB80 1X

Solution-amorce de microtubules en présence de faibles nucléateurs :

- En présence de GMPCP

40 µM de tubuline
2 mM GMPCP
1/10 de la solution-amorce de microtubules-GMPCP
Dans du BRB80 1X

- En présence de GMPPCP

40 µM de tubuline
2 mM GMPCP
1/10 de la solution-amorce de microtubules-GMPPCP

Dans du BRB80 1X

- En présence de GTPγS :

40 µM de tubuline
1 mM GTPγS
1/10 de la solution-amorce de microtubules-GTPγS
Dans du BRB80 1X

- En présence de GDP-AlF_x^-

40 µM de tubuline
1 mM GDP
2 mM HKF_2
1,5 mM $AlCl_3$
1/10 de la solution-amorce de microtubules-GDP-AlF_x^-
Dans du BRB80 1X

- En présence de GDP-BeF_3^-

40 µM de tubuline
1 mM GDP
20 mM NaF
5 mM $BeSO_4$
1/10 de la solution-amorce de microtubules-GDP-BeF_3^-
Dans du BRB80 1X

Tampon de travail sans tubuline (dilution en amont du dépôt sur grille):
Concentration finale du nucléotide d'intérêt (1 mM GTP, 0.1 mM GMPCPP, 2 mM GMPCP, 2 mM GMPPCP, 1 mM GTPγS, 5 mM GDP-BeF_3^- ou 1,5 mM GDP-AlF_x^-)
Dans du BRB80 1X

Solution de tubuline-maison porcine
La tubuline est purifiée maison à partir de cervelles de porc fournies par l'abattoir de la Cooperl de Saint-Brieux par deux cycles d'assemblage dans un tampon de haute molarité décrit précédemment (*Castoldi & Popov., 2003*) et une étape de recyclage de la tubuline pour obtenir de la tubuline chargée en GDP au sein du site E localisé au niveau de la sous-unité β de l'hétérodimère selon (*Ashford et al., 1998*). La tubuline est stockée dans le tampon BRB80 à une concentration finale à 220 µM (22 $mg.ml^{-1}$). Par précaution, une étape d'ultracentrifugation à 141 000 x g (Airfuge, A-110 rotor) avant utilisation de la solution mère de tubuline est mis en place afin d'enlever des agrégats de tubulines éventuels.

II. Méthodes

1. Préparation des microtubules dans différents états nucléotidiques

Pour nos conditions d'auto-assemblage, une concentration de tubuline purifiée équivalente à une variation de D.O comprise entre 0,2 et 0,4 en turbidimétrie à 350 nm est suffisante. En effet, ces variations de DO correspondent à une densité de microtubules comprise en moyenne entre trois et une dizaine de microtubules par champs d'acquisitions (905.23 nm x 905.23 nm) dans nos conditions de cryo-microscopie

électronique. Ainsi, cette concentration de tubuline doit être ajustée en fonction du type de nucléotide utilisé. En effet, chaque nucléotide confère à la tubuline une capacité nucléatrice différente.

La tubuline en présence des nucléotides, GTP (condition contrôle) et GMPCPP est capable de s'auto-assembler aux concentrations critiques de 15-20 µM et estimée à moins de 2 µM (*Hyman et al., 1992*), respectivement. Ainsi, pour nos manipulations *in vitro* en cryo-microscopie électronique, les microtubules-GTP et -GMPCPP sont issus de la polymérisation d'une solution d'assemblage contenant 40 µM ou 10 µM de tubuline porcine purifiée, respectivement, 1 mM GTP ou 0,1 mM GMPCPP dans le tampon de travail BRB80) mis à 35 °C pendant 1h.

La tubuline, en présence des nucléotides, GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, n'est pas capable de former des microtubules en auto-assemblage. Ces analogues non-hydrolysables du GTP confèrent à la tubuline un faible pouvoir nucléateur. Sa concentration critique finale en auto-assemblage en présence de ces faibles nucléateurs excède les 100 µM de tubuline. Cependant, une telle concentration en tubuline est inadéquate en cryo-ME car la forte concentration de matériel biologique diminue ainsi le rapport signal-sur-bruit lors de nos acquisitions. C'est pourquoi une stratégie a été élaborée pour améliorer la polymérisation. Si la phase de nucléation de la tubuline en présence de faibles nucléateurs est l'élément limitant, alors la stratégie a été de contourner la phase de nucléation et ce, en initiant l'assemblage de la tubuline en présence d'amorces, dites personnalisées. Le protocole détaillé est présenté dans l'article Ku *et al*., 2020.

Pour résumer, en présence de GMPCP, GMPPCP, GTPγS, GDP-BeF_3^- et GDP-AlF_x^-, la solution de polymérisation finale nécessite d'ajouter une solution-amorce constituée de microtubules préassemblés en présence du nucléotide d'intérêt dans une solution riche en glycérol (25 %), mis à incuber à 35 °C pendant 1 h. Les microtubules obtenus, assemblées sous divers états nucléotidiques sont alors fragmentées par sonication (30 secondes). La solution-amorce permet de s'affranchir de la barrière énergétique nécessaire pour la polymérisation des premiers oligomères de tubuline. Pour assembler des microtubules GTPγS, GMPCP et GMPPCP, un dixième de la solution finale de microtubules GTPγS, GMPCP ou GMPPCP (dont les concentrations finales à 40 µM de tubuline, à 1 mM GTPγS ou à 2 mM GMPCP ou GMPPCP, 25% de glycérol dans du BRB80) sont ajoutés dans une solution d'assemblage préchauffée à 35 °C (dont les concentrations finales à 40 µM de tubuline, à 1 mM de GTPγS ou à 2 mM de GMPCP ou GMPPCP, 1/10 d'une solution-amorce-GTPγS, -GMPCP ou -GMPPCP dans du BRB80) à 35 °C pendant 1 h. La présente stratégie permet l'obtention de microtubules- GTPγS, -GMPCP et -GMPPCP à 2,5 % de glycérol et 40 µM de tubuline en concentration finale.

Les analogues fluorés nécessitent une étape supplémentaire car leurs solutions sont peu stables dans le temps. Ainsi, elles sont préparées avant chaque expérience. Le mélange des composés fluorés s'effectue directement dans le volume de tampon d'assemblage nécessaire, soit pour la solution-amorce, soit pour la solution d'assemblage finale. Pour cela, les sels de fluors sont ajoutés en amont en concentration finale à 5 mM de fluorure de Béryllium (BeF_3^- ; à partir de 20 mM de NaF et 5 mM $BeSO_4$) ou à 1,5 mM d'Aluminium Fluoride (AlF_x^- ; à partir de 2 mM HKF_2 et 1.5 mM $AlCl_3$) dans le BRB80, lequel est complémentée avec du GDP à 1 mM (final). Ce mélange permet l'obtention de la solution de complexes nucléotidiques fluorés GDP-BeF_3^- ou GDP-AlF_x^- dans le volume nécessaire de BRB80 où est initié l'assemblage de la tubuline. Pour une solution-amorce, 25 % glycérol et 40 µM de tubuline (concentrations finales) sont ajoutés au mélange. La solution-amorce est mise à incuber à 35 °C pendant 1 h puis fragmentée par sonication (30 s) pour être utilisée comme amorces dans la solution d'assemblage. Pour la solution d'assemblage finale, 1/10 du volume de la solution-amorce fragmentée de BeF_3^- ou d'AlF_x^- et 40 µM de tubuline sont ajoutés au mélange nucléotidique fluoré préchauffée à 35 °C. Cette dernière solution constitue la solution de microtubules-GDP-BeF_3^- ou -GDP-AlF_x^- observés en cryo-ME. En résumé, la solution-amorce de BeF_3^- ou d'AlF_x^- en concentrations finales est à 40 µM de tubuline, 5 mM de BeF_3^- ou 1,5 mM d'AlF_x^-, 1 mM de GDP, 25 % de glycérol dans du BRB80, et la solution d'assemblage finale est composée de 40 µM de tubuline, 5 mM de BeF_3^- ou 1,5 mM d'AlF_x^-, 1 mM de GDP, 1/10 solution-amorce de BeF_3^- ou d'AlF_x^- dans du BRB80. Cette stratégie nous permet de récupérer une polymérisation suffisante en présence de faibles nucléateurs et de diminuer la concentration de tubuline à 40 µM et 2.5 % de glycérol dans la solution d'assemblage finale, conditions adéquates pour les acquisitions en cryo-ME.

2. Préparation des grilles pour l'analyse par cryo-microscopie électronique (cryo-ME)

Tous les échantillons de microtubules ont été préparés sur des grilles perforées et carbonées en cuivre (QUANTIFOIL Cu 200 R3.5/1). Les grilles ont été ionisées à 10 mA pendant 30 s dans un Leica EM ACE600 avant chaque dépôt d'échantillon. Tous les échantillons ont été préparés dans le cryo-préparateur automatisé de Leica EM GP. La chambre à humidité contrôlée est paramétrée à 100% humidité, le temps de blot est fixé à 2 s sur du papier filtre Whatman n°1. La température de la chambre est maintenue à 35 °C pour toutes les conditions. Les grilles et pinces sont préchauffées avant toute utilisation.

4 µl des solutions de microtubules-GDP et -GMPCPP après 1 h d'incubation à 35 °C sont prélevés et déposés directement sur les grilles. Pour les échantillons de microtubules-GMPCP, GMPPCP, -GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-, une étape de dilution avant le dépôt sur grille est nécessaire. Les solutions de microtubules-GMPCP, GMPPCP, -GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^- après un minimum d'1 h d'incubation à 35 °C sont diluées en amont dans le tampon de travail sans tubuline préchauffé à 35 °C , soit au demi (1:2) en présence des analogues GMPCP, GMPPCP, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-), soit au huitième (1:8) en présence

de GTPγS. 4 µl des solutions pré-diluées de microtubules-GMPCP, -GMPPCP, -GTPγS, -GDP-BeF_3^- et -GDP-AlF_x^-) sont ainsi déposés sur grille et sont incubés dans l'enceinte contrôlée de l'EM GP pendant 30 s. Cette courte incubation assure une adsorption des microtubules sur la grille (Alushin *et al.,* 2014). L'excédent de solution de chaque échantillon est adsorbé lors de la phase de blot, ce qui permet l'obtention de fines couches d'échantillons piégées dans les trous de chaque grille. Les grilles sont ensuite préparées par une congélation rapide dans de l'éthane liquide. Chaque grille est transférée dans des boîtes de stockage et conservées dans un tank rempli d'azote liquide jusqu'au jour de leur observation.

3. Acquisition des données de cryo-ME

Pour l'acquisition des images, les grilles vitrifiées sont transférées à l'extrémité d'un porte échantillon, simple axe (modèle 626, Gatan) dans une cryo-station remplie d'azote liquide et sont insérées dans un microscope électronique (Tecnai G2 T20 Sphera, FEI) paramétré à une tension d'accélération de 200 kV. Le microscope est équipé d'une caméra CCD 4k × 4k (USC4000, Gatan). Les images sont acquises à faible dose d'électrons en binning 2 à un grossissement nominal de x 29 000 (taille de pixel correspondant à 0,79 nm).

4. Analyses des données 2D

Les images contiennent plusieurs microtubules orientés de façon différentes. Afin d'extraire les paramètres structuraux de la paroi, chaque microtubule est individualisé, redressé et analysé dans un premier temps manuellement, et dans un deuxième temps de manière plus automatisée à l'aide du programme TubuleJ, développé dans l'équipe (Blestel, Kervrann and Chrétien, 2009b) et amélioré grâce au travail collaboratif de notre équipe avec Cédric Messaoudi (Institut Curie). Le protocole est résumé dans l'article intitulé « Determination of Microtubule Lattice Parameters from Cryo-electron Microscope Images Using TubuleJ ».

Bibliographie

Akhmanova, A. and Hoogenraad, C. C. (2015) 'Microtubule minus-end-targeting proteins', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.027.

Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2008) 'Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), pp. 309–322. Available at: http://www.nature.com/articles/nrm2369.

Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2019) 'Microtubule minus-end regulation at a glance', *Journal of cell science*. doi: 10.1242/jcs.227850.

Al-Bassam, J. and Chang, F. (2011) 'Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.007.

Alushin, G. M. *et al.* (2014) 'High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in αβ-tubulin upon GTP hydrolysis', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.053.

Amos, L. A. (1995) 'The microtubule lattice - 20 years on', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0962-8924(00)88938-2.

Amos, L. A. and Klug, A. (1974) 'Arrangement of subunits in flagellar microtubules', *Journal of Cell Science*.

Asenjo, A. B. *et al.* (2013) 'Structural model for tubulin recognition and deformation by kinesin-13 microtubule depolymerases', *Cell Reports*. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.030.

Atherton, J. *et al.* (2018) 'Microtubule architecture in vitro and in cells revealed by cryo-electron tomography', *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. doi: 10.1107/S2059798318001948.

Aumeier, C. *et al.* (2016) 'Self-repair promotes microtubule rescue', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3406.

Banerjee, A. *et al.* (1990) 'Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of β-tubulin', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1016/s0021-9258(19)40087-2.

Barbier, P. *et al.* (2019) 'Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects', *Frontiers in Aging Neuroscience*. doi: 10.3389/fnagi.2019.00204.

Benoit, M. P. M. H., Asenjo, A. B. and Sosa, H. (2018) 'Cryo-EM reveals the structural basis of microtubule depolymerization by kinesin-13s', *Nature Communications*. doi: 10.1038/s41467-018-04044-8.

Bieling, P. *et al.* (2007) 'Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro', *Nature*. doi: 10.1038/nature06386.

Bigay, J. *et al.* (1987) 'Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP.', *The EMBO Journal*, 6(10), pp. 2907–2913. doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02594.x.

Blestel, S., Kervrann, C. and Chrétien, D. (2009a) 'A Fourier-Based method for detecting curved microtubule centers: Application to straightening of cryo-Electron microscope images', in *Proceedings - 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, ISBI 2009*. doi: 10.1109/ISBI.2009.5193043.

Blestel, S., Kervrann, C. and Chrétien, D. (2009b) 'A Fourier-Based method for detecting curved microtubule centers: Application to straightening of cryo-Electron microscope images', in *Proceedings - 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, ISBI 2009*. doi: 10.1109/ISBI.2009.5193043.

Brouhard, G. J. *et al.* (2008) 'XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.043.

Brouhard, G. J. and Rice, L. M. (2014) 'The contribution of αβ-tubulin curvature to microtubule dynamics', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201407095.

Brouhard, G. J. and Rice, L. M. (2018) 'Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/s41580-018-0009-y.

Caplow, M., Ruhlen, R. L. and Shanks, J. (1994) 'The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: All of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.127.3.779.

Carlier, M. F. *et al.* (1989) 'Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00434a073.

Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (1981) 'Kinetic Analysis of Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis Associated with Tubulin Polymerization', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00510a030.

Chaaban, S. and Brouhard, G. J. (2017) 'A microtubule bestiary: Structural diversity in tubulin polymers', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E16-05-0271.

Chretien, D. *et al.* (1992) 'Lattice defects in microtubules: Protofilament numbers vary within individual microtubules', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.117.5.1031.

Chrétien, D. and Fuller, S. D. (2000) 'Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1006/jmbi.2000.3696.

Chrétien, D., Fuller, S. D. and Karsenti, E. (1995) 'Structure of growing microtubule ends: Two-dimensional sheets close into tubes at variable rates', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.129.5.1311.

Chrétien, D. and Wade, R. H. (1991) 'New data on the microtubule surface lattice', *Biology of the Cell*. doi: 10.1016/0248-4900(91)90062-R.

Combeau, C. and Carlier, M. F. (1989) 'Characterization of the aluminum and beryllium fluoride species bound to F-actin and microtubules at the site of the γ-phosphate of the nucleotide', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1016/s0021-9258(19)47259-1.

Dallai, R. *et al.* (2005) 'Giant sperm cells with accessory macrotubules in a neuropteran insect', *Tissue and Cell*. doi: 10.1016/j.tice.2005.05.002.

Debs, G. E. *et al.* (2020) 'Dynamic and asymmetric fluctuations in the microtubule wall captured by high-resolution cryoelectron microscopy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.2001546117.

Dimitrov, A. *et al.* (2008) 'Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues', *Science*. doi: 10.1126/science.1165401.

Dixit, R. *et al.* (2009) 'Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0807614106.

Dogterom, M. and Koenderink, G. H. (2019) 'Actin–microtubule crosstalk in cell biology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/s41580-018-0067-1.

Doodhi, H. *et al.* (2016) 'Termination of Protofilament Elongation by Eribulin Induces Lattice Defects that Promote Microtubule Catastrophes', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.053.

Duan, A. R. *et al.* (2017) 'Interactions between Tau and Different Conformations of Tubulin: Implications for Tau Function and Mechanism', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.018.

Estévez-Gallego, J. *et al.* (2020) 'Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.50155.

Flemming, W. (1880) 'Beiträge zur Kenntniss der Zelle und Ihrer Lebenserscheinungen: Theil II', *Archiv für mikroskopische Anatomie*. doi: 10.1007/BF02952594.

Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2010) 'Cell mechanics and the cytoskeleton', *Nature*. doi: 10.1038/nature08908.

de Forges, H. *et al.* (2016) 'Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2016.10.048.

Fourest-Lieuvin, A. *et al.* (2006) 'Microtubule regulation in mitosis: Tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E05-07-0621.

Gigant, B. *et al.* (2005) 'Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine', *Nature*. doi: 10.1038/nature03566.

Goodson, H. V. and Jonasson, E. M. (2018) 'Microtubules and microtubule-associated proteins', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a022608.

Guesdon, A. *et al.* (2016) 'EB1 interacts with outwardly curved and straight regions of the microtubule lattice', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3412.

Hamel, E. (1992) 'Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin a, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B', *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/0163-7258(92)90028-X.

Hamel, E. and Lin, C. M. (1984) 'Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), a potent nucleotide inhibitor of microtubule assembly', *Journal of Biological Chemistry*, 259(17), pp. 11060–11069. doi: 10.1016/s0021-9258(18)90622-8.

HARRIS, P. (1962) 'Some structural and functional aspects of the mitotic apparatus in sea urchin embryos.', *The Journal of cell biology*. doi: 10.1083/jcb.14.3.475.

Hood, K. A. *et al.* (2002) 'Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity', *Cancer Research*.

Horio, T. and Hotani, H. (1986) 'Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy', *Nature*. doi: 10.1038/321605a0.

Hyman, A. A. *et al.* (1992) 'Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: Information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.3.10.1155.

Hyman, A. A. *et al.* (1995) 'Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: Information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(α,β)-methylene- diphosphonate', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.128.1.117.

Janke, C. (2014) 'The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201406055.

Janke, C. and Magiera, M. M. (2020) 'The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/s41580-020-0214-3.

Jánosi, I. M., Chrétien, D. and Flyvbjerg, H. (1998) 'Modeling elastic properties of microtubule tips and walls', *European Biophysics Journal*. doi: 10.1007/s002490050160.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004) 'Microtubules as a target for anticancer drugs', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc1317.

Kikkawa, M. *et al.* (1994) 'Direct Visualization of the Microtubule Lattice Seam Both In Vitro and In Vivo Preparation of Tubulin Surface Image of Kinesin Head', *Synthesis*.

Krebs, A., Goldie, K. N. and Hoenger, A. (2004) 'Complex formation with kinesin motor domains affects the structure of microtubules', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2003.10.039.

Ku, S., Messaoudi, C., *et al.* (2020) 'Determination of Microtubule Lattice Parameters from Cryo-electron Microscope Images Using TubuleJ', *BIO-PROTOCOL*. doi: 10.21769/bioprotoc.3814.

Ku, S., Heichette, C., *et al.* (2020) 'Microtubule Seeded-assembly in the Presence of Poorly Nucleating Nucleotide Analogues', *BIO-PROTOCOL*. doi: 10.21769/bioprotoc.3714.

Lacroix, B. *et al.* (2010) 'Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201001024.

Leandro-García, L. J. *et al.* (2010) 'Tumoral and tissue-specific expression of the major human β-tubulin isotypes', *Cytoskeleton*. doi: 10.1002/cm.20436.

Ledbetter, M. C. and Porter, K. R. (1963) 'A "microtubule" in plant cell fine structure', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.19.1.239.

Leduc, C. and Etienne-Manneville, S. (2015) 'Intermediate filaments in cell migration and invasion: The unusual suspects', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.005.

Lu, Q. and Luduena, R. F. (1994) 'In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of αβII, αβIII, and αβIV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42132-6.

Ludueña, R. F. (1997) 'Multiple forms of tubulin: Different gene products and covalent modifications', *International Review of Cytology*. doi: 10.1016/s0074-7696(08)62138-5.

Mandelkow, E. M. *et al.* (1986) 'On the surface lattice of microtubules: Helix starts, protofilament number, seam, and handedness', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.102.3.1067.

Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. and Milligan, R. A. (1991) 'Microtubule dynamics and microtubule caps: A time-resolved cryo-electron microscopy study', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.114.5.977.

Manka, S. W. and Moores, C. A. (2018) 'Cryo-Em Insight into Microtubule-Doublecortin (MT-DCX) Interaction and the Stages of MT Dynamic Instability Harnessed by DCX', *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.2113.

Manka, S. W. and Moores, C. A. (2019) 'Microtubule Nucleation and Stabilization by Doublecortin', *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.1394.

Maurer, S. P. *et al.* (2011) 'GTPγS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1014758108.

Maurer, S. P. *et al.* (2012) 'EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule

ends', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.049.

Mazia, D. and Dan, K. (1952) 'The Isolation and Biochemical Characterization of the Mitotic Apparatus of Dividing Cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.38.9.826.

McEwen, B. and Edelstein, S. J. (1980) 'Evidence for a mixed lattice in microtubules reassembled in vitro', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/0022-2836(80)90300-9.

Mickey, B. and Howard, J. (1995) 'Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.130.4.909.

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S. (2000) 'The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules', *Current Biology*. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00600-X.

Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984a) 'Dynamic instability of microtubule growth', *Nature*.

Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984b) 'Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes', *Nature*. doi: 10.1038/312232a0.

Müller-Reichert, T. *et al.* (1998) 'Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: Information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (α,β)methylenediphosphonate', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.95.7.3661.

Nithianantham, S. *et al.* (2018) 'Structural basis of tubulin recruitment and assembly by microtubule polymerases with tumor overexpressed gene (TOG) domain arrays', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.38922.

Nogales, E. and Wang, H. W. (2006a) 'Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: How and why?', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2006.02.009.

Nogales, E. and Wang, H. W. (2006b) 'Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives', *Current Opinion in Structural Biology*. doi: 10.1016/j.sbi.2006.03.005.

Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998) 'Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography (vol 391, pg 199, 1998)', *Nature*.

Pamula, M. C., Ti, S. C. and Kapoor, T. M. (2016) 'The structured core of human β tubulin confers isotype-specific polymerization properties', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201603050.

Peris, L. *et al.* (2009) 'Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200902142.

Pierson, G. B., Burton, P. R. and Himes, R. H. (1978) 'Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled in vitro', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.76.1.223.

Pilhofer, M. *et al.* (2011) 'Microtubules in Bacteria: Ancient tubulins build a five-protofilament homolog of the eukaryotic cytoskeleton', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1001213.

Rice, L. M., Montabana, E. A. and Agard, D. A. (2008) 'The lattice as allosteric effector: Structural studies of αβ- and γ-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0801155105.

Richard McIntosh, J. *et al.* (2018) 'Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201802138.

Roll-Mecak, A. (2013) 'Shining light at microtubule crossroads', *Science*. doi: 10.1126/science.1248235.

Roostalu, J. *et al.* (2020) 'The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.51992.

Roostalu, J. and Surrey, T. (2017) 'Microtubule nucleation: Beyond the template', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm.2017.75.

ROTH, L. E. and DANIELS, E. W. (1962) 'Electron microscopic studies of mitosis in amebae. II. The giant ameba Pelomyxa carolinensis.', *The Journal of cell biology*. doi: 10.1083/jcb.12.1.57.

Samsonov, A. *et al.* (2004) 'Tau interaction with microtubules in vivo', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.01531.

Sandoval, I. V. *et al.* (1977) 'Role of nucleotides in tubulin polymerization: Effect of guanylyl 5'-methylenediphosphonate', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), pp. 4881–4885. doi: 10.1073/pnas.74.11.4881.

Schaedel, L. *et al.* (2015) 'Microtubules self-repair in response to mechanical stress', *Nature Materials*. doi: 10.1038/nmat4396.

Schaedel, L. *et al.* (2019) 'Lattice defects induce microtubule self-renewal', *Nature Physics*. doi: 10.1038/s41567-019-0542-4.

Song, Y. H. and Mandelkow, E. (1993) 'Recombinant kinesin motor domain binds to β-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.90.5.1671.

Steinmetz, M. O. and Prota, A. E. (2018) 'Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2018.05.001.

Stepanova, T. *et al.* (2003) 'Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein)', *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/jneurosci.23-07-02655.2003.

Straube, A. (2011) 'How to measure microtubule dynamics?', *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-61779-252-6_1.

The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology (2008) *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. doi: 10.1007/978-1-59745-336-3.

Tilney, L. G. *et al.* (1973) 'Microtubules: Evidence for 13 protofilaments', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.59.2.267.

Tran, P. T., Walker, R. A. and Salmon, E. D. (1997) 'A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.138.1.105.

Vemu, A. *et al.* (2018) 'Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation', *Science*. doi: 10.1126/science.aau1504.

Wada, B. (1955) 'Some problems on the mitotic figures studied in the living cell', *Caryologia*, 7(3), pp. 389–403. doi: 10.1080/00087114.1955.10797497.

Wade, R. H., Chrétien, D. and Job, D. (1990) 'Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate?', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/0022-2836(90)90236-

F.

Walker, R. A. *et al.* (1988) 'Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies.', *The Journal of cell biology*. doi: 10.1083/jcb.107.4.1437.

Wallace, S. L. (1961) 'Colchicine. Clinical pharmacology in acute gouty arthritis', *The American Journal of Medicine*. doi: 10.1016/0002-9343(61)90052-3.

Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. and Taylor, E. W. (1968) 'The Colchicine-Binding Protein of Mammalian Brain and Its Relation to Microtubules', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00852a043.

Yajima, H. *et al.* (2012) 'Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201201161.

Zanic, M. *et al.* (2009) 'EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0007585.

Zhang, R. *et al.* (2015) 'Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.012.

Zhang, R. *et al.* (2017) 'Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.30959.

Zhang, R., LaFrance, B. and Nogales, E. (2018) 'Separating the effects of nucleotide and EB binding on microtubule structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1802637115.

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Titre : Étude de l'effet des analogues du GTP sur la structure des microtubules

Mots clés : Cryo-ME – microtubule – coiffe GTP– activité GTPasique – assemblage – paroi

Résumé : Les microtubules sont des composants essentiels du cytosquelette, dont la dynamique est intiment liée à l'hydrolyse du GTP de la tubuline (sous-unité β) lors de la polymérisation. La paroi des MTs, constituée de tubuline-GDP et métastable, serait stabilisée par l'extrémité en croissance constituée de tubuline-GTP et ainsi nommée coiffe GTP. Cependant, la nature de la coiffe ainsi que les modifications conformationnelles subies par la tubuline lors de l'hydrolyse du GTP restent discutées. Le modèle actuel propose que la tubuline-GTP de la coiffe possèderait une conformation étendue et que son hydrolyse serait accompagnée d'une compaction fragilisant les contacts latéraux inter-tubuline et donc la stabilité de la paroi. Cependant, ce modèle découle d'études structurales réalisées sur des parois de MTs formées à partir de tubuline-GMPCPP, un analogue lentement hydrolysable du GTP, et suppose que cet analogue constituerait le modèle *bona fide* du GTP. Afin de vérifier cette théorie, nous avons entrepris au cours de ma thèse l'analyse structurale de parois assemblées en présence d'une gamme élargie d'analogues lentement hydrolysables du GTP. Nos résultats montrent notamment qu'un autre analogue du GTP, le GDP-BeF_3^-, pourrait s'avérer être un meilleur analogue structural que le GMPCPP et suggèrent l'absence de compaction de la tubuline lors de l'hydrolyse du GTP. La compaction de la tubuline ne serait donc pas le mécanisme responsable de l'instabilité de la paroi des MTs.

Title : Study of GTP analog impacts on MT structure

Keywords : Cryo-ME – microtubule – GTP cap – GTPase activity – assembly – lattice

Abstract: Microtubules are highly dynamic cytoskeletal fibers essential for the cell's life. Their dynamics is intimately linked to the GTP hydrolysis of tubulin (β subunit) during polymerization. The metastable GDP-tubulin lattice is thought to be stabilized by the growing GTP-tubulin extremity, called the GTP cap. However, the nature of this cap as well as the conformational changes undergone by tubulin during GTP hydrolysis is still discussed. The current model suggests that the GTP-tubulin conformation is extended and that its hydrolysis provokes a compaction weakening the tubulin lateral interaction and thus the stability of the lattice. However, this model is based on structural studies of MT lattices formed from GMPCPP-tubulin, a slowly hydrolysable analogue of GTP, and assumes that this analogue is the *bona fide* model of the GTP. To test this theory, we undertook, during my thesis, a structural analysis of the lattice assembled in the presence of an extended range of slowly hydrolysable GTP analogues. Our results show that another GTP analogue, GDP-BeF_3^-, may prove to be a better structural analogue than GMPCPP, and suggest the absence of tubulin compaction during GTP hydrolysis. Tubulin compaction would therefore not be the mechanism responsible for the instability of the MT wall.