



# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

---

**Présentée et soutenue par  
SEYED RAMTIN SHAYAN AZAD**

Le 11 avril 2019

**Analyse structurale de la biogenèse de la petite sous-unité  
ribosomique eucaryote par cryo-microscopie électronique et  
analyse d'images**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE**

Unité de recherche :

**LBME - Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes**

Thèse dirigée par

**Pierre-Emmanuel GLEIZES et Célia PLISSON-CHASTANG**

Jury

**Mme Christine Allmang, Rapporteur**

**Mme Emmanuelle Schmitt, Rapporteur**

**M. Guy Schoehn, Rapporteur**

**M. Pierre-Emmanuel GLEIZES, Directeur de thèse**

**Mme Célia Plisson-Chastang, Co-directrice de thèse**

## Remerciements

J'aimerais dans un premier temps remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mes travaux de recherche : Mme Christine Allmang, Mme Emmanuelle Schmitt, M. Guy Schoehn et M. Laurent Maveyraud.

Un grand merci également à mon équipe d'accueil « Dynamique et dysfonctionnements de la synthèse des ribosomes » qui m'ont fait grandir scientifiquement et humainement, durant mes cinq années passées au laboratoire: Célia, Pierre-Emmanuel, Simon, Marie-Françoise, Nathalie, Franck, Dana, Léo, Laura, Maxime, Sophie, Natacha. J'ai passé d'excellents moments à vos côtés !!!

Un remerciement exclusif à toi Célia. Je veux tout d'abord saluer tes qualités humaines, professionnelles et scientifiques, reconnues de tous !! En effet, tu as su diriger ma thèse et me faire évoluer avec rigueur et justesse. Sans toi mon parcours ne serait surement pas le même. Merci également de m'avoir fait découvrir le monde de la microscopie électronique avec passion, que tu m'as transmise. Chaque Angström gagné était un moment de joie avec toi ! Quand je n'avais plus le mojo, tu as toujours été là pour me remonter le moral et me faire avancer. C'est une chance pour moi d'avoir été encadré et travaillé avec toi. Tu m'as aussi beaucoup aidé dans ma vie personnelle et pour ça je t'en serai jamais assez reconnaissant. Je suis persuadé que par la suite tu vas encadrer de nombreux projets et de doctorants de grandes qualités. Merci pour tout, comme jamais !!

Un remerciement particulier à toi Pierre-Emmanuel. J'ai toujours été admiratif de ta passion pour la science et de ton regard critique et juste. Mes discussions avec toi m'ont beaucoup enrichi scientifiquement et intellectuellement. Mais par-dessus de tout, j'aimerais saluer ta bienveillance et tes qualités humaines. Dans les moments difficiles tu m'as toujours encouragé et accompagné avec optimisme ! Tes conseils, tout au long de ma thèse, m'ont été très précieux et ont alimenté ma réflexion. Merci encore !

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ma thèse. Dana pour la purification des particules, l'équipe de Pr Urike Kutay, l'équipe de Dr Brigitte Pertschy, l'équipe Calmip, le service informatique et Julien Marcoux pour les études protéomiques.

Merci à Steph et Vanessa du plateau (ou encore la plaque tournante des ragots). Tous les matins avant d'arriver dans mon bureau, je venais me ressourcer au près de vous ! Votre bon humeur (et les ragots) me donnait de l'énergie pour entamer ma journée. Mais le plateau était aussi ma deuxième maison. Merci pour tous ces moments forts (ou je chantais faux en manipant) et les rigolades infinies. Surtout merci de m'avoir formé en microscopie et me supporter pendant les manips. Je voulais aussi m'excuser pour mes coups de fil tardifs (même le weekend) pour vous demander de l'aide ... je vous dois beaucoup de gages et de gâteaux.

Je désire aussi remercier toutes les personnes que j'ai rencontré au sein du LBME, LMGM, CRCA, et CBD. J'ai passé des moments inoubliables au près de vous que ce soit pendant un repas à l'upsidum, dans un séminaire, autour d'un godet ou pendant un match de rugby flag. Merci de m'avoir accompagné durant ces années.

Je tiens désormais à remercier mes amis. En premier lieu, j'aimerais remercier mes plus vieux amis. Arnaud (mais aussi ta famille Lucie la mulette, Mahault et isaure), quand je t'ai rencontré au lycée je ne parlais pas encore très bien le français mais cela ne t'as pas empêché de venir vers moi et de me faire rentrer dans ta propre famille comme un frère. Je ne compte plus les moments incroyables qu'on a passé ensemble à déconner (les nighto avec un kiddy). Tu as toujours été là quelles que soient les circonstances. Merci à Antoine (la punaise), jamy, Barré Sauste, Debrito, Bichard, chaque moment en votre compagnie est un délice.

Je souhaite remercier les Mulets. Mehdi (mulet man), on s'est rencontré à la fac, et depuis tu es devenu mon frère ! Je sais que je peux toujours compter sur toi. Merci pour ces sessions méthode (plus bas) ou encore ces godets (délicat ?). Tu resteras le seul 21 du 31 à Toulouse. Merci également pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne t'en saurais jamais assez reconnaissant. Merci aussi à ta famille qui est aussi incroyables que toi.

Joe, ma première colocation était avec toi et elle a durée cinq ans ! Merci pour ces moments magiques passés ensemble notamment les sessions musiques qu'on se faisait en rentrant de soirée ... tu m'as ouvert le monde du piano et depuis ma vie a changé ! Merci.

Max (Marathon man), je t'ai rencontré à notre coloc autour d'une soirée Chips et vin et depuis, notre amitié n'a jamais cessé et ne fait que grandir. Tu es le meilleur mulet ne change jamais !

Merci à mes colocs Arthur et Marine. Arthur, tu m'as fait rêver avec les matchs endiablés et tes desserts. On trouvera un jour le meilleur Burger du monde !! Marine (Picon), tu nous as régaler tout au long de notre coloc surtout avec tes repas (spécialement les pigeons). Merci à vous deux de m'avoir supporté durant ces quatres années. Je n'oublierais jamais nos sessions méthodes, nos soirées salade ou encore nos night au black lion, vous êtes les meilleurs. Rendez-vous à Londres.

Un grand merci à Touzy (country man), Anais, Ropi, Fadou, Daminou, Raph, Julien le roux, Dimeh, Charlotte, Pym et Pierro. Avec vous, la soirée est toujours plus folle !

Merci à mes copains du labo : Clement, Natacha, Maleaume, Duykhahn, Alix, Elise, Cécilia, Julien, Jade, Tommy, Lise, Mylène (Schnaps), Thomas pilipe. Avec vous j'ai passé des moments merveilleux. Merci pour ces moments mythiques autour d'un Tarot, un godet, ou encore un limbo time. La soirée commence maintenant !

Merci aux lyonnais, Mehdi, Patoche, Ben et Dirty Pytch. Mon espérance de vie s'est divisée par deux à chaque fois que je suis venu vous voir à Lyon (un loudz ?) ... Merci, vous êtes mythiques !!

Merci aux copains de délicate, Julia, Michael, Antoine, Niko et Aurélien. On a refait le monde avec des godets. On continu les débats à Londres.

Je voudrais adresser un remerciement très particulier à ma famille Iranienne et notamment à mes parents (Mohsen, Firouzeh, Mona et Kamyar). Notre distance géographique n'a jamais influencé ni effacé notre relation, votre soutien constant et vos encouragements. Cette thèse est également le fruit de vos efforts. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis mon enfance jusqu'à maintenant.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude envers ma famille Française Rous/Cazanobe et plus particulièrement à Florence, Thierry, Thibault, Arnaud et Johanne pour votre soutient inestimable. Vous m'avez accepté comme un membre de votre famille et m'avez aidé dans les moments les plus difficiles de ma vie sans ne jamais rien demander en retour. Vous êtes très précieux et un exemple pour moi. Merci mille fois.

## Résumé :

L'assemblage des deux sous-unités ribosomiques (appelées 40S et 60S chez les eucaryotes) est un processus complexe, qui nécessite l'intervention de plus de 200 co-facteurs de maturation (CFM). Pour former des sous-unités ribosomiques matures et fonctionnelles, les CFM sont nécessaires à la maturation des ARN ribosomiques (ARNr), mais également à leur repliement correct et à leur assemblage avec les protéines ribosomiques (Rps). Malgré une identification quasi-exhaustive de ces CFM chez la levure et l'humain, leur fonction moléculaire précise reste à élucider. Par ailleurs, des défauts dans la synthèse des ribosomes ont récemment été associés à une liste croissante de maladies génétiques humaines (appelées ribosomopathies) et de cancers, ce qui nécessite une compréhension précise de chaque étape des mécanismes de biogenèse des ribosomes.

De nombreuses études moléculaires et fonctionnelles ont récemment permis de définir plusieurs étapes successives de maturation cytoplasmique des particules pré-40S eucaryotes. Il est maintenant crucial d'intégrer ces descriptions moléculaires très détaillées des événements de maturation des ribosomes dans une vision tridimensionnelle de l'assemblage des ribosomes, et de comprendre le remodelage structural que les particules pré-ribosomiques peuvent subir au cours de leur maturation. Dans ce but j'ai déterminé, par cryo-microscopie électronique en transmission et analyse d'images, la structure 3D de précurseurs de la petite sous-unité ribosomique, purifiés à différentes étapes de maturation, chez l'Homme et la levure.

Dans un premier temps, j'ai utilisé le CFM Tsr1 comme appât de purification dans des levures de phénotype sauvage, et déterminé la structure haute résolution de ces particules pré-40S cytoplasmiques. Ceci m'a permis de mettre en évidence trois étapes de maturations successives, commençant par l'autophosphorylation et le relargage du CFM Ltv1 et aboutissant à la flexibilité de la plateforme de la particule pré-40S. Ensuite, en collaboration avec le Dr Brigitte Pertschy (Graz, Autriche) j'ai déterminé la structure de particules pré-40S cytoplasmiques de levure, portant une mutation sur la protéine Rps20. Ceci a permis de mieux caractériser le rôle de Rps20 dans le relargage des CFM Rio2 et Ltv1 lors de l'assemblage de la sous-unité 40S. Enfin, j'ai déterminé la structure 3D des particules pré-40S humaines purifiées à un stade cytoplasmique tardif, à une résolution de 3 Å. Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe du Pr. Ulrike Kutay (ETH Zurich). Cette analyse nous a permis de localiser pour la première fois le CFM RIO1 sur les particules pré-40S cytoplasmiques tardives. En outre, nos résultats nous ont permis de mettre en lumière l'existence de remodelages structuraux inédits dans les dernières étapes de la maturation de la petite sous-unité ribosomique humaine.

## **Abstract :**

Ribosome assembly is a complex process that requires the intervention of more than 200 assembly factors (AFs). These proteins are essential for the processing and modification of ribosomal RNAs, as well as the structural assembly of ribosomal subunits. This mechanism, highly studied in yeast, generally conserved in eukaryotes, but has become more complex with evolution in higher eukaryotes.

In addition, defects in ribosome synthesis have recently been associated with a list of human genetic diseases (called ribosomopathies) and cancers, via ribosome biogenesis disease. Numerous molecular and functional studies then made it possible to define several successive stages of cytoplasmic maturation of pre-40S particles in human and yeast. It is now crucial to incorporate these highly detailed molecular descriptions of ribosome maturation events into a three-dimensional view of ribosome assembly and to understand the structural remodeling of pre-ribosomal maturation particles.

Using tandem purification methods, coupled with cryo-electron microscopy and isolated particle analysis, I have determined several high-resolution 3D structures of cytoplasmic pre-40S particles, in yeast and human, at different maturation steps. First, I determined the 3D structure of the pre-40S particles, purified using AF Tsr1-FPZ as a bait at 3.1 Å resolution. Structural heterogeneity tests indicated that the beak and platform domains are dynamic zones, and sheds new light on the structural remodeling events occurring during 40S subunit assembly. Moreover, in collaboration with the team of Dr. Brigitte Pertschy, we have determined the 3D structure of yeast cytoplasmic pre-40S particles carrying point mutations on Rps20. Our atomic models have allowed to highlight a close relationship between the correct assembly of Rps20 and the release of AFs Ltv1 and Rio2 from the maturing small ribosomal subunit. Finally, I also determined the 3D structures of human pre-40S particles trapped at a very late cytoplasmic maturation step, with a resolution of ~3 Å. This work was performed in collaboration with Prof. Ulrike Kutay's team (ETH Zurich). These data allowed us to uncover new steps in the cytoplasmic maturation of human pre-40S particles.

This structural study allows us to propose new molecular mechanisms underlying the final steps of eukaryotic ribosomal assembly.

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b> -----	<b>6</b>
I.A Les ribosomes eucaryotes-----	8
I.A.1 La structure et la composition des ribosomes eucaryotes-----	8
I.A.2 La biogénèse des ribosomes eucaryotes-----	13
I.B Les acteurs de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique 40S-----	15
I.B.1 La maturation de l'ARNr : Du pré-ARNr primaire à l'ARNr 18S-----	15
I.B.1.1 Maturation de l'extrémité 5'-ETS de l'ARNr 18S-----	19
I.B.1.2 Maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S-----	20
I.B.1.3 Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr-----	22
I.B.2 L'assemblage des protéines ribosomiques (RP)-----	24
I.B.3 Le rôle des co-facteurs de maturation (CFM)-----	27
I.B.3.1 Activité enzymatique des CFM-----	29
I.C Etapes de la maturation des particules pré-40S-----	31
I.C.1 Export nucléo-cytoplasmique des particules pré-40S eucaryotes-----	33
I.C.2 Etapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S de levure-----	35
I.C.3 Les étapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S de l'Homme-----	39
I.D Apport de la cryo-EM dans l'étude des ribosomes-----	41
I.D.1 Etude structurale des ribosomes matures-----	41
I.D.2 Etude structurale des particules pré-40S cytoplasmiques-----	44
I.D.3 Positionnement et rôle des CFM cytoplasmiques impliqués dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S, chez la levure-----	45
I.D.4 Positionnement et rôle des CFM cytoplasmiques impliqués dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S, chez l'Homme-----	49
I.E Contexte, problématique et objectifs de la thèse-----	53
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b> -----	<b>55</b>
II.A. Purification des particules pré-ribosomiques pré-40S-----	57
II.A.1 Purification des particules pré-40S de levures Tsr1-FPZ-----	57
II.A.2 Particules pré-40S de levures : Tsr1-TAP rps20 $\Delta$ loop-----	58
II.A.3 Purification des particules pré-40S humaines RIO1(kd)-TAP-----	58
II.B Microscopie électronique en transmission-----	59
II.B.1 Grilles de microscopie électronique en transmission-----	59
II.B.2 Ionisation des grilles-----	60
II.B.3 Principes généraux-----	60
II.B.3.1 Source d'électrons-----	61

II.B.3.2 La colonne-----	64
II.B.3.3 Les lentilles électromagnétiques-----	65
II.B.3.4 Détecteurs d'électrons-----	66
II.B.3.5 L'Intéactions des électrons avec l'échantillon et formation d'image-----	68
II.B.3.6 Formation d'images-----	70
II.B.3.7 La fonction de transfert de contraste (CTF)-----	74
II.C Préparation et acquisition d'images de l'échantillon biologique-----	77
II.C.1 Préparation de l'échantillon-----	77
II.C.1.1 Préparation de l'échantillon pour la coloration négative-----	77
II.C.1.2 Préparation de l'échantillon pour la cryo-congélation-----	78
II.C.2 Acquisition des images en cryo-EM-----	79
II.D Analyse d'images-----	83
II.D.1 Principes généraux-----	83
II.D.2 Le programme RELION 2.1.0-----	84
II.D.2.1 Pré-traitement-----	85
II.D.2.2 La classification 2D-----	88
II.D.2.3 La classification 3D-----	89
II.D.2.4 Auto-raffinement-----	90
II.D.2.5 Post-traitement-----	90
II.D.2.6 Auto-raffinement et classification masqués avec ou sans soustraction du signal-----	91
II.D.3 Interprétation des cartes de densité : construction d'un modèle atomique-----	96
II.D.4 Les ressources informatiques-----	96
<b>III. RESULTATS-----</b>	<b>97</b>
<b>III.1 Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques de levures (Tsr1-FPZ) -----</b>	<b>99</b>
III.1.A Purification des particules Tsr1-FPZ-----	99
III.1.B Analyse structurale des particules pré-40S Tsr1-FPZ par cryo-EM-----	102
III.1.B.1 Acquisition d'images au NeCEN-----	102
III.1.B.2 Acquisition d'images à l'ESRF-----	103
III.1.B.2.1 Analyse d'images par classification « globale » -----	103
III.1.B.2.2 Analyse d'images par classification localisée-----	107
III.1.C Discussion-----	114
III.1.D Perspectives-----	120
<b>III.2 Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques de levures (Delta-loop Rps20) --</b>	<b>121</b>
III.2.A Objectifs et résumé de l'article-----	121
III.2.B Article : Conformational proofreading of distant 40S subunit maturation events by a long-range communication Mechanism-----	123

<b>III.3 Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques humaines tardives (RIO1(kd)-TAP)</b>	<b>173</b>
III.3.A Purification et analyse compositionnelle des particules RIO1(kd)-TAP	175
III.3.B Analyse structurale des particules pré-40S RIO1(kd)-TAP par Cryo-EM	176
III.3.B.1 Analyse du modèle « consensus »	176
III.3.B.2 Analyse par classification 3D globale	180
III.3.B.3 Analyse par auto-raffinement et classification localisé	183
III.3.C Discussion	188
III.3.D Perspectives	191
<b>IV. Conclusion générale</b>	<b>192</b>
<b>V. Bibliographie</b>	<b>196</b>
<b>VI. Liste des abréviations</b>	<b>213</b>
<b>VII. Annexes</b>	<b>215</b>
VII.A Article : The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles	218



# **Introduction**



## Introduction

### A. Les ribosomes eucaryotes

Le ribosome est un complexe macromoléculaire qui catalyse la synthèse protéique à partir du décodage de l'information génétique contenue dans les ARN messagers (ARNm). C'est une machine moléculaire ribonucléoprotéique universelle, composée d'ARN ribosomiques (ARNr) et protéines ribosomiques (RP). Les ribosomes ont été découverts en 1955 par George E. Palade (Palade., 1955) avec l'observation de particules globulaires autour de la membrane du réticulum endoplasmique en microscopie électronique en transmission. Par la suite, de nombreuses études biochimiques et fonctionnelles ont été entreprises afin de mettre en lumière la composition et la fonction de ces complexes dans la synthèse protéique (Mcquillen et al., 1959 ; Palade 1975). Au cours des années 1980-90, la recherche sur la structure des ribosomes a rapidement progressée, grâce en particulier à la cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-EM) (Dubochet et al., 1988). Mais c'est au début des années 2000 que des études en cristallographie aux rayons X ont révélé la structure tridimensionnelle de ribosomes bactériens à l'échelle atomique. Ces travaux ont permis d'élucider la première structure des ribosomes procaryotes chez l'archaebactérie *Haloarcula marismortui* et la bactérie *Thermus Thermophilus*, à haute résolution (Ban et al., 2000 ; Yusupov et al., 2001). Ces modèles ont contribué notamment à une compréhension plus précise du rôle enzymatique de l'ARNr dans la synthèse protéique. En effet, la structure atomique de la grande sous-unité ribosomique 50S a mis en évidence que le site actif du ribosome, qui catalyse la réaction de synthèse des liaisons peptidiques, n'est en effet composé que par l'ARN ribosomique (Nissen, 2000 ; BAN, 2000 ; Muth, 2000). De ce fait, le ribosome s'est révélé être un véritable ribozyme.

#### A.1 La structure et la composition des ribosomes eucaryotes :

Les ribosomes sont composés de deux sous-unités de tailles et de morphologies distinctes, appelées communément petite et grande sous-unités. Chez les eucaryotes, la petite sous-unité est généralement nommée 40S (S, pour le coefficient de sédimentation Svedberg) et la grande sous-unité 60S (Figure 1). Le ribosome eucaryote comprend quatre ARNr et environ 80 protéines ribosomiques. Ainsi chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la petite sous-unité est formée de l'ARNr 18S et de 33 protéines ribosomiques appelées RPS (Ribosomal Protein of the Small subunit). La grande sous-unité 60S est composée de trois ARNr dénommés 5S, 5.8S et 25S associés à 47 protéines nommées RPL (Ribosomal Protein of the large Subunit)

(Ben-Shem et al., 2011 ; woelford et al., 2013). Chez l'Homme, la composition est similaire, seule change la taille de l'ARNr le plus grand appelé 28S (Anger et al., 2013 ; Khatter et al., 2015). La petite sous-unité constitue la plateforme de lecture du code génétique à travers l'appariement correct des ARN de transfert (ARNt) sur les codons de l'ARNm.

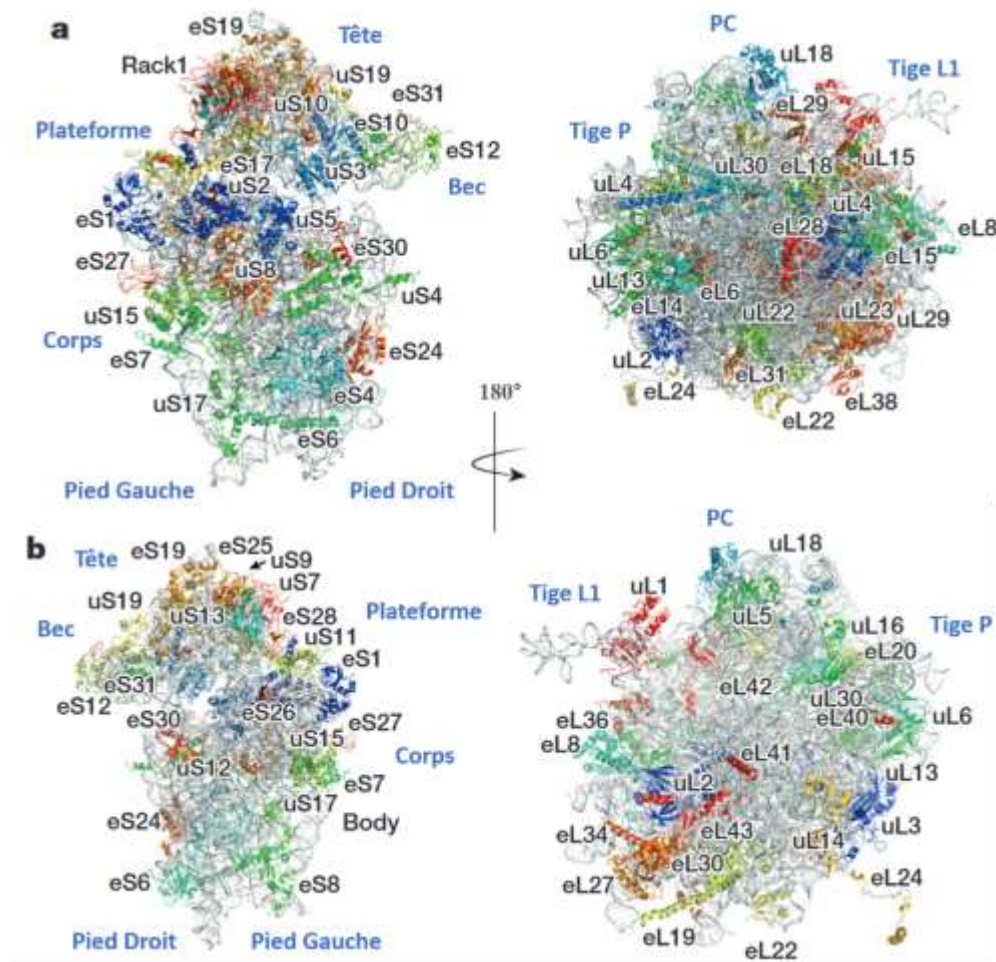


Figure 1. Structure des sous-unités ribosomiques humaines. En a) vue de solvant, en b) vue de l'interface. Les domaines caractéristiques sont indiqués en bleu : La tête, le corps, la plateforme, le bec, les pieds gauche et droit pour la petite sous-unité 40S et la protubérance centrale ainsi que les tiges L1 et P pour la grande sous-unité 60S. L'ARNr est marqué en gris et les protéines ribosomiques en couleur (Khatter et al., 2015).

Elle est de forme allongée et possède 5 domaines caractéristiques : la tête, le bec, la plateforme, le corps et les pieds. La grande sous-unité 60S assure la synthèse des liaisons polypeptidiques entre les acides aminés durant la traduction par le biais de son domaine catalytique peptidyl-transférase. Elle est de forme globulaire et se caractérise par la présence d'un domaine central associé à trois protubérances : la protubérance centrale, les tiges P et L1.

Malgré le grand nombre des protéines ribosomiques, c'est l'ARNr qui demeure majoritaire en masse dans les ribosomes. Par ailleurs, par son arrangement spatial, imposé par sa séquence nucléotidique et l'appariement des bases complémentaires, c'est lui qui constitue le squelette de la structure du ribosome. Cette structure permet d'établir des sites d'interaction spécifiques entre les sous-unités ribosomiques et les acteurs de la traduction, en particulier les ARN de transfert (ARNt) et les ARNm. Ainsi, à l'interface des deux sous-unités existent trois sites de fixation pour les ARNt porteurs des acides aminés pendant la traduction (Figure 2). A chaque étape de traduction, le site A (pour Aminoacyl-ARNt) est occupé par l'ARNt porteur de l'acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique ; le site P (pour Peptidyl-ARNt) est occupé par l'ARNt porteur de l'acide aminé lié à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse ; enfin, le site E (pour Exit) permet la libération de l'ARNt désacétylé qui a livré son acide aminé.

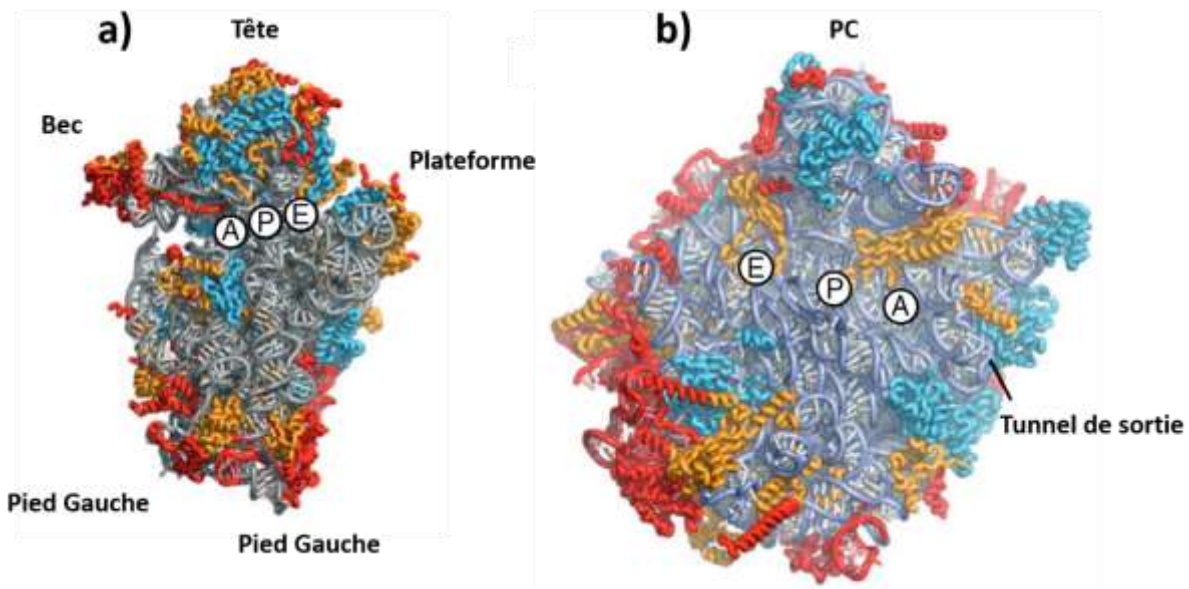


Figure 2. L'emplacement des sites de fixations des ARNt sur les sous-unités ribosomiques eucaryotes. Représentation, en vue d'interface, de la petite sous-unité 40S **a)** et de la grande sous-unité **b)** de *Tetrahymena thermophila* (numéro d'accèsion pdb: 2XZM et 4A19 pour la 40S et la 60S respectivement). Les sites A, P, E représentent les domaines de fixations de l'ARNt sur les sous-unités ribosomiques. En **a)** les domaines caractéristiques de la petite sous-unité sont : la tête, la plateforme, le bec, et les pieds. En **b)** les domaines caractéristiques de la grande sous-unité sont : la protubérance centrale (PC) et le tunnel de sortie des peptides (Adaptation de Rabl et al., 2010).

La structure des ribosomes s'est complexifiée au cours de l'évolution (Figure 3). Les ribosomes eucaryotes incluent à la fois plus de protéines ribosomiques et des ARNr de plus grande taille. Ainsi la masse du ribosome bactérien 70S, composé de la petite sous-unité 30S et la grande sous-unité 50S, est d'environ 2,5 MDa contre 3,2 MDa pour le ribosome 80S des eucaryotes unicellulaires et 4,3 MDa pour le ribosome 80S des eucaryotes supérieurs (Tableau 1). Les domaines supplémentaires sur les ARNr eucaryotes sont appelés segments d'extension. Leur allongement chez les mammifères pose la question de leurs rôles dans l'environnement complexe des cellules eucaryotes (Angers et al., 2013 ; Klinge et al., 2012).

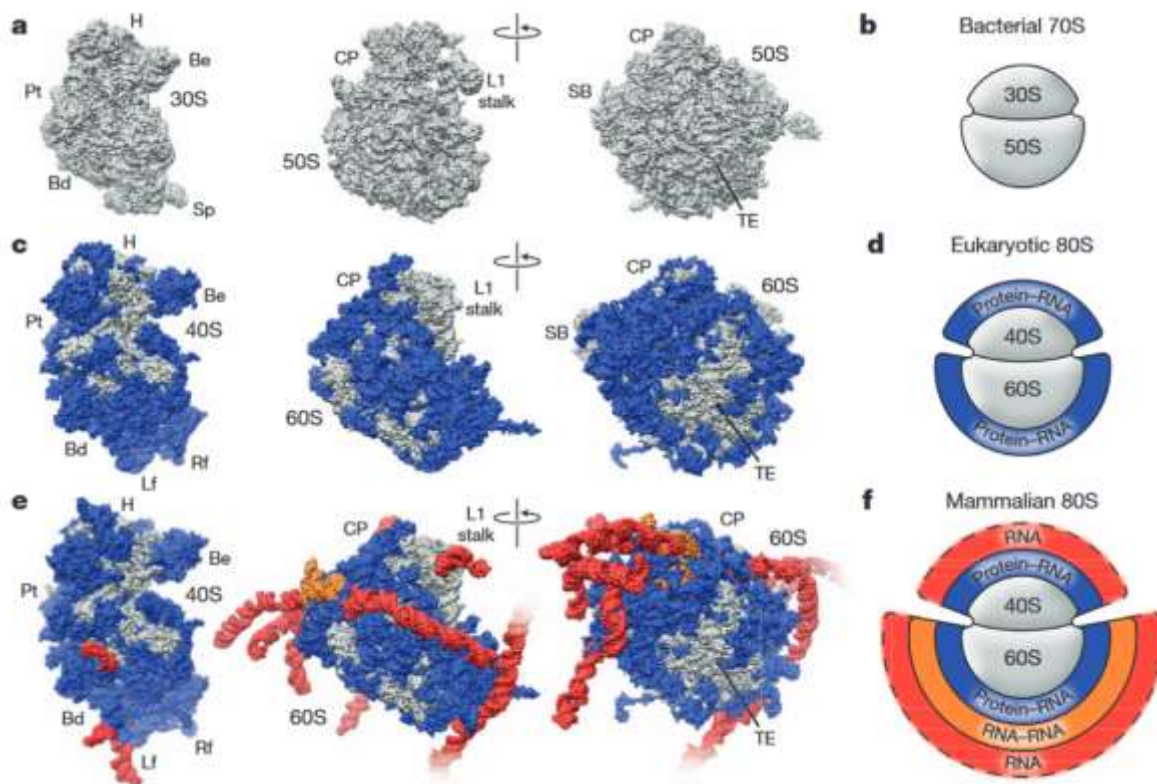


Figure 3. Comparaison des sous-unités ribosomiques bactérienne (a), eucaryote (c) et eucaryote supérieure (e). Représentation moléculaire (a, c, e) et schématique (b, d, f) des deux sous-unités ribosomiques. En a) le ribosome bactérien 70S de *Thermus thermophilus*, en b) le ribosome 80S de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en c) le ribosome 80S humain. En gris est représenté le corps commun du ribosome bactérien, en bleu les éléments protéiques et acides nucléiques supplémentaires chez la levure, en rouge et orange est représentée la couche supplémentaire chez les eucaryotes supérieurs (Adaptation de Anger et al., 2013).

Du fait de leur complexité compositionnelle plus grande, la structure 3D des ribosomes eucaryotes a été élucidée de manière plus tardive. C'est en 2010 qu'a été publiée la structure du ribosome de levure à haute résolution (4,15 Å) obtenue par cristallographie aux rayons X (Ben-

Shem et al., 2010). Un an plus tard, une structure à une résolution de 3,0 Å a précisé les relations entre les protéines ribosomiques et l'ARNr (Ben-shem et al., 2011).

Enfin, concernant le ribosome humain, deux structures déterminées en 2013 (5,4-6 Å) puis en 2015 à l'échelle atomique (3 Å) par cryo-EM ont abouti à une cartographie complète de cette machinerie moléculaire ouvrant le champ d'étude à d'autres applications. En effet ces résultats pourraient aider à comprendre les effets des antibiotiques sur ces complexes et permettre de développer de nouveaux traitements contre certaines maladies liées aux ribosomes (Anger et al., 2013 ; Khatter et al., 2015).

	Procaryotes				Eucaryotes					
	Bactérie		Archée		S. cerevisiae			H. sapiens		
Espèce	<i>E. coli</i>		<i>H. marismortui</i>		<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>		
Ribosome mature	70S				80S					
Masse (Mda)	2,4		2,6		3,3			4,3		
Grande sous-unité	50S				60S					
Nb protéine	33		33		46			47		
ARNr Taille (NT)	23S (2904)	5S (120)	23S (2923)	5S (122)	25S (3396)	5S (118)	5,8S (158)	28S (5076)	5S (121)	5,8S (157)
Petite sous-unité	30S				40S					
Nb protéine	21		24		33			33		
ARNr Taille (NT)	16S (1542)		16S (1472)		18S (1800)			18S (1869)		

Tableau 1. Tableau récapitulatif de l'évolution des ribosomes en termes de composition.

## A.2 La biogénese des ribosomes eucaryotes :

L'assemblage des ribosomes eucaryotes est un processus complexe qui représente l'activité majeure de toute cellule en croissance. Chez les eucaryotes, ce processus est compartimenté : il démarre dans le noyau, où la transcription des gènes ribosomiques entraîne la formation du nucléole; il se poursuit dans le nucléoplasme et s'achève dans le cytoplasme après export nucléaire des sous-unités ribosomiques en formation ou pré-ribosomes. La synthèse des ribosomes nécessite un grand nombre d'étapes de maturation successives et implique plusieurs processus : la transcription de l'ADN ribosomique (ADNr), le clivage et le repliement des ARNr, l'assemblage de l'ARNr avec les protéines ribosomiques, l'export des sous-unités ribosomiques vers le cytoplasme où se déroulent les dernières étapes de maturations. La biogénese des ribosomes eucaryotes a été très étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui est un modèle facile à manipuler d'un point de vue génétique. Chez cet organisme, en phase exponentielle de croissance, la transcription des gènes ribosomiques équivaut à 60% de l'activité transcriptionnelle totale et environ 2000 ribosomes sont produits par minute (Warner, 1999). Ainsi, la majeure partie de l'activité métabolique des cellules en prolifération est dédiée à la biogénese des ribosomes. Les travaux chez la levure ont mis en évidence la participation de centaines de facteurs en trans, protéines et particules RNP, dans la synthèse des ribosomes (Henras et al., 2008 ; 2015). Ces acteurs-clés sont seulement associés aux particules en cours de maturation et absents des sous-unités matures. Ces protéines seront nommées co-facteurs de maturation (CFM) dans la suite du manuscrit de thèse. La plus grande partie de ce processus se déroule dans le noyau, mais les particules pré-ribosomiques exportées dans le cytoplasme ne sont pas encore compétentes pour la traduction et doivent subir d'ultimes étapes de maturation. A l'instar des autres processus de maturation des ARN impliqués dans la traduction, le confinement de la maturation dans le noyau évite les interactions prématurées des ARN ribosomiques (ARNr) avec les acteurs de la traduction. La synthèse des ribosomes est un mécanisme qui semble globalement conservé chez les eucaryotes, mais un nombre croissant d'études a montré qu'elle s'est encore complexifiée chez les plantes ou les animaux. En combinant les ARNr et les protéines ribosomiques de la bactérie *Escherichia coli* dans un ordre précis, il est possible de provoquer l'auto-assemblage de ribosomes procaryotes matures et fonctionnels in vitro (Nomura, 1970). Ceci est impossible avec des ribosomes eucaryotes, ce qui souligne la complexité plus importante de la structure des sous-unités et des mécanismes de leur synthèse.



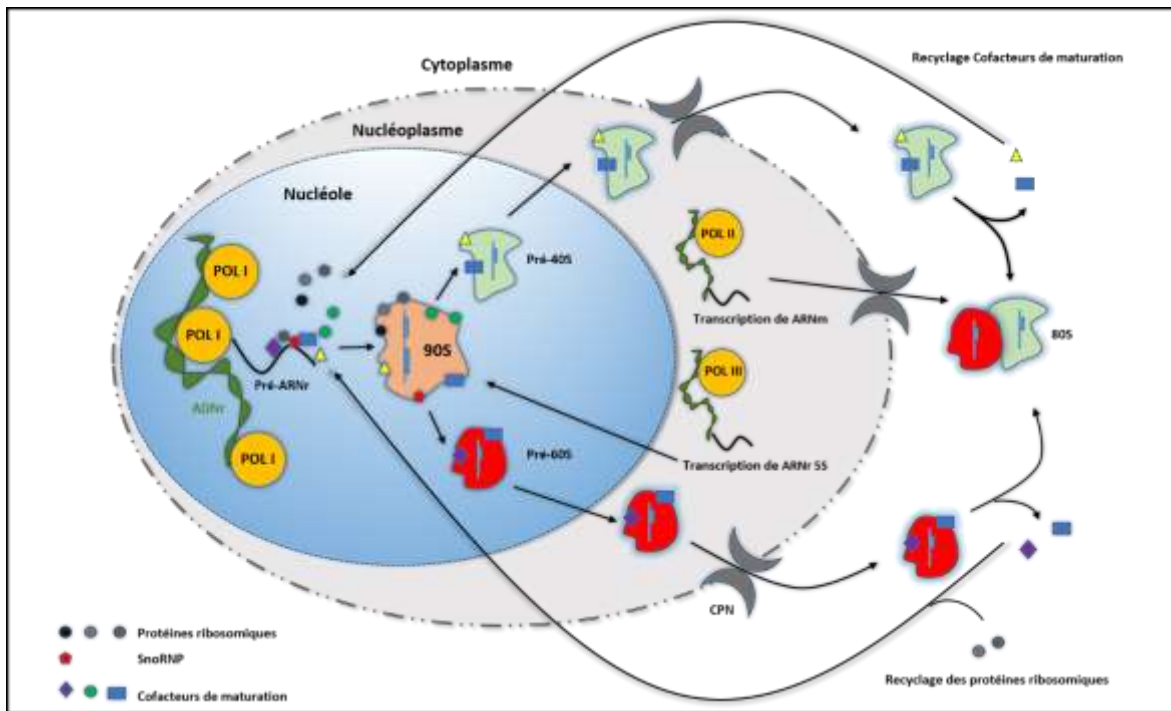


Figure 4. Schéma général de la biogenèse des ribosomes eucaryotes. L'assemblage des ribosomes commence dans le nucléole avec la transcription de l'ADNr afin de synthétiser un long précurseur polycistronique (pré-ARNr) par l'ARN POL I. Ce long pré-ARNr s'associe avec des protéines ribosomiques, des snoRNP et des co-facteurs de maturation pour former un complexe RNP précurseur des deux sous-unités ribosomiques nommé particule 90S. L'excision des espaceurs flanquants les ARN ribosomiques par des endo et exo-nucléases et l'association des protéines ribosomiques donne naissance aux précurseurs de la petite sous-unité ribosomique pré-40S et de la grande sous-unité ribosomique pré-60S. Ces particules pré-ribosomiques suivent deux voies de maturations distinctes à travers nucléole et nucléoplasme puis achèvent leur formation dans le cytoplasme. L'ARN POL II synthétise l'ARNr 5S et l'ARN POL III synthétise les protéines et co-facteurs de maturation indispensables à la synthèse des sous-unités ribosomiques matures.

L'assemblage des ribosomes commence de manière co-transcriptionnelle dans le nucléole. La transcription des gènes ribosomiques s'opère grâce à l'ARNr polymérase I (ARN POL I) et donne naissance à un long précurseur polycistronique (pré-ARNr primaire) contenant la séquence des ARNr 18S, 28/25SS et 5,8S (Figure 4 et Figure 6). La production des ribosomes requiert également l'intervention coordonnée de deux autres ARN POL : la transcription des ARNm des protéines ribosomiques est assurée par l'ARN POL II et la production de l'ARNr 5S est effectuée par l'ARN POL III.

Dans le nucléole, le long précurseur des ARNr polycistronique, s'associe à la majorité des RP, des snoRNP ainsi que des co-facteurs de maturation afin de former une particule nommée 90S. Ce long transcrit subit des modifications chimiques sur des nucléotides spécifiques telles que la méthylation en position 2' des riboses ou encore l'isomérisation d'uridines en pseudo-uridines (pseudouridylation) par des snoRNPs. Ces modifications sont guidées par de petits ARN nucléolaires (les snoARN) qui s'hybrident au niveau des nucléotides

à modifier. Les séquences flanquantes des ARN ribosomiques dans le pré-ARNr sont par ailleurs excisées par l'action concertée d'endo- et d'exonucléases, afin de générer un précurseur de la petite sous-unité ribosomique (pré-40S) et un précurseur de la grande sous-unité ribosomique (pré-60S) (Figure 4). Ces deux particules pré-ribosomiques empruntent ensuite des voies de maturation indépendantes dans le noyau et le nucléoplasme. Après transport du nucléoplasme vers le cytoplasme à travers le complexe de pore nucléaire (CPN), les particules pré-ribosomiques subissent les étapes finales de leur maturation qui permet leur participation à la traduction. En ce qui concerne les particules pré-40S, les grandes étapes de maturation cytoplasmique se caractérisent par l'association des dernières protéines ribosomiques, la libération séquentielle des co-facteurs de maturation qui accompagnent la particule dans le cytoplasme, et le clivage à l'extrémité 3' de l'ARNr 18S médié par l'activité endonucléolytique du co-facteur de maturation Nob1. Chez la levure, ces dernières étapes impliquent également une association transitoire entre les particules pré-40S et la grande sous-unité 60S formant ainsi des particules "pseudo-80S" potentiellement impliquées dans une étape de contrôle-qualité. Ces étapes de maturation cytoplasmique sont globalement comparables entre l'Homme et la levure, mais des différences soulignent la complexité accrue de ce processus au cours de l'évolution. Par la suite, je m'attacherai à décrire la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique eucaryote qui a fait l'objet de mon travail de thèse.

## **B. Les acteurs de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique 40S**

### **B.1 La maturation de l'ARNr : Du pré-ARNr primaire à l'ARNr 18S :**

La séquence de l'ARNr 18S (composant de la petite sous-unité 40S) comprise dans le pré-ARNr polycistronique, est délimitée par l'extrémité 5' flanquante (5' ETS) et l'espaceur interne ITS1 (Figure 6). La formation de l'ARNr 18S mature nécessite donc l'élimination de ces deux séquences. Pour ce faire, trois étapes successives sont requises chez la levure : la maturation progressive de l'extrémité 5'-ETS pour former l'extrémité 5' de l'ARNr ; le clivage endonucléolytique dans l'espaceur ITS1 ; le clivage de l'extrémité 3' au site D par l'endonucléase Nob1 dans le cytoplasme, afin de former l'extrémité 3' mature de l'ARNr 18S. Chez l'Homme, la maturation de l'extrémité 3' du 18S fait également intervenir des exonucléases 3'-5' (Carron et al., 2011; Preti et al, 2013; Sloan et al., 2013; Montellese et al., 2018).

Les étapes précoces de la maturation de l'ARNr 18S prennent place dans une particule pré-ribosomique, dite particule 90S ou SSU processome, qui s'assemble co-transcriptionnellement et dans laquelle on trouve la snoRNP U3 et plus de 72 co-facteurs de maturation.

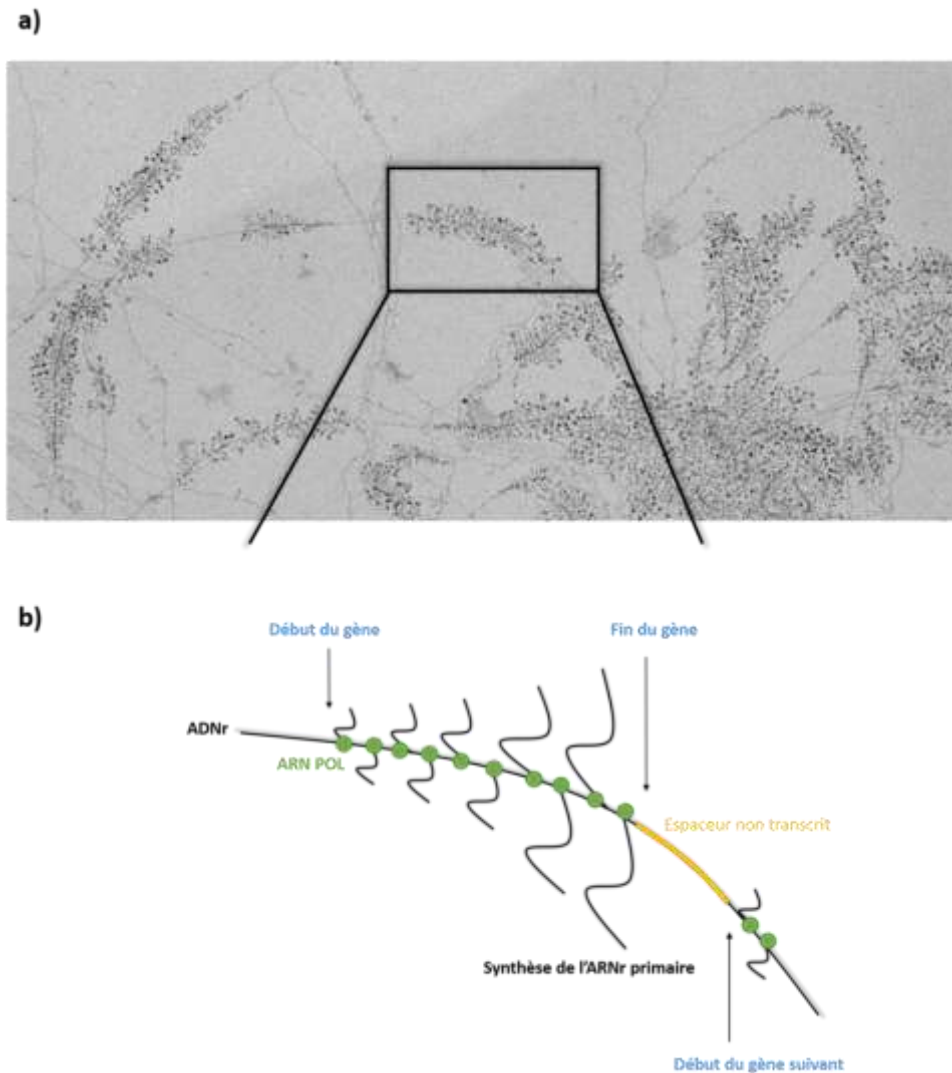


Figure 5. Etallement de gènes ribosomiques en transcription (arbre de Miller) observé par microscopie électronique en transmission a) et sa représentation schématique b) (Adaptation de Woolford et al., 2013).

La composition de cette particule de 2,2 MDa a été élucidée grâce à des approches biochimiques et structurales telles que la purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse et à la cryo-EM (Krogan et al., 2004 ; Grandi et al., 2002 ; Kornprobst et al., 2016 ; Cheng et al., 2017). L'assemblage du SSU processome fait intervenir l'association séquentielle de plusieurs modules appelés complexes UTP (pour U three proteins), comme UTP-A, UTP-B et snoRNP U3 au pré-ARNr. Ce précurseur est également composé de l'ARNr 5S associé à un complexe protéique (Zhang et al., 2007). Les études sur la maturation du pré-ARNr 35S, chez

la levure *S. cerevisiae*, montre que chez cet organisme, en phase exponentielle de croissance, 70% des transcrits primaires sont clivés de manière co-transcriptionnelle dans l'ITS1 contre 30% de façon post-transcriptionnelle (Fernandez et al., 2015).

Cela a été observé en microscopie électronique en transmission (MET) par étalement de gènes ribosomiques en transcription, ou arbres de Miller (Miller et al., 1969 ; Osheim et al., 2004) (Figure 5). D'autres études suggèrent que ce même clivage est principalement post-transcriptionnel chez les vertébrés (Mougey et al., 1993). Les étapes de maturation du pré-ARNr primaire sont relativement conservées entre la levure et l'Homme.

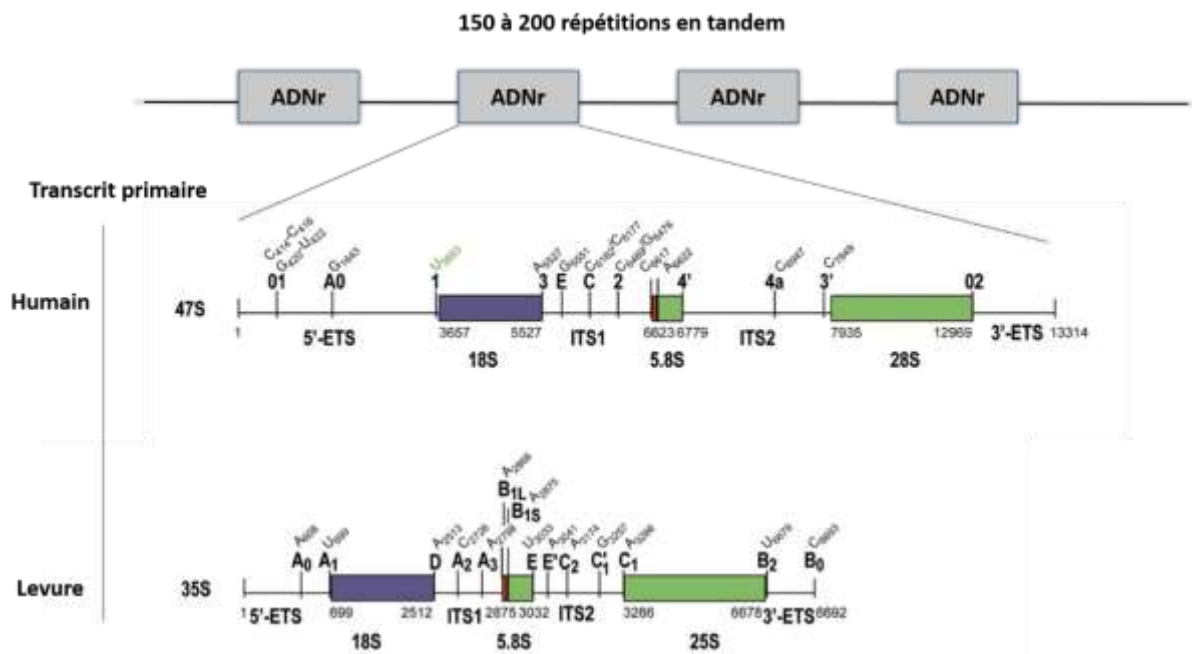


Figure 6. Représentation schématique de l'organisation d'un ADN ribosomique et son transcrit primaire, chez l'Homme et chez la levure (Adaptation de Mullineux et al., 2012).

Cependant, la taille et la séquence des espaceurs transcrits sont très différentes entre ces deux espèces. Ceci est corrélé à la présence d'étapes de maturation supplémentaires chez l'Homme, mettant en avant la complexité élevée de ce processus en comparaison avec la levure (Mullineux et Lafontaine, 2012 ; Henras et al. 2015 ; Tomecki et al., 2017). Ainsi, chez la levure, les étapes d'excision des séquences ITS et ETS de l'ARNr sont uniquement effectuées par des endonucléases (Figure 7).

Or chez l'Homme, la nécessité d'activités exonucléolytiques a également été démontrée dans la maturation de l'ITS1 (Henras et al., 2015 ; Montellese et al., 2017) (Figure 8). De plus,

si la maturation de l'extrémité 5'-ETS et 3' ITS1 s'effectue majoritairement de manière co-transcriptionnelle chez la levure en croissance, cela n'a pas été démontré à ce jour chez l'Homme. Des évidences soutenant la présence de clivage co-transcriptionnel existent néanmoins chez la souris, suggérant que ce phénomène peut se produire chez l'Homme sous certaines conditions (Lazdins et al., 1997).

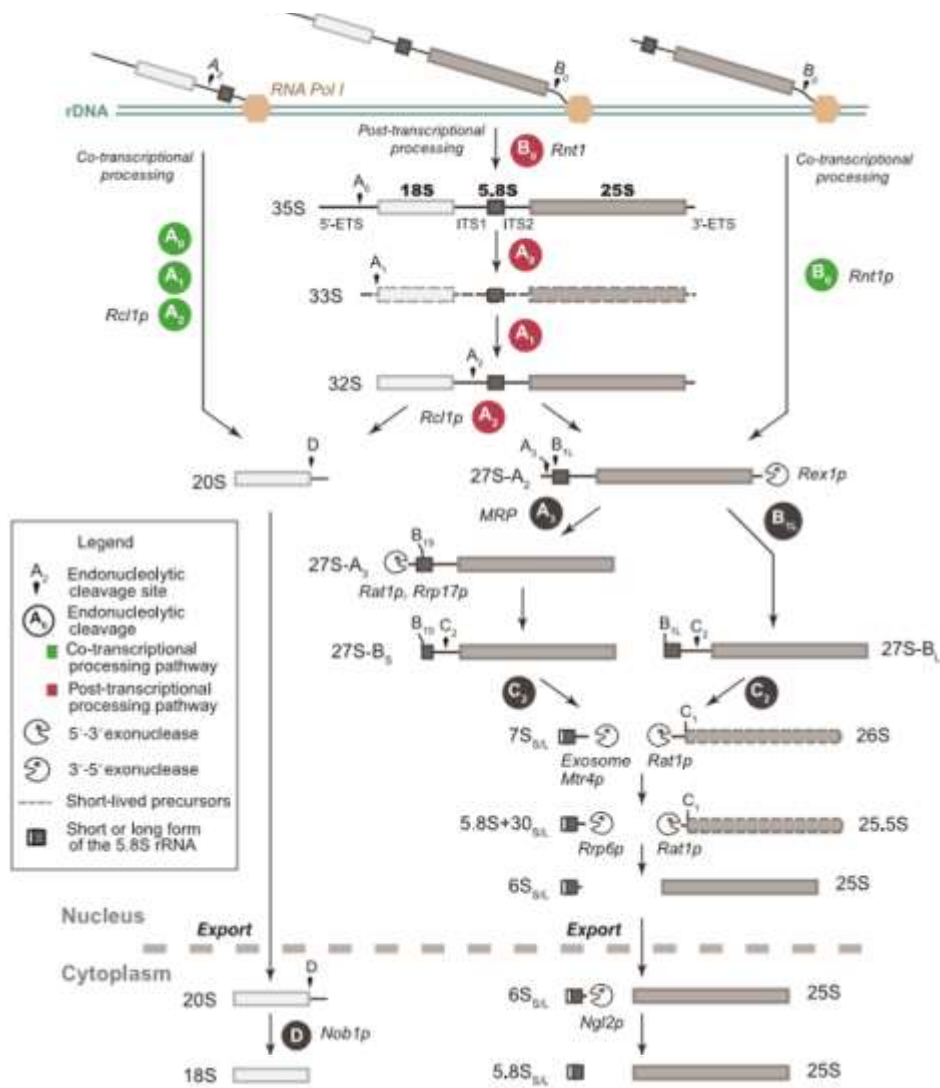


Figure 7. Les étapes de maturations du pré-ARNr chez la levure *S. cerevisiae*. La majorité des transcrits sont clivés co-transcriptionnellement aux A0, A1, et A2, (en vert) pour former le pré-ARNr 20S précurseur de l'ARNr 18S et le pré-ARNr 27S qui contient les ARNr de la sous-unité 60S. La séquence entière du pré-ARNr 35S est également produite et maturée de manière post-transcriptionnelle (en rouge). Après clivage de l'extrémité flanquante 5' ETS et de l'ITS1 au site A2, la maturation de l'ARNr 18S se termine dans le cytoplasme avec le clivage de l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S au site, par l'endonucléase Nob1. La maturation de l'ARNr de la grande sous-unité emprunte deux voies de synthèses distinctes afin de former deux variants de l'extrémité 5' de l'ARNr 5.8S (Henras et al., 2015).

D'autre part, l'ordre des premiers clivages dans le 5'-ETS ou l'ITS1 peut varier, ce qui donne naissance à plusieurs voies de maturation différentes (Figure 7 et Figure 8).

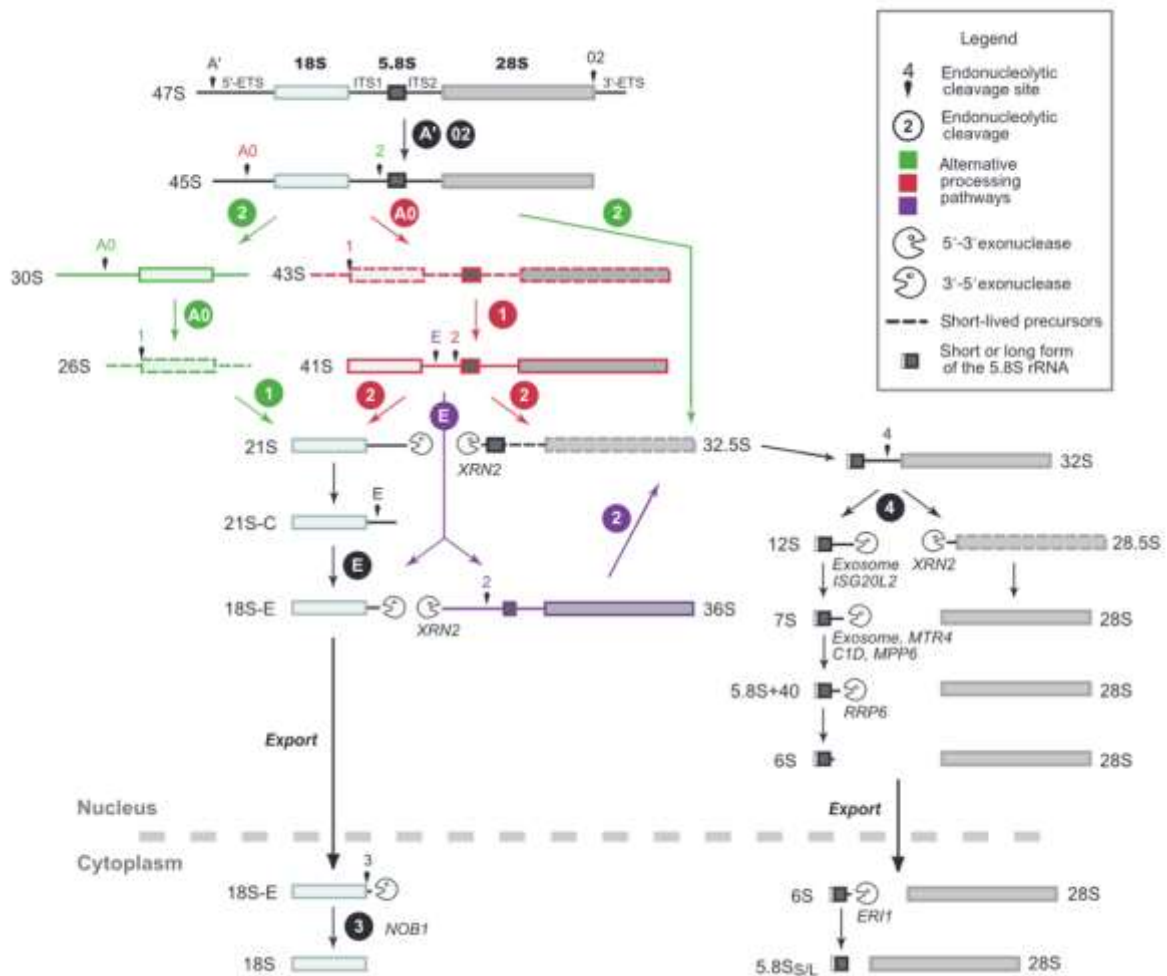


Figure 8. Les étapes de la maturation du pré-ARNr chez l'Homme. Les voies de maturation alternative sont représentées en couleur. Le clivage sur le précurseur 45S peut démarrer dans l'extrémité 5'-ETS (en rouge) ou dans l'espace transcrit ITS1 (en vert), ce qui génère deux voies de maturation distinctes. L'activité endo-nucléolytique du cofacteur de maturation NOB1 est nécessaire pour la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNr 18S-E, dans le cytoplasme, et former ainsi l'ARNr 18S mature.

### B.1.1 Maturation de l'extrémité 5'-ETS de l'ARNr 18S:

Chez l'Homme, la maturation de la séquence 5'-ETS met en jeu les clivages aux sites A', A0 et 1. Le clivage initial du précurseur primaire 47S se fait à environ 400 nucléotides en aval du site du début de transcription du gène de l'ARNr 18S, au site A'. Ce site également appelé O1, a été localisé *in vitro* et *in vivo* sur deux sites : aux nucléotides C414/416 et aux résidus G420-U422 (Kass et al., 1987 ; Kent et al., 2009) (cf. Figure 6 et Figure 8). Ce site est situé dans une région très conservée qui interagit avec les snoARN U3, U14, E1 et E3. Par ailleurs il a été

proposé que le clivage sur ce site, qui est facultatif, faciliterait les étapes de maturation suivantes. Un deuxième site de clivage a été identifié chez l'Homme entre les sites de coupures A' et 1 au site A0. Sa position a été établie par extension d'amorce en G1643 (Rouquette et al., 2005). La position du troisième site de clivage, site 1, permettant la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S a été établie *in vitro* à partir d'extrait nucléolaire issu de cellule HeLa. Ce site est localisé en position U3653 (Hannon et al., 1989 ; Morello et al., 2011). Les prédictions de la structure secondaire du pré-ARNr ainsi que les études structurales du SSU processome par cryo-EM indiquent que, les sites A0 et 1 semblent très proches formant ainsi la base d'une très longue tige-boucle (Renalier et al., 1989 ; Michot and Bachellerie, 1991, Sun et al., 2017). De plus, des travaux, *in vitro* chez l'Homme, proposent que le clivage endonucléolytique au site 1 dans le noyau est suivi par une activité exonucléase dans le cytoplasme afin de former l'extrémité 5' de l'ARNr 18S (Hannon et al., 1989; Yu and Nilsen, 1992), mais ce point reste débattu.

Récemment, plusieurs enzymes intervenant dans la maturation des précurseurs de l'ARNr 18S ont été découvertes. L'endonucléase UTP24 a été identifiée comme l'enzyme impliquée dans les clivages aux sites 1 et E (Tomecki et al., 2015 ; Wells et al., 2016). UTP23, une protéine qui possède un domaine PIN (domaine caractéristique d'endonucléase) incomplet, participe au clivage en A0, mais son rôle enzymatique n'est pas établi (Wells et al., 2017).

Chez la levure, le clivage du pré-ARNr primaire 35S au site A0 et A1 donne naissance au pré-ARNr 33S et 32S respectivement. Ces deux sites sont localisés en position A608 et U699 de l'extrémité 5'-ETS. Le clivage endonucléolytique au site A1 génère directement l'extrémité mature de l'ARNr 18S.

### B.1.2 Maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S :

Chez la levure, l'espaceur transcrit ITS1 comporte 4 sites de clivages nommés D, A2, A3 et B1L (cf. Figure 6 et Figure 7). Le site A2 est clivé dans un premier temps, séparant la voie de maturation des deux sous-unités ribosomiques. En effet la coupure au site A2 génère le pré-ARNr 20S composant de la petite sous-unité 40S, et le précurseur 27S élément de la grande sous-unité 60S. Ce clivage est catalysé par la protéine Utp24 (Wells et al., 2016). Ensuite la particule pré-40S constituée du pré-ARNr 20S est exportée rapidement dans le cytoplasme. L'ARNr 20S est alors diméthylé par le cofacteur de maturation Dim1 (dimethylase1). Cette réaction catalyse l'addition de deux groupements méthyl sur les résidus A1779 et A1780 (Lafontaine et al., 1995 ; 1998). Dans une dernière étape, le clivage au site D par l'endonucléase

Nob1 dans le cytoplasme produit l'extrémité 3' mature de l'ARNr 18S. Les récentes études montrent qu'une étape de contrôle-qualité est nécessaire, avant le clivage par Nob1 : les particules pré-40S cytoplasmiques s'associent transitoirement avec les sous-unités 60S matures et effectuent ainsi un "test de conduite" pour vérifier leur capacité à assurer la traduction, avant de se dissocier et finir leur maturation (Lebaron et al., 2012 ; Strunk et al., 2012).

Chez l'Homme, la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S est plus complexe, et fait intervenir des acteurs et des étapes supplémentaires. La séquence ITS1 est composée de 1095 nucléotides chez l'Homme contre 362 chez la levure. A la différence de la levure, l'élimination de l'ITS1 nécessite l'action combinée d'exo- et d'endonucléases. La séquence ITS1 humaine comporte également 4 sites de clivage nommés 3, E, C et 2. Le site 2 (équivalent du site A3), situé à 900 nucléotides en aval de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S est clivé majoritairement avant le site E (équivalent du site A2) formant les deux précurseurs des sous-unités ribosomiques. Toutefois, en absence de co-facteurs de maturation et de protéines ribosomiques nécessaires pour ce clivage, l'excision au site E peut se produire en premier, induisant une accumulation des précurseurs 18S-E (Preti et al., 2013 ; Sloan et al., 2013). L'endonucléase UTP24 catalyse également le clivage au site E. Selon les voies de maturation alternatives, cette coupure peut intervenir avant ou après la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S. Suivant l'ordre de clivage il y aura formation des précurseurs 30S, 26S ou 21S. Suite au clivage du site 2, une activité exonucléolytique permet l'élimination d'environ 250 nucléotides à l'extrémité 3' du précurseur 21S et induit la formation de l'intermédiaire nucléaire 21 S-C. Par la suite, le clivage au site E génère des particules pré-40S contenant le pré-ARNr 18S-E. Ce site a été localisé par des techniques de 3'-RACE et extension d'amorce aux nucléotides 78 et 81 (Preti et al., 2013 ; Sloan et al., 2013). Ces particules pré-40S sont rapidement exportées vers le cytoplasme. En effet, l'extrémité 3' de l'ARNr 18S-E est progressivement dégradée par des exonucléases dans le noyau, puis dans le cytoplasme. La ribonucléase spécifique de poly-A (PARN) a récemment été caractérisée comme une des exonucléases impliquées dans ce processus. En effet, suite au clivage au site E, l'activité exonucléolytique de PARN raccourcit l'extrémité 3' du pré-ARNr 18S-E dans le noyau (Montellese et al., 2017). Suite à cette étape, la particule pré-40S est exportée dans le cytoplasme à travers le complexe de pores nucléaires (Rouquette et al., 2005). Dans une dernière étape, l'extrémité 3' du pré-ARNr 18S-E est clivée, au site 3, par le domaine PIN du co-facteur de maturation NOB1 pour former l'ARNr 18S mature (Preti et al., 2013 ; Sloan et al., 2013).



### B.1.3 Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr :

La 2'-O méthylation et la pseudo-uridylation sont les modifications post-transcriptionnelles les plus abondantes des ARNr de toutes les espèces. Ainsi, plus de 200 nucléotides chez l'Homme et 100 nucléotides chez la levure sont modifiés au niveau d'ARNr par ces complexes (Decature et al., 2007). Ces modifications nucléotidiques se situent majoritairement dans des régions importantes sur le plan fonctionnel, et sont souvent à l'écart des zones d'interaction avec des protéines (Decatur et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que ces modifications jouent un rôle important dans le repliement et la stabilité de l'ARNr (Ofengand et al., 2002 ; King et al., 2003). Chez les eucaryotes, ces modifications sont effectuées par des snoRNP, principalement dans le nucléole. Ces modifications se regroupent sur des zones importantes tel que les sites d'interactions des ARNt, la surface d'interaction entre les deux sous-unités ribosomiques, le tunnel de sortie des peptides et le site peptide-transférase (Decatur et Fournier, 2002). Les snoRNP à boîte C/D guident et catalysent le 2'-O méthylation des riboses (ajout d'un groupement méthyle sur l'oxygène du carbone 2' du ribose) alors que ceux à boîte H/ACA assurent l'isomérisation de d'uridine en pseudouridine (Kiss et al., 1996 ; 2006 ; Tycowski et al., 1996 ; Watkins and Bohnsack, 2012). Chaque snoRNP est constitué d'un snoARN et de quatre protéines cœurs, spécifiques à chaque classe. Les protéines composant les snoRNP à boîte C/D sont : Nop1p, Nop58p, Nop56p et Snu13p. Celles qui composent les snoRNP à boîte H/ACA sont : Cbf5p, Nop10p, Gar1p et Nhp2p (Fatica et Tollervey, 2002, 2003; Meier, 2005). Nop1p (fibrillarine) est la méthyltransférase dans les snoRNP à boîte C/D tandis que Cbf5p (dyskérine) est la pseudo-uridine synthase dans les snoRNP à boîte H/ACA . L'appariement entre un snoRNP et le pré-ARNr est médié par les snoARN à proximité du nucléotide à modifier, ce qui permet de positionner l'activité enzymatique sur ce résidu :

- **2'O Méthylation** : les snoARN à boîte C/D contiennent les boîtes C, D, C', D', ainsi qu'une séquence guide d'environ 10 à 21 nucléotides. Cette séquence permet l'appariement entre le pré-ARNr et le snoARN. Cet appariement positionne la Nop1 en face du nucléotide, placé à 5 nucléotides en aval de la boîte D ou D'. Cela permet ainsi la catalyse de la réaction de méthylation par Nop1 qui utilise la S-adenosyl methionine comme donneur de méthyle. Cela permet l'ajout du groupement méthyle au groupement 2'O hydroxyle du ribose (Figure 9) .

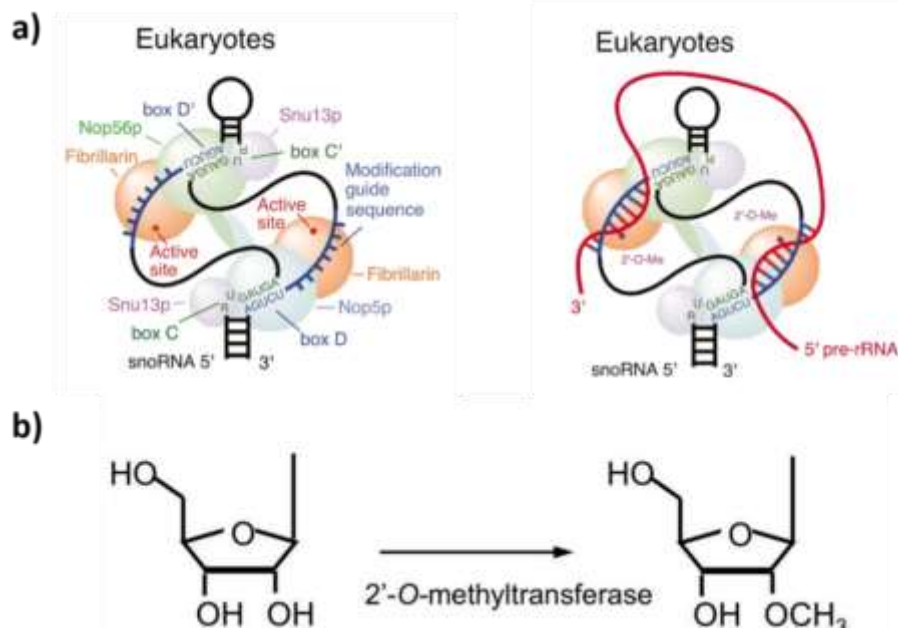


Figure 9. a) Représentation schématique des snoRNP à boîte C/D b) la 2'O méthylation du pré-ARNr correspond à l'ajout d'un groupement méthyl en position 2' du ribose (Adaptation de Fatica et Tollervy, 2003 ; Yuang et al., 2016).

- **Pseudo-uridylation** : Les snoARN à boîte H/ACA sont structurés en deux tiges boucles et possèdent deux motifs conservés sur la région simple brin, les boîtes H et ACA. L'appariement du SnoARN avec le pré-ARNr se fait par le biais de deux séquences

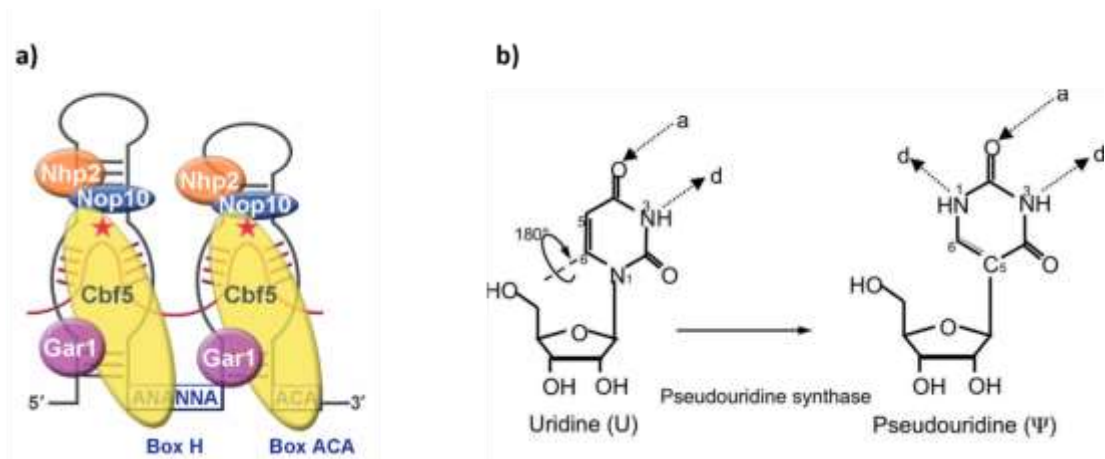


Figure 10. a) Représentation schématique des snoRNPs à boîte H/ACA, b) isomérisation de l'uridine en pseudo-uridine par l'enzyme Cbf5 (Adaptation de Raichow et al., 2007 ; Yuang et al., 2016).

complémentaires contenant le nucléotide à modifier. L'uridine à modifier se situe de 14 à 16 nucléotides en amont des boîtes H et ACA (Figure 10).

De par leur position sur les sous-unités ribosomiques, ces modifications peuvent affecter la structure et la fonction des ribosomes. De plus, il a été démontré que l'absence de certaines de ces modifications peut réduire l'efficacité de la traduction (Roshek et al., 2007 ; Liang et al., 2007).

D'autres modifications, indépendantes de l'action des snoARN, sont appliquées au pré-ARNr. Pour exemple, des bases de l'ARNr 18S ainsi que 28S sont méthylées sans l'intervention des snoARN (Decatur et Fournier, 2002) et sont assurées par des méthyltransferases spécifiques de site. Ces enzymes peuvent être également nécessaires pour l'assemblage des ribosomes indépendamment de leur activité catalytique. Ainsi, le facteur d'assemblage Dim1 est responsable de la diméthylation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme chez la levure (Lafontaine et al., 1995 ; 1998). Chez l'Homme le CFM DIM1, homologue de Dim1 chez la levure, assure la diméthylation de l'ARNr au niveau du noyau et est absent des particules pré-40S cytoplasmiques. (Zorbas et al., 2015). Toutefois, l'activité catalytique de Dim1/DIM1 n'est pas nécessaire pour l'assemblage de la sous-unité 40S.

## B.2 L'assemblage des protéines ribosomiques (RP) :

L'association des protéines ribosomiques avec l'ARNr pour former la sous-unité 40S est progressive et se fait de manière séquentielle (revue par Hadjiolov, 1985; voir aussi la discussion dans O'Donohue et al., 2010). Elle commence dans le nucléole et le nucléoplasme par la formation du corps de la sous-unité, qui se forme avec l'association du domaine 5' de la séquence de l'ARN 18S avec des protéines nommées iRPS (initiation RPS). Cette structuration se poursuit avec la formation progressive de la tête par association des protéines appelées pRPS (progression RPS) avec le domaine 3' majeur de l'ARNr 18S, dans le nucléoplasme puis le cytoplasme (O'Donohue et al., 2010) (Figure 11). L'ordre d'assemblage des protéines eucaryotes est similaire à celui des procaryotes. Cela a été mis en évidence par des études de reconstitution des particules ribosomiques *in vitro* chez la bactérie. (Nomura, 1970 ; Mulder et al., 2012 ; Ferreira-Cerca et al., 2005 ; 2007 ; O'Donohue et al., 2010).

De nombreuses études, *in vitro* et *in vivo*, chez la levure et les cellules humaines, montrent que les protéines ribosomiques (RP) ont de multiples fonctions durant la maturation des sous-unités ribosomiques. Elles permettent notamment la maturation et le repliement correct de l'ARNr, la stabilisation progressive de la structure des sous-unités ribosomiques durant leurs maturations, et sont requises pour l'export nucléo-cytoplasmique.

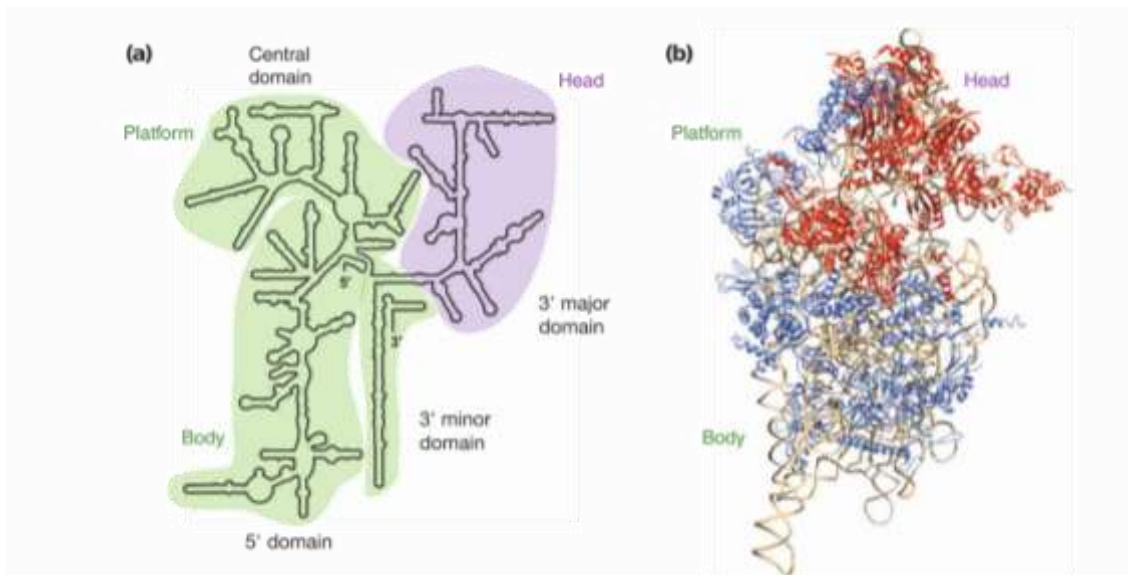


Figure 11. **Localisation des pRPS et iRPS.** a) Structure secondaire de l'ARNr 18S formant les domaines caractéristiques de la sous-unité 40S : Tête, Bec, plateforme et le corps. b) Localisation des deux groupes fonctionnels des protéines ribosomiques : les iRPS (représentées en bleu) et pRPS (colorées en rouge) sur la particule 40S. (PDB :4V6X). L'ARNr est représenté en jaune (Adaptation de Henras et al., 2015).

Par ailleurs, par leurs interactions avec des protéines non ribosomiques, ces protéines influencent le processus de la traduction (Nierhaus 2004). Chez la levure, parmi les 33 RP composantes de la petite sous-unité 40S, 15 possèdent des homologues dans les trois domaines de l'évolution, 13 sont conservées entre les archées et les eucaryotes et seulement 4 n'ont pas d'équivalent chez les archées et les bactéries (Lecompte et al., 2002) (Figure 12). Cela met en avant l'importance des RP dans la structure et la fonction des ribosomes, puisque peu de RP ne sont pas essentielles pour la maturation des sous-unités ribosomiques. En effet, les seules protéines qui semblent non-requises pour la maturation de l'ARNr 18S sont RPS12 et RPS25 chez la levure (Ferreira-Cerca et al., 2005), et RPS25 chez l'Homme (O'Donohue et al., 2010).

En parallèle, la publication des structures des ribosomes matures et des précurseurs des sous-unités ribosomiques obtenues par cristallographie-rayons X et par cryo-EM, couplée à des données fonctionnelles ont permis de localiser les co-facteurs de maturation (CFM), de positionner et montrer le domaine d'interactions des RP dans les particules ribosomiques (Melnikov et al., 2012 ; Angers et al., 2013 ; Khatter et al., 2015 ; Heuer et al., 2017 ; Ameismeier et al., 2018).

Les RPS humaines peuvent être sous-divisées en deux catégories fonctionnelles suivant les étapes de maturation du pré-ARNr pour lesquelles elles sont requises. Ainsi, une première moitié des protéines RPS, nommées iRPS (initiation RPS), sont requises pour que soient initiés les clivages nécessaires à la formation de l'ARNr 18S dans le 5'-ETS et l'ITS1 (sites A0, 1, 3, E), à l'exception du clivage en A'. De manière corrélée, ces protéines s'associent précocement avec les particules 90S (Hadjiolov, 1985).

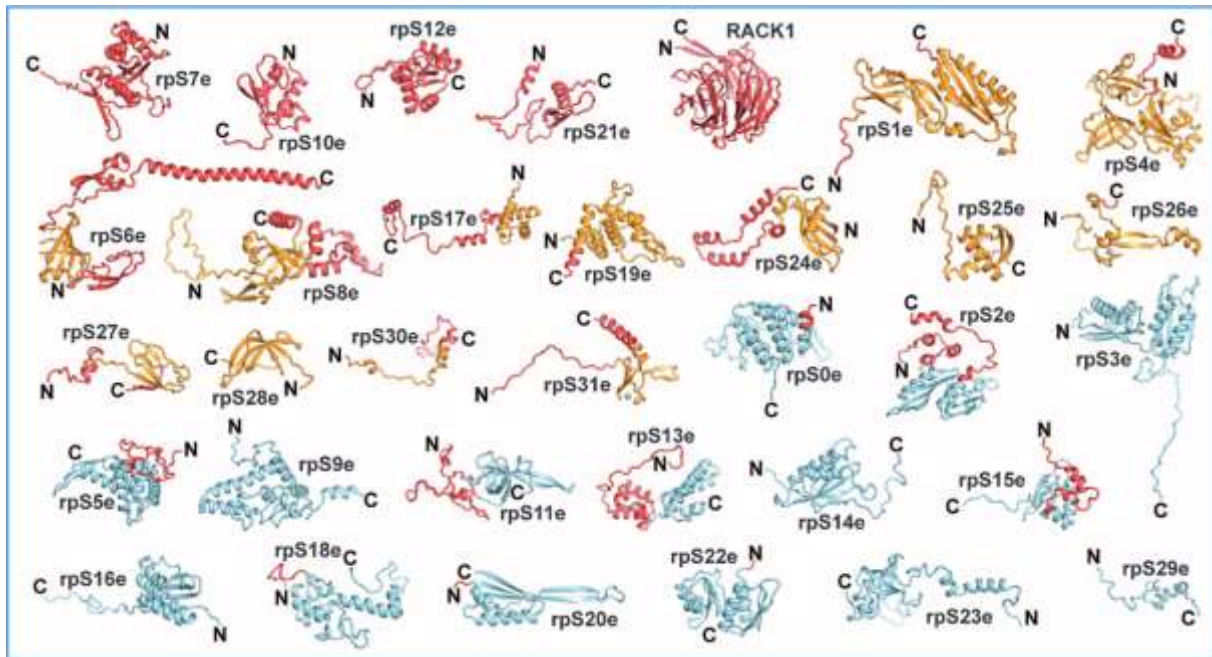


Figure 12. Représentation de la structure des protéines ribosomiques de la sous-unité 40S. Le corps des protéines est représenté en couleur selon l'appartenance aux trois royaumes de la vie. La partie commune est représentée en bleu clair, les domaines spécifiques aux archées sont colorés en orange. Les protéines et extensions spécifiques aux eucaryotes sont colorées en rouges (Rabl et al., 2011). Les extrémités N- et C-terminales sont représentées par N et C respectivement.

Ces protéines composent le corps, la plateforme ainsi qu'une partie de la tête des particules pré-40S. Parmi les iRPS, les RPS9, RPS11 et RPS23 encadrent l'extrémité 5' de l'ARNr contribuant à une position correcte de cette région pour les étapes de clivages au site A0 et 1. La déplétion des iRPS provoque une accumulation des précurseurs précoces de l'ARNr 18S : pré-ARNr 45S et 30S (O'Donohue et al., 2010). La deuxième catégorie des RPS appelées pRPS (pour progression RPS) sont requises pour des étapes ultérieures et s'associent de manière plus tardive. Ces protéines sont positionnées dans le domaine 3' majeur de l'ARNr 18S, composant essentiellement la tête de la sous-unité 40S (Figure 13).

Ainsi, la déplétion de RPS18, RPS19, RPSA et RPS21 entraîne une accumulation nucléaire du pré-ARNr 21S avec un défaut de maturation de l'ITS1 au site E; les protéines RPS17 et RPS15 sont requises pour l'export nucléaire de la particule pré-40S; la perte d'expression de RPS3, RPS10, RPS20, RPS26, RPS27a, RPS29 et RPS30 empêche la maturation du précurseur 18S-E dans le cytoplasme. Des études similaires réalisées chez *S. cerevisiae* (Ferreira-Cerca et al., 2005; Ferreira-Cerca et al., 2007) montrent que cette dichotomie fonctionnelle des protéines ribosomiques est partagée chez la levure et chez l'Homme.

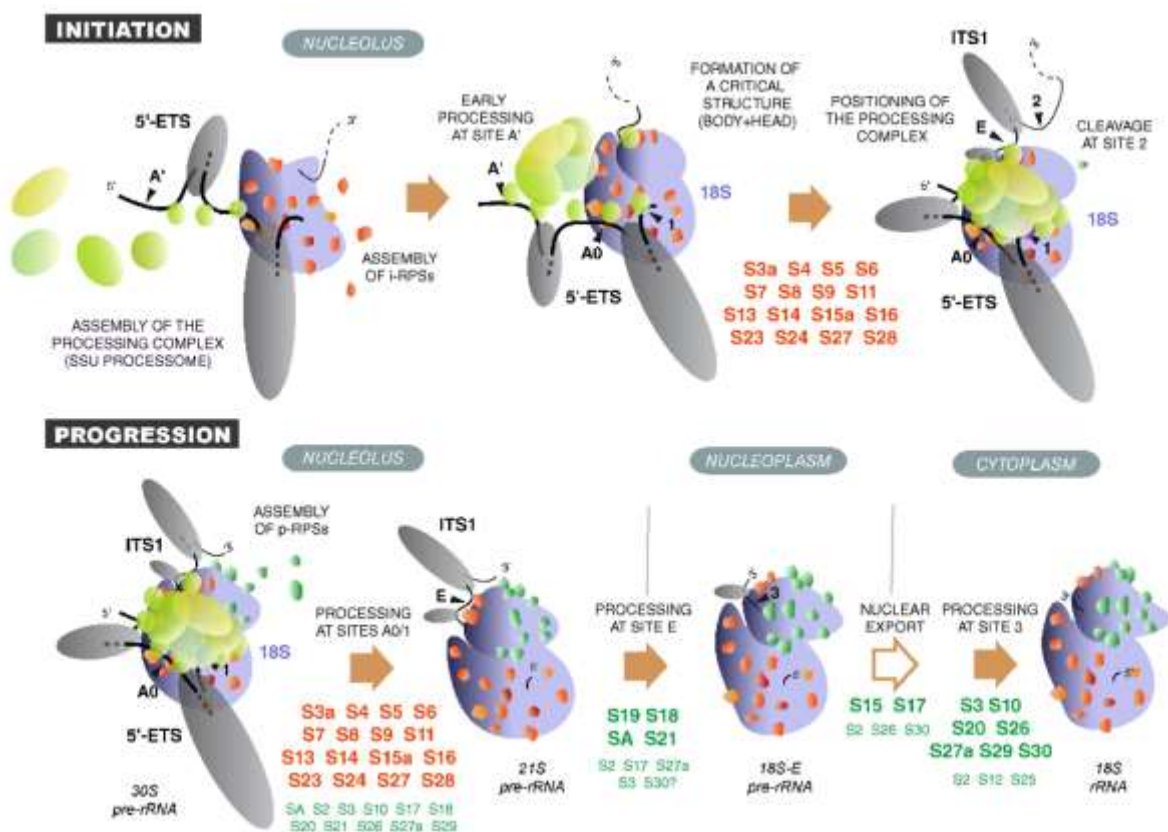


Figure 13. Dynamique d'association des iRPS et pRPS dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique chez l'Homme. Les iRPS (en rouge) et les co-facteurs de maturation (en bleu) s'associent avec le pré-ARNr primaire permettant le repliement correct de l'ARNr. L'ensemble de cette association permet le clivage 5'-ETS. L'association des pRPS (en vert) s'opère en aval induisant les clivages endonucléolytiques aux sites A0 et 1. Après le clivage au site E, les particules pré-40S sont exportées du noyau vers le cytoplasme afin de finir leur maturation.

### B.3 Le rôle des co-facteurs de maturation (CFM) :

En plus des protéines ribosomiques et des snoRNP, la synthèse des sous-unités ribosomiques nécessite l'intervention de nombreuses protéines non ribosomiques (>160 chez *S. cerevisiae*) appelées ici co-facteurs de maturation (CFM). Elles sont nécessaires pour le repliement correct et la maturation de l'ARNr comme pour l'assemblage des protéines ribosomiques. Ces protéines interviennent tout au long des étapes de maturation dans le noyau

et le cytoplasme en s'associant de manière transitoire avec les particules pré-ribosomiques. Certaines de ces protéines sont spécifiques d'un compartiment cellulaire. Ainsi, chez l'Homme, C21ORF70, NOC4 ou encore la diméthylase DIM1, sont associées aux particules pré-40S dans le noyau et sont absentes des particules cytoplasmiques. A l'inverse, les kinases atypiques RIO1 et RIO3 interviennent spécifiquement dans des étapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité 40S humaine (Wylter et al., 2011 ; Widmann et al., 2012). En règle générale, les CFM interviennent dans la maturation de l'une ou l'autre des deux sous-unités ribosomiques. Toutefois, certains CFM peuvent être impliqués dans les deux voies de synthèse, comme c'est le cas de Rrp12, qui est nécessaire à l'export des deux sous-unités ribosomiques, comme montré chez la levure.

Aujourd'hui, grâce à de nombreuses avancées biochimiques et génétiques, de nombreux CFM ont été caractérisés. En effet, l'inhibition de l'expression des gènes par les siRNA couplée à du criblage à haut débit, ou la purification d'affinité des pré-ribosomes couplée à des analyses de leur composition par spectrométrie de masse, ont grandement augmenté notre connaissance sur les CFM. Ces analyses ont permis d'établir une liste d'environ 160 à 200 CFM impliqués dans l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques, chez la levure (Schäfer et al., 2003; Dragon et al., 2002 ; Saveanu et al., 2001 ; 2004).

Chez l'Homme, ce nombre est plus important, du fait de la complexité accrue de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères. Un premier crible par siARN, basé sur une analyse en microscopie de fluorescence, a révélé 464 protéines potentiellement impliquées dans la biogenèse de la petite sous-unité 40S humaine. Cela a mis en évidence une conservation globale des CFM impliqués dans les étapes de maturation nucléolaires, nucléoplasmiques et cytoplasmiques comparé à la levure (Wild et al., 2010). L'analyse du rôle de 625 protéines nucléolaires dans la maturation du pré-ARNr a confirmé la conservation de la biogenèse des sous-unités 40S, mais a également souligné des différences entre ces deux organismes (Tafforeau et al., 2013). Dans ce travail, les auteurs ont identifié 286 protéines nécessaires pour la biogenèse des ribosomes. D'autre part, dans cette étude les auteurs ont confirmé les aspects conservés, au cours de l'évolution de la biogenèse des sous-unités 40S, mais également révélé des différences substantielles.

Par exemple la déplétion du CFM TSR1 dans les cellules humaines induit une accumulation nucléaire des particules pré-40S, tandis que chez la levure, cette même déplétion entraîne une accumulation cytoplasmique des précurseurs de la petite sous-unité ribosomique (Carron et al.

2011). Par ailleurs, le CFM Dim1, chez la levure, est associé aux particules pré-40S nucléaires et cytoplasmiques alors que chez l'Homme, cette association est nucléaire (Shafer et al., 2003 ; Strunk et al., 2011 ; Zorbas et al., 2015).

Plus récemment, un crible pangénomique par siRNA a permis d'établir une liste de 300 protéines, impliquées de manière directe ou indirecte, dans la formation de la sous-unité 40S chez l'Homme, dont 80% interviendraient dans les étapes nucléaires (Badertscher et al., 2015). Enfin très récemment, la recherche de protéines dont la déplétion entraîne une augmentation du nombre de nucléole dans le noyau a permis la découverte de sept nouveaux CFM, impliqués dans la maturation du pré-ARNr et la formation de l'ARNr 18S (Farley-Barnes et al., 2018).

Il faut noter que l'association des CFM sur les particules pré-40S peut être très transitoire. En effet, RIO1, un CFM impliqué dans les dernières étapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S, n'est pas co-purifié avec ces précurseurs en condition sauvage. Cependant, l'inactivation de son activité kinase, par une mutation ponctuelle, stabilise cette association sur les particules pré-40S (Widmann et al., 2012 ; Ferreira-Cerca et al., 2014 ; Turowski et al., 2014).

### B.3.1 Activité enzymatique des CFM :

Malgré la connaissance des CFM impliqués dans l'assemblage de la sous-unité 40S, le rôle précis de la majorité d'entre eux reste à élucider. Toutefois, une grande partie des CFM possèdent une activité enzymatique comme : ATPases, GTPases, kinases, hélicases, nucléases, ou encore méthyl-transférases (Kressler et al., 2010 ; Strunk et al., 2011). Par la suite je m'attacherai à donner quelques exemples d'activité enzymatique des CFM.

- **Les GTPases** : le CFM eIF5B, également appelé Fun12, est nécessaire pour la formation des particules pseudo-80S, issu de l'association des particules pré-40S avec la sous-unité 60S, dans les dernières étapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité 40S, chez la levure (Lebaron et al., 2012 ; Strunk et al., 2012).
- **Les kinases** : chez l'Homme comme chez la levure, le kinase Hrr25 et son homologue CK1  $\delta/\epsilon$  (isoformes de la caséine kinase1) chez l'Homme, interviennent dans la phosphorylation et le relargage des CFM Enp1 et Ltv1 dans le cytoplasme (Zemp et al., 2009 ; Zemp et al., 2014 ; Ghalei et al., 2015). De même, les kinases atypiques Rio1, Rio2 et RIO3 (cette dernière est uniquement présente chez les eucaryotes supérieures)



sont requises pour les dernières étapes cytoplasmiques de maturation de la sous-unité 40S (Widmann et al., 2012). Les cibles de Rio1 et Rio2 n'ont pas été identifiées. Il a été proposé que c'est avant tout leur activité d'ATPase qui jouerait un rôle sur leur fonction en régulant leur dissociation des particules pré-40S (Ferreira-Cera et al., 2012). RIO3 a été identifié comme un composant des particules pré-40S cytoplasmiques tardives. La déplétion de RIO3 induit une accumulation nucléaire du pré-ARNr 21S. Cela indique que ce facteur pourrait potentiellement être impliqué dans le recyclage des CFM nécessaire pour la maturation du pré-ARNr 21S (Baumas et al., 2012). Cependant sa position n'est pas localisée sur les structures des particules pré-40S, récemment publiées. Cela suggère une association très transitoire, ou particulièrement labile, avec les particules pré-40S.

- **Les ATPases** : ces enzymes interviennent également dans la biogénèse des ribosomes. Par exemple, l'ATPase Fab7 est requise, chez la levure, pour la dernière étape de maturation cytoplasmique qui consiste à cliver le pré-ARNr 20S au site D à l'extrémité de l'ARNr 18S mature (Granneman et al., 2005). De plus, Fap7 interagit avec la protéine Rps14 empêchant ainsi son association stable aux particules pré-40S (Hellmich et al., 2012 ; Loc'h et al., 2014). La mutation du domaine ATPase de cette protéine entraîne un défaut de maturation du pré-ARNr 20S. Il a été proposé que Fap7 intervient dans les dernières étapes de maturations, par le biais de son activité ATPase, en stabilisant l'association de Rps14 au niveau de la plateforme des particules pré-40S. En effet Rps14 étant positionné à proximité du site de clivage D, son incorporation pourrait induire un changement de conformation permettant le clivage et l'association stable de Rps26 (Hellmich et al., 2013).
- **Les hélicases** : ces enzymes sont impliquées, dans la biogénèse des ribosomes, dans la modulation des interactions de type ARN-ARN ou pré-ARNr et snoRNP. Par exemple, l'hélicase Prp43 semble jouer un rôle déterminant dans l'appariement de certains snoRNP avec le pré-ARNr 27S (Bohnsack et al., 2009). De même, l'hélicase DDX2 est requise dans le décrochage du snoRNP U8 de l'extrémité 3' de l'ARNr 28S chez la souris (Srivastava et al., 2010).
- **Les méthyltransférases** : parmi ces enzymes, Dim1 est responsable de la diméthylation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme, chez la levure (Lafonataine et al., 1995 ; Lafonataine et al., 1998). Son homologue DIM1, chez l'Homme, assure la même

fonction sur le pré-ARNr 18S-E, mais au niveau nucléaire (Zorbas et al., 2015). D'autres méthylases comme Bud23 ou encore Emg1 interviennent dans la maturation de l'ARNr 18S. Par ailleurs, la présence et non l'activité méthyltransférase de Bud23 est nécessaire pour un export efficace des particules pré-40S (White et al., 2008).

- **Les nucléases :** Ces activités enzymatiques interviennent tout au long de la formation de l'ARNr 18S. En effet, différentes étapes endo- et exonucléolytiques interviennent durant la maturation de l'ARNr 18S dans le noyau et dans le cytoplasme. Par exemple UTP24 est nécessaire pour le clivage au site A2 chez l'Homme. De plus, l'endonucléase Nob1 est responsable du clivage au site D du pré-ARNr 20S chez la levure. NOB1 (l'homologue de Nob1 chez l'Homme) clive le pré-ARNr 18S-E au site 3 et permet la formation de l'ARNr mature 18S. Chez l'Homme, en plus des activités endonucléolytiques, des exo-nucléases 3'-5' sont nécessaires pour la maturation de l'ARNr 18S (Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013; Tafforeau et al., 2013). L'une d'elles a été identifiée comme la Poly-A spécifique RiboNucléase (PARN). PARN raccourcit l'extrémité 3' du pré-ARNr 18S-E dans le noyau (Montellese et al., 2017) avant l'export nucléaire des particules pré-40S.

Il existe également des CFM sans activité enzymatique connue ou prédite. Cependant ces protéines possèdent des domaines d'interaction à l'ARNr (GAR, S1, RRM, domaines à doigt de zinc, etc...) et aux protéines (HEAT, TPR, HAT). Certains s'assemblent en sous-complexes de protéines avant de s'associer aux particules pré-ribosomiques. A titre d'exemple, les complexes UTP-A, UTP-B ainsi que les protéines Bms1-Rcl1 forment un précomplexe avant de s'assembler avec la particule 90S pour la formation du SSU processome (Wegierski et al., 2001 ; Karbstein et al., 2005 ; Phipps et al., 2011 ; Delprato et al., 2014).

### **C. Etapes de la maturation des particules pré-40S :**

Nous définissons ici la particule pré-40S, comme le précurseur de la sous-unité 40S issu de la dissociation du SSU processome après le clivage du 5'-ETS du pré-ARNr. Dans le noyau, le clivage au site A2/2 dans l'ITS1 (chez la levure et l'Homme respectivement) dans le transcrit primaire est suivi du désassemblage de la particule SSU processome. Ceci donne naissance aux premières particules pré-40S. Ces précurseurs sont composés de la majorité des protéines

ribosomiques, du pré-ARNr 20S/18S-E (Homme/levure) et sont stablement associés aux co-facteurs de maturation ENP1/Enp1, LTV1/Ltv1, DIM2/Dim2, DIM1/Dim1, NOB1/Nob1, PRP43/Prp43, CK1/Hrr25, TSR1/Tsr1, RRP12/Rrp12 chez l'Homme et la levure respectivement. Ce précurseur est alors très rapidement exporté vers le cytoplasme où se poursuit sa maturation. L'état des connaissances actuelles indique que, seul un nombre limité des CFM impliqués dans la biogenèse de la petite sous-unité 40S restent stablement associés sur les particules pré-40S, dans les étapes cytoplasmiques de la maturation.

A)

Co-facteurs de maturation		Taille (a-a)		Domaines d'interaction à l'ARNr 18S (CRAC)	Espèce	Technique	Code d'accèsibilité PDB	Compartment cellulaire
Homme	Levure	Homme	Levure					
NOB1	Nob1	412	459	h40 (NT: 1390-1396) h28 (NT: 1625-1627) h35(NT: 1765-1800)	<i>P. aeruginosa</i>	RMN	2LCC (165 acides-aminés)	Nucléaire et Cytoplasmique
DIM2	Dim2	252	274	h45 (NT:1767-1806) h24 (NT: 1001-1024) h28 (NT: 1617-1634)	<i>C. thermophilum</i>	X RAY	5DQ6 (259 acides aminés)	Nucléaire et Cytoplasmique
TSR1	Tsr1	804	788	h45 (NT: 1765-1771) h19, h26, h27	<i>S. cerevisiae</i>	X RAY	5W7 (704 acides aminés)	Nucléaire et Cytoplasmique
LTV1	Ltv1	475	463	h16 (NT: 453-454) h41 (NT: 1490-1491)	<i>S. cerevisiae</i>	X RAY	5WWD (131 acides aminés)	Nucléaire et Cytoplasmique
ENP1	Enp1	437	483	h33 (NT: 1256-1259)	<i>S. cerevisiae</i>	X RAY	5WWD (363 acides aminés)	Nucléaire et Cytoplasmique
RIO2	Rio2	552	425	h31 (NT: 1194-1196)	<i>C. thermophilum</i>	X RAY	4GY1 (397 Acides-aminés)	Cytoplasmique
RIO1	Rio1	568	484	h44 (NT: 1633-1647) h18 (NT: 554-583) h19, h27	<i>H. sapiens</i>	X RAY	4DTP (352 Acides-aminés)	Cytoplasmique

B)

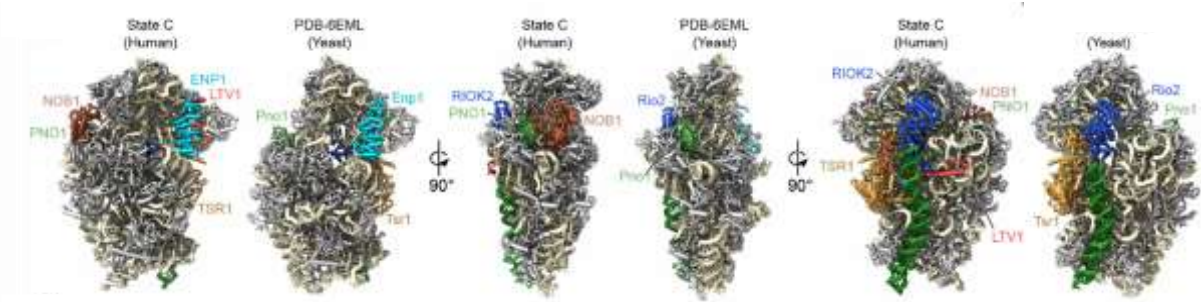


Figure 14. Caractéristiques et localisation des CFM impliqués dans les étapes cytoplasmiques de la maturation de la petite sous-unité ribosomiques. A) Liste des structures et les caractéristiques des CFM cytoplasmiques, disponibles dans les banques de données des modèles atomiques. Les hélices sont marquées par la lettre (h) et les nucléotides par les lettres (NT). B) Positionnement des CFM dans les cartes de densités électroniques des particules pré-40S cytoplasmiques chez l'Homme et la levure. L'ARNr est coloré en jaune clair, les protéines ribosomiques sont représentées en gris, les CFM sont schématisés en couleur. Enp1/ENP1 et Ltv1/LTV1 (en cyan et rouge respectivement) sont localisés au niveau du bec des particules pré-40S, Rio2/RIO2K (en bleu) est positionné au-dessus de l'hélice 44 entre la tête et le corps des particules pré-40S, Tsr1/TSR1 (en jaune foncé) situé à l'interface de l'interaction avec la sous-unité 60S, NOB1 (en marron) et PNO1/Dim2 (en vert clair) sont localisés sur la plateforme des particules pré-40S. L'hélice 44 est colorée en vert foncé (Adaptation de Ameismeier et al., 2018).

Chez la levure, après l'export nucléaire, les particules pré-40S sont associées aux CFM Tsr1, Dim1, Enp1, Ltv1, Rio2, Nob1 et Dim2 (Schafer et al., 2003 ; Strunk et al., 2011, Johnson et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). Chez l'Homme, les particules pré-40S cytoplasmiques sont associées aux CFM RRP12, TSR1, ENP1, LTV1, RIO2, NOB1 et DIM2 (Wylter al., 2011 ; Ameismeier et al., 2018). La structure, les caractéristiques et le positionnement de ces CFM sont détaillés dans la (*Figure 14*) et seront discutés ci-dessous. Les CFM Ltv1 et Rio2 (Strunk et al., 2011 ; Heuer et al., 2017 ; Johnson et al., 2017), Nob1 (Scaiola et al., 2018) et DIM2 (Ameismeier et al., 2018) ont été utilisés comme appât de purification, pour l'analyse structurale des particules pré-40S et positionnement des CFM.

### C.1 Export nucléo-cytoplasmique des particules pré-40S eucaryotes :

Chez la levure en phase exponentielle de croissance environ 20 particules pré-ribosomiques sont exportées vers le cytoplasme à travers chaque complexe de pores nucléaires (CPN) par minute (Warner, 1999). L'export des particules pré-ribosomiques à travers le CPN est une étape clé dans la biogenèse des ribosomes. De ce fait, l'export des particules ribosomiques requiert l'action coordonnée de plusieurs protéines : l'exportine Crm1 et de ses adaptateurs, les nucléoporines (composants du CPN) et l'activité fonctionnelle de l'enzyme RanGTPase (Hurt et al., 1999 ; Gleizes et al., 2001 ; Thomas and Kutay, 2003). La protéine Crm1 s'associe indirectement aux particules pré-40S nucléaire via la séquence NES sur un adaptateur. Les co-facteurs de maturation Dim2, Ltv1 et Rio2 ont été proposés pour jouer ce rôle d'adaptateur. En effet ces protéines sont associées aux particules pré-40S nucléaires et possèdent une séquence d'export nucléaire (NES) riche en leucine. Néanmoins, la délétion de la séquence NES sur les protéines Ltv1 et Rio2 n'entraîne pas de défaut dans la survie des cellules et la biogenèse de la sous-unité ribosomique 40S (Schafer et al., 2003 ; Seiser et al., 2006 ; Fischer et al., 2015). Ces données suggèrent que ces deux protéines ne sont pas essentielles pour l'export des particules pré-40S. Elles pourraient jouer le rôle d'adaptateur pour d'autres exportines ou avoir d'autres séquences NES utiles à cet effet. Contrairement aux protéines Ltv1 et Rio2, la suppression de la séquence NES du co-facteur de maturation Dim2 entraîne une accumulation nucléaire des particules pré-40S (Vanrobays et al., 2008). Cependant, ce défaut de transport pourrait être secondaire à un défaut de maturation du pré-ARNr aux sites A1 et A2 qui est également observé. En plus de ces trois protéines, d'autres protéines ont été impliquées dans l'export des particules pré-40S. Des études *in vitro* chez la levure propose que la protéine Rrp12 pourrait interagir avec les motifs FG des protéines Nup composant le CPN, de manière à faciliter l'export des particules pré-40S (Oeffinger et al., 2004). L'hétérodimère Mtr2/Mex67, connu pour sa fonction

dans l'export des ARNm, a également été proposé comme facteur d'export des particules pré-40S. Cependant le mode d'action de ce co-facteur de maturation reste à élucider (Faza et al., 2012). Rrp12 et Mex67/Mtr2 contribuent également à l'export des particules pré-60S.

Chez l'Homme, les CFM spécifiques des particules pré-40S, ENP1 et DIM2 sont les premiers à se lier sur ces complexes. En effet, ces protéines ont une localisation nucléolaire et leurs déplétions provoquent une accumulation nucléaire des précurseurs pré-40S composés de pré-ARNr 26S et 21S (Zemp et al., 2009 ; Carron et al., 2012; Tafforeau et al., 2013). La protéine RIO2 (orthologue de Rio2 chez la levure) possède une séquence NES dans son domaine C-terminal qui interagit directement avec l'exportine CRM1 et pourrait jouer le rôle d'adaptateur pour cette protéine. Néanmoins la présence de RIO2 n'est pas strictement nécessaire pour l'export nucléaire des particules pré-40S humaines (Zemp et al., 2009). De même, la déplétion de TSR1 induit une accumulation partielle des particules pré-40S dans le noyau (Carron et al., 2011). Toutefois cette protéine ne possédant pas de séquence NES. La présence de TSR1 pourrait alors intervenir dans la structuration et le repliement correcte des particules pré-40S en amont de l'export nucléaire.

Il est à noter que les RP jouent également un rôle important dans l'export des particules pré-ribosomiques. La déplétion des RP Rps2, Rps3 ainsi que Rps0 entraîne une accumulation nucléaire des particules pré-40S (Ferreira-Cerca et al., 2005). De même l'absence de Rps15 provoque un défaut dans l'export de ces précurseurs (Leger-Sylvestre et al., 2004).

L'export nucléo-cytoplasmique et les étapes de maturation cytoplasmique semblent très similaires entre l'Homme et la levure. De plus, les CFM des particules pré-40S ainsi que l'ordre de leur association et dissociation sont comparables entre les deux espèces. Cependant la complexité accrue et le manque de connaissance dans la maturation des sous-unités ribosomiques chez l'Homme, laisse de nombreuses questions sans réponses. Des hypothèses sont proposées sur un changement de conformation potentiel des particules pré-40S après le clivage au site E et la formation du pré-ARNr 18S-E. Cet événement serait nécessaire pour le passage nucléo-cytoplasmique des particules pré-40S à traverser le CPN (Rouquette et al., 2005). Comme pour les particules de levure, ce transfert nécessite l'implication de l'exportine CRM1 et des nucléoporines (Kutay et al., 2003 ; Wild et al., 2010).

## C.2 Etapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S de levure :

Les particules pré-40S correctement assemblées, issues du SSU processome, sont très rapidement exportées vers le cytoplasme. Ces particules pré-40S, dites cytoplasmiques précoces, sont composées du pré-ARNr 20S, de toutes les RPS à l'exception de RPS10 et RPS26, et sont stablement associées aux co-facteurs de maturation Dim2, Nob1, Enp1, Ltv1, Hrr25, Dim1 et Tsr1. (Schafer et al., 2002 ; Ferreira-Cerca et al., 2005 ; Strunk et al., 2011 ; Scaiola et al., 2017 ; Heuer et al., 2017). Dans le cytoplasme, les particules pré-40S subissent différentes étapes de maturation : diméthylation de l'ARNr, intégration et stabilisation de RPS10 et RPS26, libération séquentielle des co-facteurs de maturation et élimination d'environ 211 nucléotides sur l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S par l'endonucléase Nob1 pour former l'ARNr mature 18S (Figure 15). L'étude de la chronologie de ces événements indique que le relargage de Ltv1 sur les particules précoces semble être la première étape de la maturation cytoplasmique. La dissociation de Ltv1 requiert sa phosphorylation par Hrr25, l'homologue de CDK1 (Ghalei et al., 2015 ; Mitterer et al., 2016). Le départ de Ltv1 est couplé à la stabilisation de Rps3 dans sa position finale. En effet la stabilisation de Rps3 nécessite l'interaction du domaine N-terminal de Rps3 avec Rps20 et l'hélice 41, ce qu'empêche la présence de Ltv1 sur le bec des particules pré-40S (Mitterer et al., 2016). Enp1 et Rps3 sont également phosphorylés par le CFM Hrr25, cependant les mécanismes permettant ces événements restent à élucider (Ferreira-Cerca et al., 2012 ; Ghalei et al., 2015 ; Schafer et al., 2006). Par ailleurs, Ltv1 et Enp1 étant positionnées sur le bec des particules pré-40S (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018), à la même place que RPS10, leur relargage est nécessaire pour l'incorporation de la protéine RPS10.

Le rôle précis et la chronologie de dissociation de ces co-facteurs de maturation n'est pas encore clair à ce jour. Toutefois, de nombreux travaux s'accordent sur une libération plus précoces des co-facteurs de maturation Ltv1, Enp1, Rio2, Dim1 et Tsr1 en comparaison avec Dim2 et Nob1, qui sont nécessaires jusque dans les toutes dernières étapes de maturation cytoplasmique (Strunk et al., 2012 ; Hector et al., 2014 ; Ghalei et al., 2015). D'autre part, l'activité kinase des CFM Rio1 et Rio2 est requise pour la maturation cytoplasmique du pré-ARNr 20S et le relargage des facteurs d'assemblage. En revanche, les substrats de ces protéines n'ont pas encore été identifiés à ce jour (Geerlings et al., 2003 ; Rouquette et al., 2005 ; Turowski et al., 2014 ; Ferreira-Cerca et al., 2012 ; 2014).

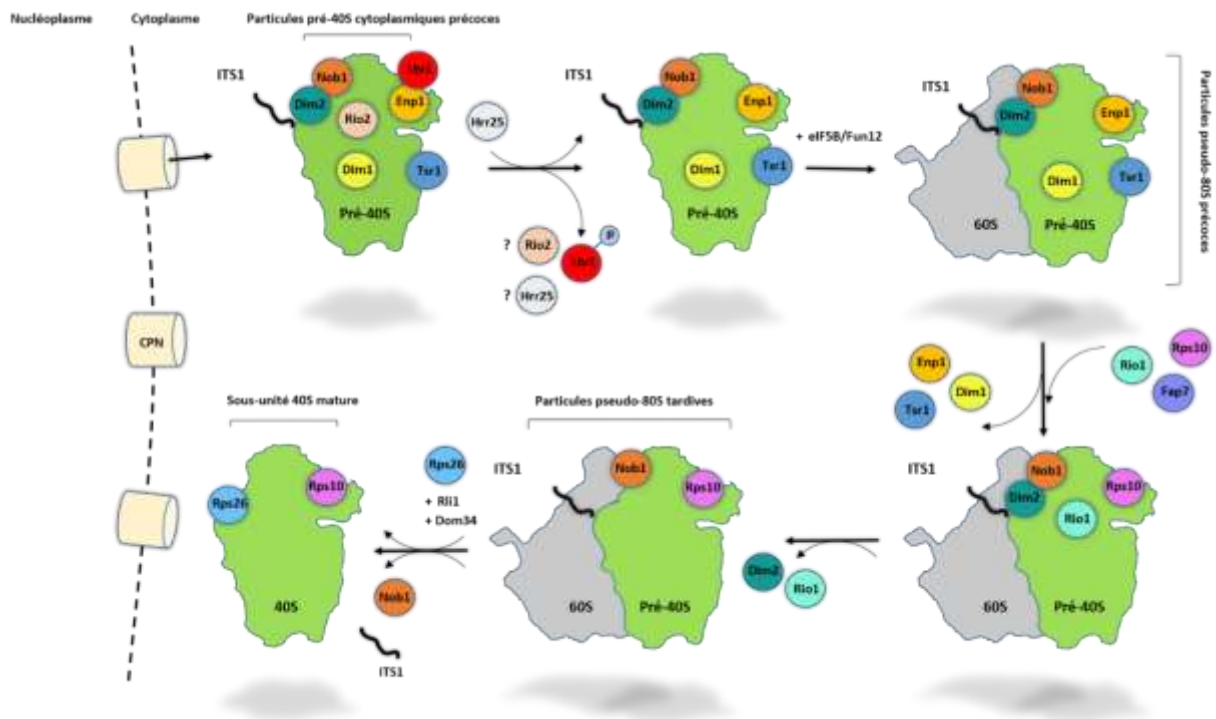


Figure 15. **Etapes de maturation cytoplasmique de la sous-unité ribosomique 40S chez la levure.** Les composants de la particule pré-40S sont représentés en vert clair. La sous-unité 60S est colorée en gris. Les CFM et les protéines ribosomiques (RPS) sont schématisés avec une forme ovale. L'extrémité 3' (ITS1) du pré-ARNr 20S est représentée par un trait noir. Les mécanismes permettant le relargage des CFM Hrr25 et Rio2 ne sont pas clairs à ce jour. (Représentés par un point d'interrogation). Le CFM eIF5B/Fun12 est nécessaire pour l'association des particules pré-40S avec la sous-unité 60S. Cela permet la formation des particules dit pseudo-80S. La dissociation de ces deux complexes requiert les CFM Rli1 et Dom34. Il reste à comprendre si le clivage de l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S, au site D, se produit dans les particules pseudo-80S ou après dissociation des deux complexes. Cette dernière étape de maturation nécessite un changement de conformation et le relargage de Dim2, libérant le site de clivage pour l'endonucléase Nob1.

Le relargage des co-facteurs de maturation Ltv1, Enp1, Rio2, Dim1 et Tsr1, permet la formation d'une nouvelle particule pré-40S dite « tardive » composée des facteurs d'assemblage Nob1, Dim2 et du pré-ARNr 20S. La dernière étape de maturation cytoplasmique consiste à cliver l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S au site D par l'activité endonucléolytique de Nob1. Or cette protéine s'associe aux particules pré-40S bien en amont, dans le noyau. L'activité de Nob1 fait donc l'objet d'un mécanisme de contrôle. Il a été proposé que le domaine PIN catalytique de Nob1 serait éloigné de son substrat, jusqu'à la dernière étape de maturation cytoplasmique. L'extrémité 3' de l'ARNr 18S serait ainsi maintenue dans une conformation immature par les CFM afin de prévenir un clivage prématuré. Un remodelage structural de la plateforme serait donc nécessaire pour mettre Nob1 en contact avec le site de clivage D et déclencher le clivage endonucléolytique (Pertchy et al., 2009 ; Hector et al., 2014).

D'autres études proposent qu'une association des particules pré-40S tardives avec les particules 60S matures est préalablement nécessaire avant le clivage au site D de l'ARNr par Nob1. L'association de ces deux complexes forme une particule dite pseudo-80S (par similarité à un ribosome mature), avant de se dissocier à nouveau pour finir la maturation de la sous-unité 40S (Lebaron et al., 2012 ; Strunk et al., 2012) (Figure 15). Le complexe pseudo-80S est non compétent pour l'initiation de la traduction et se forme en absence d'ARNm et ARNt (Strunk et al., 2011 ; 2012). Cette association est favorisée par une GTPase, le facteur d'initiation de la traduction eIF5B, également appelée Fun12. La mutation de eIF5B/Fun12 induit une accumulation de précurseurs de l'ARNr 20S avec un défaut de clivage au site D (Li et al., 2009 ; Lebaron et al., 2012). En parallèle il a été proposé qu'une mutation de la protéine Rpl3 (composante de la grande sous-unité ribosomique 60S) a pour effet une accumulation cytoplasmique du pré-ARNr 20S. Par ailleurs, lorsque Rpl3 est mutée, l'activité GTPase de eIF5B/Fun12 incorporée dans les particules pseudo-80S est inhibée. Ces données suggèrent que l'intégration correcte de Rpl3 dans la grande sous-unité ribosomique est nécessaire pour l'activité GTPase de eIF5B/Fun12 permettant le clivage au site D du pré-ARNr 20S au sein des particules pseudo-80S (Garcia-Gomez et al., 2014). Cependant le lien entre l'hydrolyse de GTP par eIF5B/Fun12 et le clivage au site D par Nob1 reste à élucider.

Dans ce modèle, l'ATPase Fap7 joue aussi un rôle important dans la progression de la maturation des particules pseudo-80S, nouvellement formées (Granneman et al., 2005). Cette protéine est présente au niveau nucléaire et cytoplasmique et interagit transitoirement avec les particules pré-ribosomiques. Plusieurs rôles ont été attribués dans la littérature, à cette protéine, dans les étapes précoces et tardives de la biogenèse de la sous-unité 40S.

Il est proposé que la protéine Fap7 joue le rôle de chaperonne en s'associant avec les protéines RPS14 et RPS26. L'activité ATPase de Fap7 serait nécessaire pour la dissociation de ce complexe et l'intégration de RPS14 et RPS26 au sein du SSU processome, au niveau nucléaire (Granneman et al., 2005 ; Hellmich et al., 2013 ; Pena et al., 2016). En effet, ces deux protéines sont co-purifiées avec les particules pré-ribosomiques nucléaires, en utilisant le co-facteur de maturation nucléaire NOC4, composant de SSU processome, comme appât. Fap7 intervient également dans les étapes tardives de maturation cytoplasmique des particules pré-40S. En effet, cette protéine est requise pour le relargage des CFM Enp1, Tsr1, et Dim1 et la formation des particules pseudo-80S (Ghalei et al., 2017). D'autre part, la déplétion de Fap7 entraîne une accumulation du facteur d'élongation eEF2 et induit un défaut de maturation du pré-ARNr 20S. La protéine eEF2 empêche le mouvement de « Ratchet » qui se caractérise par



une rotation du corps et le pivotement de la tête de la petite sous-unité ribosomique 40S par rapport à la grande sous-unité 60S, durant la traduction. De plus, le défaut de maturation du pré-ARNr 20S peut être sauvé par une mutation ponctuelle réduisant l'interaction de Dim1 sur les particules pseudo-80S. Ces données suggèrent que Fap7 favorise le relargage de Dim1 en stabilisant le mouvement de rotation de la petite sous-unité par rapport à la grande sous-unité ribosomique dans les particules pseudo-80S (Ghalei et al., 2017).

Récemment, l'apparition et la comparaison des structures 3D à haute résolution des particules de SSU processome et pré-40S cytoplasmiques, par cryo-EM, a permis d'élucider la position des protéines ribosomiques sur ces modèles (Sun et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). Ces données ont permis de constater l'association stable de RPS14 aux particules SSU processome et ce, jusqu'à la formation de la sous-unité mature 40S. Par ailleurs, ces études ont souligné l'absence de RPS26 sur les particules pré-40S cytoplasmiques, dont l'emplacement est occupé par le CFM Dim2 (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). Cela a soulevé de nombreuses questions notamment sur la chronologie d'action de Fap7 et l'association de RPS26 sur les particules pré-40S. En effet il n'est pas clair si Fap7 reste associée aux particules pré-ribosomiques jusqu'à la formation des particules pseudo-80S ou si elle intervient à nouveau dans les étapes cytoplasmiques, après la dissociation du complexe Fap7-Rps14-Rps26.

Suite à l'action de Fap7 et la dissociation des co-facteurs de maturation Enp1, Tsr1, et Dim1 se forme une particule pseudo-80S tardive. Ce complexe est composé des facteurs Dim2, Rio1 et l'endonucléase Nob1 nécessaire pour le clivage au site D du pré-ARNr 20S. La chronologie d'association et le mode d'action de l'ATPase Rio1 dans ces particules reste à élucider. Toutefois, la déplétion ou la surexpression de la protéine Rio1 mutée pour son activité catalytique induit un défaut de relargage des co-facteurs de maturation Dim2, Nob1, Tsr1, Dim1, et Fap7 sur les particules pseudo-80S. Cela suggère une action plus tardive de Rio1 par rapport à la protéine Fap7.

Les particules pré-40S et 60S se dissocient sous l'action de l'ATPase Rli1 et de la protéine Dom34 (Strunk et al., 2012). De nombreuses questions se posent concernant le rôle des particules pseudo-80S dans l'assemblage ribosomique. En effet la déplétion du facteur eiF5B, nécessaire pour la formation des particules pseudo-80S, n'affecte pas la survie des cellules et n'entraîne pas un blocage total dans la maturation du pré-ARNr 20S (Strunk et al., 2012 ; Lebaron et al., 2012). De plus, à l'état sauvage seulement une faible fraction des particules pré-ribosomiques s'engagent dans la formation des particules pseudo-80S (Lebaron et al., 2012 ;

Strunk et al., 2012 ; Turowski et al., 2014). On peut noter que des particules pseudo-80S s'accumulent lorsque la formation de la sous-unité 40S est bloquée tardivement par la déplétion de Fap7, Nob1 ou Rio1 (Strunk et al., 2012 ; Turowski et al., 2014 ; Scaiola et al., 2017). Il est possible que cette association soit une étape de contrôle qualité afin de détecter les particules ribosomiques non compétentes pour la traduction.

La dernière étape de maturation cytoplasmique consiste à cliver le pré-ARNr 20S au site D puis libérer les co-facteurs de maturation restants pour former la sous-unité mature 40S. Ce clivage est effectué par le domaine PIN de l'endonucléase Nob1. Toutefois, la coordination des événements permettant cette dernière étape de maturation est à élucider. Il reste à déterminer si le clivage au site D s'opère dans les particules pseudo-80S ou après sa dissociation (Figure 15).

### C.3 Les étapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S de l'Homme :

La connaissance sur la formation des particules pré-40S humaines a longtemps été plus faible en comparaison avec celles de la levure. En effet, la levure est un organisme génétiquement facile à manipuler. Néanmoins, les avancées scientifiques et technologiques des dernières décennies ont permis d'aborder en détail les mécanismes moléculaires de la synthèse de la petite sous-unité 40S chez l'Homme. En effet, de nombreux travaux basés sur des études biochimiques et structurales tels que la purification d'affinité, la spectrométrie de masse, l'utilisation de ARNi couplé au criblage à haut débit, ou encore la cryo-EM ont permis d'élucider la composition des intermédiaires pré-ribosomiques. De plus, ces études ont grandement contribué à une compréhension plus avancée du rôle des CFM dans la biogenèse de la sous-unités 40S, même si les fonctions précises de ces acteurs de la biogenèse des ribosomes restent à élucider.

L'état des connaissances actuelles indique qu'après l'export nucléaire à travers le CPN, les particules pré-40S humaines sont composées du pré-ARNr 18S-E, de la majorité des RP et des CFM ENP1, TSR1, NOB1, DIM2, RIO2K, RRP12 et des isoformes  $\delta$  et  $\epsilon$  de la caséine kinase 1 (CK1  $\delta/\epsilon$ ). Les isoformes CK1  $\delta/\epsilon$ , orthologues de Hrr25 chez la levure, phosphorylent LTV1 et ENP1 dans le cytoplasme (Zemp et al., 2014). La phosphorylation de LTV1 par CK1  $\delta$  entraîne sa dissociation des particules pré-40S (Figure 16). La présence de RIO2 est nécessaire au relargage de ENP1, DIM2, LTV1 et NOB1, mais son activité kinase n'est requise que pour les trois derniers CFM (Zemp et al., 2009). La déplétion de RIO2 entraîne une accumulation cytoplasmique du précurseur pré-ARNr 18S-E (Rouquette et al., 2005). La protéine RIO1 est



de DIM2, NOB1 et RIO1, afin de former la sous-unité 40S mature (Figure 16). A la grande différence des étapes de maturation cytoplasmique chez la levure, pour l'heure, il n'y a pas de données décrivant une association des particules pré-40S avec les particules 60S chez l'Homme.

Ainsi, l'absence des particules pseudo-80S chez l'Homme souligne une différence majeure dans les étapes de maturation de ces deux espèces. Cette différence chez l'Homme peut s'expliquer par une disparition de cette étape de maturation avec l'évolution. La formation des particules pseudo-80S peut également correspondre à un évènement de maturation très tardif chez l'Homme, pas encore décrit dans la littérature

#### **D. Apport de la cryo-EM dans l'étude des ribosomes :**

##### **D.1 Etude structurale des ribosomes matures**

La structure globale des ribosomes a été observée pour la première fois par G. Palade en 1955. En effet, grâce à la microscopie électronique en transmission, Palade a observé des particules de forme sphérique, très abondantes dans le cytoplasme et en périphérie du réticulum endoplasmique des cellules, dont il estime la taille à environ 20 nanomètres. Cela lui a valu le prix Nobel de la médecine en 1974. Cette découverte a été possible grâce à la coloration des échantillons biologiques par des sels de métaux lourds. La coloration négative, elle aussi basée sur le contraste apporté des métaux lourds, a permis l'observation de la forme globale des deux sous-unités ribosomiques purifiées (Lake et al., 1974 ; Vasilev et al., 1974). Par la suite, Jacques Dubochet et ses collaborateurs ont mis au point la technique de cryo-microscopie électronique en transmission, une nouvelle approche pour l'étude structurale des particules biologique (Dubochet et al., 1988). Ce procédé consiste à congeler instantanément l'échantillon biologique dans une glace vitreuse. Cela permet l'observation des complexes biologiques sous forme hydratée, proche de leur état natif. L'association de ce processus avec un développement important des techniques d'analyse d'images a contribué à la reconstruction 3D de nombreux macromolécules biologiques, dont les ribosomes. Dans les années 90, une première structure de ces complexes ribonucléoprotéiques a été résolue par cryo-EM avec une résolution de 40 Å. Par la suite, l'étude structurale de ce complexe a sollicité l'effort de la communauté scientifique afin de déterminer son modèle 3D d'abord à 23 Å puis à 11 Å de résolution chez la bactérie *E. coli* (Stark et al., 1995 ; Gabashvili et al., 2000). L'ensemble de ces données ont été déterminantes pour la compréhension du rôle des ribosomes dans les processus biologiques, notamment les mécanismes de la traduction de l'information génétique. En effet, en utilisant

la cryo-EM, la structure du ribosome mature 80S chez la levure *S. cerevisiae*, chez l'Homme et la plante *Triticum aestivum*, ont contribué à une modélisation correcte de l'ARNr, des segments d'extension (ES) et des RP chez les eucaryotes. De plus, ces travaux ont permis la localisation des sites fonctionnels importants pour la traduction (Spahn et al., 2001 ; Chandramouli et al., 2008 ; Armache et al., 2010). Les années 2000 ont également vu la détermination des structures des deux sous-unités ribosomiques à haute résolution, chez les archées et les bactéries grâce à la cristallographie aux rayons X (Schluenzen et al., 2000 ; Wimberly et al., 2000 ; Ban et al., 1998 ; 1999 ; 2000, Herms et al., 2001). L'association de ces données couplées à des structures venant de la cryo-EM ont permis une nouvelle interprétation de la fonction des sous-unités ribosomiques. Ces travaux ont été récompensés par l'attribution du prix Nobel de chimie 2009 aux chercheurs Ada Yonath, Thomas Steitz et Venkatraman Ramakrishnan pour l'ensemble de leurs travaux sur la caractérisation moléculaire et fonctionnelle du ribosome bactérien. Après plus de 20 ans de mise au point de cristaux de ribosomes, les trois lauréats ont oublié en 2000 les premières images du ribosome à l'échelle atomique : T. Steitz a élucidé la structure de la grande sous-unité du ribosome de la bactérie *Haloarcula marismortui*, tandis que A. Yonath et V. Ramakrishnan ont obtenu celle de la petite sous-unité ribosomique de la bactérie *Thermus thermophilus*. En 2010 puis en 2011, le défi de l'étude structurale des ribosomes eucaryotes à l'échelle atomique est relevé. En effet Ben-shem et ses collaborateurs déterminent la structure 3D du ribosome eucaryote de la levure *S. cerevisiae* à 4,15 puis à 3 Å de résolution avec la technique de cristallographie aux rayons X (Ben-Shem et al., 2010 ; 2011). A cette résolution, la localisation des 80 protéines ribosomiques et les 5500 bases de l'ARNr composant le ribosome mature 80S est sans ambiguïté. De plus, la structure du ribosome mature à très haute résolution a fourni des informations détaillées sur l'architecture des ponts inter-sous-unités, chez les eucaryotes.

Depuis quelques années, la cryo-EM connaît une révolution en termes de résolution. Cela est le fruit d'un développement technologique important des détecteurs directs d'électrons, couplé aux progrès considérables des algorithmes d'analyse d'images et des capacités des calculs. Ces avancées ont contribué à la publication des structures de nombreux complexes moléculaires à l'échelle quasi-atomique, dont celles de ribosomes eucaryotes et de leurs précurseurs. (Bai et al., 2013 ; Khatter et al., 2015 ; Scaiola et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Sun et al., 2017 ; Meismeyer et al., 2018).

Contrairement aux caméra CCD, l'acquisition des images en MET avec les détecteurs directs d'électrons ne nécessite pas la conversion des électrons en photons. De ce fait, les

électrons détectés conservent leurs énergies, ce qui contribue à une augmentation du rapport signal sur bruit des images acquises. De plus ces détecteurs permettent désormais un nouveau mode d'acquisition d'images appelé « MOVIE ». Ce procédé consiste à effectuer la prise de vue de chaque champ de particules sous forme d'un film au lieu d'une seule image. L'alignement et la somme des images de ce film permet de corriger les mouvements de l'échantillon liés à l'exposition au faisceau électronique et d'obtenir ainsi une image de plus haute résolution, dont le contraste et le rapport signal sur bruit sont augmentés (Brilot et al., 2012 ; Campelle et al., 2012).

Une limite majeure dans l'étude structurale des complexes biologiques réside dans la nature hétérogène de ces molécules, en termes de composition et de conformation. Cette hétérogénéité résulte de la présence de plusieurs états structuraux dans la glace vitreuse pour un échantillon biologique étudié. La reconstruction 3D d'un échantillon biologique hétérogène aboutit à une modélisation 3D bruitée et de basse résolution. Désormais cet obstacle est levé, au moins en partie, grâce à des avancées considérables dans le développement des algorithmes qui utilisent des statistiques dites bayésiennes. En effet, l'utilisation de ces approches statistiques permet aujourd'hui, un tri de l'hétérogénéité structurale de l'échantillon biologique par le biais d'une classification 3D (Scheres, 2012). Cela permet d'obtenir des images de hautes résolutions des variants structuraux d'un échantillon biologique.

Le développement des ressources informatiques et de stockage de données ont également joué un rôle déterminant dans l'évolution de la cryo-EM. Si la reconstruction 3D d'un complexe biologique nécessitait plusieurs mois de traitement de données il y a encore quelques années, la réduction du temps de calcul liée aux performances des ordinateurs permet aujourd'hui sa modélisation en quelques semaines.

L'ensemble de cette révolution technologique en cryo-EM a permis récemment l'obtention de multiples structures 3D du ribosome mature, à haute résolution, chez différents organismes. En effet, les structures des ribosomes bactériens 70S de *Thermus thermophilus* et eucaryote 80S de *Saccharomyce cerevisiae*, ont été déterminées à une résolution globale de 4 Å en 2013. Dans cette étude, les auteurs ont observé les feuilletés bêta, les hélices alpha et les chaînes latérales des acides aminés pour les régions les mieux résolues. Par ailleurs, ces données ont démontré également une flexibilité plus importante de la petite sous-unité ribosomique en comparaison avec la grande sous-unité 60S (Bai et al., 2013). La même année, grâce à la cryo-EM, une nouvelle étape a été franchie dans l'étude des ribosomes matures chez les eucaryotes. En effet, Anger et ses collaborateurs ont déterminé la carte de densité électronique du ribosome mature

80S, en complexe avec le facteur d'élongation eEF2 et l'ARNt du site E, chez la *Drosophila melanogaster* et chez l'Homme à 6 Å de résolution (Anger et al., 2013). Ces structures illustrent d'une part la conservation du cœur de la structure des ribosomes chez les trois domaines du vivant, et soulignent d'autre part, la complexité des ribosomes des eucaryotes supérieurs, avec l'ajout d'éléments nucléiques et protéiques durant l'évolution (Anger et al., 2013). En 2015, la structure du ribosome humain est déterminée, pour la première fois, à l'échelle quasi atomique par cryo-EM par l'équipe de Bruno Klaholtz à Strasbourg. Avec une résolution moyenne de 3,6 Å, allant jusqu'à 2,9 Å pour les zones les plus stables. Ce modèle fournit des informations sans précédent sur les ARN ribosomiques et les chaînes latérales des acides aminés des protéines. De plus, cette observation a révélé notamment les sites de liaison des ARNt et les sites de liaison entre les deux sous-unités ribosomiques. Cela a permis de proposer un modèle atomique du ribosome humain ouvrant la voie à d'autres études, notamment à l'analyse des effets secondaires des antibiotiques et des maladies associées à la synthèse dérégulée des protéines (Khatter et al., 2015).

## D.2 Etude structurale des particules pré-40S cytoplasmiques :

Malgré la publication récente des ribosomes eucaryotes à l'échelle quasi-atomique, l'étude structurale des précurseurs de la petite sous-unité ribosomique 40S a longtemps été difficile. Ces dernières années, de nombreux travaux ont décrit la structure des particules pré-ribosomiques 90S ou SSU processome (Kornprobst et al., 2016 ; Cheng et al., 2017 ; Sun et al., 2017), ainsi que les précurseurs de la sous-unité 60S (Laidig et al., 2014 ; Wu et al., 2016 ; Sanghai et al., 2018). L'obtention de la structure 3D des particules pré-40S à l'échelle quasi-atomique, chez les eucaryotes supérieurs, semblait encore limitée récemment, compte tenu de leur nature dynamique et hétérogène. Toutefois, l'étude structurale des précurseurs pré-40S connaît aujourd'hui des progrès considérables, notamment grâce aux avancées technologiques de la cryo-EM et de l'analyse d'image.

Si aujourd'hui nous disposons des données détaillées sur la composition des particules pré-40S, le rôle précis et la chronologie d'association et dissociation des CFM restent à élucider. Afin de mieux comprendre la fonction de ces CFM, diverses études structurales ont été entreprises, chez la levure et très récemment chez l'Homme. Ces travaux ont permis d'une part, de localiser les CFM et d'autre part de proposer des rôles sur la fonction de ces protéines dans l'assemblage de la sous-unité 40S.

Par la suite, je m'attacherai à décrire les dernières connaissances sur l'étude structurale des particules pré-40S cytoplasmique et le positionnement des CFM chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae*.

### D.3 Positionnement et rôle des CFM cytoplasmiques impliqués dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S, chez la levure :

En 2011, Strunk et ses collaborateurs déterminent la première structure de particules pré-40S cytoplasmiques eucaryotes, purifiées en utilisant Ltv1 comme appât, à une résolution de 18 Å (Strunk et al., 2011). Par la suite, en 2017 puis en 2018, d'autres travaux ont abouti à la reconstruction 3D des particules pré-40S cytoplasmiques, d'abord à 9 Å de résolution puis à l'échelle quasi-atomique, à 3,6 et 3,4 Å de résolution (Johnson et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018).

Les cartes de densités électroniques de ces précurseurs ont été combinées avec des données de CRAC (UV crosslinking and analysis of cDNA), indiquant le site d'interaction des CFM avec l'ARNr. De plus, avec des analyses de déplétion de CFM, les auteurs ont ainsi pu proposer la localisation de plusieurs CFM (Granneman et al., 2010 ; Strunk et al., 2011 ; Johnson et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018) (Figure 17). Pour ces analyses structurales, les particules pré-40S ont été purifiées en prenant pour appât Ltv1, Rio2 (Strunk et al., 2011 ; Johnson et al., 2017 ; Heuer et al., 2017) et Nob1 (Scaiola et al., 2018), cette dernière étant inactivée dans son activité catalytique. Ces modèles montrent des particules pré-40S cytoplasmiques précoces (avant association avec la particule 60S) et des particules pseudo-80S purifiées avec Nob1. Concernant les particules pré-40S précoces, les auteurs ont observé la présence de plusieurs densités supplémentaires, en comparaison avec la sous-unité mature 40S, qu'ils ont attribués à Ltv1, Enp1, Tsr1, Rio2, Dim2. En revanche, la structure des particules pseudo-80S ne possède aucun CFM excepté la présence d'une densité supplémentaire, de basse résolution, à l'extrémité 3' de ARNr 18S. Il n'est pas à exclure que cette densité puisse correspondre, soit à une partie de la séquence ITS1 soit à Nob1. Ce modèle est en contradiction avec les données biochimiques indiquant la présence des CFM sur la particule pseudo-80S dont la raison reste à élucider. L'interprétation de cette carte de densité nécessite une meilleure résolution de cette densité supplémentaire.



Concernant les CFM Ltv1 et Enp1, ils sont positionnés au niveau du bec, entre la tête et le corps des particules pré-40S; Tsr1 est localisé à l'interface avec la sous-unité 60S, à la place occupée par le facteur d'initiation de la traduction eIF5B; Rio2 est situé dans le sillon de l'ARNm entre la tête et le corps des particules; Dim2 est localisé sur la plateforme des particules pré-40S au voisinage de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S.

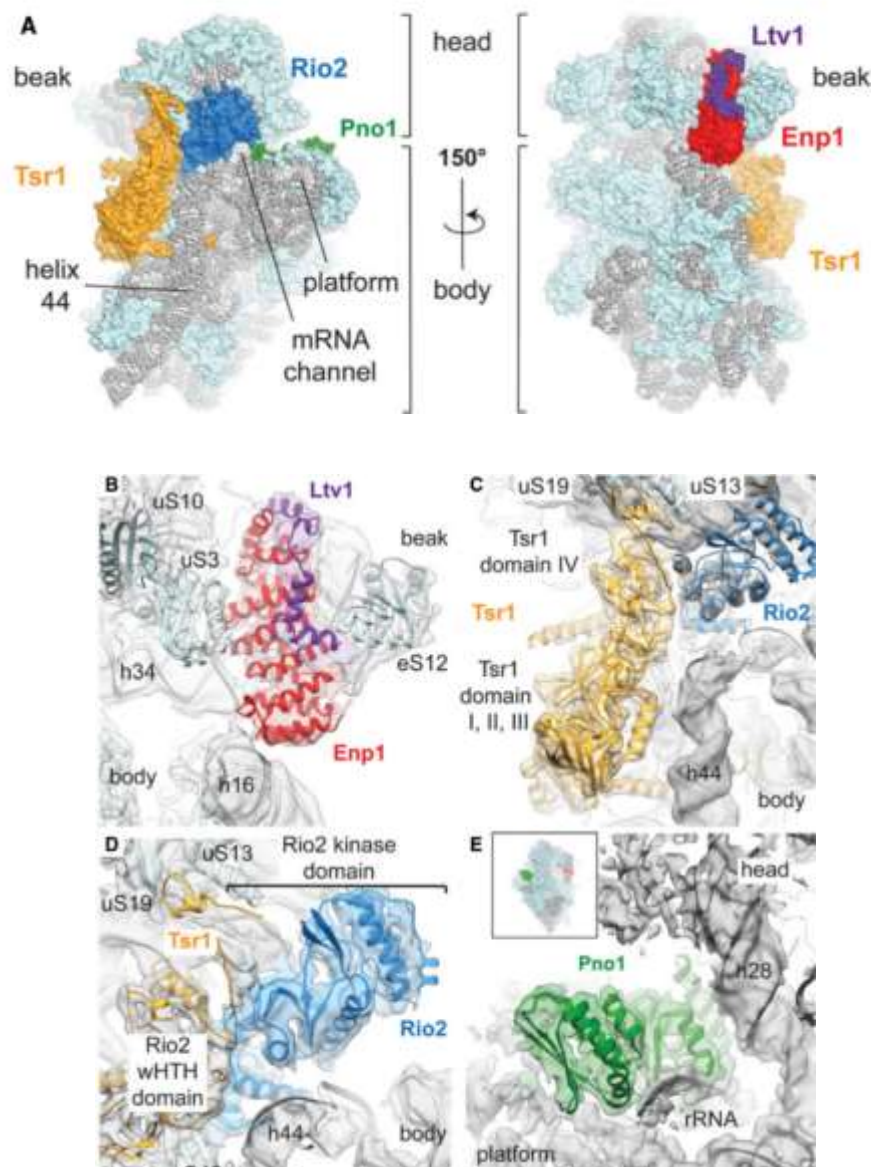


Figure 17. Localisation des CFM sur les particules pré-40S cytoplasmiques chez la levure *S. cerevisiae*. A) Représentation moléculaire de la particule pré-40S cytoplasmique et vue d'interface et vue de solvant. L'ARNr est coloré en gris, les protéines ribosomiques en bleu clair et les co-facteurs de maturation en couleur. B) La position des CFM Enp1 (rouge) et Ltv1 (violet) au niveau du bec, C) Tsr1 (en jaune) situé sous la tête à l'interface avec la sous-unité 60S, D) Rio2 (en bleu) positionné entre la tête et le corps des particules, E) Dim2 (en vert) localisé au niveau de la plateforme à proximité de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Adaptation de Scaiola et al., 2018).

De manière surprenante, Nob1 n'est pas présent sur les cartes de densité électroniques même en étant utilisée comme appât pour la purification des particules pré-40S (Scaiola et al., 2018) (Figure 17). Cela suggère une association labile et/ou flexible de cette protéine sur la plateforme des particules pré-40S (Lamanna et Karbstein, 2009; Turowski et al., 2014).

Au vu de leurs positions sur la particule pré-40S, les auteurs ont proposé des hypothèses sur le rôle des CFM dans l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique. De par leur localisation sur les sites fonctionnels importants, tel que le sillon de l'ARNm ou encore les sites d'interactions avec l'ARNt, les CFM empêchent une entrée prématurée des particules pré-40S en initiation de la traduction (Strunk et al., 2011). En effet, Tsr1 occupe le site d'interaction du facteur d'initiation de la traduction eIF5B, et Rio2 se lie au niveau des sites d'interactions A et P de l'ARNt rendant la particule incompétente pour la traduction (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). De plus, les CFM semblent maintenir le pré-ARNr dans une conformation immature. Cette analyse est soutenue par des données biochimiques qui montrent que les CFM régulent l'assemblage et la stabilisation des protéines ribosomiques en maintenant le pré-ARNr dans une conformation flexible (Hector et al., 2014). De plus Tsr1 et Enp1 interagissent avec les hélices h33, h34 et h35 qui composent de la tête et du bec des particules pré-40S, et les maintiennent dans une conformation immature. Cela empêche la formation du site A pour l'interaction des ARNt. Par ailleurs, dans les particules pré-40S, le linker entre les hélices h28 et h44, formant le site A et P, est déplacé par rapport à sa position mature rendant ces sites non fonctionnels. En effet, le domaine N-terminal de Tsr1 maintient l'hélice h44 dans une position immature. De même, le domaine C-terminal de Dim2 est en contact avec l'hélice h28 de l'ARNr l'empêchant d'atteindre sa position mature (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). Ces résultats suggèrent que la mise en place de l'ARNr 18S nécessite un changement de conformation dû au relargage des CFM.

Par ailleurs, les études structurales des particules pré-40S indiquent qu'il existe des variants conformationnels pour les CFM Tsr1, Dim1 et Rio2. En effet la protéine Rio2 est observée dans une conformation ouverte liant la tête des particules par son domaine kinase et le corps par son domaine N-ter wHTH (Wing helix to helix) (Figure 17 D). Cette conformation n'est pas compétente pour l'hydrolyse d'ATP. De ce fait, il a été proposé que le changement structural du bec des particules pré-40S, induit par le relargage de Ltv1 en Enp1, entraîne l'adoption par Rio2 d'une conformation « active » provoquant l'hydrolyse de l'ATP et son relargage (Ferreira-Cerca et al., 2012 ; Scaiola et al., 2018). Il a également été proposé que Tsr1 pourrait empêcher l'association des particules pré-40S avec les sous-unités 60S (Strunk et al.,

2011 ; McCaughan et al., 2016 ; Johnson et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). En maintenant l'hélice 44 dans une position immature, Tsr1 et Rio2 jouent un rôle essentiel dans le maintien des nucléotides de décodage dans une conformation non active. Ainsi, dans les particules pré-40S, les adénosines A1755 et A1756 composant les nucléotides de décodage, sont distants de 16 Å par rapport à leurs positions matures. Le retour de ces résidus à leurs positions matures est nécessaire pour l'intégration des hélices de l'ARNm/ARNt durant la traduction.

Dans le modèle proposé par Johnson et al., en 2017, Dim1 est positionné sur le corps à l'interface des particules pré-40S. Dim1 pourrait ainsi empêcher l'association avec la sous-unité 60S. Dans ce travail, les auteurs proposent un modèle dans lequel le relargage de Dim1 dans les particules pseudo-80S induirait, par un changement de conformation de l'hélice h45 (contenant les deux adénosines diméthylées par Dim1), le rapprochement de l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S et du domaine PIN de Nob1 (Johnson et al., 2017). Cependant Dim1 est absent des particules pré-40S purifiées en utilisant comme appât Rio2 et Nob1 (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). Cela suggère soit un départ très précoce de Dim1 des particules pré-40S cytoplasmiques, soit une association faible et dynamique de cette protéine avec ces précurseurs.

La localisation de Ltv1 et Enp1 sur le bec des particules pré-40S semble empêcher l'intégration stable du domaine N-terminal de la protéine ribosomique RPS3, ce qui suggère un rôle de ces CFM dans la mise en place stable de cette protéine ribosomique (Strunk et al., 2011 ; Mitterer et al., 2016 ; Johnson et al., 2017). De fait, le départ de Ltv1 et Enp1, dépendant de l'activité kinase de Hrr25, a été rapporté comme nécessaire pour la mise en place de la protéine Rps3 (Shafer et al., 2006 ; Ghalei et al., 2015). De plus, ces CFM partagent le même site d'interaction que la protéine Rps10. Cela suggère que leur départ est nécessaire pour l'intégration stable de Rps10.

Le CFM Dim2, partenaire de Nob1, est localisé au niveau de la plateforme des particules pré-40S. Son site d'interaction avec l'ARNr a été localisé par CRAC à proximité immédiate du site D, substrat de l'endonucléase Nob1 (Granneman et al., 2010 ; Turowski et al., 2014). Le domaine C-terminal de Dim2 interagit avec les nucléotides 1795 à 1799 de l'ARNr, par le biais d'un domaine KH (K Homology) composé d'une séquence GXXG hautement conservée. Ces nucléotides sont positionnés juste en amont du site de clivage (A1800) catalysé par le domaine PIN de Nob1. Cela suggère qu'un changement conformationnel de Dim2 est nécessaire pour libérer le site D du pré-ARNr 20S et permettre ainsi son clivage par l'endonucléase Nob1 (Turowski et al., 2014). Par ailleurs, Dim2 interagit avec l'hélice h28 et la boucle liant l'hélice h44 et h45 de l'ARNr 18S via ses domaines C-terminal et KH respectivement. Ces interactions

semblent maintenir la tête et le site de décodage écartés de leur position mature (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018).

La kinase Rio1 est absente dans les cartes de densités électroniques récemment publiées. Dans la littérature, il est proposé que ce CFM intervient dans les dernières étapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité 40S. En effet l'activité kinase de Rio1 est requise pour le relargage de Dim2 et l'activation du clivage par Nob1 (Turowski et al., 2014). La déplétion de Rio1 entraîne l'inhibition du départ de Nob1, Tsr1, Dim2 et Fap7 des particules pseudo-80S. Par ailleurs, l'absence de Rio1 induit, de manière inefficace, l'engagement en traduction des particules pré-40S contenant le pré-ARNr 20S et Nob1 (Belhabich-Baumas et al., 2017). Ce résultat indique que la présence du pré-ARNr 20S et de Nob1 n'est pas limitante pour l'entrée des particules 40S immatures en traduction.

#### D.4 Positionnement et rôle des CFM cytoplasmiques impliqués dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S, chez l'Homme :

En 2016, Larburu et ses collaborateurs ont déterminé la première structure des particules pré-40S cytoplasmiques précoces à 19 Å de résolution, en utilisant LTV1 comme appât de purification. La structure des particules pré-40S cytoplasmiques précoces chez l'Homme et la levure est globalement similaire. Les auteurs ont identifié la présence de 5 densités supplémentaires dans ces particules pré-40S par rapport à la sous-unité 40S, qu'ils ont attribué aux CFM NOB1, TSR1, ENP1, LTV1 et RIO2. Ils ont également constaté la présence de la protéine RACK1 (homologue de Asc1 chez la levure) sur la tête des particules pré-40S cytoplasmique. RACK1 est décrite comme une protéine "scaffold" impliquée dans plusieurs voies de signalisation et processus cellulaires (Adams et al., 2011 ; Gandin et al., 2013). Cette protéine est associée sur la sous-unité 40S et peut être considérée comme une protéine ribosomique. Des données de spectrométrie de masse révèlent la présence de cette protéine sur les particules pré-40S nucléaires et cytoplasmiques chez l'Homme (Wyler et al., 2011 ; Widmann et al., 2012). Or cette protéine est absente dans les étapes cytoplasmiques précoces et intermédiaires chez la levure, marquant une différence majeure dans le rôle de RACK1 entre ces deux espèces. La perte d'expression de RACK1 induite par des siARN induit un retard de maturation du pré-ARNr 18S-E, suggérant qu'elle est requise pour une maturation efficace de l'ARNr 18S. Par ailleurs, la perte d'expression de RACK1 entraîne une baisse de la quantité des sous-unités 40S et 60S libres, une augmentation significative du nombre de monosomes

80S et une diminution de la fraction des polysomes, ce qui suggère un rôle de RACK1 dans la régulation de la traduction (Larburu et al., 2016).

Très récemment, plusieurs structures de particules pré-40S humaines à différentes étapes de maturations, purifiées en utilisant DIM2 comme appât, ont été publiées (Ameismeier et al., 2018). Parmi ces structures, nommées étapes de A à R, deux de ces dernières (C et R) ont été raffinées à une résolution inférieure à 4 Å de résolution (Figure 18). L'état C, similaire aux modèles de pré-40S cytoplasmiques publiés chez la levure, a été utilisé pour la construction d'un modèle atomique entier avec la localisation des CFM TSR1, NOB1, PNO1, ENP1, RIO2 et une partie de LTV1 (Figure 19). Ces données proposent une localisation similaire des CFM sur les particules pré-40S cytoplasmiques chez l'Homme et la levure (cf. Figure 14 B). De plus, ces structures illustrent, comme chez la levure, le maintien du pré-ARNr par des CFM, dans une conformation immature, comparée à sa position mature.

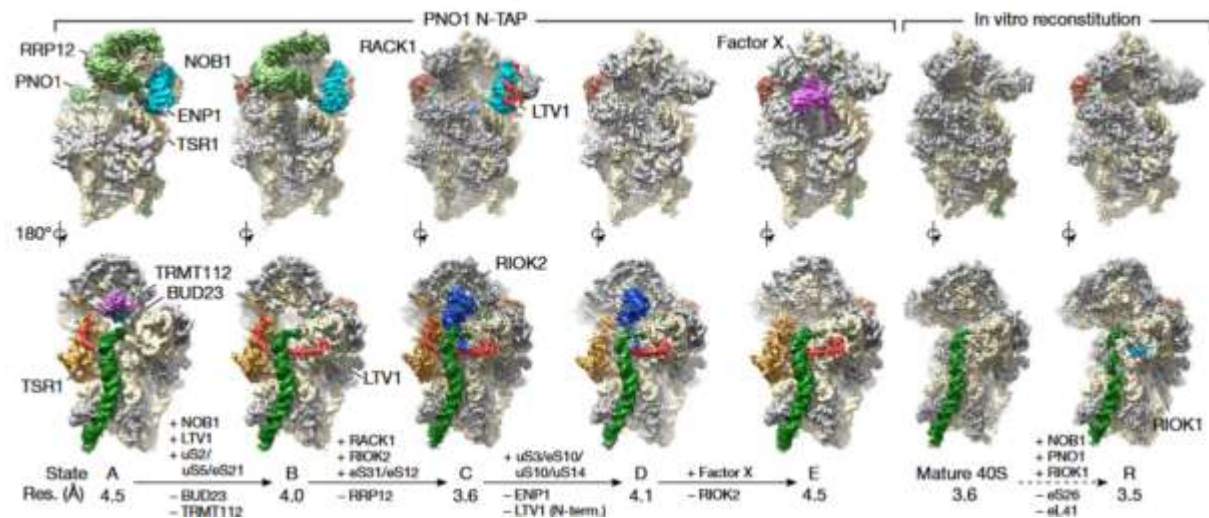


Figure 18. Les structures des particules pré-40S humaines à différentes étapes de maturation, purifiées en utilisant le CFM DIM2 comme appât. Les protéines ribosomiques sont représentées en gris, l'ARNr et jaune clair, l'hélice 44 en vert et vue de l'interface, les CFM sont positionnés en couleur. Les états A à E correspondent à des particules pré-40S natives, l'état R est une étape à laquelle les particules sont reconstituées in vitro (Adaptation de Ameismeier et al., 2018).

Ainsi la position correcte et mature de l'ARNr 18S nécessite un relargage séquentiel des CFM. De plus, RRP12 semble maintenir les hélices 35, 37, 38, 39, et 40 de l'ARNr 18S dans une conformation immature. Le relargage de RRP12 induit une rotation de l'hélice 39 d'environ

140 °, ce qui rapproche l'hélice 40 de sa position mature. Ce réarrangement structural permet l'association de RACK1 sur la tête des particules pré-40S (Ameismeier et al., 2018).

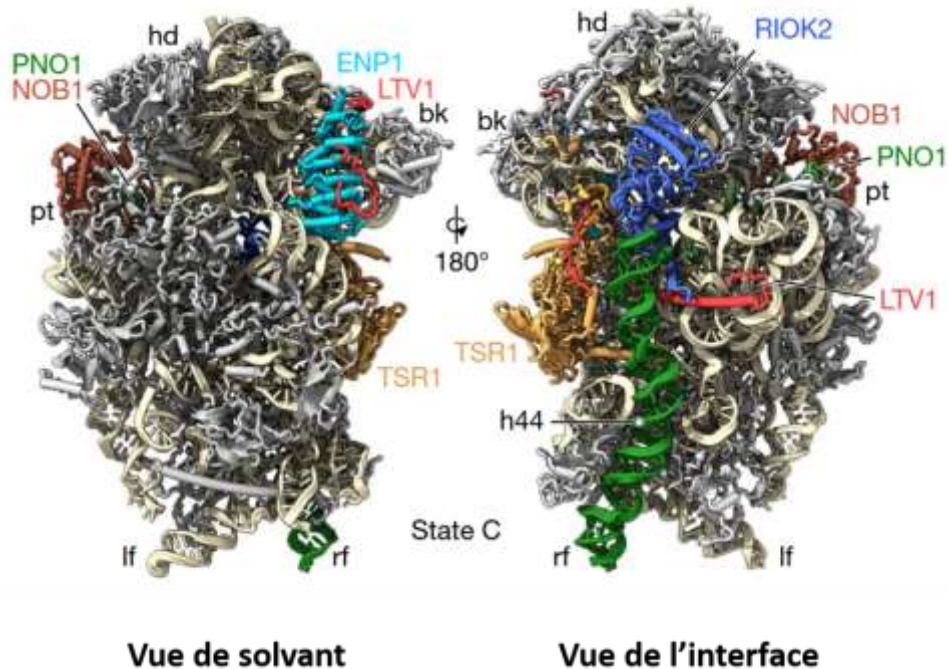


Figure 19. Positionnement des CFM sur une particule pré-40S cytoplasmique précoce. ENP1 (bleu) et LTV1 (rouge) sont localisés sur le bec des particules pré-40S. Le domaine C-terminal de LTV1 passe sous l'hélice 44 (en vert) sur la vue de l'interface. RIO2 (en bleu) est placé entre la tête et le corps dans le sillon de l'ARNm, TSR1 (en jaune) est positionné sur la tête des particules pré-40S sur une vue de l'interface. Les CFM NOB1 et DIM2 (en marron et vert respectivement) sont au niveau de la plateforme des particules pré-40S (Adaptation de Ameismeier et al., 2018).

De plus la libération des CFM LTV1 et ENP1 permet l'association stable des protéines ribosomiques RPS3, RPS10, RPS20 ainsi que RPS29. Ce réarrangement du bec des particules pré-40S humaines est similaire aux événements induits chez la levure, et entraîne le mouvement de l'hélice 34 proche de sa position mature. Par ailleurs, ces modèles montrent que le centre de décodage est dans une position immature du fait de la présence de TSR1, LTV1 et RIO2, qui décale l'hélice h44. En effet, les domaines N-terminal de TSR1 et C-terminal de RIO2 et LTV1 se situent sous l'hélice h44. Cela empêche le repliement correct du lien entre les hélices h44, h28 et h45 et prévient ainsi la formation des sites fonctionnels A et P (Ameismeier et al., 2018). Par ailleurs le domaine C-terminal de LTV1 partage la même position que Dim1 chez la levure. La diméthylation de l'ARNr par DIM1 est nucléaire chez l'Homme et cytoplasmique chez la

levure, suggérant que DIM1 n'est pas impliqué dans les étapes de maturation cytoplasmique chez l'Homme (Zorbas et al., 2015).

RIO1 semble également jouer un rôle important dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S chez l'Homme. Une partie de ce CFM correspondant à un segment du domaine C-terminal de RIO1 a été positionné, sur des particules reconstituées *in vitro*, à partir de sous-unités 40S purifiées et de CFM recombinants. Ce domaine semble se positionner sur la même région que celle précédemment occupé par le domaine C-terminal de LTV1 et RIO2. Cela est en accord avec les données fonctionnelles chez la levure indiquant l'importance de ce domaine pour la liaison de RIO1 aux particules pré-40S (Ferreira-Cerca et al., 2014). De plus, le clash de RIO1 avec RIO2 et LTV1 explique pourquoi la seule présence de RIO1, et non son activité ATPase, est suffisante pour le relargage de ces deux CFM (Widmann et al., 2012).

De manière similaire que chez la levure, DIM2 interagit avec l'hélice h28 et la région reliant l'hélice h44 et h45 de l'ARNr, en les maintenant dans une position immature. De plus, comme indiqué chez la levure, DIM2 interagit directement avec NOB1 au niveau de la plateforme des particules pré-40S. Cette interaction s'effectue entre le segment formé des résidus Phe128 à Trp208 du domaine KH de DIM2, et le domaine C-terminal de NOB1. Cette interaction empêche le clivage de l'extrémité 3' (site 3, A1869) de l'ARNr 18S en maintenant le domaine catalytique de NOB1 à environ 30 Å de distance de son substrat. Le relargage de DIM2, accompagné d'un changement de conformation au niveau de la plateforme permettraient ainsi de libérer l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et son clivage par NOB1 (Turowski et al., 2014 ; Amesmeier et al., 2018).

## E. Contexte, problématique et objectifs de la thèse :

Comme on l'a vu dans cette introduction, la biogénèse des ribosomes est un processus primordial pour toutes les cellules en croissance, et extrêmement complexe. L'étude de l'assemblage des ribosomes eucaryotes a fortement progressé ces dernières années, notamment grâce aux avancées considérables en cryo-EM et en analyse d'image. Cette approche a en effet permis l'obtention de structures atomiques de divers précurseurs cytoplasmiques, de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ces données ont révélé des similarités mais également des différences entre l'Homme et la levure. Parmi les divergences, on peut noter des étapes et des mécanismes supplémentaires dans la maturation de l'ARNr 18S chez l'Homme. De plus, l'interventions de certains CFM, homologues entre les deux espèces, peut s'effectuer à des étapes de maturations distinctes. La levure étant un organisme génétiquement facile à manipuler, de nombreuses études fonctionnelles et structurales ont permis d'établir un premier modèle décrivant les grandes étapes de la maturation cytoplasmique de la particule pré-40S (Strunk et al., 2011 ; Johnson et al., 2017 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018, Pour revue Cerezo et al., 2018).

Ces modèles ont également contribué à la compréhension des étapes de maturations cytoplasmiques chez l'Homme. Très récemment, l'équipe de Roland Beckmann a déterminé la structure de particules pré-40S cytoplasmiques humaines à différentes étapes de maturations. Les auteurs de cette étude proposent, comme chez la levure, un premier modèle décrivant les étapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique. Cependant ce modèle reste à valider, et est très schématique. Une meilleure compréhension de la biogénèse des ribosomes humains est devenue plus urgente avec la découverte d'un nombre croissant de maladies génétiques liées à des défauts de production de ribosomes. Les gènes mutés codent soit pour les protéines ribosomiques, comme c'est le cas par exemple pour Rps19 et Rps24 dans l'anémie de Blackfan-Diamond, soit pour le CFM *SBDS* muté dans le cas du Syndrome de Shwachman-Diamond.

L'ensemble des travaux existants, que ce soient des études fonctionnelles, biochimiques ou structurales, a permis de localiser et de proposer des rôles pour certains CFM impliqués dans l'assemblage cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique 40S eucaryote. Cependant la fonctions précise, le mode d'action et la chronologie de dissociation de ces CFM, notamment dans les étapes de maturations tardives, restent à élucider.

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans cette perspective. Pour ce faire j'ai entrepris une étude structurale des particules pré-40S cytoplasmiques chez l'Homme et la levure. J'ai effectué



une analyse structurale de trois particules pré-40S cytoplasmiques distinctes, par cryo-EM et l'analyse d'images (par la méthode dite d'analyse de particules isolées, ou SPA pour Single Particle Analysis). J'ai tout d'abord déterminé la structure 3D de particules pré-40S cytoplasmiques de levure, purifiées en utilisant comme appât le CFM Tsr1 (particules « Tsr1-FPZ »). Ensuite, en collaboration avec l'équipe du Dr. Brigitte Pertschy (Graz, Autriche), j'ai effectué une analyse structurale de particules pré-40S de levures purifiées également via Tsr1, et portant une mutation sur la protéine Rps20. Ceci avait pour but de mieux caractériser le rôle de la protéine Rps20 dans les dernières étapes de maturation de la petite sous-unité ribosomique. Enfin, pour mieux caractériser les toutes dernières étapes de maturation cytoplasmique de particules pré-40S humaines, j'ai entrepris une étude structurale de ces complexes, purifiés en utilisant une version étiquetée et catalytiquement inactive du CFM RIO1 (Particules « RIO1(kd)-StHA). Cette mutation permet en effet d'accumuler des particules pré-40S dont la maturation est bloquée juste avant le clivage du pré-ARNr 18S-E par NOB1. Ce projet a été initié en collaboration avec l'équipe du Pr. Ulrike Kutay (ETH Zurich).

L'ensemble de ces travaux m'a permis de proposer des nouvelles étapes dans la maturation cytoplasmique des particules pré-40S chez l'Homme et la levure.

# Matériel et méthodes



## Matériels et Méthodes

### A. Purification des particules pré-ribosomiques pré-40S :

#### A.1- Purification des particules pré-40S de levure Tsr1-FPZ :

Pour cette étude, les particules sont purifiées par Dana Rinaldi, assistante ingénieur dans notre équipe, en utilisant le facteur de maturation Tsr1 comme appât (Tsr1-FPZ) {(Léger-Silvestre et al., 2004)}. Dans ce protocole, 10-12L de culture de levures ont été récoltées en fin de phase de croissance (à une DO600 d'environ 1) et les culots sont lavés puis congelés dans de l'azote liquide sous forme de « spaghettis ». Les cellules sont par la suite broyées à l'aide d'un broyeur planétaire Retsch PM100 en maintenant le bol à la température de l'azote liquide entre chaque cycle de broyage. Au total, environ 10 cycles de broyage de 3' sont réalisés. Le broyat est re-suspendu dans le tampon TP1 (50mM Tris HCl pH 8,1 ; 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, Igépal 0.1% ; inhibiteurs de protéase Roche). La suspension est centrifugée sans accélération avec le JA-20 15 min à 10000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et le pH est ajusté à 8 avec du Tris 1 M non tamponné. Les lysats ont ensuite été incubés sur une colonne (Econo-Pac® chromatography columns Bio-Rad), en présence de billes couplées à des anticorps monoclonaux anti-ZZ (Puig et al., 2001) sous agitation pendant 1h à 4°C. Les complexes non fixés sont éliminés par plusieurs lavages dans un tampon TP2 (20mM HEPES pH 7,6 ; 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KOAc, 1mM DTT, Tween 0.02 %, Triton 0.1 %). Les complexes fixés aux billes sont élués par incubation de 40U de PréScission Protéase (GE Healthcare) dans du TP2 contenant également de la RNasine (200U) à 4°C pendant 2h. Les complexes élués sont récupérés et incubés avec des billes anti-Flag (M2 affinity Gel Sigma) sur une colonne (Poly-Prep Chromatography columns Bio-Rad 10 ml). Les molécules non fixées sur les billes sont éliminées par des lavages dans du tampon TP3 (10mM Tris HCl pH 7,4 ; 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>). L'éluat final est effectuée par ajout de 400µL de peptide Flag à la colonne (0,4 mg/mL final). Cette solution est passée 4 fois sur la colonne afin d'élué le maximum de particules d'intérêt dans un volume restreint.

Enfin, l'éluat est déposé sur un gradient de saccharose 10-30% et ultracentrifugé pendant 3h à 29000 rpm. Les fractions de gradient sont ensuite collectées grâce à un collecteur de gradients (Foxy R1 UA-6 TELEDYNE ISCO). Les fractions d'intérêt sont poolées, débarrassées de leur saccharose par des lavages successifs avec du TP3 et simultanément concentrées sur une colonne Vivacon (MWCO 500kDa, Sartorius).

## A.2- Particules pré-40S de levure : Tsr1-TAP rps20 $\Delta$ loop

Les particules pré-40S ont été purifiées en utilisant le cofacteur de maturation Tsr1 en tant que protéine d'appât. Les cellules ont été cultivées dans 2 L de milieu YPD à 30 ° C et ont été récoltées à une DO600 d'environ 1,8. Les souches TSR1-TAP exprimant des variants mutants de Ltv1 à partir de plasmides LEU2 ont été cultivées dans un milieu SDC de 4 L dépourvu de leucine et récoltées à une DO600nm d'environ 0,9. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans du tampon de lyse contenant du TRIS 50 mM à pH 7,5, du NaCl 100 mM, du MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, du NP75 à 0,075%, du DTT 1 mM, un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Serva). Les cellules ont été cassées en présence de billes de verre par agitation dans un broyeur à billes (homogénéisateur B. Braun 853022) refroidi au CO<sub>2</sub>. Les lysats ont été éliminés par centrifugation à 4 °C pendant 10 et 30 min à 5 000 et 14 000 tr/min, respectivement. Les lysats ont été incubés avec des billes d'IgG (GE Healthcare) sur une roue en rotation à 4 ° C pendant 75 min. Les billes ont été lavées avec 5 ml de tampon de lyse sans inhibiteurs de protéase, puis transférées dans des colonnes Mobicol (Mobictec) et lavées avec 10 ml de tampon de lyse. Après remise en suspension dans du tampon de lyse, les particules pré-40S ont été éluées par incubation avec la protéase du virus de la gravure du tabac (TEV) à température ambiante sur une roue en rotation pendant 90 min. Les éluats ont été analysés par SDS-PAGE sur des gels de Polyacrylamide (Invitrogen) à 4-12% et avec une coloration de Coomassie ou un Western blot avec les anticorps indiqués.

## A.3- Purification des particules pré-40S humaine RIO1(kd)-TAP :

Les particules pré-40S ont été purifiées dans notre équipe par Dana Rinaldi, d'après le protocole établi dans l'équipe du Pr Ulrike Kutay (Wyler et al., 2011). Dans ce protocole, on utilise des lignées cellulaires humaines (Flp-In T-Rex HEK293, Thermofisher Scientific) dans lesquelles un CFM portant une étiquette de purification est exprimé de manière conditionnelle, en présence de tétracycline. Dans notre cas, il s'agit d'une forme catalytiquement inactive de RIO1, portant une étiquette StHA en C-terminal (RIO1(kd)-StHA). Le tag St-HA est composé de l'épitope de l'hémagglutinine ainsi que du peptide de fixation à la streptavidine. Lorsque les cellules arrivent à confluence, l'expression de RIO1(kd)-StHA est induite par l'ajout de 0,5mg/mL de tétracycline dans le milieu de culture pendant 24h. Après récolte des culots cellulaires, ceux-ci sont remis en suspension dans un tampon TP1 (10mM Tris HCl pH 7,6 ;

100mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1Mm DTT ; NP40 0,5 %; inhibiteurs de protéase Roche ; 0,5mM NaF ; 0,1mM NaVO<sub>4</sub>) ; puis les cellules sont lysées à l'aide d'un Dounce. Les débris cellulaires sont éliminés par 12 min de centrifugation à 4500 g et à 4°C. Les lysats ont été incubés avec sur de la résine agarose couplée à des anticorps monoclonaux anti-HA (Pierce anti-HA agarose, Thermofisher Scientific) sous agitation à 4°C pendant 2h. Les molécules non fixées sur les billes sont éliminées par des lavages dans du tampon TP2 (20mM Tris HCl pH 7,6 ; 100mM Kcl ; 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1Mm de DTT). Les particules d'intérêt sont éluées par l'ajout de tampon d'éluion sur la colonne (TP2+ 0,2mg/mL peptide HA).

## B. Microscopie électronique en transmission :

### B.1. Grilles de microscopie électronique en transmission :

L'observation en microscopie électronique, nécessite un support adéquat, sur lequel les particules pré-ribosomiques seront réparties de manière homogène. Pour la coloration négative, les grilles sont composées de cuivre, recouvert d'un film de carbone fin, continu et uniforme (QUANTIFOIL® Cu 300 mesh). En ce qui concerne la Cryo-MET, ces grilles métalliques comportent un film de carbone à trous de 2 µm de diamètre espacés chaqu'un de 1 µm. Ce dernier est recouvert d'une deuxième couche de carbone fin et continu (QUANTIFOIL® holey carbon film, R2/1, +2nmC) (Figure 20).

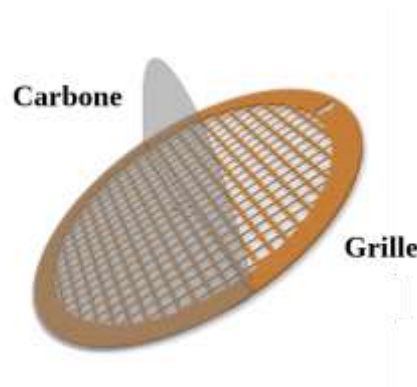


Figure 20. Schéma d'une grille de microscopie électronique en transmission

## B.2. Ionisation des grilles :

Le film de carbone servant de support pour les particules étant hydrophobe, lors du dépôt de l'échantillon sur la grille, la solution aqueuse aura tendance à former une goutte ayant peu d'interaction avec la grille. Par conséquent, les particules isolées ne seraient pas réparties de manière homogène sur la surface de la grille. Afin de rendre le carbone hydrophile, les grilles sont déposées dans une cloche sous vide entre une anode et une cathode. Ainsi, à l'établissement d'une tension, entre l'anode et la cathode, il y aura formation de plasma d'ozone, à partir d'ionisation de gaz à faible pression (oxygène). Ainsi, les charges négatives produites, vont se déposer sur le film de carbone, le rendant hydrophile.

Ce processus est effectué à l'aide d'un ionisateur Pelco EasiGlow. Dans le cadre de notre étude, les grilles sont placées sous un vide de 0.45 mBar, avec un courant d'intensité de 25 mA, appliqué durant 30 secondes.

## B.3. Principes généraux :

La mise au point des microscopes électroniques est le fruit d'un ensemble de travaux scientifiques réalisés à partir de 1926. En effet, durant cette période, les travaux de Denis Gabor sur les lentilles magnétiques, puis ceux de Ernst Ruska, de Max Knoll et H. Bush sur les bobines et l'optique électronique, ont contribué à la mise au point d'un premier prototype de microscope électronique en 1931.

Le microscope électronique en transmission (MET ou TEM en anglais) utilise un faisceau d'électron avec une tension d'accélération (d'environ 200KV à 300KV), émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. Seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image (Figure 21).

Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, qui doit à la fois conserver leur structure, et permettre de ne pas absorber tous les électrons incidents. Ainsi des coupes très fines de l'échantillon peuvent être réalisées à l'aide de l'ultramicrotome (de 80 à 100 nm). Des colorations aux métaux lourds sont également possibles pour augmenter les contrastes des structures particulières des échantillons, préalablement placées sur des grilles.

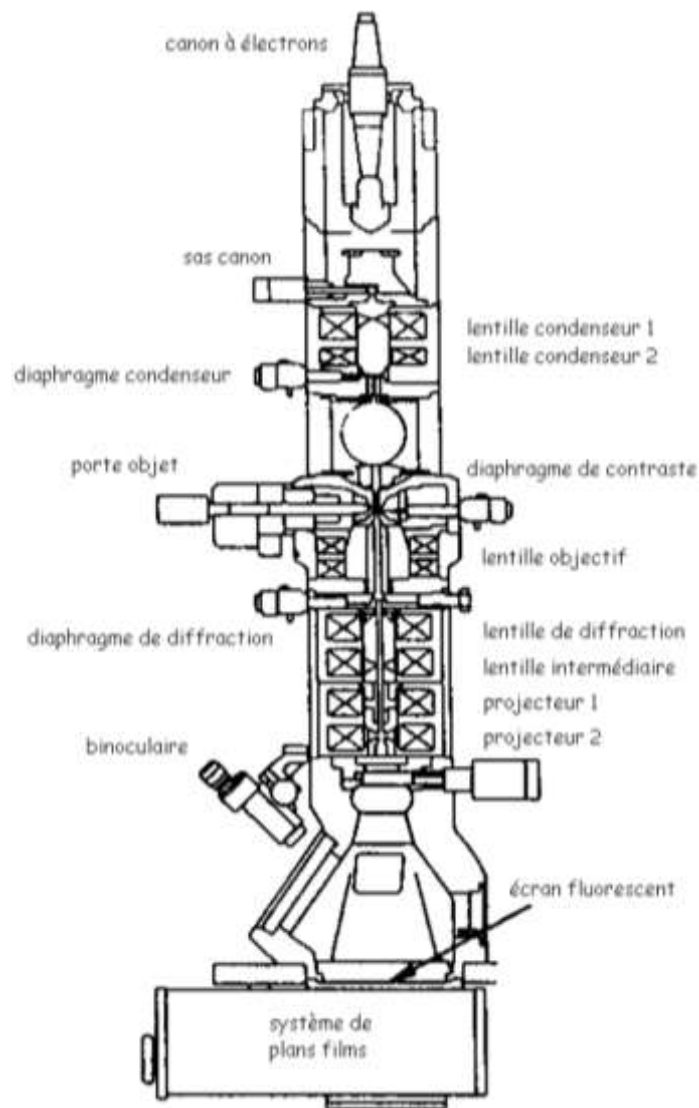


Figure 21. Schéma du microscope électronique en transmission (Adaptation de <https://www.stem.lps.u-psud.fr>).

### B.3.1- Source d'électrons :

Les électrons sont produits par un canon à électrons. Le principe consiste à extraire puis accélérer des électrons à partir d'un matériau. Il en existe de deux sortes :



### B.3.1.1- Canons à émission thermoïoniques :

Dans ce cas, la tension de chauffage provoque un flux de courant à travers le filament. Ce courant chauffe le filament (entre 1500 à 2500°C) et l'émission thermoïonique (émission thermique d'électrons) permet la sortie des électrons du métal. Un nuage d'électrons se met alors en place autour de la cathode chaude.

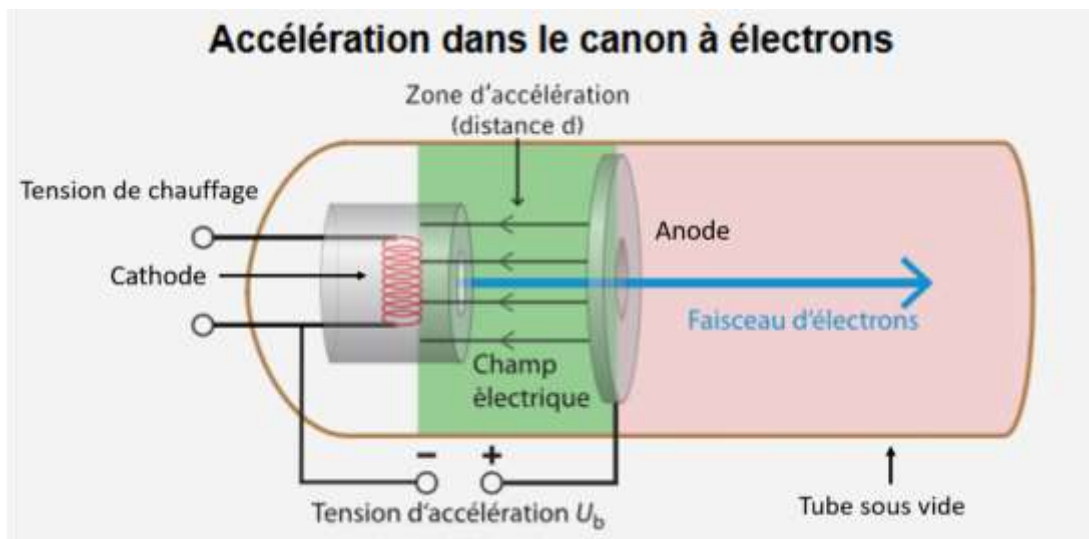


Figure 22. Schéma général de fonctionnement de canon à émission thermoïonique

La tension d'accélération crée un champ électrique entre la cathode et l'anode. Ce champ accélère les électrons libres de la cathode vers l'anode. Après avoir passé l'anode, les électrons se déplacent vers l'avant en ligne droite à vitesse constante. Tout ceci a lieu dans un canon à électron (schematisé par un tube en verre sur la figure 22) sous vide, de telle sorte que les électrons ne se heurtent pas aux molécules d'air (Figure 22). Des filaments Tungstène et des cristaux l'hexaborure de lanthane (pointe  $LaB_6$ ) sont régulièrement utilisés comme cathode, en raison d'un besoin en énergie faible, afin en extraire les électrons. Le monocristal de  $LaB_6$  est chauffé à une température moins élevée que celle des filaments de tungstène (1500°C pour la pointe  $LaB_6$  contre 2500°C pour les filaments de Tungstène). De ce fait, cette cathode nécessite un vide plus poussé et dispose d'un faisceau plus cohérent.

### B.3.1.2- Canons à émission de champs (source FEG) :

Si un fort champ électrique est appliqué entre la cathode et l'anode, un flux d'électron est alors créé par effet de champ. Le canon à émission de champ est formé par une cathode métallique, constituée d'une pointe extrêmement acérée à laquelle un champ électrique de l'ordre de 2 à 7kV est appliqué (Figure 23). Les électrons sont émis par effet tunnel. Le faisceau obtenu est très brillant et très cohérent. Cependant, ce système nécessite de maintenir la cathode dans un vide très poussée pour un régime d'émission stable (Figure 24). Il existe deux types de canons à émission de champ :

- L'émission de champ à froid (Cold-FEG). La pointe reste à température ambiante.
- L'émission de champ assistée thermiquement (Schottky-FEG). La pointe est alors portée à une température typique de 1800 °K.

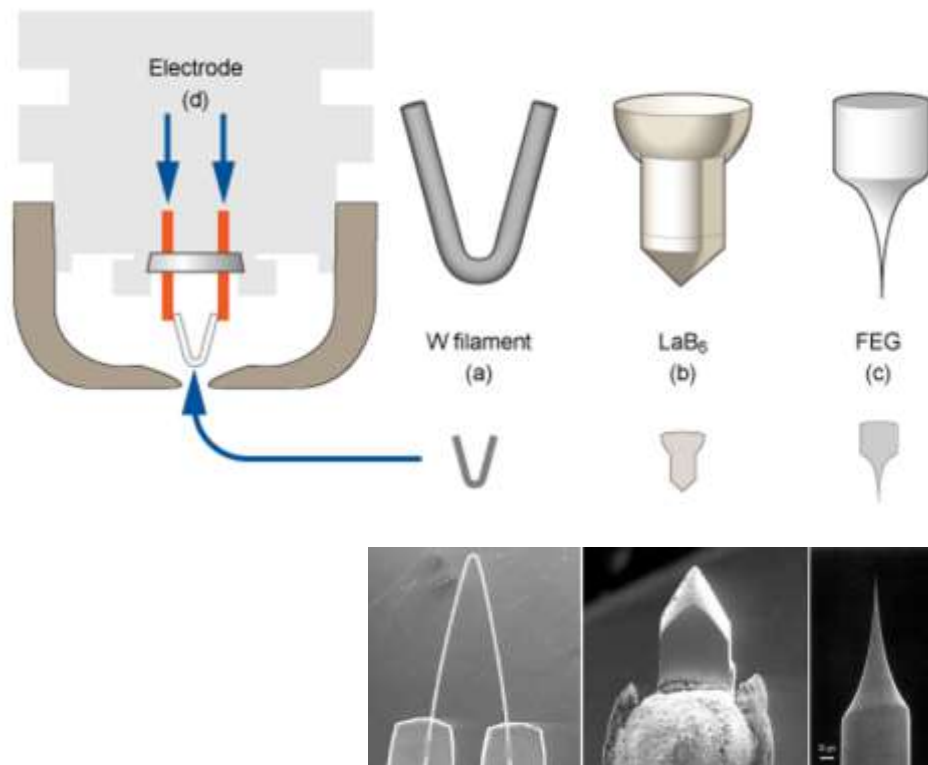


Figure 23. Différentes sources d'émission d'électrons. a) Filament de Tungstène, b) monocristal de LaB<sub>6</sub>, c) pointe en tungstène de FEG.

	Filament en tungstène	Cristal en hexaborure de lanthane	Canons à émission de champ (source FEG)
Énergie d'extraction (eV)	≈ 4.5	2.7	4.5
Densité de courant [A cm <sup>-2</sup> ]	1.3	≈ 25	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
Température de fonct <sup>mt</sup> [K]	2500	1400 - 2000	300
Brillance [A cm <sup>-2</sup> sr <sup>-1</sup> ]	5. 10 <sup>4</sup> – 5. 10 <sup>5</sup>	3. 10 <sup>5</sup>	5. 10 <sup>7</sup> – 2. 10 <sup>9</sup>
Dispersion en énergie [eV]	1 – 2	0.5 – 2	0.2 – 0.4
Pression de fonct <sup>mt</sup> [Pa]	10 <sup>-2</sup> – 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>

Figure 24. Tableau comparatif des différents types de canon à électron

### B.3.2- La colonne :

Les électrons, une fois extraits, se propagent dans la colonne du microscope. Ceci est rendu possible grâce à un système de vide poussé, mis en place par des pompes à vide. Le vide généré est de l'ordre de  $10^{-6}$  mbars pour les émissions thermoïoniques allant jusqu'à  $10^{-10}$  mbars pour les colonnes à émissions à champs. Ce vide limite les interactions entre le faisceau électronique et les molécules résiduelles dans la colonne, qui perturberait le trajet et l'énergie des électrons. Un système dit « condenseur », permet de diriger les électrons vers l'échantillon. Ce système est composé de plusieurs lentilles électromagnétiques, qui permettent de régler et ajuster la taille et la convergence du faisceau (spot). Ces lentilles se situent le long de la colonne du microscope de part et d'autre de la lentille objective (Figure 25). Celles qui se situent au-dessus de l'objet, servent pour l'éclairage de l'objet et celles situées en dessous serviront à l'agrandissement de l'image ou de diagramme de diffraction.

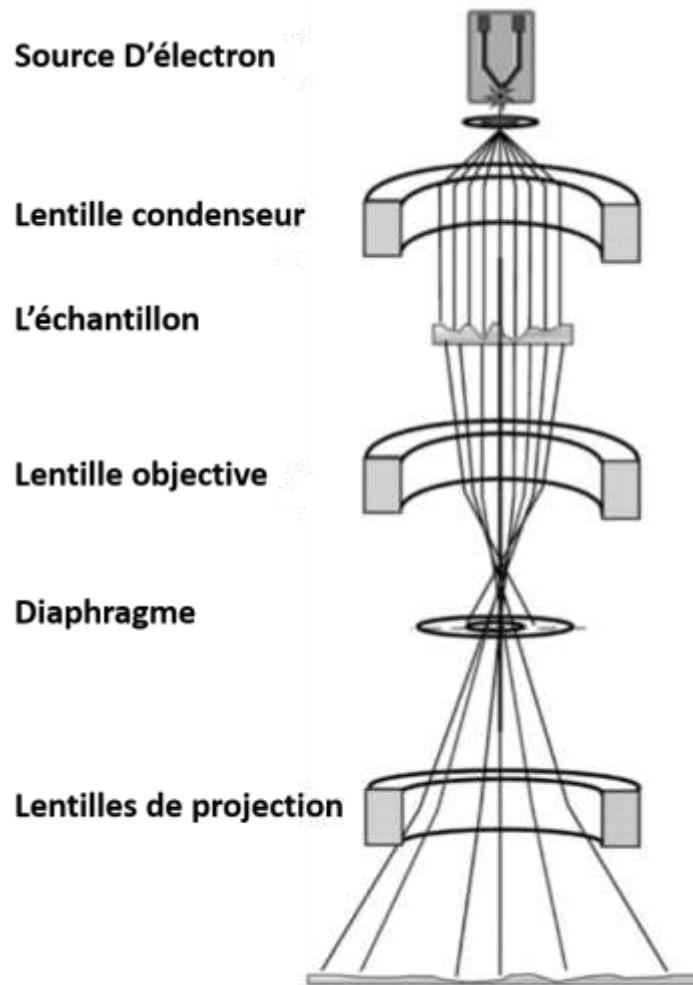


Figure 25. Représentation simplifiée de la colonne en MET (Adaptation de <https://www.stem.lps.u-psud.fr>).

### B.3.3- Les lentilles électromagnétiques:

Les microscopes photoniques, qui possèdent des lentilles optiques afin de focaliser les photons, les microscopes électroniques possèdent des lentilles électromagnétiques. Elles correspondent à des bobines de fils en cuivre dans lesquelles circule un courant électrique, engendrant un champ magnétique. La variation de la valeur de ce champ magnétique par des variations du courant permet de modifier la trajectoire des électrons. Les lentilles électromagnétiques sont parcourues par un courant. C'est la variation du courant qui permettra de faire varier la focale de chaque lentille et donc leur agrandissement. Un fort courant correspondra à une sur focalisation et à une petite focale alors qu'un faible courant correspondra à une sous focalisation et à une grande focale.

#### B.3.4- Détecteurs d'électrons :

L'image finale de l'échantillon, en sortie de colonne peut être visualisée soit, sur un plan phosphorescent (à l'œil nu), soit sur un ordinateur par le biais des détecteurs d'électrons d'une caméra. Initialement le film photographique était le support le plus souvent utilisé, afin d'acquérir les images en MET. L'avantage de ces émulsions photographiques réside dans leurs l'efficacité, en terme de résolution spatiale et leur coût. Cependant le développement, leur traitement, ainsi que la digitalisation, à posteriori des images, a laissé place à des systèmes d'acquisition plus rapide et plus efficace comme des caméras CCD (charge coupled device). Récemment, les avancées technologiques avec l'arrivé des détecteurs directs d'électrons, ont permis une révolution en terme de la résolution des images. Ces progrès ont contribué à la publication de nombreux échantillons biologiques à l'échelle atomique

##### B.3.4.1- Capteurs CCD (charge coupled device) :

Les capteurs CCD permettent une acquisition et digitalisation de l'information en temps réel. Ils convertissent une image de départ issue d'un rayonnement électromagnétique en un signal analogique (ou numérique) à la fin. Le principe de base d'un capteur repose sur l'effet photoélectrique, qui permet à un photon incident d'arracher des électrons à chaque élément sensible (appelé photosite) d'une matrice de petits capteurs élémentaires. Ceux sont donc des systèmes à transfert de charge. En MET Ces caméras sont composées d'une couche de scintillateur afin de convertir les électrons en photons. Par la suite les fibres optiques transmettent les photons au capteur CCD composé de silicium ou chaque photon cède son énergie à un électron appartenant à un atome de silicium. Le nombre d'électrons collectés est proportionnel à la quantité de lumière reçue. Les électrons sont collectés, puis les charges sont transformées en tension proportionnelle au nombre d'électrons. Ce signal sera, à l'extérieur du CCD, amplifié et numérisé (Figure 26 a).

##### B.3.4.2- Détecteurs directs d'électrons (CMOS, Complementary Meta Oxide Semiconductor):

Un grand effort a été accompli au cours des dernières années pour équiper les microscopes, de détecteur d'électron à la fois performant, en terme de rapport signal sur bruit, et rapide pour l'acquisition des images. Ces détecteurs sont composés de capteur monolithique à pixel actifs (MAPS en anglais).

Contrairement aux capteurs CCD qui captent les électrons de manière indirecte, les capteurs CMOS peuvent détecter les électrons sans les convertir en photon. Le principe consiste à détecter directement l'énergie des électrons, accélérés à travers une fine membrane semi-conductrice, par l'électronique directement fabriqué sur la membrane des capteurs (CMOS). Ces électrons sont convertis directement en signal électrique (Figure 26 b). Ce mécanisme a pour avantage un meilleur rapport signal sur bruit couplé à une grande vitesse d'acquisition.

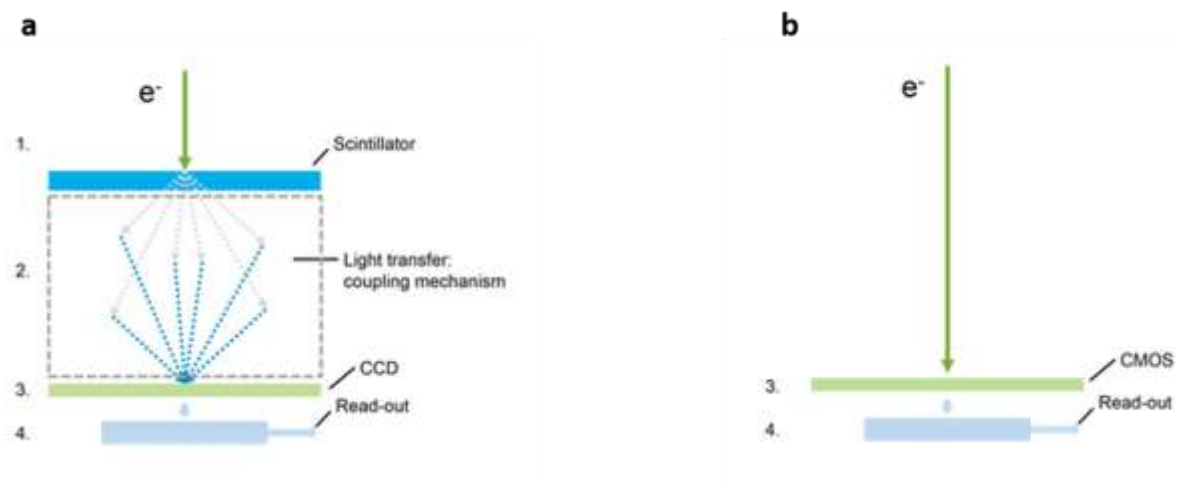


Figure 26. *Schéma comparatif des capteurs d'électrons. a)* Composants d'une caméra CCD, *b)* Composants d'une caméra à détection directe d'électron. (D'après GATAN).

### B.3.4.3- L'efficacité des capteurs d'électrons :

L'efficacité des détecteurs d'électrons peut être mesurée par un paramètre appelé : l'efficacité quantique de détection (DQE pour Detective Quantum Efficiency). Elle exprime la mesure combinant les effets du bruit et du contraste en fonction du niveau de détail ou la fréquence spatiale. Autrement dit, elle qualifie la dégradation du rapport signal sur bruit par rapport aux erreurs de détection des électrons. La valeur du DQE est exprimée entre 0 (100 % de bruit) à 1 (pour un détecteur sans bruit). En réalité, l'ensemble des détecteurs expriment un DQE inférieure à 1.

Alors que les capteurs CCD possèdent un DQE d'environ 0.1, l'efficacité des DDD peut atteindre jusqu'à 0.8. Cela s'explique par la mise en place de nouveaux modes d'acquisition de plus en plus performant, permettant l'acquisition des images avec un rapport signal sur bruit (SNR pour Signal to Noise Ratio) élevé.

### B.3.5- L'Interactions des électrons avec l'échantillon et formation d'images :

En microscopie électronique, l'image est due à l'interaction des électrons avec les atomes de l'échantillon observé. Plusieurs cas de figures peuvent se produire concernant le trajet des électrons :

#### B.3.5.1- Pas d'interaction entre les électrons et les atomes composant l'échantillon :

Dans ce cas l'électron ne sera pas dévié de sa trajectoire initiale, et son énergie n'est pas modifiée.

#### B.3.5.2- Interaction élastique :

Lors d'une interaction élastique, l'électron incident interagit avec le noyau des atomes de l'échantillon, Il ne perd pas d'énergie mais sa direction est modifiée. Après un certain nombre de diffusion élastique, un électron peut ressortir de l'échantillon (Figure 27 panel de gauche). On parle ici de rétrodiffusion. Plus un échantillon est composé d'atomes à numéro atomique élevé, plus l'angle de déviation des électrons sera grand, allant parfois jusqu'à la rétrodiffusion des électrons. Ainsi un échantillon biologique, essentiellement composés d'atome légers (C, N, O,) ont un contraste intrinsèquement faible. Toutefois le contraste peut être augmenté grâce notamment à l'utilisation de solution d'atomes lourds (coloration négative).

#### B.3.5.3- Interaction inélastique :

Lors d'une interaction inélastique, l'électron incident interagit avec les électrons du nuage électronique des atomes de l'échantillon biologique. Ayant la même masse, celui-ci lui transfère alors son énergie. Dans ce cas les électrons sont faiblement déviés et perdent de leurs énergies (Figure 27 panel de droite). Les électrons changent alors de niveau énergétique ou sont parfois éjectés transformant l'atome en ion et formant des radicaux libres, à l'origine des dommages de l'échantillon. Si l'électrons acquière une énergie suffisante pour aller dans une orbite plus haute en énergie, lors de son retour à sa position initiale, il émet un photon X.

Si l'électron est peu lié, il peut acquérir une énergie cinétique suffisamment importante pour être éjecté. On l'appelle alors l'électron secondaire. Il a une énergie plus faible que les électrons primaires. Lorsqu'un électron est éjecté, l'atome est sous forme ionisée. Alors, le retour à son état initial s'accompagne de l'émission de photon X.

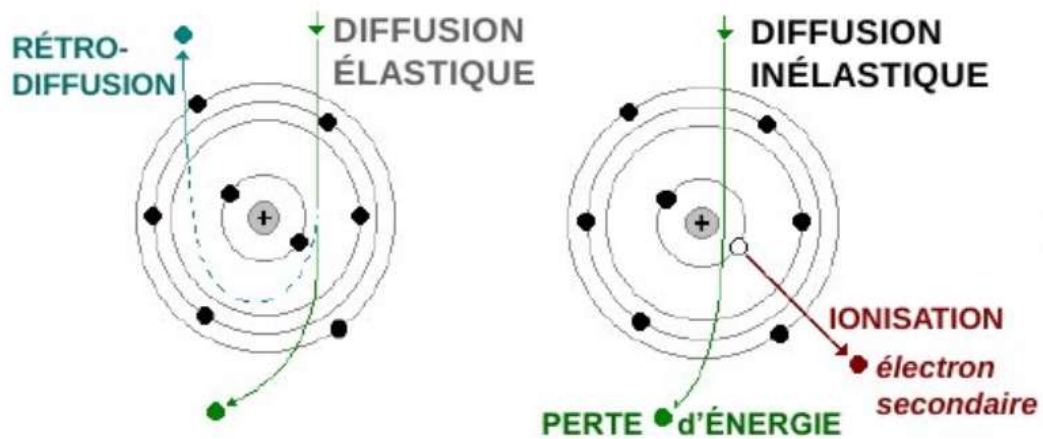


Figure 27. L'Interactions des électrons avec l'échantillon. Pas de transfert d'énergie en diffusion élastique contrairement à la diffusion inélastique

En MET, l'image de l'échantillon est issue de l'ensemble des électrons transmis. Considérant ainsi le faisceau d'électrons des ondes électromagnétiques, on peut décrire le contraste par deux composés essentiels : le contraste d'amplitude et le contraste de phase :

### B.3.5.3- Le contraste d'amplitude :

Le contraste d'amplitude est lié à la perte d'électrons au passage du faisceau dans l'échantillon. Il est aussi causé par l'introduction d'un diaphragme objectif à la sortie de l'échantillon, pour éliminer une partie des électrons diffusés et transmis. Ce contraste est faible, car les électrons sont faiblement déviés par les échantillons biologiques, qui sont principalement composés d'atomes légers (C, N, O, H). Le contraste d'amplitude peut être augmenté par l'utilisation de solutions contrastantes (comme l'acétate d'uranyle, cf. coloration négative ci-dessous) ou encore en diminuant la taille du diaphragme.



#### B.3.5.4- Le contraste de phase :

Ce phénomène résulte d'une interférence entre les électrons diffusés élastiquement et les électrons non diffusés. En effet, après interaction avec l'échantillon, la longueur d'onde des électrons diffusés élastiquement peut changer et ainsi, interférer avec les électrons transmis (non déviés). Cela peut être modulé par la défocalisation des lentilles objectives.

#### B.3.6- La formation d'images :

En MET, la formation d'image est issue de l'ensemble des électrons transmis, par les échantillons biologiques, selon les interactions décrites ci-dessus. La trajectoire des électrons transmis est également modulée par la lentille objective. Après la lentille objective, les électrons convergent au niveau du plan focal de la lentille. Elles forment alors un spectre de diffraction, caractéristique de la géométrie de l'échantillon. Cela peut être représenté mathématiquement, par la transformée de fourier (TF). Par la suite, les électrons forment une image agrandie de l'échantillon sur le plan image. La transformée de fourier inverse ( $TF^{-1}$ ) permet, mathématiquement, le passage du spectre de diffraction à l'image de l'échantillon (Figure 28).

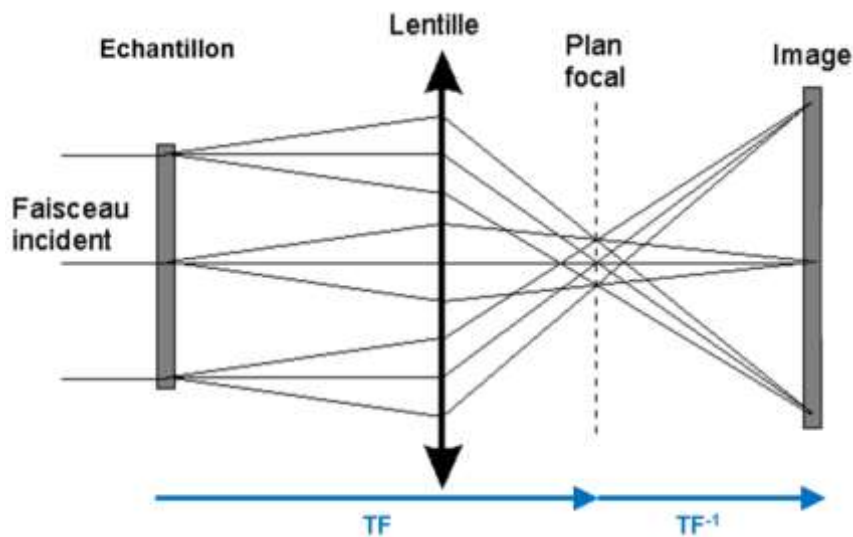


Figure 28. Principe de la formation d'image en MET (d'après <http://www.phys.polymtl.ca/desjardins/tem.htm>)

### B.3.6.1- La résolution théorique

Selon le critère de Rayleigh, On ne peut distinguer deux objets différents dans un appareil que si les taches de diffraction sont distinctes. On peut considérer que c'est le cas si le maximum de l'une correspond au premier minima de l'autre (Figure 29 b). De ce fait la résolution théorique d'un système optique peut être déterminé lorsque la plus petite distance entre deux disques d'Airy pour qu'ils apparaissent partiellement séparés est égale au rayon de disque.

La différence majeure entre les microscopes photoniques et électronique se caractérise par le pouvoir séparateur (résolution) de ces deux méthodes. Autrement dit, la plus petite distance séparant deux points reconnus comme des objets distincts. La résolution est directement liée à la longueur d'onde de la source lumineuse par la relation suivante :

$$R_{th} = \frac{0.61 \times \lambda}{n \times \sin\alpha} \quad (1)$$

Où  $\lambda$  désigne la longueur d'onde,  $n$  l'indice de réfraction du milieu, et  $\alpha$  l'angle d'incidence du faisceau.

La longueur d'onde des électrons étant plus petite que les photons, la résolution en microscopie électronique est plus grande. Elle dépend de la tension d'accélération selon la formule :

$$\lambda = \frac{12.3}{\sqrt{V}} \quad (2)$$

De ce fait, l'augmentation en tension d'accélération résulte d'une diminution de la longueur d'onde. Par exemple, pour une tension d'accélération de 200 KV la longueur d'onde  $\lambda$  est égale à 0.0025 nm. Par conséquent la résolution augmente. Alors que cette résolution est limitée à 200nm pour les microscopes optiques, elle peut atteindre, en théorie, 0.0014 Å pour les microscopes électroniques. Toutefois, d'autres facteurs comme les aberrations des lentilles

magnétiques ou encore le phénomène de la diffraction, limitent la résolution spatiale de ces microscopes et altèrent ainsi la qualité des images obtenues.

### B.3.6.2- Les limites de la résolution :

#### a) La diffraction :

Dans un système optique expérimental, l'image d'un point, n'est pas un point mais un disque brillant entouré d'anneaux alternativement sombres et lumineux appelé disque de diffusion ou encore tâche d'Airy. Ce phénomène est dû à la diffraction de la lumière lors du passage de la source lumineuse à travers une ouverture circulaire (Figure 29).

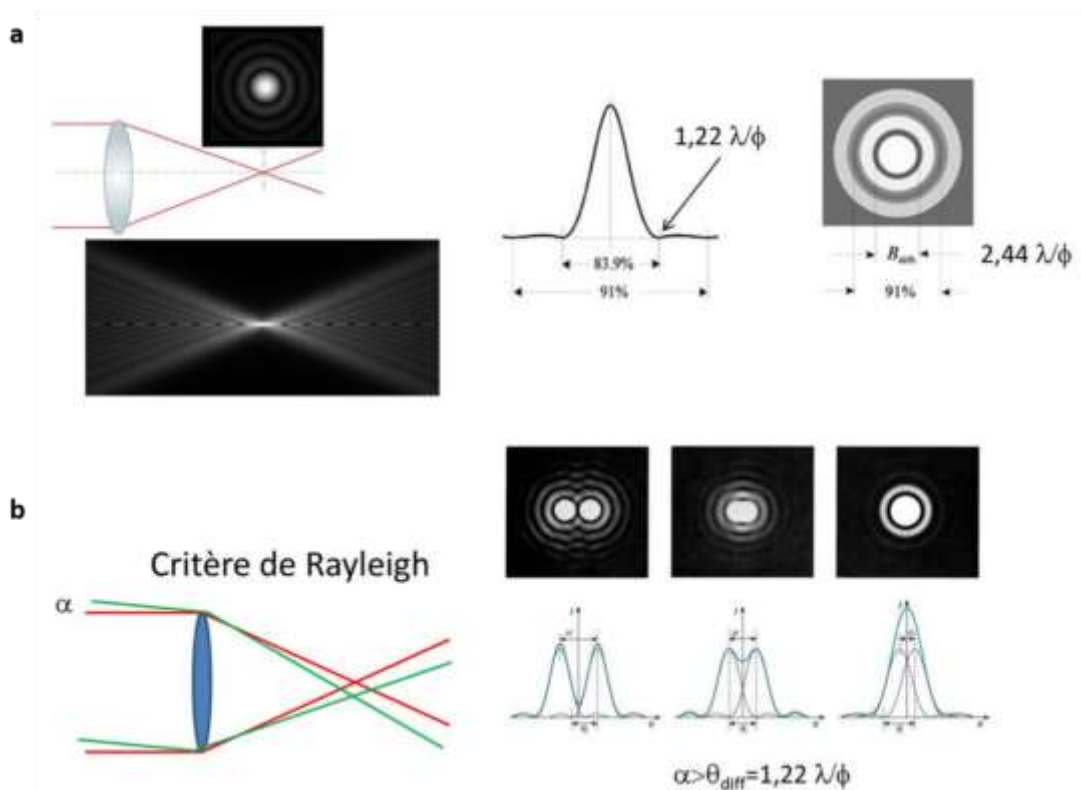


Figure 29. Représentation de la diffraction. a) La tâche d'airy, b) le critère de Reyleigh (Adaptation de Orlova et Saibil, Chemical reviews 2011)

## b) Aberrations des lentilles électromagnétiques :

Ces défauts sont responsables de la limitation de la résolution des microscopes électronique en transmission et altèrent ainsi la qualité des images. Parmi ces aberrations, trois formes majeures se distinguent :

### b.1- Aberration sphérique :

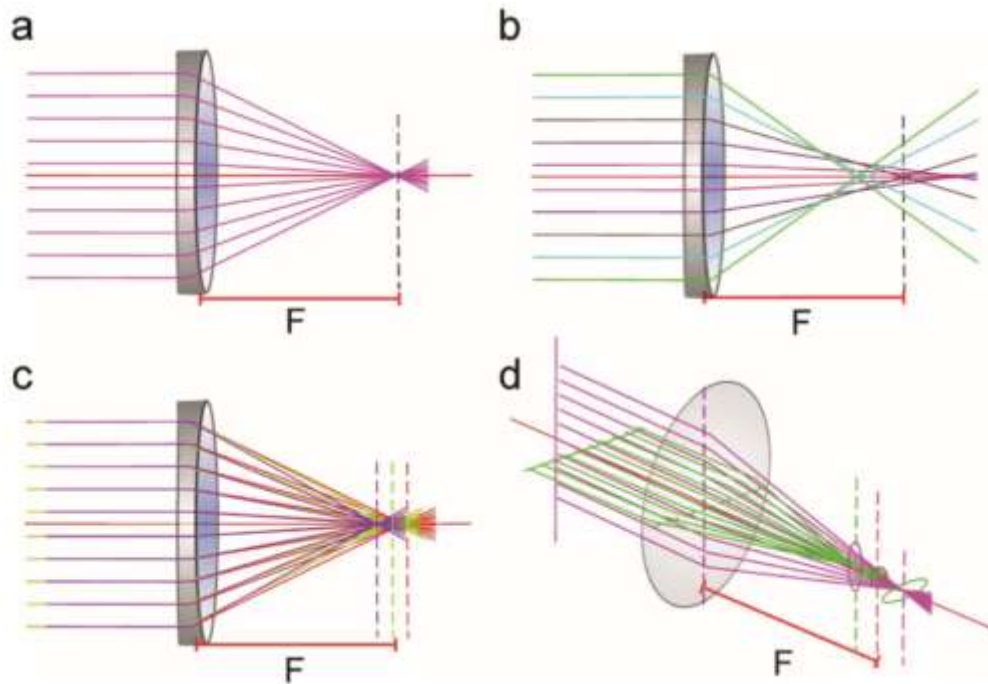
Ce défaut se caractérise par le fait que les électrons provenant du bord et le centre des lentilles, ne convergent pas sur le même plan focal. On observe alors une caustique de focalisation, dans laquelle le point image attendu sera remplacé par un halo flou. La formation de ce halo est nommée le cercle de moindre de confusion. Le rayon de ce disque est proportionnel au constant de l'aberration sphérique  $C_s$  (*Figure 30 b*).

### b.2- Aberration chromatique :

Le faisceau d'électron émis par les canons n'est pas monochromatique. Autrement dit, les électrons ont des longueurs d'ondes et donc des énergies différentes. Selon les sources d'électrons, cette variation est plus ou moins importante. Par exemple les canons à émission de champ (source FEG), ont une dispersion en énergie moins importante. Lors de l'interaction des électrons avec les lentilles électromagnétiques, les électrons de faible énergie seront moins déviés. C'est pourquoi, les électrons ne convergent pas au même point lorsqu'ils ont des énergies distinctes. Alors l'image d'un point sera un cercle de moindre diffusion dont le rayon est en fonction de la constante d'aberration chromatique  $C_c$  (*Figure 30 c*).

### b.3- L'astigmatisme :

Cette imperfection résulte d'une variation de la distance focale le long de l'axe des lentilles. Cette distance dépend de l'indice de réfraction et de l'homogénéité du rayon des lentilles. Lorsque celle-ci varie, alors la distance focale change également. Cela se traduit par la formation d'une image elliptique au lieu d'une image circulaire (*Figure 30 d*).



*Figure 30. Représentation des aberrations des lentilles électromagnétiques.* a) lentille parfaite, b) L'aberration sphérique, c) L'aberration chromatique, d) L'aberration astigmatique. F représente le plan focal de la lentille. (Adaptation d'Orlova et Saibil, Chemical reviews 2011)

### B.3.7- La fonction de transfert de contraste (Contrast Transfert Fonction, CTF) :

La CTF est une modélisation, dans l'espace de fourrier, prenant en compte à la fois l'aspect ondulatoire du contraste dû aux interactions des électrons avec l'échantillon, mais également les imperfections dans la transmission des informations des microscopes électroniques. Ces modifications affectent le contraste d'amplitude et de phase de l'image, conduisant à une CTF oscillante qui diminue avec l'augmentation de la fréquence spatiale (*Figure 31*). Cela se traduit par une inversion de contraste dans les fréquences spatiales dont l'asymptote est égale à zéro. Lorsque l'amplitude est égale à zéro, cela équivaut à une perte d'information dans les hautes fréquences. La position des zéros peut être modulé en modifiant

la valeur de la défocalisation de la lentille objective. Par ailleurs, lorsque l'amplitude est négative, le contraste de l'image est inversé.

Il est donc important d'acquérir des images dans une gamme de défocalisation variables, afin d'obtenir des informations sur toute la gamme de fréquence spatiale, et de corriger l'inversion du contraste. Cette correction est réalisée durant l'analyse d'image.

La CTF est décrite, mathématiquement, par la relation suivante :

$$CTF(k) = 2 \times [(1 - W) \times \sin \gamma - W \times \cos \gamma] \quad (3)$$

$$\gamma = 2\pi \times (0.25 \times k^4 \times Cs \times \lambda^3 - 0.5 \times \lambda \times \Delta Z \times k^2)$$

k représente la fréquence spatiale, W le pourcentage dû au contraste d'amplitude,  $\gamma$  le déphasage,  $\lambda$  la longueur d'onde, Cs la constante d'aberration sphérique et  $\Delta Z$  la défocalisation de l'image.

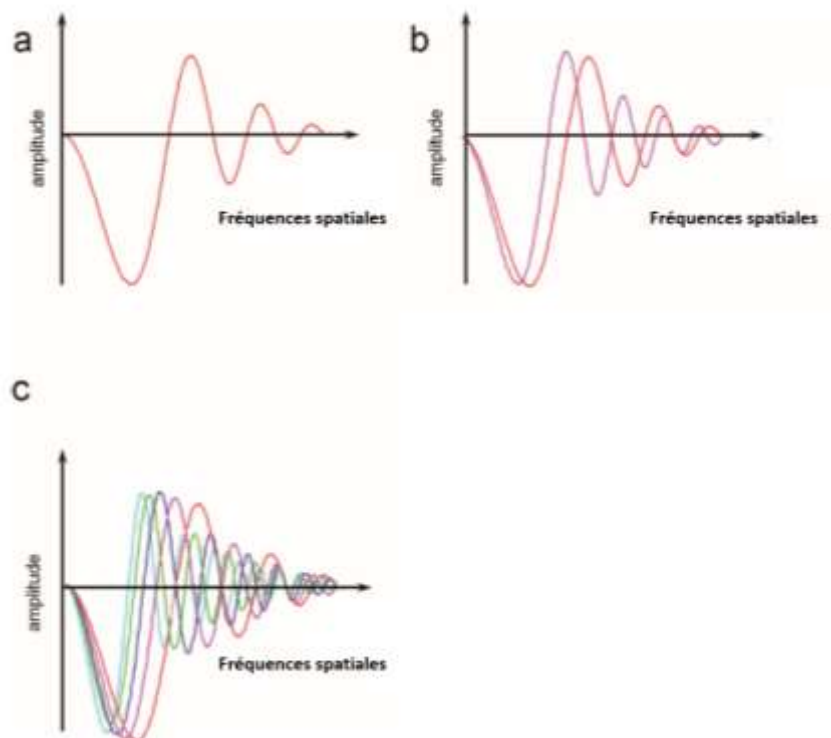


Figure 31. a) La courbe CTF pour une seule valeur de défocalisation, b) La courbe rouge avec une défocalisation proche de la focale, oscillant plus lentement, c) Les différentes courbes correspondent à une image avec plusieurs valeurs de défocalisation. Les courbes bleu et verte ont les plus hautes valeurs de défocalisation. La courbe rouge est la plus proche de la focale.

### B.3.7.1- La correction de la CTF :

La correction de la CTF s'effectue durant l'analyse d'images. Elle consiste à corriger l'amplitude et la phase afin d'inverser, de manière périodique en fonction du defocus calculé auparavant, les contrastes négatifs et les normaliser (Figure 32).

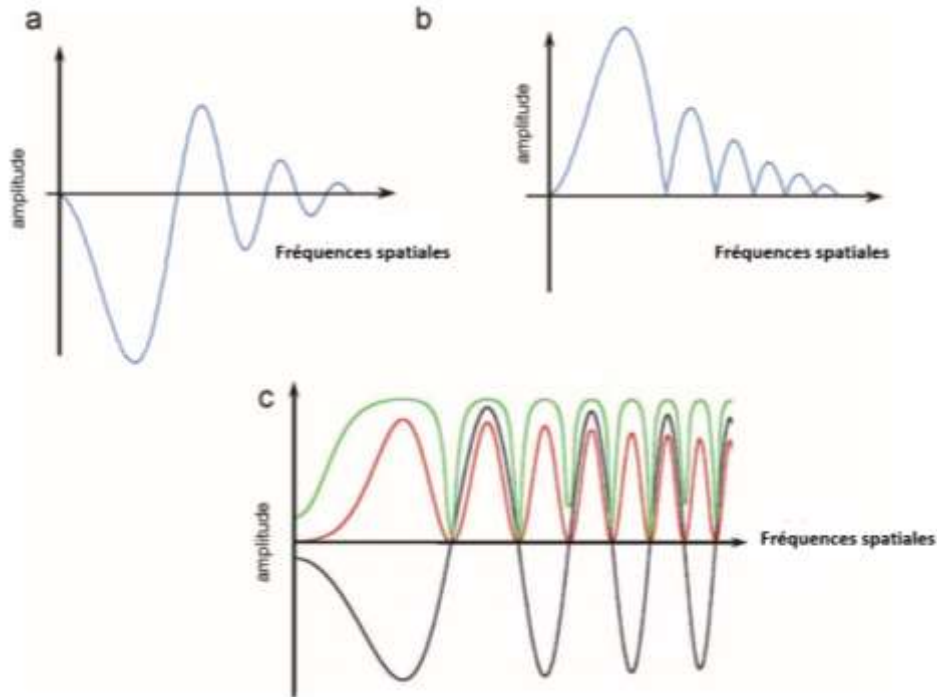


Figure 32. **a)** La courbe CTF pour un jeu de données non corrigé, **b)** La courbe CTF après la correction de la phase, **c)** En noir, la courbe CTF d'un jeu de données non corrigé, en rouge après la correction de la phase, en verte après la correction de la phase et l'amplitude. (Adaptation d'Orlova et Saibil, Chemical reviews 2011)

### B.3.7.2- La fonction d'enveloppe :

Les aberrations des lentilles électromagnétiques, ainsi que l'instabilité de la tension d'accélératrice et du faisceau d'électron affectent la CTF. En effet, ces variables vont induire une diminution de l'amplitude de la CTF dans les hautes fréquences. L'ensemble de ces modifications nommés fonction d'enveloppe est traduit par l'équation suivante :

$$E_{(k)} = \exp[-\pi^2 \cdot Q^2 \cdot (k^2 \cdot C_s \cdot \lambda^3 - \Delta Z \times k \times \lambda)^2] \times \exp[k^4 \cdot \lambda^2 \cdot D_z^2 - \frac{\pi^2}{(16 \times \ln(2))} \cdot \sqrt{(C_s \times \lambda)}] \times \exp[-(\frac{k}{E_g})^2] \quad (4)$$

La fonction d'enveloppe correspond à la multiplication de trois exponentielles. La première décrit la taille de la source noté  $Q$ , la deuxième tient compte de l'instabilité de défocalisation noté  $D_s$  (defocus spread), et le troisième prend en compte les variations de tous les autres paramètres, avec  $(Eg)$  qui est la largeur à mi-hauteur de la fonction de type Gaussien.

### **C. Préparation et acquisition d'images de l'échantillon biologique :**

#### **C.1- Préparation de l'échantillon :**

##### **C.1.1- Préparation de l'échantillon pour la coloration négative :**

Les échantillons biologiques sont, en règle générale, composés d'atomes légers (hydrogène, carbone, oxygène, ...). Par conséquent ils ont un faible pouvoir diffuseur. En d'autres termes, lors du contact avec l'échantillon biologique, la trajectoire des électrons ne sera que faiblement déviée en comparaison avec la trajectoire initiale. Cela se traduit par un faible contraste intrinsèque lors d'une observation de l'échantillon en microscopie électronique en transmission (MET). Pour rendre visible le matériel biologique, la technique de la coloration négative a été élaborée par HORNE en 1959 (Brenner, Horne et al., 1959). Ce processus consiste à enrober l'échantillon par des métaux ayant des atomes lourds (Acétate d'uranyle), opaques aux électrons. Ces sels de métaux lourds se fixent à la surface des particules. Cela aura pour effet d'un assombrissement du fond sans colorer l'objet lui-même, et donc de rendre visible les structures biologiques en augmentant le contraste.

La coloration négative permet, dans un premier temps, de vérifier l'état et l'homogénéité de l'échantillon isolé. Ce contrôle est nécessaire afin de savoir si les particules sont conformes à une étude structurale par MET.

Dans cette étude, 3.5  $\mu$ l de solution contenant les particules pré-40S isolées, sont déposées sur une grille carbonée (QUANTIFOIL® Cu 300 mesh), préalablement ionisée, durant une minute. Par la suite, l'excès de suspension est absorbé, à l'aide d'un papier filtre (Whatman 1). Puis la grille contenant l'échantillon est plongée dans une goutte d'Acétate d'uranyle (AU) et l'excès est éliminé instantanément avec un papier filtre (Whatman 1). Cette étape est répétée une deuxième fois, lors duquel l'excès est éliminé après 20 secondes d'attente. Enfin, la grille est séchée à l'air libre durant environ une minute (Figure 33 a).



### C.1.2- Préparation de l'échantillon pour la cryo-congélation (Cryo-Plunge):

Afin d'éviter toute modification structurale dû à l'utilisation de contrastant, et pour pouvoir observer l'échantillon hydraté proche de son état natif, il est nécessaire de le congeler dans de la glace vitreuse, transparente aux électrons. Ce processus implique un refroidissement instantané de la solution dans un cryogène (cf. ci-dessous). Ceci évite la formation de glace cristalline, opaque aux électrons, pouvant endommager les particules.

Cette étape est effectuée à l'aide d'un automate de congélation : EM GP (Leica). Cet appareil est composé d'une chambre, dans laquelle la température et l'humidité sont contrôlées et ajustables. Dans le cas de notre étude, elles sont réglées à 20 °C et 95% respectivement. 3,5 µl de suspension contenant les particules pre-40S isolées, est déposée sur la grille et placée dans la chambre. Par la suite, l'excès de la solution est éliminé avec un papier filtre (Whatman 1). Le temps de contact entre la grille et le papier (blot) a été optimisé pour ces grilles entre 1.8 et 2.3 secondes. Après l'étape de blotting, la grille est instantanément plongée dans une cupule contenant de l'éthane liquéfié à -185°C. La congélation dans ce fluide permet de transformer instantanément tout l'eau composant l'échantillon, en glace amorphe.

Les grilles sont ensuite transférées soit dans un porte objet Cryo-MET pour une observation en MET, soit conservées dans des boîtes de stockage cryo, maintenus dans des containers d'azote liquide pour une utilisation ultérieure. Dans les deux cas, tout au long des manipulations, les grilles doivent être impérativement manipulées et conservées dans l'azote liquide (-196°C) afin d'éviter une contamination ainsi que la cristallisation de la glace vitreuse, irréversible (Figure 33 b).

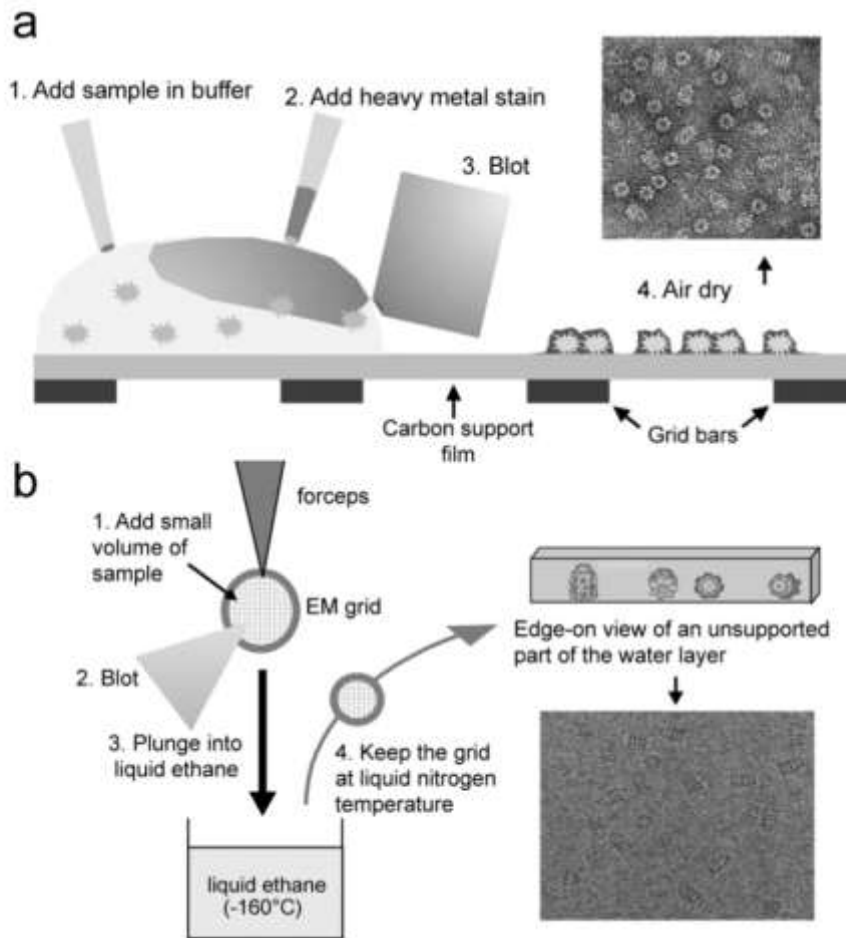


Figure 33. **Préparation des échantillons en coloration négative et en cryo-EM. a)** représentation schématique de la coloration négative :1. Dépôt de l'échantillon sur la grille de MET, 2. Marquage avec des sels de métaux lourds, 3. Absorption de l'excès de l'échantillon, 4. Observation en MET. **b)** Représentation schématique de la cryo-congélation : 1. Dépôt de l'échantillon sur grille de MET, 2. Absorption de l'excès de l'échantillon, 3. Vitrification instantanée de l'échantillon dans l'éthane liquide, Observation en cryo-EM. (Adaptation de Orlova et Saibil, Chemical reviews 2011)

## C.2.- Acquisition des images en cryo-EM :

### C.2.1- Conditions d'acquisitions :

L'échantillon biologique étant fragile sous le faisceau d'électrons, il est nécessaire de limiter la dose d'électrons lors des acquisitions d'images en cryo-EM. En effet, une longue durée d'exposition couplée à une forte dose d'électron induira d'une part l'évaporation de la glace et d'autre part la formation de radicaux libre, dégradant l'échantillon. De ce fait, l'observation et

l'acquisition des images en cryo-EM se font en mode « faible dose » (Low dose en anglais). Ce mode permet l'acquisition des images tout en contrôlant la dose totale des électrons.

Les démarches à suivre pour une acquisition d'image, en mode faible dose, se résument en trois grands points :

**1. Recherche de la zone d'intérêt en mode « search »:**

Ce mode permet de survoler la grille, à faible grossissement (x5000), afin de trouver des positions optimales en termes de glace à photographier.

**2. Mise au point de la focale : (Mode Focus)**

Une fois la zone à imager repérée, l'utilisation de ce mode sur une région voisine permet la mise au point de la focale et l'application de la défocalisation à un grossissement d'environ x50 000. Ce grossissement important permet d'éviter toutes expositions sur la zone d'intérêt avant l'acquisition d'image.

**3. Acquisition d'image de la zone d'intérêt : (Mode record)**

La prise de vue s'effectue en mode film avec une taille de pixel de 1.04 Å, 1.067 Å ou 1.24 Å (selon le microscope utilisé). Les détails de l'acquisition des images sont décrits sur le tableau (Figure 34).

**4. Les microscopes utilisés :**

Plusieurs microscopes ont été utilisés durant cette thèse. En ce qui concerne la vérification ainsi que la sélection des meilleures grilles en coloration négative et en cryo-EM, les microscopes utilisés sont Jeol JEM 1400 et Jeol JEM 2100 de la plateforme de microscopie électronique intégrative de Toulouse (METI), pour l'étude des particules pré-40S, mutantes pour la protéine RPS20, les images ont été acquises sur un microscope de type Talos Arctica, à l'institut Européen de chimie et biologie (IECB) de bordeaux en France. Pour l'acquisition d'image à très haute résolution j'ai utilisé le microscope FEI Titan Krios de l'ESRF (grenoble), de l'EMBL (Heidelberg) et de NeCEN (Pays-bas).

Les microscopes Talos Arctica et Titan Krios sont équipés de caméra à détecteurs directs d'électrons. L'acquisition des images s'est fait en mode « Movie » (cf. partie analyse d'image) Les conditions d'acquisition des images en vue d'une analyse d'image, par microscopes et par échantillons sont représentées sur le tableau (Figure 34).

## C.2.2- Caractéristiques des microscopes :

### C.2.2.1- Microscopes utilisés pour la vérification de l'échantillon ainsi que la sélection des grilles cryo-EM pour l'analyse d'image :

La vérification de l'échantillon en coloration négative s'effectue sur un MET Jeol JEM 1400. Il dispose d'un filament en tungsten comme source d'électron, opérant à une tension d'accélération entre 80 et 120KV. Il est également équipé d'une caméra CCD Gatan Orius SC1000B 11 Megapixels. L'acquisition des images s'effectue par le biais du Logiciel d'acquisition d'image Digital Micrograph Gatan.

Concernant la vérification et la sélection des grilles en cryo-EM en vue d'une acquisition sur des microscopes hautes performances, les échantillons sont observés sur un MET de type Jeol JEM 2100, disposant d'un cristal LaB6 comme source d'électron et opérant à une tension d'accélération d'environ 200KV. Par ailleurs le microscope est composé d'un filtre de perte d'énergie post-colonne Gatan GIF jumelé à une caméra GIF Gatan Ultrascan US4000 4Kx4K. Les images sont prises à l'aide du logiciel Serial-EM.

### C.2.2.2- Utilisation de microscopes à hautes performances en vue d'une étude structurale :

#### a) Etude des particules pré-40S de la levure : WT Tsr1-TAP

Les images des particules pré-40S de la levure sauvage (WT), purifiées en utilisant la protéine Tsr1 comme appât, ont été obtenues sur un microscope FEI Titan Krios à Installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF) situé à Grenoble. Ce microscope dispose d'une source d'électron de type FEG, opérant à 300KV. Il est équipé d'un détecteur direct d'électrons (DED) de type Gatan K2 summit couplé à un filtre d'énergie de type Gatan Bioquantum LS/967. L'obtention des images est automatisée avec le logiciel EPU. Les images sont acquises avec une taille de pixel calibrée à 1.067 Å pour un grossissement de 130 000 ×. Pour ce faire, le mode movie a été utilisé. Utilisation de ce mode consiste à acquérir plusieurs images, du même champ de particules, durant un temps d'exposition donné. Dans le cadre de notre étude, cela correspond à l'acquisition d'une pile de 28 images (aussi appelée stack de

frames) par pile, avec une dose d'électrons de l'ordre de  $1.05 \text{ e}/\text{\AA}^2/\text{image}$ . Un total de 3100 piles a été obtenu en utilisant une gamme de défocalisation allant de -800 nm jusqu'à -2800 nm

#### b) Etude des particules pré-40S humaines : RIO1kd-TAP

En ce qui concerne les particules pré-40S humaines, purifiées en utilisant la protéine hRIO1KD comme appât, les images sont obtenues également avec un microscope FEI Titan Krios, au sein du laboratoire européen de biologie moléculaire situé à Heidelberg en Allemagne. En terme de dispositif et condition d'acquisition, elles sont identiques à celle réalisées à Grenoble. L'obtention des images est automatisée avec le logiciel SerialEM. Les images sont acquises avec une taille de pixel calibrée à  $1.04 \text{\AA}$  pour un grossissement de  $130\,000 \times$ . Un total de 9494 images a été effectuées en utilisant une gamme de défocalisation allant de -800 nm jusqu'à -2800 nm.

#### c) Etude des particules pré-40S de la levure : WT Tsr1-FPZ (NeCEN) et Tsr1-TAP rps20 $\Delta$ loop

Pour les particules pré-40S purifiées à partir de cellules WT Tsr1-FPZ, les meilleures grilles de cryo-EM ont été envoyés au NeCEN (Pays-bas), pour une l'acquisition d'image sur un microscope FEI Titan Krios à correction de Cs (FEI, Thermo Fisher Scientifique) opérant à 300 kV. À l'aide du logiciel FEI EPU, les images ont été automatiquement enregistrées sur un détecteur directe d'électrons Falcon II à un grossissement de  $59\,000 \times$  (correspondant à une taille de pixel calibré de  $1,12 \text{\AA}$ ) et à une dose électronique totale de  $45,6 \text{ e} / \text{\AA}^2$  sur 7 frames. Des images de particules pré-40S purifiées à partir de cellules Tsr1-TAP rps20 $\Delta$ loop ont été enregistrées sur la plate-forme cryo-EM de l'IECB, à Bordeaux, en France, sur un Talos Arctica opérant à 200 kV, équipé d'un détecteur directe d'électron Falcon III (FEI, Thermo Fisher Scientifique). L'acquisition automatique d'images a été réalisée avec le logiciel EPU, à un grossissement de  $120\,000 \times$  correspondant à une taille de pixel calibrée de  $1,24 \text{\AA}$  et à une dose électronique totale de  $45,5 \text{ e} / \text{\AA}^2$  sur 20 frames. Pour les deux acquisitions de données, les valeurs de defocalisations étaient comprises entre -1000 nm et -3000 nm. Un ensemble de 6978 et 4037 images ont été obtenues pour les particules pré-40S WT Tsr1-FPZ et Tsr1-TAP rps20 $\Delta$ loop respectivement.

Echantillons	Microscopes	Taille de pixel (Å)	Détecteurs	Nombre de frame/stack	Dose (e / Å <sup>2</sup> / stack)	Défocalisation (nm)	Logiciel d'acquisition	Mode d'acquisition	Nombre total d'image
Tsr1-TAP WT (Levure) ESRF	FEI Titan Krios	1,067	Gatan K2 Summit	28	29,4	-800 à -2800	EPU	Movie	3100
Tsr1-FPZ WT (Levure) NeCEN	FEI Titan Krios	1,12	FEI Falcon 2	7	45,6	-1000 à 3000	EPU	Movie	6978
Tsr1-TAP rps20Δloop (Levure) IECB	Talos Arctica	1,24	FEI Falcon 3	20	45,5	-800 à -3000	EPU	Movie	4037
RIO1kd-TAP (Humaine) EMBL	FEI Titan Krios	1,04	Gatan K2 Summit	28	29,4	-800 à -2800	Serial EM	Movie	9494

Figure 34. Tableau comparatif des conditions d'acquisition des images sur des microscopes hautes performances.

## D. Analyse d'images :

### D.1- Principes généraux :

Le principe de reconstruction de structures 3D à partir d'images de microscopie électronique en transmission repose sur le théorème des sections centrales. Cela consiste en une modélisation tridimensionnelle d'un objet à partir d'un ensemble d'images prises sous différents points de vue. En cryo-MET, les images des particules sont des projections 2D de l'objet, orientées de façon aléatoire dans la glace vitreuse. La transformée de Fourier de chacune de ces projections 2D est une section centrale de la transformée de Fourier 3D de l'objet. Ainsi, si l'on peut déterminer l'orientation relative des particules imagées par MET, on peut les combiner pour reconstruire la structure 3D de ces particules. La reconstruction 3D obtenue dépendra de la qualité des images, mais aussi de la répartition des particules dans l'espace. En effet si l'échantillon se positionne dans la glace, selon une orientation préférentielle, la reconstruction 3D peut être déformée par manque d'information sur les angles concernés.

Dans cette étude, la méthode dite des particules isolées a été utilisée pour déterminer la structure 3D des particules pré-40S, à l'aide du programme RELION 2.1.0 (Scheres, 2017).

## D.2- Le programme RELION 2.1.0

RELION (REGularised LIkelihood Optimisation), est une suite de programmes développée par Sjors Scheres au MRC à Cambridge. Elle utilise une approche de statistique bayésienne, afin de décrire la probabilité maximale d'orientation de chaque particule imagée, en prenant en compte la flexibilité structurale de cette particule, ainsi que, entre autres, la variabilité du rapport signal/bruit dans le jeu de donnée d'images acquises (Scheres, 2012). Ce programme permet de trier l'hétérogénéité structurale de l'échantillon, sans que l'utilisateur en ait une connaissance a priori.

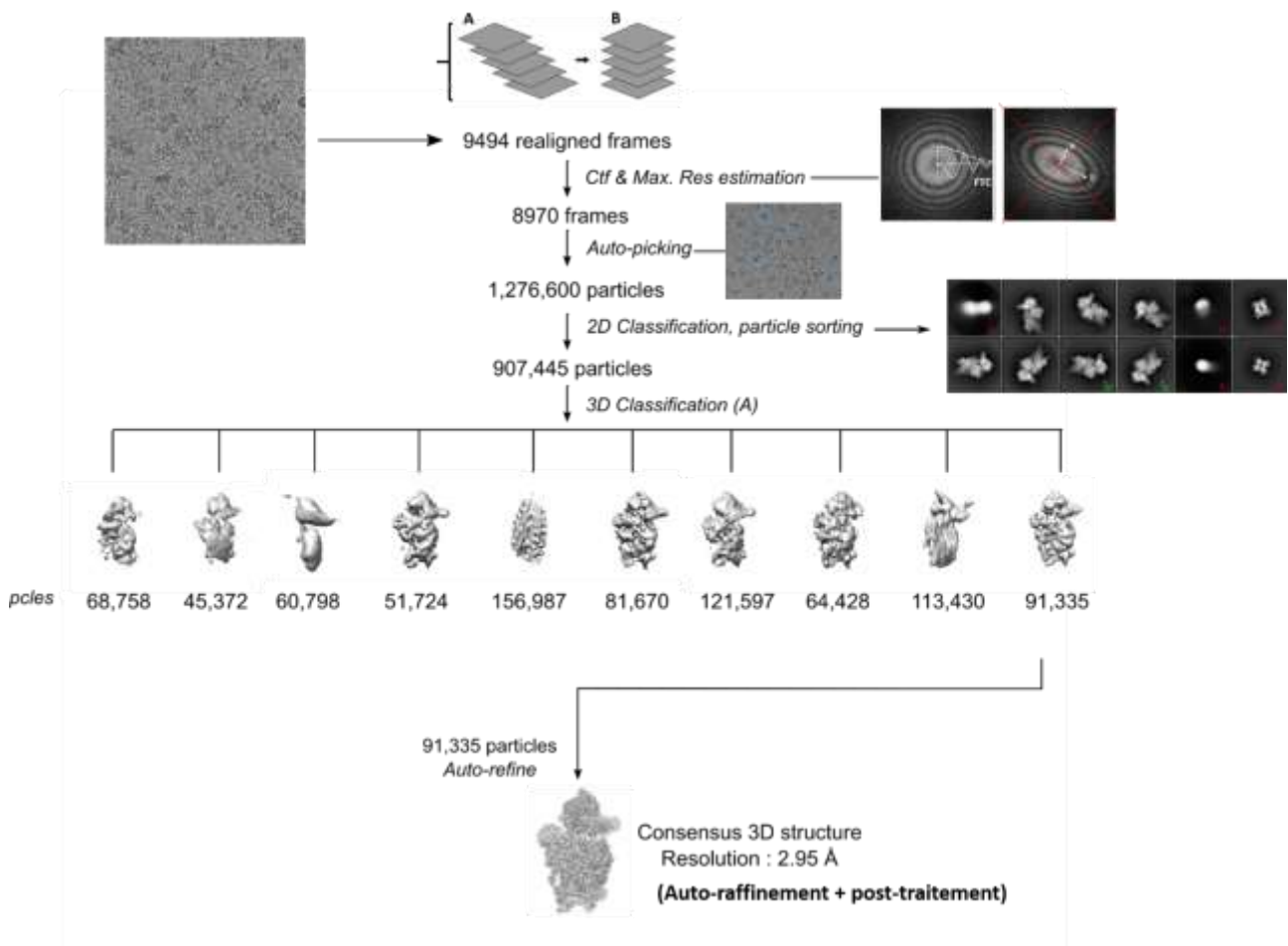


Figure 35 Les principales étapes de calcul de la reconstruction 3D

D'autre part, et par une méthodologie dite de « Gold Standard FSC », ce programme permet de réduire au maximum les biais de référence. RELION 2.1.0 a récemment été employé pour déterminer la structure de différentes macromolécules, à des résolutions quasi-atomiques

(Brown et al., 2014 ; Voorhees et al., 2014 ; Pang et al., 2015 ; Yan et al., 2015 ; Walls et al., 2016 ; Löwe et al., 2016 ; Scaiola et al., 2017, Heuer et al., 2017, Ameismeier et al., 2018).

Les principales étapes de calcul de la reconstruction 3D sont résumées dans la (Figure 35) ci-dessous.

Elles consistent en 5 étapes, décrites ci-dessous :

#### D.2.1- Pré-traitement :

##### a) Traitement et tri des images en mode « Movie » :

Grâce aux caméras à détection directs d'électrons (DED), un champ de particules est imagé en une pile (ou stack) d'images. Sous l'effet du faisceau d'électrons, l'échantillon biologique peut subir des mouvements induisant du bruit dans la reconstruction 3D de l'objet biologique. La première étape du traitement d'image consiste donc à ré-aligner les images de la pile, puis à les sommer (Figure 36).

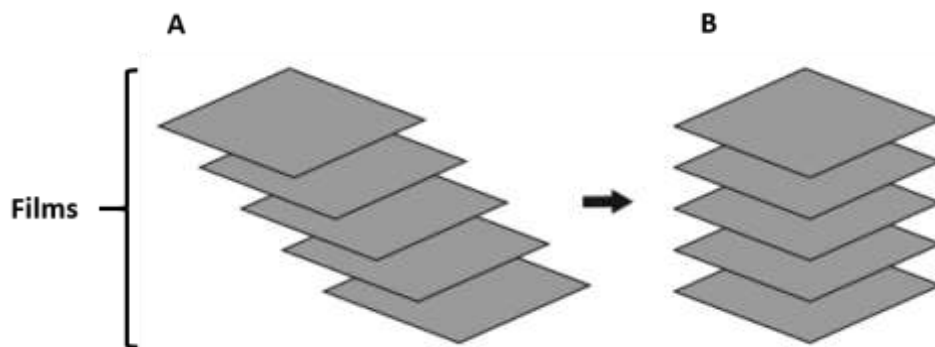


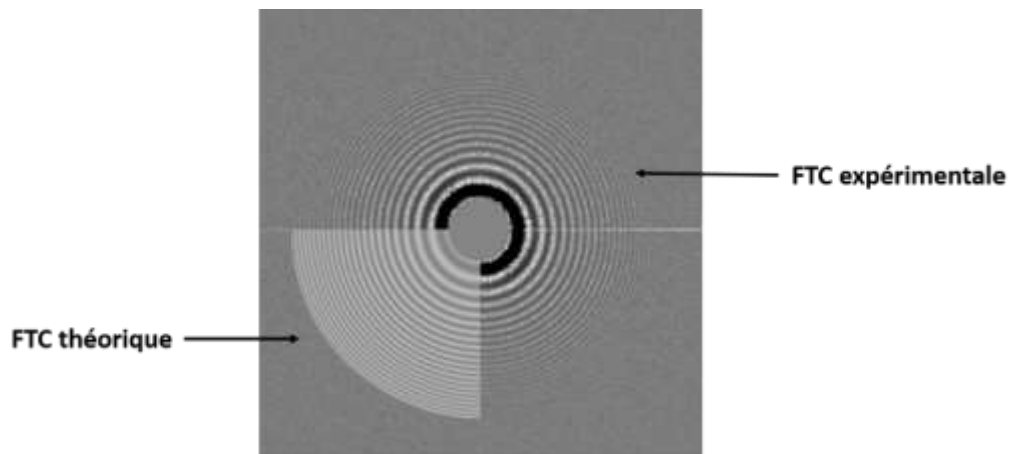
Figure 36. Représentation schématique d'un film avant (A) et après (B) alignement.

Pour ce faire, le logiciel MotionCorr (Li et al., 2013) est utilisé. Par la suite un tri visuel en terme de qualité des images est effectué. Cela permet d'écartier des images avec des contaminants et/ou ayant des épaisseurs de glace importantes.



**b) Estimation et sélection selon la CTF :**

Cette démarche consiste à calculer le spectre de puissance de chaque image afin d'estimer leurs valeurs de défocalisation. Cette estimation se fait grâce au logiciel CTFFIND4 (Rohou & Grigorieff, 2015). Le principe consiste à sous-diviser une image puis de calculer le spectre de puissance de chaque part. La somme de ces spectres donne naissance à une CTF expérimentale qui sera comparée à une CTF théorique calculée à partir des paramètres suivants : la constante d'aberration, le voltage et le contraste d'amplitude. Les modulations d'amplitude de la CTF expérimentale sont ensuite ajustées de sorte que la courbe théorique soit le plus semblable à la courbe expérimentale (Figure 37). Un fichier de sorti, au format texte de type « .STAR » sera disponible, contenant les valeurs de défocalisation affinées ainsi que le voltage et les noms des images. Ces paramètres serviront, afin de corriger au mieux la CTF de chaque image dans les étapes suivantes de l'analyse d'image.



*Figure 37. Comparaison de la transformée de Fourier d'une image expérimentale avec sa fonction théorique, estimée avec le logiciel CTFFIND4*

Par ailleurs l'inspection des CTF permet de mettre à l'écart les images présentant des aberrations (Astigmatisme ou encore le mouvement de l'échantillon sous le faisceau) (Figure 38).

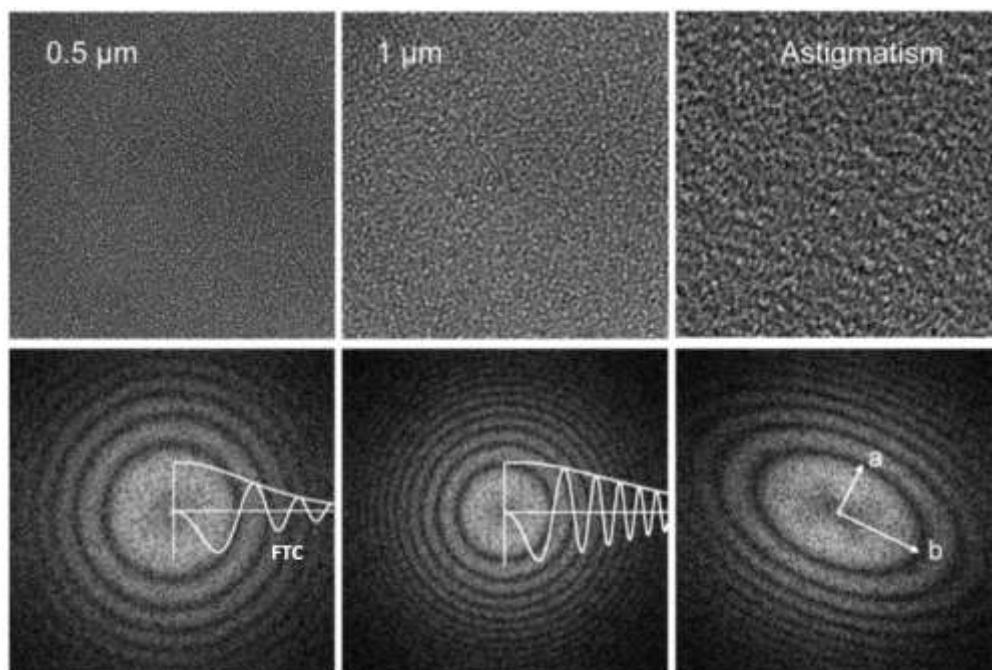


Figure 38. . Images de film de carbone prises en MET avec les CTF correspondantes. De gauche à droite : Une image prise avec une défocalisation de 0.5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  et une image présentant un défaut d'astigmatisme. Les anneaux de thon de la deuxième image oscillent plus rapidement et sont plus proches de l'origine. Les inversions de contraste sont représentées sur les courbes CTF correspondantes. (Adaptation de Orlova et Saibil, Chemical reviews 2011)

### c) Sélection des particules des images :

Le but de cette étape consiste à délimiter puis extraire, dans une boîte carrée (box), chaque particule d'un champ d'image donné. Pour cela le programme de sélection semi-automatique (Manual picking et Autopicking) de RELION 2.1.0 a été utilisé. Tout d'abord, entre 1000 et 5000 particules sont sélectionnées manuellement, sur quelques images. Par la suite, ces particules sont extraites puis regroupées et moyennées durant une étape de classification 2D afin de créer des classes 2D. Parmi ces classes, les meilleures seront utilisées comme références, afin de sélectionner de manière automatique l'ensemble des particules sur la totalité du jeu de données. Les corrélations entre les références et les particules seront déterminées par trois paramètres :

- La distance minimale entre deux particules : L'optimisation de ce paramètre a pour but de sélectionner des particules isolées afin d'éviter d'extraire des images correspondantes à des agrégats ou encore des contaminants proches des particules.

. Le seuil de sélection : Cela correspond à un coefficient de corrélation entre les classes 2D de références choisies et la zone de particule à sélectionner. Sa valeur est comprise entre 0 et 1.

. Ecart type maximum de bruit : L'optimisation de ce paramètre sert à exclure les particules qui sont hors trou de la glace (ou sur le bord de carbone). Cela permet d'écarter les zones avec un rapport signal sur bruit trop élevé, et les contaminations, pour la suite de l'analyse d'image.

Ces paramètres sont optimisés sur quelques images, et une variable correspondant à ces trois facteurs, pour chaque particule sélectionnée sera déterminée (FOM, Figure Of Merit). Une fois satisfait de ces paramètres, les variables seront appliquées à l'ensemble du jeu de données en utilisant des classes 2D de référence (cf. Auto-picking sur la **Error! Reference source not found.**).

#### d) Extraction des particules des images :

A la fin de l'étape de sélection des particules, un texte au (format .STAR) sera généré. Ce fichier contient les paramètres (FOM) de sélection ainsi que les coordonnées pour chaque particule de chaque image. Ce fichier sert par la suite à extraire chaque particule dans une boîte individuelle. La taille de cette boîte doit être ajustée de sorte, à ce qu'elle englobe l'intégralité de la particule sélectionnée.

### D.2.2- La Classification 2D :

Le but de cette étape consiste à éliminer des particules aberrantes (contaminants, agrégats, bords de carbone, etc...), parmi les particules automatiquement sélectionnées et extraites. En effet la propreté du jeu de donnée est un facteur majeur dans la qualité des modèles 3D reconstruits, ensuite. Le principe consiste, dans un premier temps à répartir aléatoirement le jeu de données, dans un nombre de classe (K) choisi par l'utilisateur. Par la suite les images de chaque classe seront alignées et moyennées afin de former une classe 2D qui servira de référence dans l'itération suivante. A chaque itération, chaque particule est comparée en translation et rotation à toutes les classes 2D de référence. Après comparaison, un score de probabilité sera attribué à cette particule, en terme de ressemblance à la référence, score d'alignement et rapport signal sur bruit. Ainsi chaque particule sera pondérée en fonction de

son score de ressemblance. Lorsque cette probabilité est maximum entre une particule et une classe 2D de référence, la particule sera attribuée à la classe 2D. Au fur et à mesure de ce processus itératif, les images d'une même vue de l'objet seront regroupées, alignées et sommées dans une même classe, augmentant ainsi le rapport signal sur bruit de la classe 2D générée. Concernant les particules aberrantes, elles ne peuvent pas s'aligner et seront regroupées dans des classes 2D de basses résolutions. De ce fait il est possible de garder que les classes 2D contenant des particules pré-ribosomiques et éliminer, par conséquent, les particules aberrantes (cf. Figure 35 classification 2D).

### D.2.3- Classification 3D :

Comme pour la classification 2D, la classification 3D est un processus itératif basée sur le principe de maximum de vraisemblance. Néanmoins, cette étape exige d'avoir un modèle initial 3D de référence. Par ailleurs, ce modèle consensus initial doit être fortement filtré par un filtre passe bas, afin de minimiser d'éventuels biais de référence dans la reconstruction 3D. Durant la première itération, des projections 2D sont générées à partir de ce modèle initial 3D dont les orientations sont connues. Par la suite, chaque particule sera comparée, selon ses coordonnées en translation et en rotation, avec chaque projection générée à partir du modèle initial. Lorsque la probabilité de ressemblance est maximum, l'orientation des projections 2D issues du modèle 3D initial est alors attribuée à la particule expérimentale. Une fois les particules orientées, elles seront réparties, de manière aléatoire dans un nombre de classe (K) défini par l'utilisateur. Pour chaque classe (K) un modèle 3D sera reconstruit qui servira de référence pour générer à nouveau des projections 2D pour l'itération suivante. Au fil des itérations, les orientations s'affinent lorsque le modèle 3D reconstruit est ressemblant aux particules expérimentales. Le jeu de donnée étant hétérogène, la classification 3D permet d'une part d'écarter les particules aberrantes, et d'autre part de trier l'hétérogénéité structurale et conformationnelle de l'échantillon biologique. Il est important de choisir un nombre de classe (K) adéquat puisque la résolution, la qualité et l'interprétation du modèle 3D reconstruit dépend également du nombre de particule composant le modèle 3D. De plus, le nombre d'itérations de calculs étant défini par l'utilisateur, il est important de suivre la convergence du calcul afin d'adapter le nombre d'itération nécessaire (Figure 35 classification 3D).

#### D.2.4- Auto-raffinement 3D :

Après la sélection des modèles issus de la classification 3D, il est nécessaire de raffiner la précision des orientations des particules d'une même classe 3D. De la même manière que la classification 3D, le principe de cette étape consiste à comparer les reprojctions 2D issues d'un modèle 3D, initial filtré par un filtre passe-bas, avec les particules. Ce processus itératif n'est pas régulé par l'utilisateur, contrairement à la classification 3D. En effet, le programme affine, de manière indépendante, les orientations relatives des particules jusqu'à un point de « convergence » où la résolution n'évolue plus. Le raffinement des angles se fait par le principe de « Gold Standard FSC » dont la démarche est décrite par Scheres & Chen 2012. En résumé, le programme sépare aléatoirement le jeu de donnée en deux. Puis à chaque itération, deux reconstructions 3D, appelées demi-cartes, sont calculées de manière indépendante. La résolution de ces deux demi-cartes est calculée à chaque itération, par la comparaison des transformés de Fourier des deux structures 3D. Par ailleurs, l'assignation des orientations se font par la comparaison des transformés de Fourier des demi-cartes avec celle de la référence. La recherche de corrélation se fait à basse résolution afin d'éviter toute l'influence du bruit dû aux hautes fréquences. Lorsque le calcul arrive à convergence, la précision des orientations n'évolue plus et par conséquent la résolution reste stable. A ce stade, le jeu de donnée des deux demi-cartes se rassemblent afin de calculer une reconstruction 3D. Cela permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi améliorer la résolution du modèle 3D final.

#### D.2.5- Le post-traitement :

La résolution du modèle 3D obtenue après l'étape de raffinement prend en compte également le bruit entourant la particule. De ce fait il est considéré que la résolution obtenue peut être sous-estimé. Dans le but d'éliminer le bruit et affiner la carte de densité électronique, l'étape de post-traitement détermine un masque binaire entourant la particule. Ce masque est appliqué aux deux demi-cartes issue de la dernière itération du raffinement 3D puis, la résolution est calculée à nouveau par corrélation des transformées de Fourier des cartes masquées. Afin d'éviter une sur-évaluation de la résolution en lien avec l'utilisation du masque binaire, certaines phases de la carte sont remplacées aléatoirement par du bruit aléatoire, à partir d'une résolution donnée. La comparaison des phases des modèles masqués avec les phases originales permet de vérifier la présence d'éventuels de bruit au-delà d'une certaine résolution. De cette façon la résolution est déterminée, une nouvelle fois, par le procédé dit de Gold

Standard FSC. Dans une dernière étape, le programme appliquera un filtre passe-bande dans le but de diminuer les basses fréquences et amplifier les hautes fréquences jusqu'à la résolution estimée pour la reconstruction 3D. Au-delà, le signal ne sera pas pris en compte afin d'éviter une sur-interprétation du bruit (Figure 35 Auto-raffinement et post-traitement).

#### D.2.6- Auto-raffinement et classification masqués avec ou sans soustraction du signal:

Lorsqu'une partie d'un complexe étudié est flexible et/ou dynamique, comme la tête des particules étudiées (Figure 39 A), cette zone apparaît floue et par conséquent mal résolue dans le volume 3D reconstruit. Dans le but d'améliorer la résolution et donc de pouvoir interpréter ces zones, il est possible d'appliquer un masque autour de la région d'intérêt et de focaliser les calculs uniquement sur cette zone (Scheres, 2016). Pour cela il est nécessaire de construire un masque binaire (c'est à dire un volume dont les voxels ont une valeur de zéro ou un) à partir d'un modèle PDB, ou d'un volume 3D reconstruit avec Relion 2.1. L'édition des masques peut

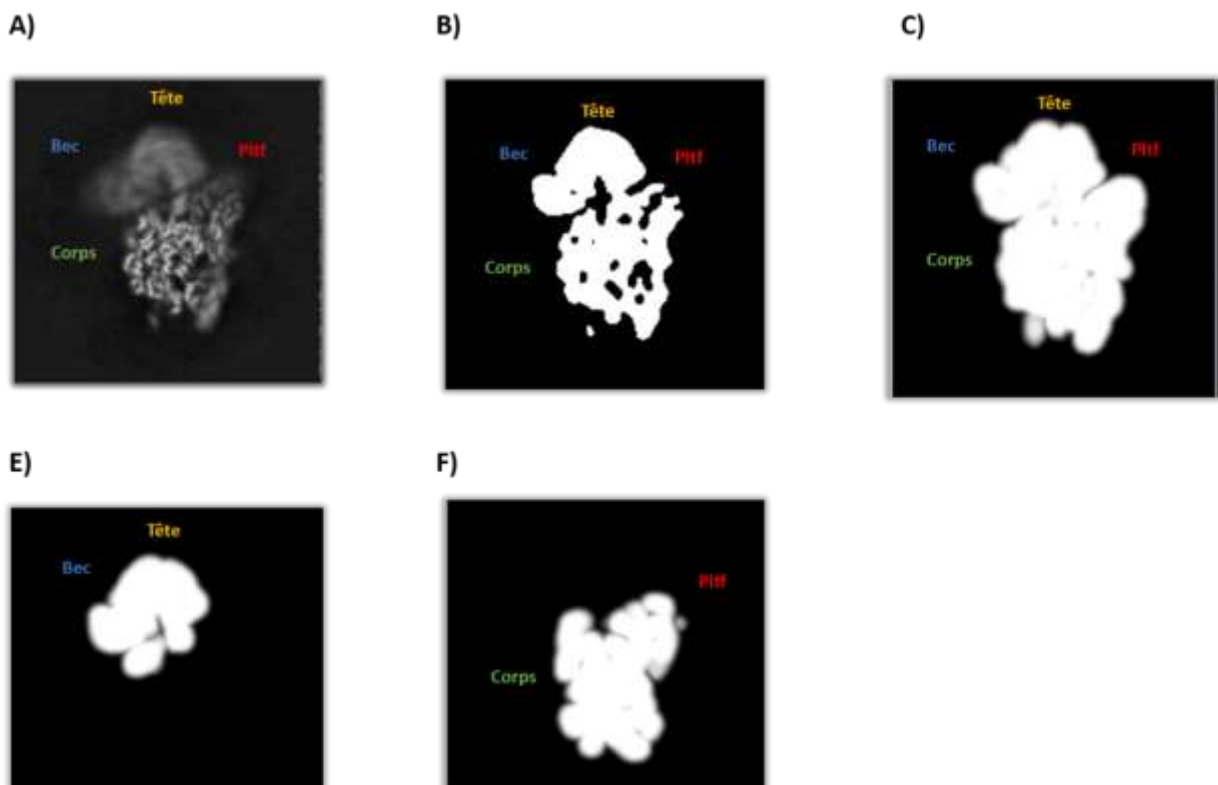


Figure 39. Création de masque binaire. **A)** Section centrale du volume 3D des particules pré-40S, non masqué. **B)** en blanc est représenté un masque englobant l'intégralité du complexe, **C)** Le masque produit en **(B)** filtré à 30 Å, dilaté et adouci pour les bords. **E)** un masque autour de la tête des particules, **F)** un masque autour du corps des particules.

également être effectuée grâce au logiciel UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) et son outil de segmentation de volume, Segger (Pintilie et al., 2010). Le principe est de créer un volume 3D ayant les mêmes dimensions que le volume d'origine, mais ne contenant que la région d'intérêt, et d'éliminer tous les domaines environnants. Afin d'éviter les artefacts dans l'espace de Fourier, en raison des effets de convolution du masquage, il faut le filtrer par un filtre passe-bas (environ 30 Å), dilater ce masque (c'est à dire l'agrandir) puis adoucir les bords de ce masque (« soft-edge ») sur le masque (Figure 39 A à F). Ces modifications peuvent être ajoutés aux masques en utilisant l'outil mask create de Relion 2.1. Dans le cas de cette thèse nous avons optimisé ces valeurs pour un élargissement et un adoucissement des bords de 10 et 12 pixels respectivement.

Ensuite plusieurs cas de figures se présentent:

#### D.2.6.1- Auto-raffinement masqué :

Si une partie du complexe est en mouvement par rapport à une autre partie stablement structurée, en imposant un masque autour de la région dynamique puis en la raffinant, on peut améliorer la résolution de cette région d'intérêt.

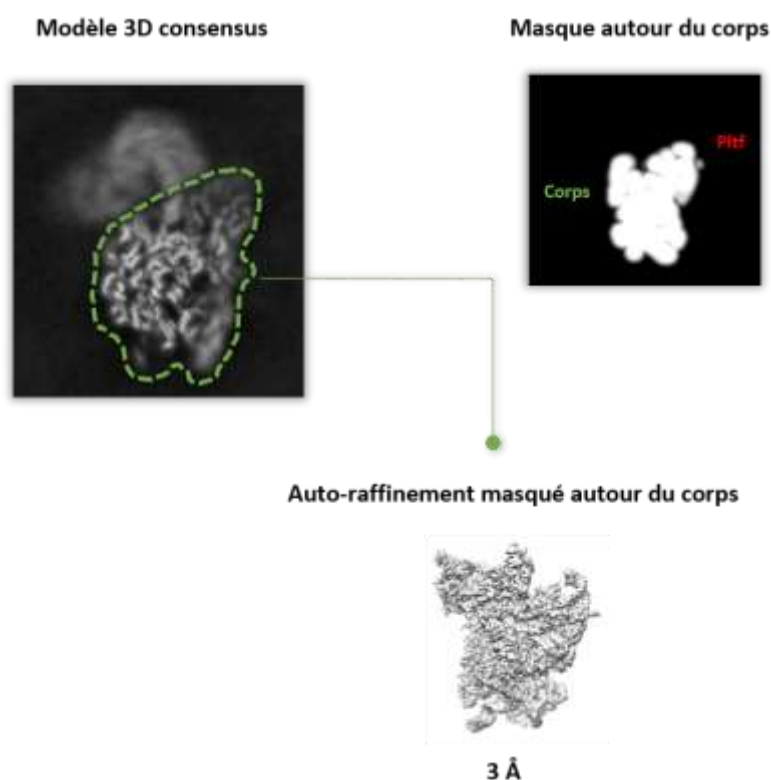


Figure 40 ; Exemple d'Auto-raffinement masqué sans soustraction du signal

Cette approche peut constituer un outil adapté pour traiter un mouvement continu d'un domaine par rapport à un autre, comme c'est le cas pour le mouvement de swivel de la tête de la petite sous-unité ribosomique par rapport à son corps (Mohan et al., 2014). Dans cette approche, on applique un masque 3D à la référence à chaque itération de calcul. Ainsi, les images de particules (expérimentales), ne seront alignées que par sur la partie de la structure de référence qui se trouve dans le masque. De ce fait, le raffinement devient relativement insensible à ce qui se passe dans les régions extérieures au masque.

#### D.2.6.2- Classification 3D masqué :

Si l'hétérogénéité structurale de la zone d'intérêt est discrète et de petite taille (inférieure à 200 kDa), la classification 3D masquée peut être avantageuse. Par exemple, cette approche peut être utilisée pour séparer des différences de conformation, dans une partie de la structure tout en ignorant les différences dans d'autres. En outre, cette démarche permet également de décrire un mouvement continu, en divisant les données en un nombre discret de sous-ensembles, fixés par l'utilisateur.

Dans l'étude des particules pré-ribosomiques, après avoir obtenu une structure « consensus » par auto-affinement de l'ensemble des particules, nous avons par exemple effectué une classification masquée autour de la tête des particules, sans imposition d'alignement des images. Cela nous a permis de subdiviser les particules en 4 ou 5 classes, en fonction de l'orientation et de la morphologie de leur tête. Ainsi, chacune de ces classes contient moins de particules que l'ensemble de données d'origine, mais le niveau de détail de certaines de ces classes a été considérablement amélioré par rapport à la structure consensus, en particulier lorsque certains états conformationnels étaient plus peuplés que d'autres (Figure 41).

Après cette étape où les particules les plus similaires ont été triées et regroupées, on peut ensuite réaliser une étape d'auto-raffinement de ces classes d'intérêt, et gagner en résolution pour le domaine d'intérêt par rapport à la structure consensus.



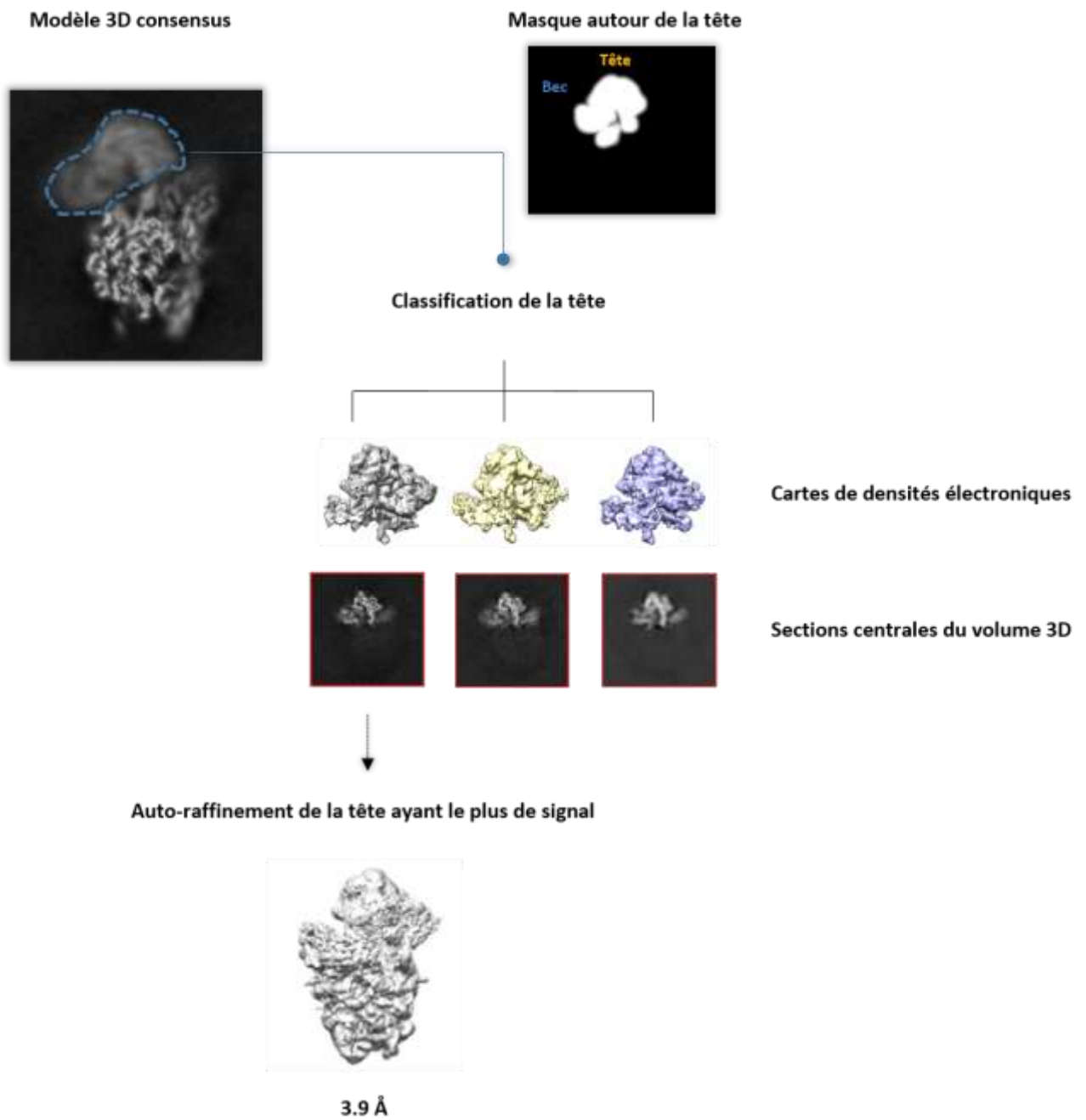


Figure 41. Exemple de classification 3D masquée sans soustraction du signal.

#### D.2.6.3- Auto-raffinement/classification 3D avec soustraction du signal :

Lors des étapes d'auto-raffinement et classification masqués, les densités présentes dans une image de particule expérimentale, situées à l'extérieur du masque, agiront comme un bruit lors des comparaisons. Ce bruit détériore les attributions d'orientation et/ou de classe et diminue

donc la résolution. Cet effet peut être réduit en soustrayant la partie du signal des images expérimentales hors de la zone d'intérêt (et donc du masque). Pour ce faire, comme décrit ci-dessus on effectue d'abord un auto-raffinement 3D pour obtenir une structure « consensus » de l'ensemble du jeu de données. Ensuite, on conçoit deux masques. Le premier masque est appliqué à la reconstruction issue de l'affinement du consensus, et les projections de cette reconstruction masquée sont soustraites de toutes les images de particules expérimentales de l'ensemble de jeu de données (Figure 42 panel de gauche). Cela permet d'obtenir un jeu de données d'images ne contenant que le signal de la zone d'intérêt à analyser. Cette démarche est possible avec l'outil « signal subtraction » du logiciel Relion 2.1. Il est important d'utiliser les orientations et les valeurs de CTF calculées à partir du modèle consensus. Le deuxième masque encapsule la région d'intérêt sur laquelle on effectuera une classification 3D masquée (et/ou un auto-raffinement 3D masqué) à partir des images expérimentales contenant que le signal de la tête (Figure 42 panel de droite). En outre, Le second masque comprend l'ensemble du complexe à l'exception de la région qui se trouve à l'intérieur du premier masque.

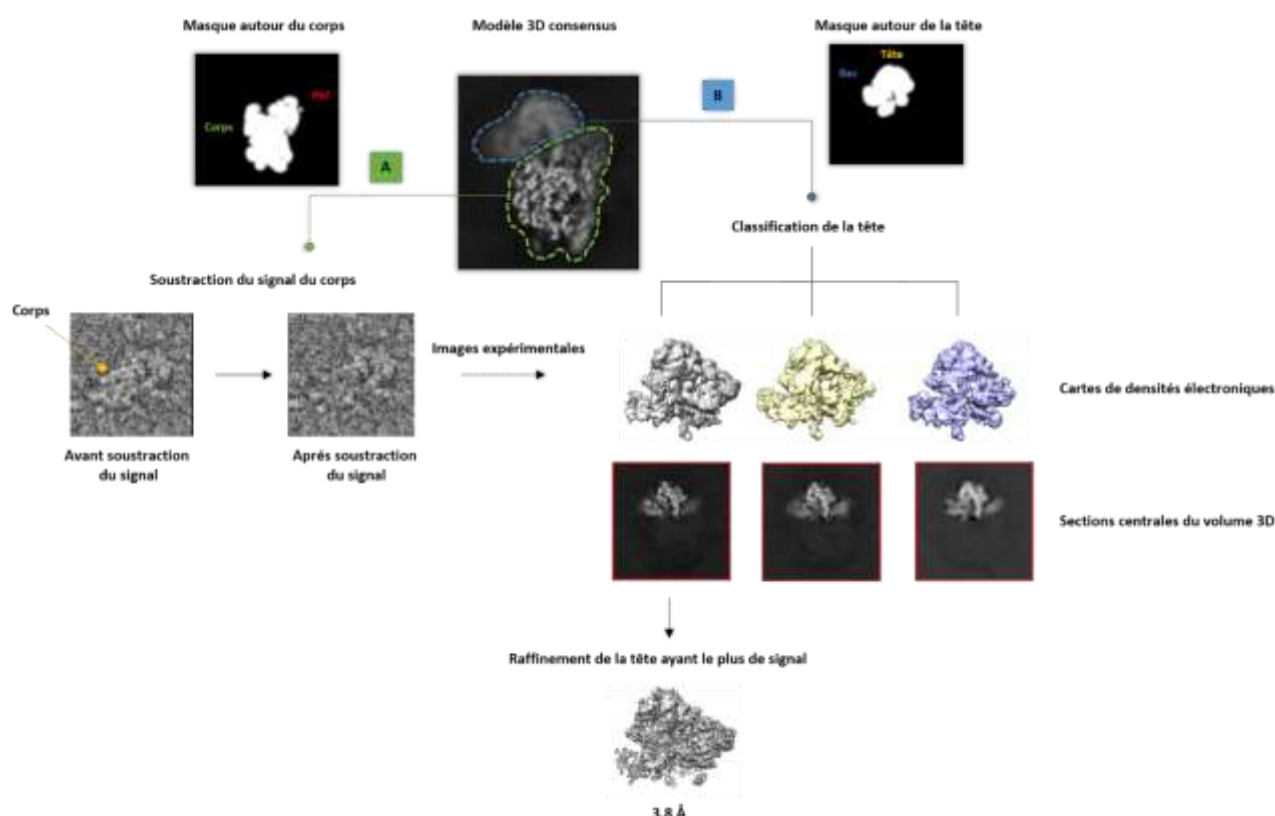


Figure 42. Exemple de raffinement de la tête des particules pré-ribosomiques dans une démarche de classification 3D avec soustraction du signal. Dans un premier temps (A) le signal correspondant au corps des particules est éliminé dans les images expérimentales. Les images soustraites sont utilisées pour une classification masquée autour de la tête. La tête ayant le plus de signal est raffinée à la plus haute résolution.

### D.3- Interprétation des cartes de densité : construction d'un modèle atomique :

Les reconstructions 3D, aussi appelées cartes de densité électronique sont visualisées avec le logiciel Chimera (Pettersen et al., 2004). Pour construire un modèle atomique dans nos cartes de densité, nous nous sommes basés sur des modèles pdb déjà existants structure cristallographique de petite sous-unité ribosomique mature de levure, pdb code 4V88, ou modèles cryo-EM de particules pré-40S de levure ou humaines, pdb codes respectifs 6FAI, 6EML, 6G5I). L'ajustement des modèles PDB dans la carte de densité électronique s'opère tout d'abord par rigid body docking (RBD) avec la commande « Fit in map » de Chimera. Le réarrangement manuel du modèle PDB dans la carte d'effectue ensuite avec le logiciel Coot (Emsley et al., 2004) et le raffinement des positions des atomes dans la carte se fait avec Refmac et/ou l'option RealSpaceRefine de Phenix (Afonine et al., 2018). Par ailleurs, des simulations dynamiques du modèle PDB dans la carte de densité électronique (flexible fitting) ont été réalisées à l'aide du logiciel MDFF (Molecular Dynamics Flexible Fitting) (Trabuco et al., 2008).

La qualité des modèles atomiques ainsi obtenus est évaluée avec MolProbity (chen et al., 2010) de la suite de programmes Phenix.

### D.4- Les ressources informatiques

L'ensemble des opérations effectuées en vue d'une détermination de structure 3D (classifications 2D et 3D, auto-raffinement...) nécessite de grandes capacités de calcul. Dans le cadre de ces travaux de recherche, les calculs ont été effectués sur EOS, le supercalculateur du mésocentre régional de de cœurs de Midi-Pyrénées (CALMIP). Le cluster de calcul dispose de 612 nœuds de calculs avec une mémoire de 64 Gb/nœud pour un nombre total de 12240 cores.

# Résultats



## Résultats

### I. Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques de levures (Tsr1-FPZ).

Au début de ma thèse, aucune structure haute résolution de particule pré-40S n'était disponible. Nous avons donc décidé d'étudier tout d'abord la structure de particules pré-40S de levure, dans un contexte « wild-type », en utilisant le cofacteur de maturation Tsr1 comme appât de purification. Ce CFM est en effet l'un de ceux qui permettent d'immunoprécipiter la plus grande quantité de pré-ARNr 20S (Léger-Silvestre et al., 2004).

#### A. Purification des particules Tsr1-FPZ

Toutes les études structurales réalisées sur des précurseurs cytoplasmiques de la petite sous-unité ribosomique, que ce soit procaryote ou eucaryote, ont démontré que ces particules ont une large hétérogénéité structurale et compositionnelle (Schäfer et al., 2006; Strunk et al., 2011; Larburu et al., 2016; Johnson et al., 2017; Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018; Ameismeier et al., 2018; Razi et al., 2017 ; Davis, 2017). Afin de réduire cette hétérogénéité, nous avons préparé des particules cytoplasmiques pré-40S selon 3 étapes de purifications distinctes. Nous avons utilisé le facteur de maturation Tsr1 comme appât (Tsr1-FPZ) {(Léger-Silvestre et al., 2004)}, et avons d'abord effectué une purification par affinité en tandem, suivie d'une étape de séparation physique des particules éluées sur un gradient de saccharose 10-30%. Le profil de sédimentation présenté sur la (Figure 43 A) montre que la majorité des particules pré-40S Tsr1-FPZ migrent sous la forme de sous-unités « libres » et présente un profil de sédimentation très similaire aux sous-unités ribosomiques matures (Figure 43 panneau supérieur). Un pic plus petit, correspondant à des fractions plus lourdes, indique que Tsr1-FPZ est également retrouvé dans des complexes plus grands, dont certains pourraient être des particules pseudo-80S (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012; Ghalei et al., 2017; Belhabich-Baumas et al., 2017). Les observations de MET après coloration négative ont confirmé que les particules des fractions plus légères avaient la taille et la forme globales des sous-unités 40S, tandis que les fractions plus lourdes révélaient des objets plus gros et plus ronds, de dimensions compatibles avec les particules de type pseudo-80S (Figure 43 A panneau inférieur).

**Figure 1**

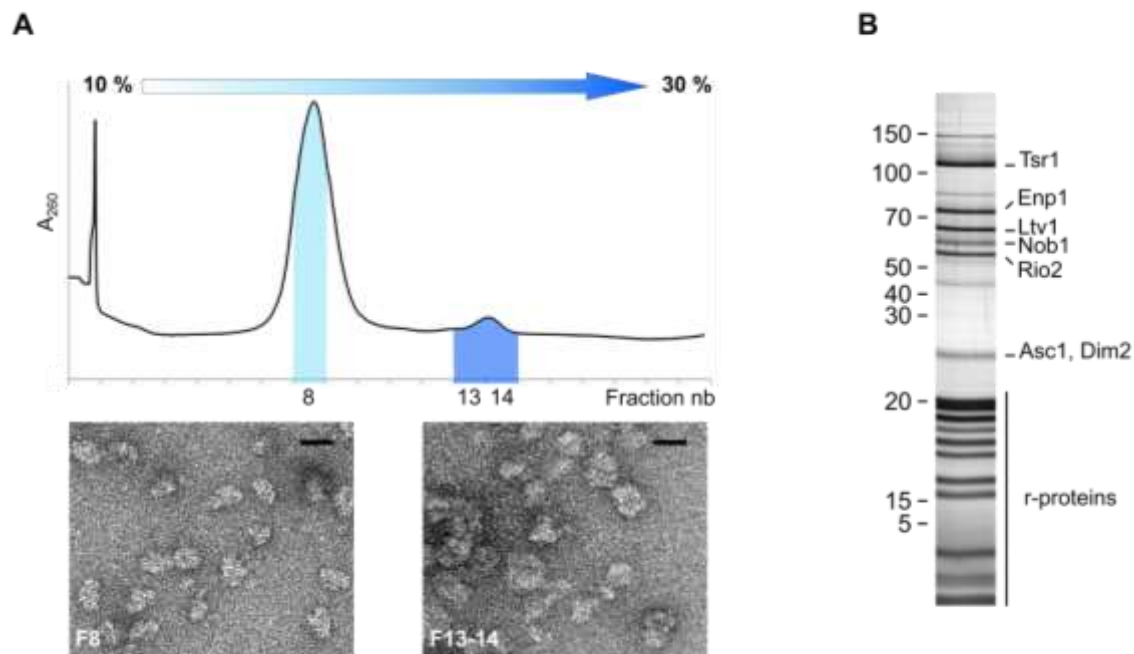


Figure 43. A) Profil de sédimentation et observation en coloration négative, des particules pré-40S Tsr1-FPZ. La fraction 8 correspond à des particules pré-40S libres et les fractions 13 et 14 comprennent des particules pseudo-80S. L'observation en MET, après coloration négative, des fractions F8 et F13/F14 est représentée sur la partie basse de la figure A. B) Analyse compositionnelle de la fraction F8 par SDS-PAGE.

Les particules pré-40S recueillies dans les fractions F8 du gradient (ci-après dénommées « particules pré-40S Tsr1-FPZ ») ont été analysées pour déterminer leur composition en protéines Par SDS-PAGE (Figure 43 B) et par des analyses protéomiques de type Bottom-up LC MS/MS (Figure 44). L'étude protéomique a été réalisée par Julien Marcoux (IPBS, Toulouse). Les particules pré-40S sont composées de toutes les RPS, y compris Asc1 / RACK1, sauf Rps26 et Rps31. De la même façon, Rps10 n'a été que partiellement détectée par les analyses protéomiques, ce qui suggère que l'association de cette protéine à la sous-unité pré-ribosomique est très labile à cette étape de maturation. Les cofacteurs de maturation Tsr1, Rio2, Enp1, Ltv1, Dim2 et Nob1 sont associés à ces particules pré-40S. L'analyse protéomique a également montré qu'Enp1 et Ltv1 pourraient héberger des résidus phosphorylés (sérines S172, S195, S196, S404 pour Enp1 et les sérines S460, S336, S339 pour Ltv1), et a révélé la présence de petites quantités de peptides Hrr25. Hrr25 est la kinase responsable de la phosphorylation de

Ltv1, qui est supposée déclencher la libération de Ltv1 des particules cytoplasmiques pré-40S {[Schäfer et al., 2006; Zemp et al., 2014; Ghalei et al., 2015]}. La présence de Ltv1 phosphorylée associée aux particules pré-40S de Tsr1-FPZ, ainsi que nos données structurales (voir ci-dessous) suggèrent que la phosphorylation de Ltv1 pourrait ne pas être immédiatement suivie de sa libération à partir de particules pré-ribosomiques, et que d'autres événements pourraient également être nécessaires à la dissociation de Ltv1.

Protein	MW (Th.)	IBAQ	BU modif
TSR1_YEAST	90976	3218800	
ENP1_YEAST	55217	7996800	
LTV1_YEAST	53358	4018600	
NOB1_YEAST	52052	1381800	
GBLP_YEAST	34898	1696900	
PNO1_YEAST	30331	5783300	
RIO2_YEAST	49379	4616900	
RSSA1_YEAST	28024,44	14069740	
RSSA2_YEAST	27962,46	14069740	
RS2_YEAST	27449,81	7452700	
RS3_YEAST	26502,75	5238800	
RS3A1_YEAST	28812,42	1905920	
RS3A2_YEAST	28743,36	1905920	
RS4A/B_YEAST	29410,19	9076000	
RS5_YEAST	25038,61	11072000	
RS6A/B_YEAST	26996,33	8755300	
RS7A_YEAST	21622,2	7768800	
RS7B_YEAST	21634,26	7768800	
RS8A/B_YEAST	22489,67	7733100	
RS9A_YEAST	22442,8		
RS9B_YEAST	22298,67	32754800	
RS10A_YEAST	12739,47		
RS10B_YEAST	12738,48		X
RS11A_YEAST	17748,85	7327900	
RS12_YEAST	15471,68	8196200	
RS13_YEAST	17028,9	8712300	
RS14A_YEAST	14536,61	4438600	
RS14B_YEAST	14649,73		
RS15_YEAST	16001,84	4972700	
RS16A/B_YEAST	15847,46	25408000	
RS17A_YEAST	15788,34	4125900	
RS17B_YEAST	15803,32		X
RS18A/B_YEAST	17037,58	12971000	
RS19A_YEAST	15917,11	13480000	
RS19B_YEAST	15891,07		X
RS20_YEAST	13907,05	9507300	
RS21A_YEAST	9745,84	4281800	
RS21B_YEAST	9759,87		
RS22A/B_YEAST	14626,04	4229000	
RS23A/B_YEAST	16037,8	9394800	15
RS24A/B_YEAST	15328,77	27589000	
RS25A_YEAST	12039,2		
RS25B_YEAST	12009,18	2576600	X
RS26A_YEAST	13504,8		X
RS26B_YEAST	13446,77		X
RS27A_YEAST	8879,37		X
RS27B_YEAST	8865,34	19941000	
RS28A_YEAST	7591,83	9799700	
RS28B_YEAST	7564,8	9799700	
RS29A_YEAST	6660,66	1484200	
RS29B_YEAST	6727,71		X
RS30A/B_YEAST	7118,48	4705500	
RS31_YEAST	17216,12		X

Figure 44. Analyses protéomique de la F8, contenant les particules pré-40S libre, par spectrométrie de masse de type Bottom-up (BU). En rose sont indiqués les CFM associés aux particules pré-40S. Les protéines indiquées en vert ont été détectées en bottom-up. Le poids moléculaire est indiqué par (MW) et le nombre de peptides détecté est représenté par IBAQ.



Les analyses de spectrométrie de masse n'ont pas révélé la présence de Dim1 et de Rio1, qui sont des CFM retrouvés respectivement aux étapes de maturation cytoplasmique précoces et tardives de la petite sous-unité ribosomique. L'ensemble de ces résultats indique que, en utilisant Tsr1-FPZ comme appât, nous avons purifié des particules cytoplasmiques pré-40S à une étape de maturation cytoplasmique intermédiaire.

## B. Analyse structurale des particules pré-40S Tsr1-FPZ par Cryo-EM :

### B.1 Acquisition d'images au NeCEN

Afin de mieux décrire les événements de remodelage se produisant dans les particules pré-40S cytoplasmiques, nous avons effectué une analyse par cryo-EM des particules pré-40S Tsr1-FPZ. Pour cela, nous avons tout d'abord acquis des images sur le cryo-microscope Titan Krios 2 du NeCEN (Netherlands Center for Nanoscopy, Leiden, Pays-Bas), alors équipé d'un détecteur direct d'électron de type Falcon II (FEI). J'ai analysé ces images avec Relion 1.3, et ai obtenu des reconstructions 3D ne dépassant pas 6 Å de résolution, et ce malgré de nombreux essais de classification 3D masquées, avec ou sans soustraction de signal (cf. Figure 45).

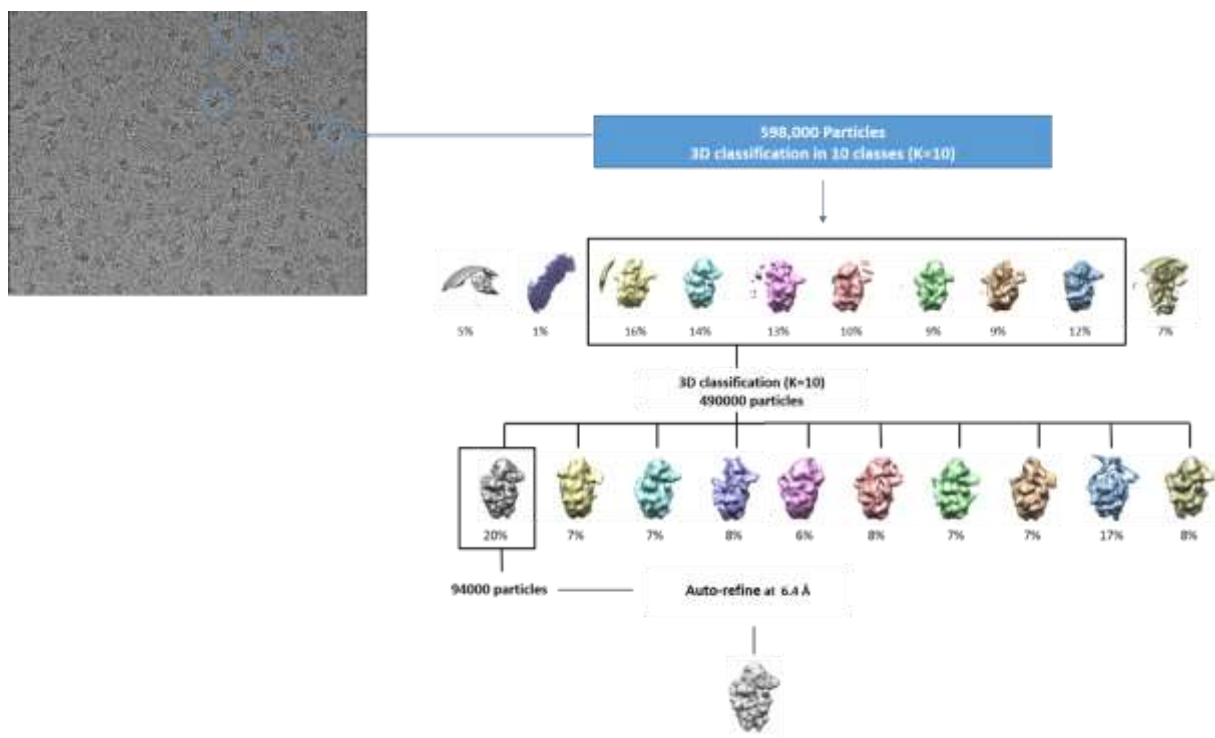


Figure 45. Schéma récapitulatif des grandes étapes de l'analyse d'images des particules Tsr1-FPZ. Les classifications 3D ont permis l'obtention d'une structure 3D consensus à une résolution de 6,4 Å.

## B.2 Acquisition d'images à l'ESRF

La publication, en Novembre 2017 puis en Janvier 2018 de deux structures de particules pré-40S cytoplasmiques de levure à des résolutions quasi-atomiques (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018) a rendu nos structures 3D caduques, du fait de leur trop basse résolution. Nous avons alors décidé de ré-enregistrer des images de nos particules pré-40S Tsr1-FPZ sur le Titan Krios CM01 de l'ESRF (Grenoble), qui est équipé d'un autre type de détecteur direct d'électrons, la caméra K2 summit (Gatan). Dans la suite de ce manuscrit, je ne détaillerai que l'analyse des particules imagées à l'ESRF, car ces images m'ont permis d'atteindre des résolutions quasi-atomiques.

### B.2.1 Analyse d'images par classification « globale »

Dans un premier temps, j'ai réalisé une analyse d'images « globale », sans imposer de masque sur un domaine particulier des particules d'intérêt (*Figure 46*). Cette analyse globale m'a permis d'obtenir une structure 3D « consensus », avec une résolution de 3,1 Å (*Figure 46 et Figure 47*).

L'inspection des sections centrales du volume 3D ainsi que les mesures de la résolution locale a confirmé que le corps de la particule est extrêmement bien résolu, avec des zones allant jusqu'à 2.9 Å de résolution (*Figure 47 B*) et présente donc peu de flexibilité ou de variabilité. Le corps de la particule est très semblable à celui des petites sous-unités ribosomiques matures. Une différence notable est la position du haut de l'hélice 44 de l'ARNr, qui semble détaché du corps dans la particule pré-40S (*Figure 48 A et B*).

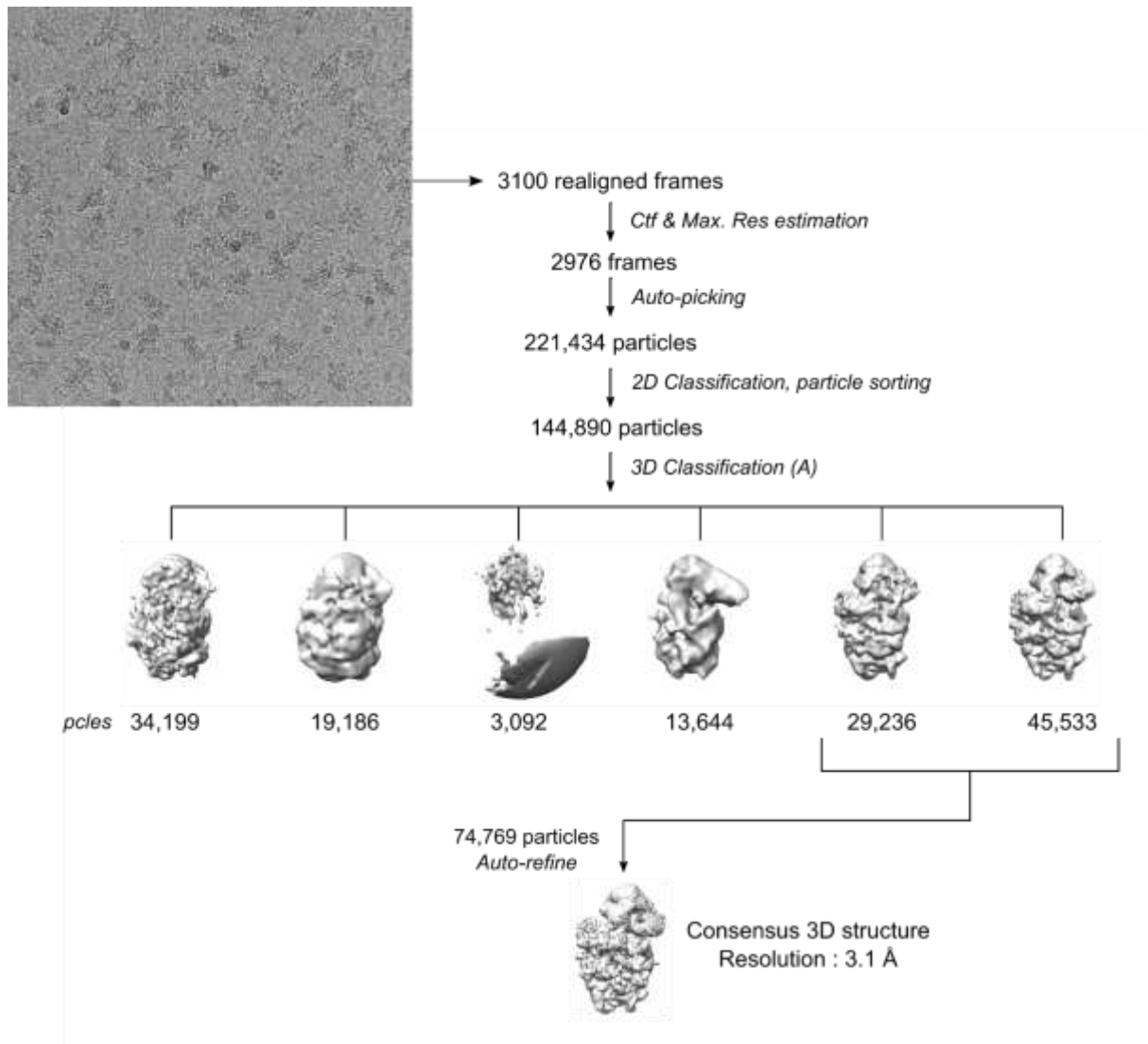


Figure 46. Schéma récapitulatif des grandes étapes de l'analyse d'images des particules Tsr1-FPZ. La classification 3D (A) a permis l'obtention d'une structure 3D consensus à une résolution de 3,1 Å

La tête semble beaucoup plus floutée que le corps, ce qui suggère un degré élevé d'hétérogénéité structurale. Pour évaluer ce phénomène, nous avons tout d'abord effectué des tests de classification 3D globaux des particules composant la structure 3D consensus (cf. Figure 49), sans imposer de masque sur une région particulière de la particule.

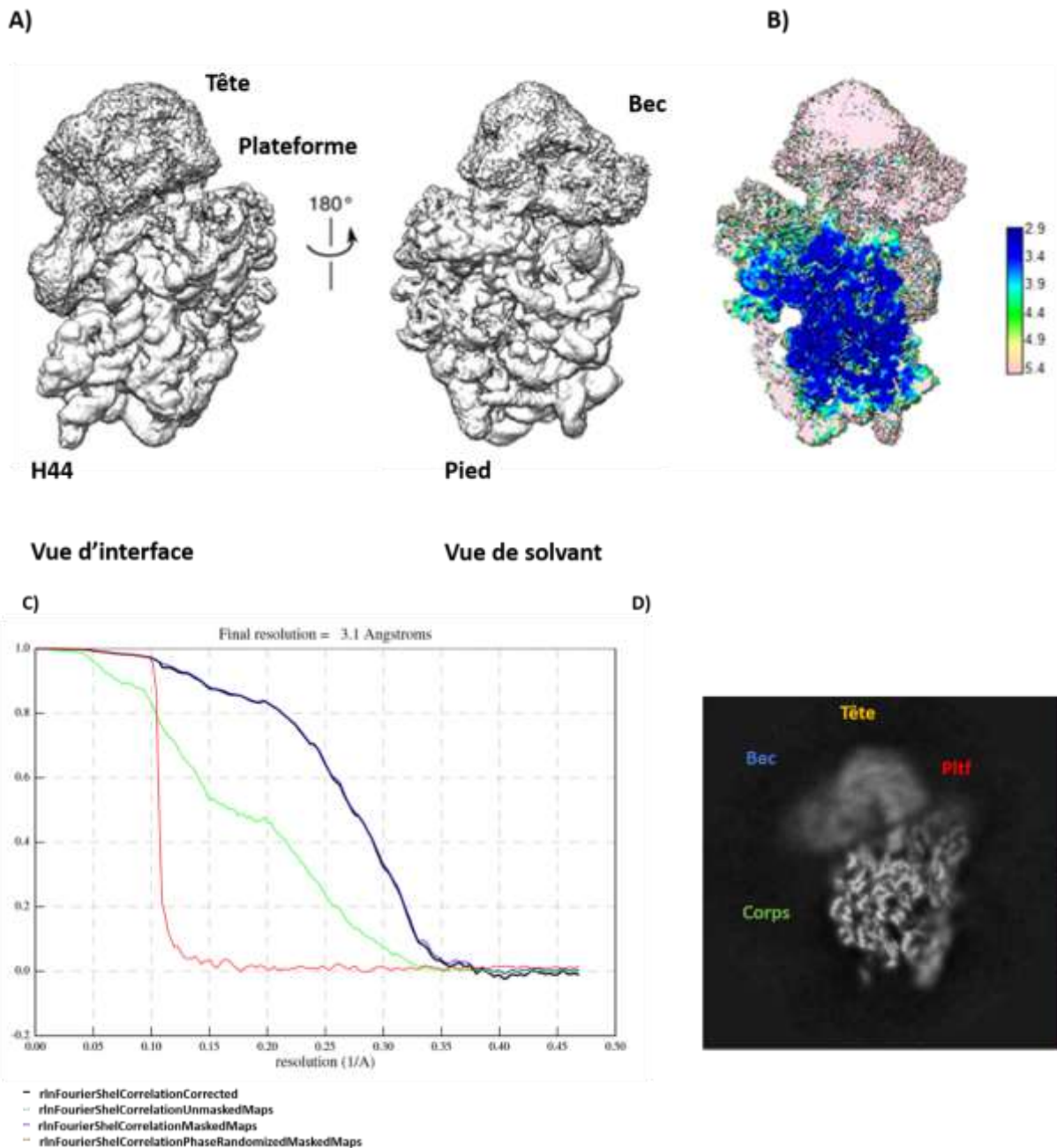
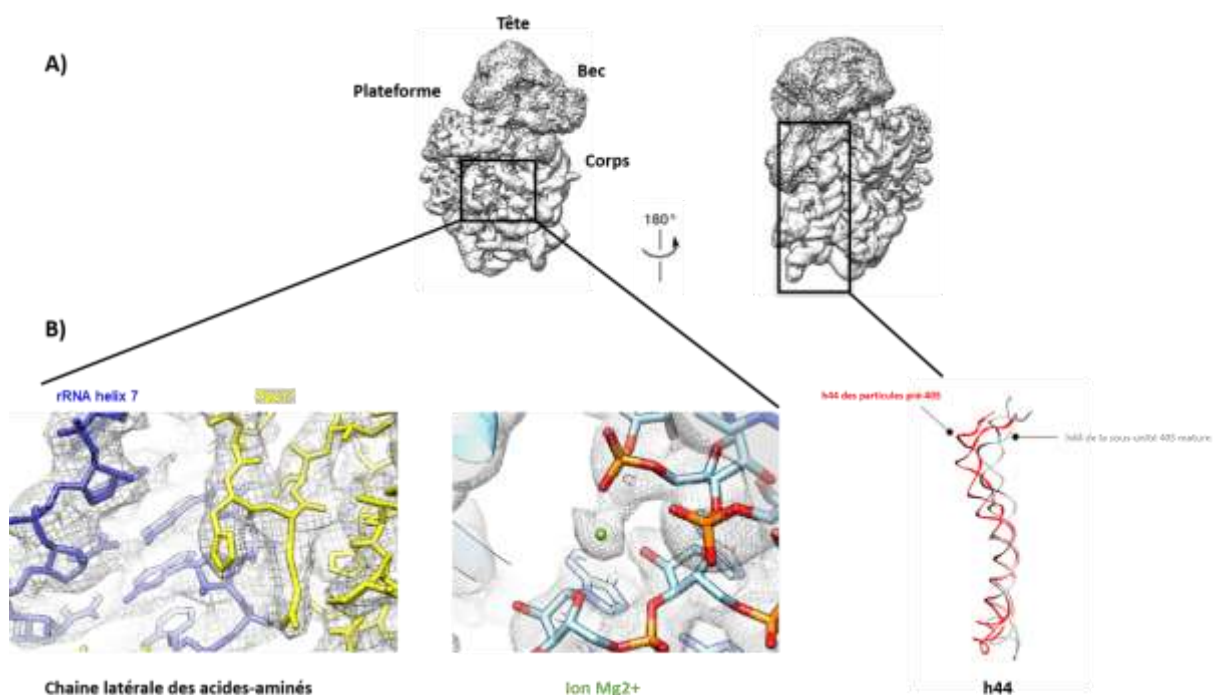


Figure 47. **A)** Carte de densité électronique des particules pré-40S Tsr1-FPZ, en vue de l'interface et vue de solvant. **B)** Détermination local de la résolution. **C)** Détermination de la résolution selon la FSC Gold Standard de Relion. **D)** Section centrale du volume 3D en vue de l'interface.

Ces expériences ont donné 3 structures 3D majoritaires (nommées K2, K3 et K4) avec des résolutions comprises entre 3,4 et 3,9 Å (Figure 49). La comparaison des 3 classes 3D n'a montré aucune variation de la région du corps. Ceci est en parfaite adéquation avec le fait que dans la structure 3D consensus, le corps est déjà la partie là mieux résolue de la particule.

D'autre part, Tsr1 et Rio2 adoptent dans toutes les trois classes 3D K2 à K4 un positionnement stable, sur le côté en interface avec la particule 60S.

L'arrière de la tête de la particule présente également très peu de variabilité. De manière frappante, seule la classe K2, correspondant à ~26 % des particules, affiche au niveau du bec une densité suffisante pour accommoder Enp1 et Ltv1 (classe K2 sur la Figure 49), tandis que les deux autres classes arborent un bec beaucoup plus flouté, difficilement interprétable.



Les classes K2 et K3 (représentant 57% des particules analysées) ont une plateforme bien définie, avec des caractéristiques claires pour Rps1, Rps14, Dim2 et l'hélice h23 de l'ARNr, tandis que la classe K4 affiche une plate-forme totalement floutée (Figure 49).

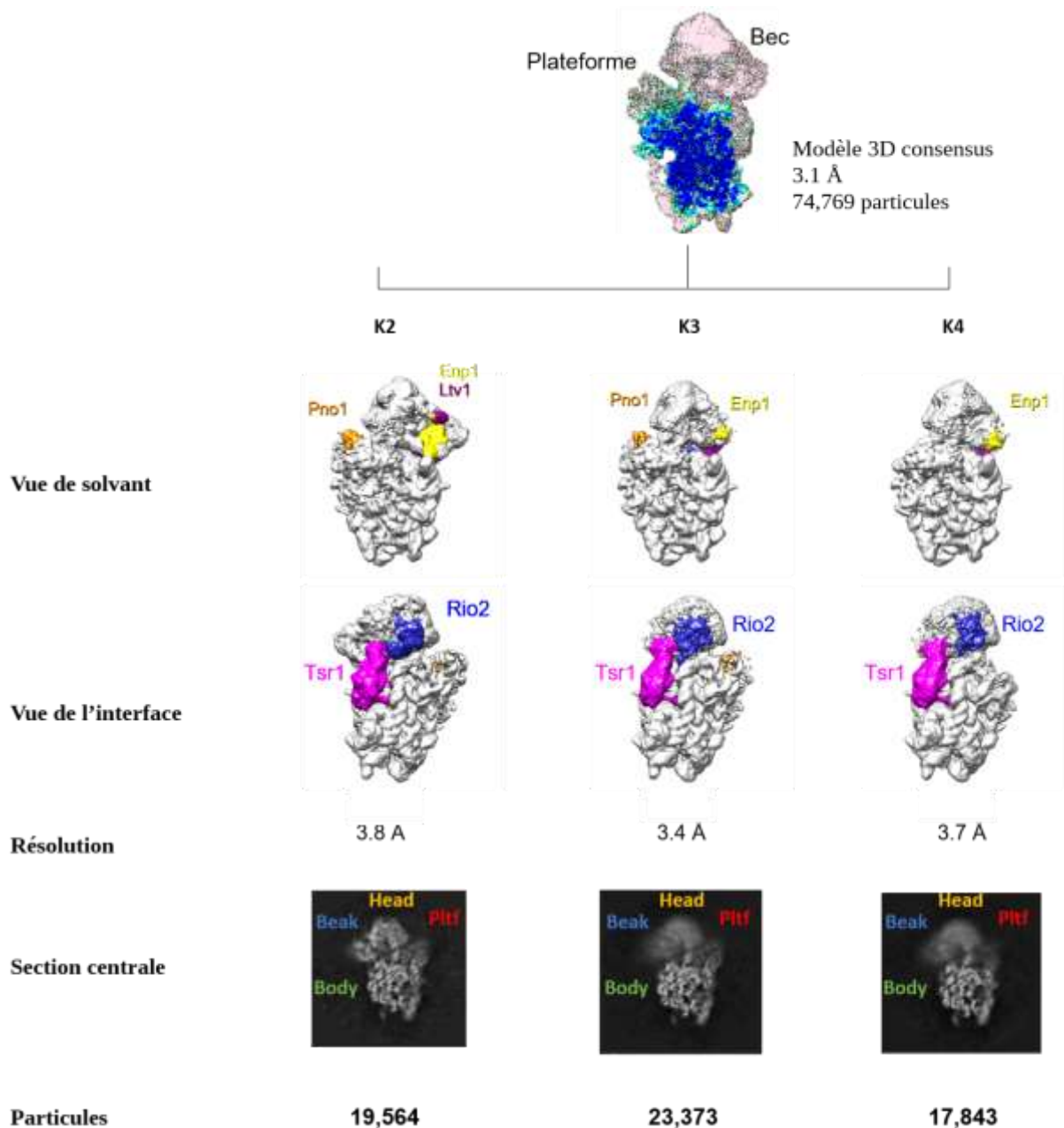


Figure 49. Schéma représentant les variant structuraux K2, K3 et K4 issus de la classification 3D globale (B), du modèle consensus Tsr1-FPZ. Les densités supplémentaires attribuées aux CFM sont colorées de manière suivante : Enp1 (Jaune), Ltv1 (violet), Tsr1 (rose), Rio2 (bleu) et Dim2 (orange). La section centrale, en vue de l'interface, de chaque modèle est représentée sur la partie basse de la figure. Les caractéristiques des particules pré-40S sont indiquées sur les sections centrales : Bec, Plateforme, tête et le corps.

### B.2.2 Analyses d'images par classification localisée

Cette analyse par classification globale a renforcé l'idée que la tête (et plus particulièrement le bec) et la plateforme de ces particules pré-40S sont particulièrement dynamiques. Par exemple, le manque de définition de la tête est vraisemblablement dû au

mouvement de « swivel », c'est à dire au pivotement intrinsèque bien connu de la tête par rapport au corps des particules de la sous-unité 40S (Ratje et al., 2010). De plus, comme RELION exécute ses alignements sur le plus grand domaine des particules imagées (ici le corps de la particule pré-40S, qui représente approximativement 2/3 de la particule pré-40S), il en résultera un mauvais alignement c'est-à-dire un flou des domaines mobiles autour de ce domaine majoritaire.

Pour aller plus loin, et afin de tenter de mieux interpréter ces régions, nous avons entrepris une analyse localisée de ces régions flexibles par classification ou auto-raffinement masqués, avec ou sans soustraction du signal (voir Matériel et Méthodes). Ainsi, nous avons effectué des classifications locales de la tête et de la plateforme et utilisé deux méthodes: **(1)** nous avons utilisé des « classifications masquées », pour lesquelles nous avons appliqué un masque autour de la région d'intérêt (pour exemple la tête), sans réaliser d'alignement des particules. Ensuite nous avons effectué un auto-raffinement et d'un post-traitement de chacune des classes générées; **(2)** Nous avons effectué des classifications localisées avec soustraction de signal. Dans ce cas, nous avons soustrait le signal correspondant au corps de la particule et avons effectué des classifications 3D sans alignement, suivies d'un auto-raffinement et d'un post-traitement de la tête, ou de la plateforme seuls (Scheres, 2016).

Les différentes analyses localisées que j'ai réalisées sont présentées sur la (Figure 50).

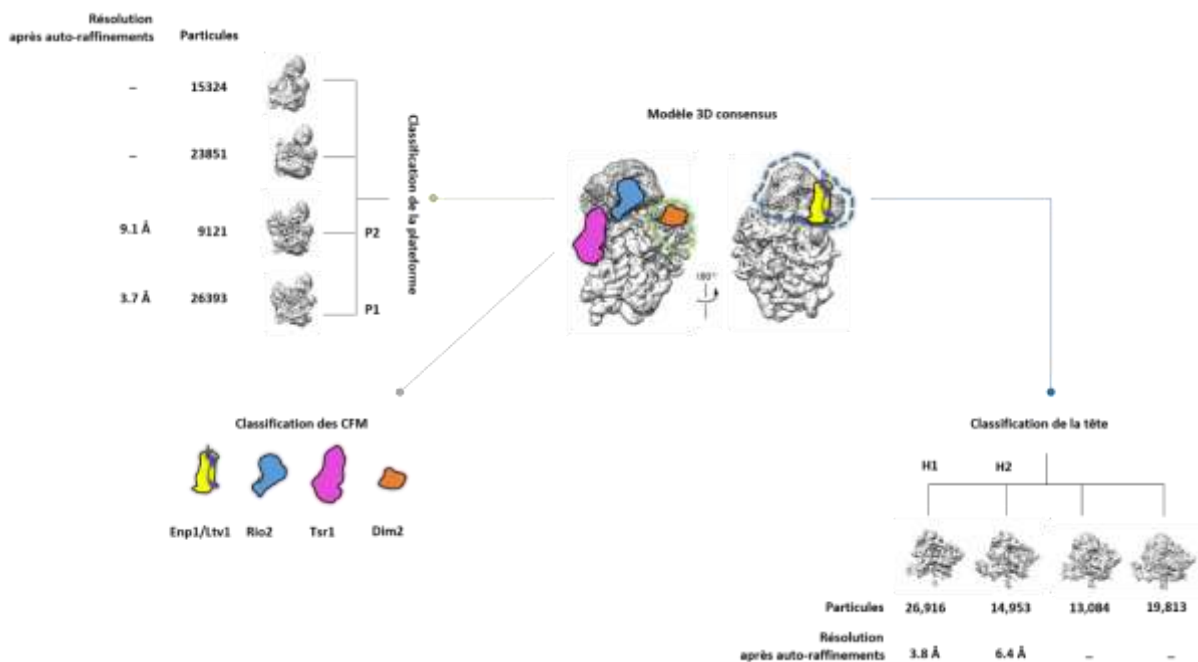


Figure 50. Analyse localisée de la tête, du corps, de la plateforme et des CFM, par classification/Auto-raffinement masqué avec ou sans soustraction du signal. La tête et la plateforme sont procédées par classification 3D masqué avec soustraction du signal. La classification 3D masqué pour les CFM (densité de taille plus petite) est effectué sans soustraction du signal.

### B.2.2.1 Analyse structurale de la tête des particules pré-40S : de structuralement stable à flexible

Quel que soit le type d'analyse localisée effectuée (avec ou sans soustraction de signal), ces expériences focalisées sur la tête ont donné des cartes de densité électroniques similaires, révélant au moins deux, voire trois types de structures 3D distinctes (Figure 51). Les expériences avec soustraction de signal ont donné les structures les mieux résolues et seront présentées ci-après (Figure 52).

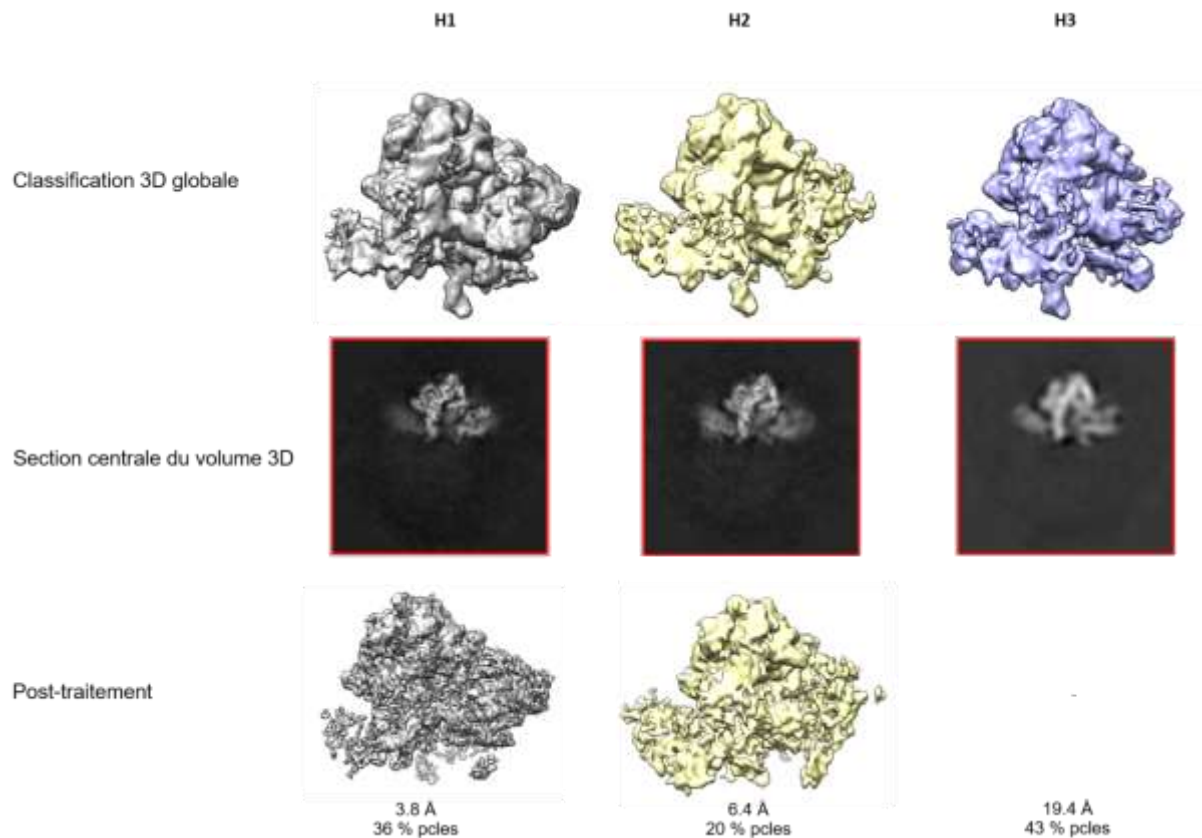


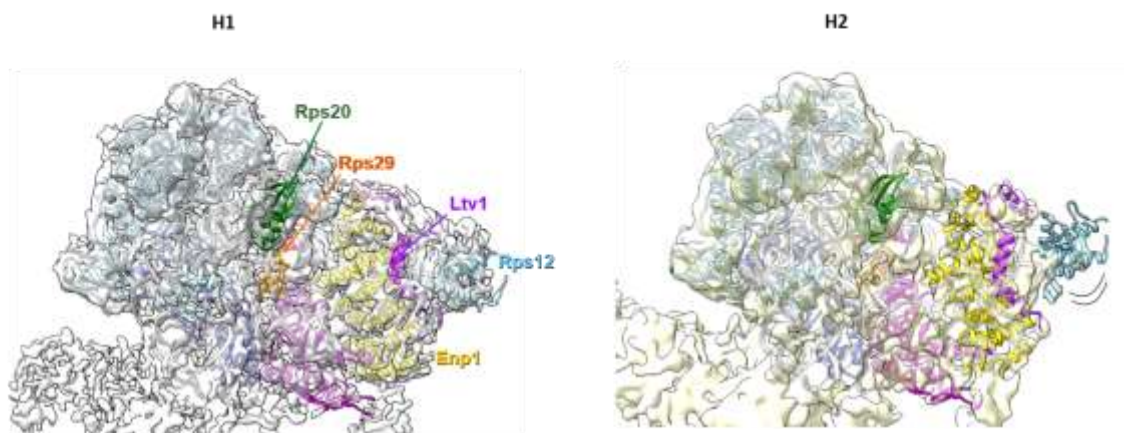
Figure 51. Classification masquée sur la tête des particules pré-40S Tsr1-FPZ (avec soustraction de signal). De haut en bas : les cartes de densités électroniques issues de la classification 3D masquée, les sections centrales du volume 3D de chaque classe et les modèles après post-traitement. Trois classes, nommées H1, H2, H3 cohabitent dans les images expérimentales dont deux ont pu être affinées à une résolution de 3,8 Å et 6,4 Å respectivement. La classe H3 étant très hétérogène et dynamique, les images ne peuvent pas être alignées et par conséquent cette classe n'a pas été raffinée.

La première classe 3D, représentant 36 % des particules et ci-après appelée H1, a été obtenue à une résolution de 3,8 Å. Afin d'interpréter cette carte de densité, nous avons utilisé le modèle atomique de particule pré-40S publié par l'équipe de Nenad Ban (Scaiola et al., 2018 ; numéro d'accèsion pdb : 6FAI). Nous avons ajusté ce modèle dans notre carte de densité,



d'abord par rigid body docking en utilisant le logiciel Chimera, puis manuellement avec le logiciel Coot (voir Matériel et Méthodes). Ceci nous a permis de voir que notre carte de densité est très similaire au modèle publié. Ainsi, les acides aminés 205 à 466 de Enp1 et deux hélices de Ltv1 comprenant les acides aminés 395 à 405 puis 364 à 383 ont clairement pu être positionnés sur le bec. La partie résolue de Ltv1 forme une structure allongée sur toute la longueur de Enp1, s'étendant vers l'interface 60S sur la pointe du bec de la particule pré-40S (Figure 52, panels de gauche). Sur la base d'analyses par spectrométrie de masse, la densité fragmentée sur la pointe du bec a été attribuée à Rps12 (eS12), qui pourrait ne pas être complètement stabilisée à cette étape de maturation de la petite sous-unité ribosomique.

A)



B)

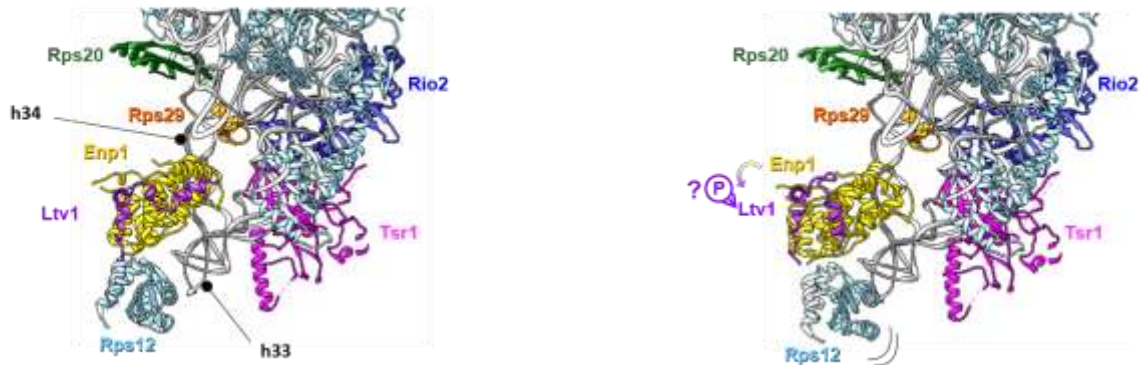


Figure 52. Analyse structurale des classes H1 et H2 issus de la classification masquée autour de la tête. En A) le modèle PDB: 6FAI (Scaiola et al., 2018) est ajusté par RBD et manuellement (par Coot), dans les cartes de densités électroniques H1 et H2, observées sur une vue de solvant. En B) les modèles atomiques de chaque classe observée sur une vue de dessus. La comparaison des deux modèles permet de constater une position ouverte du CFM Enp1, un déplacement du domaine C-ter (l'hélice comprenant les acides aminés 395 à 405) de Ltv1 et une flexibilité de Rps12 dans la classe H2. Les hélices 33 et 34 formant le bec des particules pré-40S sont indiqués par h33 et h34.

Comme dans les structures de particules pré-40S publiées précédemment, les hélices h33 et h34 de l'ARNr sont déplacées par rapport à leurs positions matures et adoptent une conformation plus ouverte. Une grande partie de S29 (acides aminés 20 à 41) et un petit fragment (N-terminal) de S20 pourraient être positionnés sans ambiguïté à côté des hélices d'ARNr h39 et h41 (composants de la tête) respectivement, alors qu'aucune densité nette ne pourrait être attribuée à la présence de Rps3, malgré sa détection en spectrométrie de masse. Ceci suggère que, bien qu'elles soient associées à la formation de pré-40S à cette étape de maturation, la stabilisation de S20 et S29 est incomplète, et n'a pas encore eu lieu pour Rps3.

Les classifications focalisées avec soustraction de signal de la tête ont donné une deuxième classe 3D (appelée H2), englobant 20% des particules raffinées à une résolution inférieure (6,4 Å). Pour interpréter cette carte, nous avons effectué un Rigid Body Docking du modèle atomique dérivé de la classe 3D H1, suivi d'un repositionnement manuel du bloc Enp1 / Ltv1 avec l'aide du logiciel Coot (Emsley et al., 2010). En effet, Enp1, qui reposait sur les hélices 33 et 34 des ARNr dans la classe 3D H1 et les autres modèles atomiques disponibles (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018), adopte maintenant une position plus détachée. En outre, l'hélice composée des acides-aminoés 395 à 405 de Ltv1 s'est déplacée de 34 Å par rapport à l'hélice h33 de l'ARNr, pour adopter une structure en pince (Figure 52 B, panel de droite). Sur la base de nos données de spectrométrie de masse ainsi que d'autres études biochimiques et fonctionnelles, nous nous proposons que ce repositionnement du module Enp1 / Ltv1 soit un effet de leur phosphorylation par la kinase Hrr25 (voir la discussion).

#### B.2.2.2 Une « vibration » de la plateforme?

Pour mieux caractériser l'hétérogénéité structurale de la plateforme, nous avons utilisé la même double approche de classification locale que celle décrite ci-dessus pour la tête.

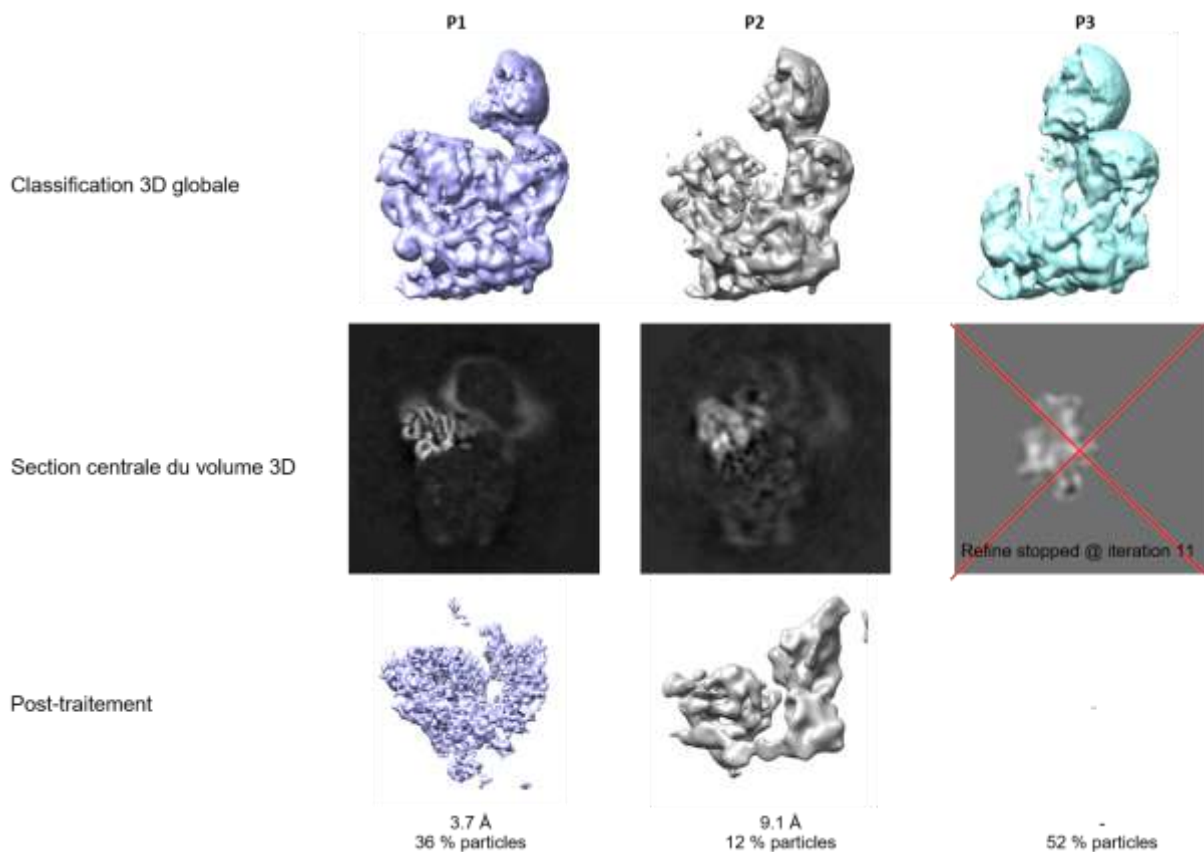


Figure 53. Classification masquée sur la plateforme des particules pré-40S Tsr1-FPZ. De haut en bas : les cartes de densités électroniques provenant de la classification 3D masquée, les sections centrales du volume 3D de chaque classe et les modèles après post-traitement. Trois variants structuraux, nommés P1, P2, P3 cohabitent dans les images expérimentales dont deux ont pu être affinées à une résolution 3,7 Å et 9,1 Å respectivement. La classe P3 étant très hétérogène et dynamique, les images ne peuvent pas être alignées et par conséquent cette classe ne peut être raffiner.

Les classifications masquées avec soustraction de signal (cf. Figure 53) ont donné une classe (P1) avec une résolution de 3,7 Å, comprenant sans ambiguïté Rps1, Rps14, l'hélice h23 de l'ARNr et Dim2 reposant sur le site D, c'est-à-dire l'extrémité 3' de l'ARNr (Figure 53 et Figure 54 panel de gauche). Comme pour les autres structures existantes de levure pré-40S, Nob1, qui est connu pour interagir directement avec Dim2, n'a pas pu être positionné sur le domaine de la plate-forme (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018). De même, la région ITS1 du pré-ARN 20S constituée de 200 nucléotides après le site D, n'a pas pu être vue sur cette structure, ce qui suggère sa grande flexibilité.

Une seconde classe (P2) représentant approximativement 12% de la population (Cf. Figure 53) présente des caractéristiques structurales bien définies pour les Rps0, Rps17 et l'hélice h40 de l'ARNr, tandis que le domaine formé par Rps1, Rps14 et l'hélice h23 de l'ARNr 18S était plus flou, indiquant l'instabilité structurale de cette région (Figure 54 panel de droite). Une

troisième classe (P3), représentant 52% des particules, n'a pas pu être affinée du tout avec cette approche; ceci est dû au fait que Relion n'a pas pu aligner la plateforme de ces particules entre elles. Nous attribuons ce phénomène à une très grande flexibilité de la zone étudiée pour cette classe de particules. En effet, il est peu probable que ce domaine de la plateforme se détruise, ou que ses composants se détachent totalement de la particule pré-40S. Les données de spectrométrie de masse, même si elles ne sont que semi-quantitatives, n'indiquent pas de sous-stœchiométrie de Rps1, Rps14 ou Dim2 par rapport à d'autres RPS de masse équivalente. Nous pensons donc que cette perte de densité correspond à un phénomène de « vibration » du module de la plateforme formée par ces protéines et l'hélice h23 de l'ARNr.

De manière similaire, les classifications masquées sans soustraction de signal ont donné 3 classes où le domaine formé par Rps1, Rps14 et l'hélice d'ARNr 23 et Dim2 / Pno1 était soit complètement structuré, soit partiellement ou totalement absent de la plateforme. L'ensemble de ces analyses suggère qu'après une étape de maturation où la plate-forme est structuralement stable, un signal de nature inconnue déclenche sa vibration, qui pourrait être nécessaire dans les dernières étapes de maturation de la particule pré-40S (voir la discussion).

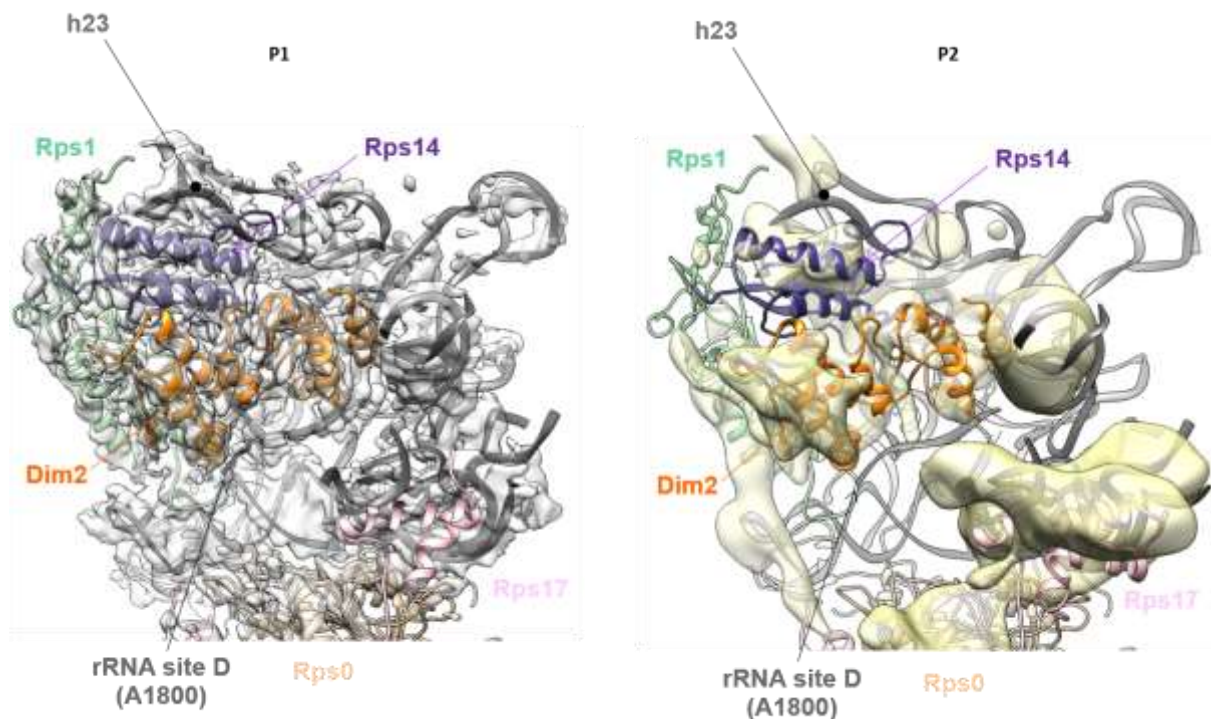


Figure 54. Analyse structurales des classes P1 et P2 issus de la classification masquée autour de la plateforme. Le modèle PDB: 6FAI (Scaiola et al., 2018) est ajusté par RBD puis manuellement dans les cartes de densités électroniques P1 et P2. La classe P1 est caractérisée par une plateforme où Rps1, Rps14, Dim2 et l'hélice h23 de l'ARNr sont très bien résolus. La classe P2 est beaucoup moins résolue pour ce domaine.

### B.2.2.3 Trois étapes de maturations successives

La classification 3D globale des particules Tsr1-FPZ a révélé la co-existence de 3 types de structures 3D parmi celles-ci (cf. partie B.2.1). D'autre part, les analyses par classification 3D masquées (avec et sans soustraction de signal) nous ont permis de décrire 2 types de conformations de la tête, et 3 types de conformation de la plateforme (cf parties B.2.2.1 et B.2.2.2). Afin de mettre en évidence d'éventuels changements conformationnels de chacun des CFM, j'ai également effectué des classifications 3D masquées (suivies des étapes d'auto-refine et de post-traitement) comme suit : (1) Sans imposition d'alignement, en appliquant un masque autour de chaque CFM. (2) une classification 3D, sans alignement, en appliquant deux masques correspondant à deux CFM distincts (cf. Figure 50).

Ces expériences n'ont pas révélé de changements significatifs pour Rio2 et Tsr1, contrairement à ce qui avait été proposé dans une étude précédente, à plus basse résolution (Johnson et al., 2017). Cependant, là encore, j'ai systématiquement observé 3 classes structurales différentes, similaires à celles obtenues par classification globale, mais en augmentant localement la résolution de la région d'intérêt. Ces données m'ont permis de mettre en lien les trois conformères de la plateforme avec les deux états structuraux distincts de la tête. Ainsi, les particules ayant la tête la plus stablement structurée (état similaire à H1, comprenant Enp1 et Ltv1 en position « canonique ») ont également une plateforme très stable (correspondant à l'état P1, avec Rps1, Rps14, Dim2 et h23 de l'ARNr clairement définis). Ensuite, les particules où le bec est moins stable (état similaire à H2) se subdivisent en deux populations : l'une où la plateforme est partiellement stable (état P2), et l'autre où la plateforme est déstabilisée (comme dans l'état P3) (Figure 49).

## C. Discussion

### C.1 Composition des particules pré-40S Tsr1-FPZ étudiées

Nous avons entrepris une étude structurale de particules pré-40S de levure, purifiées en utilisant le CFM Tsr1 comme appât. L'analyse protéomique réalisée par Julien Marcoux (IPBS Toulouse) a révélé que ces précurseurs de la petite sous-unité ribosomique sont composés de la totalité des protéines ribosomiques, excepté Rps10, Rps26 et Rps31. Nos expériences de cryo-EM montrent des zones de densité fragmentée au niveau de la tête et du bec des particules, là

où Rps3, Rps20 et Rps29 seront positionnées dans la petite sous-unité ribosomique mature. Ainsi, contrairement à ce qui a été proposé précédemment (Heuer et al., 2017), ces trois protéines seraient bien associées aux particules pré-ribosomiques cytoplasmiques que nous avons purifiées, cependant leur position n'est pas encore stabilisée.

De plus, les particules Tsr1-FPZ comprennent les CFM Tsr1, Enp1, Ltv1, Rio2, Dim2, et Nob1. Par ailleurs la présence en faible quantité de la kinase Hrr25 indique que Enp1 et Ltv1 pourraient être phosphorylées dans ces particules. Ceci est confirmé par les données de bottom-up MS (cf. ci-dessous). Le CFM Dim1 n'est détecté que partiellement, indiquant une association dynamique de cette protéine à cette étape de maturation. L'ensemble de ces données montrent qu'en utilisant Tsr1 comme appât, nous avons bien purifié des particules cytoplasmiques pré-40S à une étape de maturation cytoplasmique intermédiaire. Notre étude est donc la première étude menée chez la levure pour décrire la structure 3D de particules pré-40S purifiées à ce stade de maturation.

## C.2 Le bec et la plateforme passent d'un état structuralement stable à un état dynamique/vibrationnel:

L'étude structurale des particules pré-40S par cryo-EM nous a permis d'obtenir un premier modèle consensus des particules Tsr1-FPZ à une résolution de 3,1 Å. Cette structure a révélé une dynamique importante dans les régions de la tête et de la plateforme, contrairement au corps, qui est stablement structuré et dans un état quasi-mature. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature, mais par des approches indirectes. En effet, plusieurs études impliquant la délétion systématique de protéines ribosomiques montrent que le bec et la plateforme des particules pré-40S se forment dans les dernières étapes de maturation de la petite sous-unité ribosomique (Ferreira-Cerca et al., 2007 ; O'Donohue et al., 2010). D'autres études, menées sur la structure secondaire de l'ARNr afin de tester leurs sensibilités aux réactions chimiques (« chemical probing ») montrent que les CFM Tsr1, Rio2, Ltv1, et Enp1 permettent le maintien du domaine 3' de l'ARNr (la tête) dans une conformation flexible (Hector et al., 2014).

Afin de pouvoir mieux les caractériser, nous avons ensuite réalisé des analyses localisées de ces zones dynamiques. Cette démarche a révélé la présence d'au moins deux conformations différentes pour la tête et trois états distincts pour la plateforme. Ces deux domaines semblent en effet passer d'un état structuralement stable et bien résolu à un état beaucoup plus dynamique, donc mal résolu (Figure 55). Concernant la tête, l'état H1 se caractérise par une

association stable des CFM Enp1/Ltv1, et une conformation « ouverte » des hélices h33 et h34 du pré-ARNr comparée à leur position mature. Cette conformation a été précédemment décrite dans la littérature, pour des particules pré-40S purifiées à un stade cytoplasmique précoce dans des souches de phénotype sauvage (Heuer et al., 2017) ou mutées pour l'activité endonucléase Nob1 (Scaiola et al., 2018). Ceci nous permet de proposer qu'une partie des particules pré-40S que nous avons purifiées sont dans un état cytoplasmique précoce. Nos analyses de classification 3D globales indiquent que cet état structural représente 26 % des particules purifiées.

La deuxième conformation (H2), plus flexible pour le bec, présente une configuration « ouverte » du CFM Enp1 par rapport à l'hélice h33 du pré-ARNr et un changement de conformation de l'hélice du domaine C-ter de Ltv1. Dans le troisième état (vu dans nos analyses localisées sans soustraction de signal), nous n'avons que des densités très fragmentées pour toute la zone du bec (Enp1, Ltv1, Rps12 et h33 du pré-ARNr 20S).

En intégrant les données de spectrométrie de masse à nos données structurales, nous faisons l'hypothèse que cette déstabilisation progressive du bec soit induit par la phosphorylation de Enp1/Ltv1 par la kinase Hrr25. En effet, les données de MS révèlent une faible quantité du CFM Hrr25 avec une phosphorylation partielle de Ltv1 sur les résidus sérine 336, 339 et 460. Cette étape de phosphorylation est requise pour la dissociation et le recyclage de Enp1 et Ltv1 des particules pré-40S (Ghalei et al., 2015 ; Mitterer et al., 2016). Nos données structurales nous permettent de proposer que le changement de conformation et/ou la dissociation d'Enp1 et Ltv1 entraîne la flexibilité/vibration du bec de la particule pré-40S. Ces deux CFM joueraient donc bien un rôle de stabilisateur structural du bec des particules pré-40S, comme proposé dans les études précédentes (Strunk et al., 2011 ; Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018).

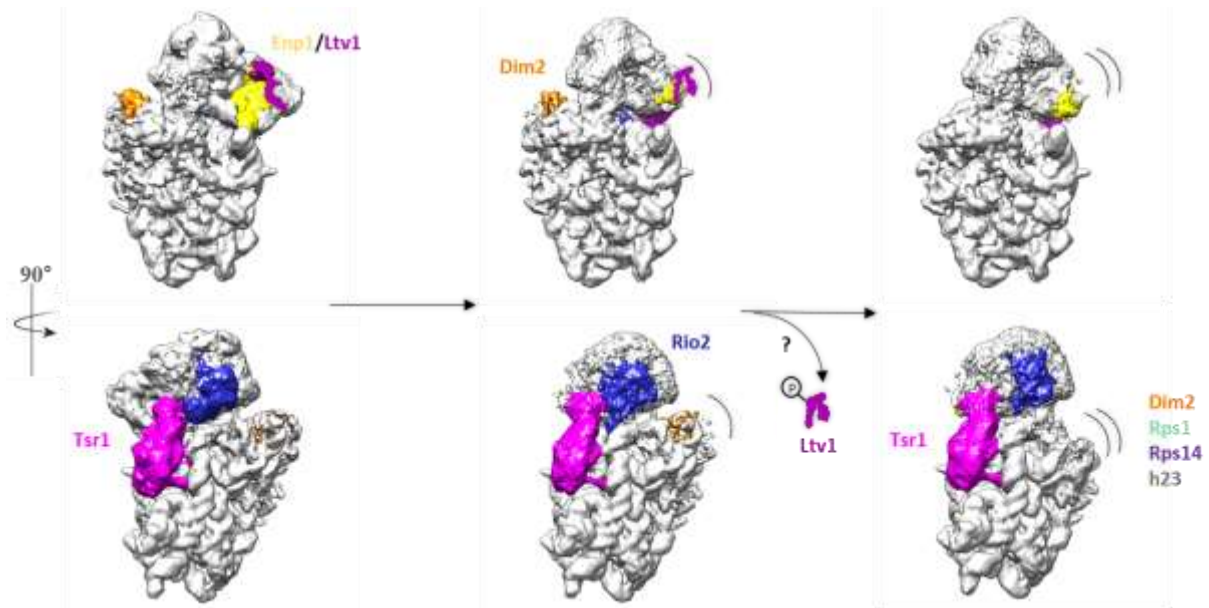


Figure 55. Modèle hypothétique de la maturation des particules pré-40S Tsr1-FPZ. De gauche à droite : Dans un premier temps la tête, le bec et la plateforme sont stablement structurés. L'autophosphorylation de Ltv1, par Hrr25, entraîne un changement de conformation puis le relargage de Ltv1, induisant l'intégration progressive des protéines Rps20, Rps29, Rps3 et le déplacement des hélice h33 et h34 vers leur position mature. Le changement de conformation du bec entraîne la flexibilité des domaines Rps1, Rps14, Dim2 et l'hélice 23 composant la plateforme.

Cette étape de déstabilisation / vibration du bec pourrait être requise pour l'intégration des protéines ribosomiques Rps20, Rps29, Rps3 et le déplacement des hélice 33 et 34 vers leurs positions matures. Cela serait également nécessaire pour l'intégration stable de la protéine Rps10. En effet, Enp1 occupe la position de Rps10 dans la particule ribosomique mature ; le relargage d'Enp1 est donc requis pour l'association de la protéine Rps10.

En ce qui concerne la plateforme, l'analyse structurale a révélé la présence d'au moins deux conformations distinctes, (P1 et P2), caractérisées par un module formé par Rps1, Rps14, Dim2 et l'hélice 23 de l'ARNr qui peut être totalement structuré (P1), ou partiellement dynamique (P2). Les expériences de classification 3D sans soustraction de signal font état d'un troisième état pour ce module, qui est alors très dynamique, donc totalement absent des reconstructions 3D. Cette « entrée en vibration » de la plateforme que nous avons observée par cryo-EM est en adéquation avec des expériences de « chemical probing » / SHAPE menées sur d'autres particules pré-40S de levure, qui montrent la flexibilité des hélices h33, h35, h37, h40 et h41 (composants de la tête) dans des particules pré-40S de levure purifiées à des stades de maturation cytoplasmique intermédiaires (Hector et al., 2014).



Malgré sa présence dans les données de spectrométrie de masse, le CFM Nob1 n'est pas présent sur les structures des particules pré-40S Tsr1-FPZ. Cela concorde avec les études structurales précédentes menées chez la levure (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018) et souligne l'association labile et dynamique de ce CFM avec les particules pré-40S. Grâce à des données de CRAC, mais aussi de cryo-EM menées sur des particules pré-40S humaines, on sait que Nob1 est positionné au niveau de la plateforme. Nob1 est l'endonucléase responsable du clivage au site D de l'ARNr 18S. Dim2 interagit avec l'hélice h28 avec son domaine C-ter, et avec l'extrémité 3' (U1796-A1800) de l'ARNr par le biais de son domaine KH1. En outre, Dim2 et Nob1 sont toujours co-purifiés dans les particules pré-40S, et interagissent directement l'une avec l'autre (Hector et al., 2014). Le positionnement de Dim2 empêche donc d'une part l'endonucléase Nob1 d'atteindre sa cible. D'autre part, nos données de spectrométrie de masse et de cryo-EM montrent que la protéine Rps26 n'est pas présente dans les particules pré-40S Tsr1-FPZ. Dans la petite sous-unité ribosomique mature, Rps26 partage le même emplacement que Dim2, et est localisée sous l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Figure 56). Ainsi, le départ de Dim2 est nécessaire à la fois pour permettre le clivage de l'ARNr 18S au site D par Nob1, et pour l'intégration stable de la protéine Rps26 à la petite sous-unité ribosomique.

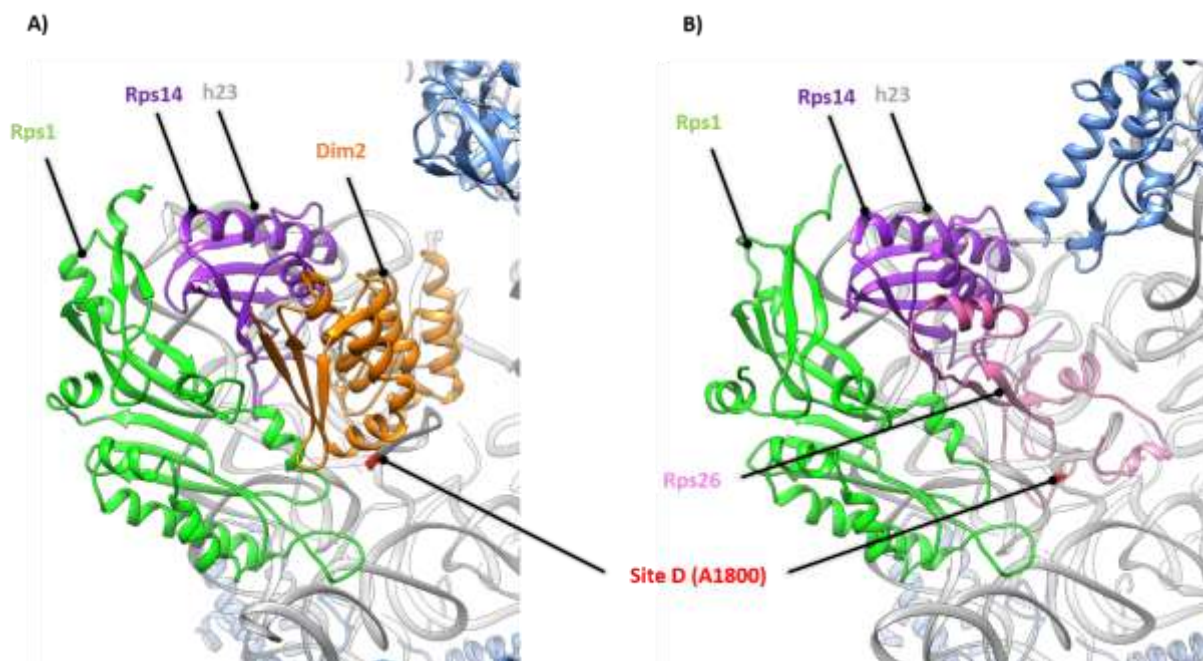


Figure 56. La comparaison de la plateforme entre les particules pré-40S **A)** et la sous-unité 40S mature **B)**. Dim2 et Rps26 partagent le même emplacement sous l'extrémité 3' de l'ARNr 18S.

Nous proposons donc que la « vibration » de la plateforme observée dans les particules pré-40S Tsr1-FPZ soit le reflet structural de ces étapes de maturation de la plateforme.

### C.3 Quels sont les mécanismes déclencheurs de la vibration du bec et de la plateforme ?

Nos données structurales nous permettent de proposer que dans le cytoplasme, les particules pré-40S en cours de maturation passent d'un état précoce, structuralement stable à un état intermédiaire, où la plateforme et le bec sont déstabilisés et entrent en vibration. Cependant, les mécanismes qui entraînent ce phénomène restent à élucider. Selon nos expériences de classification 3D, le bec serait le premier des deux domaines à entrer en vibration. Nous proposons que la phosphorylation de Ltv1 par Hrr25 puis sa dissociation de la particule, déjà observées par des approches biochimiques (Ghalei et al., 2015 ; Mitterer et al., 2016) entraîne la déstabilisation du bec, et permette sa maturation finale (stabilisation des protéines Rps20, Rps29, Rps3, et intégration/stabilisation de Rps10 et Rps31 ; maturation des hélices h33 et h34 du préARNr 18S).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la vibration de la plateforme sont là encore largement inexplorés ; on peut toutefois se baser sur les données biochimiques et fonctionnelles existantes pour proposer au moins deux pistes à explorer, qui ne sont pas mutuellement exclusives : les interactions longue distance entre la plateforme et le bec, et le rôle du CFM Fap7.

Tout d'abord, une cascade de changements conformation du bec vers la plateforme pourrait être déclenchée par la phosphorylation et la dissociation de Ltv1 et Enp1 par la kinase Hrr25. Ces deux CFM sont localisés sur les hélices h33/h34 de l'ARNr formant le bec de la particule, qui est également en contact avec le domaine IV du CFM Tsr1. Ce domaine de Trs1 interagit avec le domaine C-lobe de Rio2 qui est à son tour en contact avec l'hélice h28 de l'ARNr 18S, à l'arrière de la tête. Cette hélice est également en contact direct avec le domaine C-ter de Dim2. On peut ainsi imaginer une cascade d'évènements, où la phosphorylation de Ltv1 par Hrr25 serait propagée par l'arrière de la tête par des changements conformationnels de Tsr1 et Rio2, et aboutirait à la vibration de la plateforme. Ceci permettrait à son tour le départ de Dim2, le clivage du pré-ARNr 20S au site D par l'endonucléase Nob1, et l'intégration de la protéine Rps26. Cependant, nos analyses ne nous ont pas permis de visualiser de changements structuraux drastiques de Tsr1 et Rio2, ce qui suggère que d'autres phénomènes pourraient également intervenir dans le déclenchement de la vibration de la plateforme.

Le CFM Fap7 est un élément essentiel dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique. Outre son rôle dans le relargage des CFM Dim1 et Tsr1 (Ghalei et al., 2017) et la formation des particules pseudo-80S (Granneman et al., 2005), cette ATPase joue le rôle de chaperonne pour l'intégration des protéines ribosomiques Rps14 et Rps26 dans les particules pré-ribosomiques (Granneman et al., 2005 ; Hellmich et al., 2013 ; Loc'h et al., 2014 ; Pena et al., 2016). Nous proposons que l'interaction de Fap7 avec Rps1 et Rps14 entraîne la vibration de la plateforme que nous observons. Cette interaction pourrait être déclenchée par l'action préalable de Hrr25 sur Ltv1, et permettrait la maturation finale de la plateforme. Comment et quand Fap7 agissent exactement restent à caractériser.

#### D. Perspectives

Pour valider les hypothèses émises ci-dessus, il serait intéressant d'étudier tout d'abord la structure de particules pré-40S dans lesquelles l'activité kinase de Hrr25 est invalidée, afin de voir si la proportion de particules sans plateforme diminue. Une autre piste serait également d'étudier l'effet de la suppression de l'activité ATPase de Fap7 sur la structure de particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires.

Pour l'instant, il n'existe aucune structure de particules pré-40S bloquées à des stades tardifs de leur maturation. La comparaison des structures de particule pré-40S à différentes étapes de maturations permettrait de comprendre les remodelages structuraux durant la maturation de la petite sous-unité 40S, et la chronologie de dissociation des CFM. Pour cela, il serait donc intéressant de purifier par exemple des particules pré-40S de levure dont l'activité catalytique de Rio1 est invalidée, comme nous l'avons fait pour les particules RIO1(kd)-TAP humaines (cf. partie III des Résultats). La localisation du CFM Nob1 sur les particules pré-40S permettrait de mieux caractériser les étapes de maturations tardives permettant le clivage du pré-ARNr 20S, la formation de l'ARNr 18S mature et le relargage des CFM. Pour cela il serait possible de reconstituer particules pré-40S-like *in vitro*, purifiant des sous-unités 40S matures et en les incubant avec le CFM Nob1 recombinant. La détermination structurale et sa comparaison avec la sous-unité mature permettrait de localiser ce CFM. Cette approche a permis de localiser la position du CFM NOB1 sur les particules pré-40S humaines (Ameismeier et al., 2018).

## Résultats

### II : Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques de levures mutantes (Tsr1-FPZ Rps20 $\Delta$ loop).

#### A. Objectifs et résumé de l'article

Dans la continuité de l'étude de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique de levure, durant ma thèse, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr. Brigitte Pertschy (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Graz Universität, Autriche). Ce groupe s'intéresse particulièrement aux étapes de maturation cytoplasmiques des pré-ribosomes de levure, notamment au rôle des CFM Ltv1 et Enp1 dans la structuration progressive du bec des particules pré-40S. En effet, dans une étude précédente, ces chercheurs ont démontré que le relargage de Ltv1 était l'une des premières étapes de maturation cytoplasmique, et que cette dissociation requiert la phosphorylation de Ltv1 par la kinase Hrr25. De plus ils ont identifié les serines S336, S339 et S349 de Ltv1 comme substrat de la kinase Hrr25. Les mutations de ces résidus entraînent une diminution significative de phosphorylation de Ltv1 par Hrr25 (Mitterer et al., 2016). Ce phénomène est accompagné par l'intégration stable de Rps3, d'abord par son domaine N-ter, qui interagit avec la protéine Rps20 et l'hélice h41 de l'ARNr. Cette interaction est empêchée par la présence de Ltv1 sur le bec des particules pré-40S (Mitterer et al., 2016). En effet, le domaine N-ter de Rps3, nouvellement synthétisée, est maintenu dans une conformation immature par une protéine chaperonne nommée Yar1. Le relargage de Yar1 laisse place à l'intégration de Ltv1 sur le domaine N-ter de Rps3. C'est la phosphorylation de Ltv1 et sa dissociation qui permet le changement de conformation de ce domaine et l'intégration stable de Rps3 sur le bec des particules pré-40S (Mitterer et al., 2016).

D'autre part, cette équipe a plus récemment acquis un ensemble de données fonctionnelles, par des études génétiques (double hybride) et biochimiques, afin de caractériser le rôle de la protéine Rps20 dans la synchronisation du relargage des CFM Ltv1 et Rio2, positionnés de chaque côté de la tête des particules pré-40S. Les données obtenues par l'équipe du Dr Pertschy montrent tout d'abord que l'interaction du domaine N-ter de Rps3 avec Rps20 est nécessaire au recrutement de Hrr25, induisant la phosphorylation de Ltv1 et son relargage. De plus, la délétion d'une boucle non structurée du domaine C-terminal de Rps20, profondément enfouie dans la tête des particules pré-40S, prévient l'hydrolyse de l'ATP par Rio2 et son relargage des particules. De plus, une mutation empêchant la phosphorylation de

Ltv1 ou l'hydrolyse de l'ATP par Rio2 n'entraîne pas d'altération de l'activité catalytique de ces deux CFM. Cependant, cela induit un défaut de relargage de ces deux protéines des particules pré-40S. Ainsi, la protéine Rps20 jouerait un rôle de « médiateur » qui vérifierait que les étapes de maturation de part et d'autre de la tête ont bien eu lieu, et qui autoriserait la maturation à suivre son cours, ou la bloquerait en cas de dysfonctionnement au niveau de Ltv1 ou de Rio2.

Afin de confirmer ces hypothèses fonctionnelles, l'équipe du Dr Pertschy a purifié des particules pré-40S de levure dans des souches portant une délétion des acides aminés 68 à 78 de Rps20, en utilisant une version étiquetée de Tsr1 comme appât de purification. (Particules pré-40S Tsr1-TAP S20 $\Delta$ Loop). J'ai entrepris l'analyse structurale par cryo-EM de ces particules cytoplasmiques de levures. Pour ce faire, j'ai obtenu un premier jeu de données à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) de Bordeaux, sur un cryo-microscope de type Talos Arctica, doté d'un détecteur direct d'électron de type FEI Falcon III. L'analyse de ces images avec le logiciel Relion 2.1, m'a permis d'obtenir deux variants structuraux à 10,6 Å et 6,6 Å de résolution. Ainsi, les particules pré-40S Tsr1-TAP S20 $\Delta$ Loop peuvent être divisées en deux grands types de populations structurales ; toutes deux présentent des différences avec les structures de particules pré-40S existantes (Heuer et al., 2017 ; Scaiola et al., 2018, cf aussi mes données sur les particules Tsr1-FPZ « wild type »). L'ensemble de nos données structurales et fonctionnelles a été soumis pour publication dans la revue Nature Communications en juillet dernier. Le manuscrit soumis est présenté ci-dessous.

**B. Article : Conformational proofreading of distant 40S subunit maturation events by a long-range communication mechanism**

## Conformational proofreading of distant 40S subunit maturation events by a long-range communication mechanism

Valentin Mitterer<sup>1,5,6</sup>, Ramtin Shayan<sup>2,6</sup>, Sébastien Ferreira-Cerca<sup>3,\*</sup>, Guillaume Murat<sup>4</sup>, Tanja Enne<sup>1</sup>, Dana Rinaldi<sup>2</sup>, Sarah Weigl<sup>1</sup>, Pierre-Emmanuel Gleizes<sup>2</sup>, Hajrija Omanic<sup>1</sup>, Dieter Kressler<sup>4,\*</sup>, Celia Plisson-Chastang<sup>2,\*</sup> and Brigitte Pertschy<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Molecular Biosciences, University of Graz, Humboldtstrasse 50, 8010 Graz, Austria

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>3</sup> Biochemistry III – Institute for Biochemistry, Genetics and Microbiology, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany

<sup>4</sup> Unit of Biochemistry, Department of Biology, University of Fribourg, Chemin du Musée 10, CH-1700 Fribourg, Switzerland

<sup>5</sup> present address: Biochemistry Centre, University of Heidelberg, Heidelberg, 69221, Germany

<sup>6</sup> these authors contributed equally

<sup>7</sup> lead contact

\*Correspondence: [Sebastien.Ferreira-Cerca@vkl.uni-regensburg.de](mailto:Sebastien.Ferreira-Cerca@vkl.uni-regensburg.de) (S.F.-C.), dieter.kressler@unifr.ch (D.K.), celia.plisson@ibcg.biotoul.fr (C.P.-C.), brigitte.pertschy@uni-graz.at (B.P.)

### Keywords

ribosome biogenesis, ribosome assembly factor, Rps20, Rio2 ATPase, Ltv1, Rps3, Hrr25 kinase, assembly factor release

## Summary

Eukaryotic ribosomes are synthesized in a hierarchical process driven by a plethora of assembly factors, but how individual maturation events at physically distant sites on pre-ribosomes are coordinated is poorly understood.

Here we show that ribosomal protein Rps20 orchestrates communication between two multi-step maturation events across the pre-40S subunit. Our study reveals that during pre-40S maturation, formation of essential contacts between Rps20 and Rps3 permits assembly factor Ltv1 to recruit the Hrr25 kinase, thereby promoting Ltv1 phosphorylation. In parallel, a deeply buried Rps20 loop reaches to the opposite pre-40S side, where it stimulates Rio2 ATPase activity. Both cascades converge to the final maturation steps releasing Rio2 and phosphorylated Ltv1.

We propose that conformational proofreading exerted via Rps20 constitutes a checkpoint permitting assembly factor release and progression of pre-40S maturation only after correct completion of all earlier maturation steps.

## INTRODUCTION

Eukaryotic ribosomes consist of a large 60S and a small 40S subunit, each composed of ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins (r-proteins). The synthesis of ribosomes is a highly complex process starting with the assembly of pre-rRNA, r-proteins, and ribosome assembly factors (AFs) into pre-ribosomal particles in the nucleolus (reviewed in (de la Cruz et al., 2015; Kressler et al., 2017; Peña et al., 2017; Woolford and Baserga, 2013)).

The first steps in the synthesis of 40S subunits occur within a large precursor termed 90S particle, in which rRNA folding and processing steps, as well as the incorporation of r-proteins and AFs take place (Chaker-Margot et al., 2017; Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002; Kornprobst et al., 2016; Sun et al., 2017). An endonucleolytic rRNA cleavage within 90S precursors then releases a 43S particle, also termed pre-40S particle, which contains a 3' extended precursor of the mature 18S rRNA (the 20S pre-rRNA), most 40S r-proteins, and a few AFs (Schäfer et al., 2003). These particles are quickly exported into the cytoplasm, where further 40S maturation events take place. Finally, conversion of the 20S pre-rRNA into the 18S rRNA by the endonuclease Nob1 results in the release of mature, translation-competent 40S subunits (Fatica et al., 2003; Lebaron et al., 2012; Pertschy et al., 2009).

Several biochemical studies together with recent cryo-electron microscopy (cryo-EM) structural analyses provided insights into the organization of early cytoplasmic pre-40S particles; revealing that AFs Tsr1, Pno1, Nob1, Dim1, and Rio2 are located on the intersubunit side of the 40S subunit and that Enp1, Ltv1, and most likely also Hrr25 are bound on the solvent-exposed side in the area of the beak structure (Ferreira-Cerca et al., 2012; Granneman et al., 2010; Heuer et al., 2017; Johnson et al., 2017; Larburu et al., 2016; Mitterer et al., 2016; Scaiola et al., 2018; Schäfer et al., 2003; Strunk et al., 2011).

These early cytoplasmic pre-40S particles undergo a cascade of maturation events, with the two first and presumably rate limiting ones being two different ATP-dependent maturation steps, resulting in the dissociation of AFs Rio2 and Ltv1 (Ferreira-Cerca et al., 2012; Ghalei et al., 2015; Mitterer et al., 2016; Schäfer et al., 2006).

Rio2 is an ATPase that is bound at the junction between the head and the body of pre-40S subunits and its release from pre-40S particles is promoted by ATP hydrolysis (Ferreira-Cerca et al., 2012; Knüppel et al., 2018). In addition, Rio2 release was suggested to require and trigger conformational changes necessary for progression of pre-40S particles into subsequent maturation steps (Ferreira-Cerca et al., 2012; Knüppel et al., 2018).

Ltv1 interacts with two 18S rRNA helices (h16 and h41) and several proteins (i.e. Enp1, and r-proteins Rps3 (uS3)<sup>1</sup> and Rps20 (uS10)) within the head domain of pre-40S particles, and its

---

<sup>1</sup> new nomenclature of ribosomal proteins (Ban et al., 2014)



release involves at least two different steps. One is promoted by phosphorylation of three serines in the C-terminal part of Ltv1 by the casein kinase I homolog Hrr25 (Ghalei et al., 2015; Mitterer et al., 2016; Schäfer et al., 2006). The other step comprises the formation of contacts of the Rps3 N-domain with Rps20 and rRNA helix h41 (Granneman et al., 2010; Mitterer et al., 2016). It is however not known whether these two steps are interconnected and in which order they occur.

Notably, mutations blocking Ltv1 release also inhibited the release of other AFs, including Rio2, from pre-40S particles, indicating that Ltv1 dissociation is a prerequisite for the release of these factors (Mitterer et al., 2016). However, previous studies on Rio2 demonstrated that a catalytic *rio2* mutant, which is impaired in Rio2 release, accumulates Ltv1 on pre-40S particles, indicating that Rio2 catalytic activity and/or its subsequent release is on the other hand a prerequisite for Ltv1 release (Ferreira-Cerca et al., 2012, 2014). How Ltv1 release, taking place on the solvent side of the pre-40S subunit, might be coordinated with Rio2 catalytic activity and/or release, which occurs more than 50Å apart<sup>2</sup> on the intersubunit side, has however remained elusive.

Here we report that Rps20 coordinates Ltv1 and Rio2 release. The largest part of Rps20 is located on the solvent-exposed side of pre-40S particles where it contacts Rps3, thereby promoting Hrr25 recruitment by Ltv1 and subsequent Ltv1 phosphorylation. Two  $\beta$ -strands in Rps20 connected by an unstructured loop dive deeply into the (pre-)40S subunit, almost reaching to the Rio2-binding site. Deletion of this Rps20 loop leads to an altered conformation of Rio2 on pre-40S particles, and reduction of its ATP hydrolysis; however, Ltv1 phosphorylation can still occur normally. *Vice versa*, mutations preventing Ltv1 phosphorylation still allow Rio2 ATP hydrolysis. In either case however, final release of both Rio2 and Ltv1 is inhibited. We conclude that Rio2 and Ltv1 release are multi-step processes, with the respective final steps occurring in an interdependent manner. We suggest that, by sensing the correct conformations of both maturation sites, Rps20 provides a quality control checkpoint, which ensures that release of Ltv1 and Rio2 is only triggered once all necessary earlier maturation steps have been completed.

---

<sup>2</sup> distance between the h41 Ltv1 rRNA-binding site (which is later occupied by the Rps3 N-domain) and the h31 Rio2 rRNA-binding site (Granneman et al., 2010), measured in the mature 40S structure (Ben-Shem et al., 2011).

## RESULTS

### **Rps3 N-domain assembly promotes Hrr25 recruitment, thereby disturbing the Ltv1-Enp1 interaction**

Our previous studies suggested that both the phosphorylation of Ltv1 by Hrr25 and the contact formation between the Rps3 N-domain and Rps20 are required for Ltv1 release, but the order of these maturation events was unclear (Mitterer et al., 2016). To better define the effects of mutations impairing the establishment of contacts between positively charged amino acids of the Rps3 N-domain (K7 and K10) and negatively charged amino acids of Rps20 (D113 and E115), we analyzed the composition of pre-40S particles isolated from such mutants. We considered the AF Tsr1 as a suitable bait protein for this purification, since it purifies a broad range of pre-40S particles by binding in the nucleus and dissociating at a late cytoplasmic step, after Ltv1 and Rio2 release (Hector et al., 2014; Schäfer et al., 2003; Strunk et al., 2012).

In line with our previous results, several AFs, including Ltv1, accumulated in pre-40S particles isolated from *rps3.K7/K10>ED* or *rps20.D113/E115>K* mutants (Figure 1A). Surprisingly however, one band was absent in the *rps3.K7/K10>ED* mutant and strongly reduced in the *rps20.D113/E115>K* mutant (indicated by a red dashed line in Figure 1A). Analysis by mass spectrometry (MS) revealed that this band corresponded to the Hrr25 kinase, which executes phosphorylation of Ltv1 (Ghalei et al., 2015; Mitterer et al., 2016; Schäfer et al., 2006). Hence the correct formation of the Rps3-Rps20 contact occurs prior to, and is even a pre-requisite for Ltv1 phosphorylation.

We speculate that the restructuring of the Rps3 N-domain promotes, by unleashing a crucial binding surface, the recruitment of Hrr25. To better understand how Hrr25 is recruited to pre-40S particles, we performed yeast two-hybrid (Y2H) analyses testing the interaction of Hrr25 with several other AFs contained in early cytoplasmic pre-40S particles, as well as with some r-proteins of the 40S head domain (Figure S1A). Ltv1 showed a robust interaction with Hrr25, suggesting that it interacts not only transiently with Hrr25 while it is being phosphorylated, but forms a stable interaction with the kinase on pre-40S particles. No other tested AF interacted with Hrr25 in this assay and only the r-protein Rps15 displayed a weak interaction with Hrr25 (Figure S1A). Since full-length Hrr25 (494 aa) fused to the Gal4 DNA-binding domain displayed some self-activation of the *HIS3* reporter gene (Figure S1A, left panel), we performed subsequent analyzes with a C-terminally truncated version of Hrr25 (aa 1-394) (Ye et al., 2016), which showed no self-activation and still interacted with Ltv1 (Figure 1B). Moreover, mutation of the catalytic lysine residue to arginine (Hrr25(1-394).K38R mutant) strengthened the interaction between Ltv1 and Hrr25 (Figure 1B and Figure S1A, right panel). However, the interaction was fully maintained when the three main Hrr25 phosphorylation sites on Ltv1 (S336, S339 and S342) and an additional three proximal serines (S344, S345 and S346) were

either exchanged for alanines (Ltv1.S6>A) or glutamates (Ltv1.S6>E), mimicking the unphosphorylated or phosphorylated states of these residues, respectively (Figure 1C). Accordingly, Hrr25 was present in pre-40S purifications from the *ltv1.S336/339/342>A* mutant, but absent in pre-40S preparations from a  $\Delta$ *ltv1* strain (Figure 1D). Together, these results suggest that Ltv1 is necessary to recruit Hrr25 to pre-40S particles and that Ltv1's phosphorylated serines are only transiently bound by Hrr25 during its catalytic activity, while the main Hrr25 interaction site lies elsewhere within Ltv1.

The fact that Hrr25 is not recruited when the contact between the Rps3 N-domain and Rps20 is abolished suggests that structural re-arrangement brings Ltv1 into a conformation where it is able to interact with Hrr25. To better understand which part of Ltv1 needs to be exposed to allow for Hrr25 recruitment, we mapped the Hrr25-binding sites on Ltv1. Remarkably, Ltv1 appears to harbor two sites, which can bind Hrr25 independently, and whose minimal fragments either exhibit a robust (aa 160-296) or moderate (aa 333-412) Y2H interaction with Hrr25(1-394).K38R (Figure 1E and Figure S2). Notably, the second, weaker interaction surface comprises the residues that are phosphorylated by Hrr25 and partially overlaps with the previously mapped Rps20-binding region (Mitterer et al., 2016). Enp1 is another pre-40S component that directly interacts with Ltv1 via its bystin domain and was suggested to be a phosphorylation substrate of Hrr25 (Figure S1B, (Campbell and Karbstein, 2011; Schäfer et al., 2006; Sun et al., 2017)). Strikingly, Ltv1 also contains two independent Enp1-binding sites; both of these minimal Enp1-binding fragments (aa 218-271 and aa 354-412 of Ltv1) display an equally strong Y2H interaction and largely overlap with the Hrr25-binding regions (Figure 1E, 1F and Figure S2). In line with this, over-expression of Enp1 weakened the Y2H interaction between Ltv1 and Hrr25, indicating that Enp1 and Hrr25 compete for Ltv1 binding (Figure 1G). Therefore, we propose that the binding of Hrr25 helps to physically detach the interaction between Ltv1 and Enp1, thereby loosening the interaction of Ltv1 with pre-40S particles even before its phosphorylation and final dissociation take place.

### **Initial cytoplasmic pre-40S maturation steps are functionally linked**

Mutations blocking Ltv1 release also inhibited the release of other AFs, including Rio2, from pre-40S particles, while mutations impairing Rio2 release also accumulated Ltv1 on pre-40S particles, indicating that Ltv1 and Rio2 release are mutually interdependent (Ferreira-Cerca et al., 2012, 2014; Mitterer et al., 2016). To confirm that ATP hydrolysis by Rio2 is necessary for Ltv1 release, we made use of an Ltv1-GFP reporter construct that shows a nuclear steady-state localization due to mutation of Ltv1's nuclear export sequence (NES) (Ltv1-NES3A-GFP) (Figure S3A, (Merwin et al., 2014; Mitterer et al., 2016)). The localization of this reporter construct was evaluated in a mutant expressing the catalytically inactive *rio2.D253A* allele, which is viable but shows reduced Rio2 disassembly from 40S maturation

intermediates (Ferreira-Cerca et al., 2012). Indeed, in contrast to its predominantly nuclear localization in wild-type cells, the Ltv1-NES3A-GFP reporter construct mislocalized to the cytoplasm in *rio2.D253A* cells (Figure S3B). In addition, the Enp1-GFP fusion protein also accumulated in the cytoplasm in the *rio2.D253A* mutant, indicating a block of downstream pre-40S maturation steps.

The interdependence of the spatially separated Rio2 and Ltv1 release events prompted us to test for functional connections between mutations affecting Rio2 release and mutations inhibiting Ltv1 release. To this end, we tested the *ltv1.S336/S339/S342>A* allele for genetic interaction with the catalytically inactive *rio2.D253A* variant, notably revealing a synthetic lethal phenotype (Figure 2A). Additionally, combining the *rio2.D253A* allele with *rps3* or *rps20* variants, which are impaired in establishing contacts between Rps3 (K7 and K10) and Rps20 (D113 and E115) or Rps3 (K8 and R9) and rRNA (h41), resulted in synthetic lethal phenotypes (Figure 2B and 2C). These results suggest a tight functional connection between Rps3 N-domain assembly, Ltv1 phosphorylation and release, and ATP-hydrolysis-dependent release of Rio2.

### **A conserved loop in Rps20 is essential for cytoplasmic pre-40S maturation**

While Ltv1, Rps3, and Rps20 are positioned on the solvent-exposed side of the pre-40S head domain, Rio2 is positioned on the subunit-interface side, bridging the head and the body (Ferreira-Cerca et al., 2012; Granneman et al., 2010; Heuer et al., 2017; Johnson et al., 2017; Larburu et al., 2016; Scaiola et al., 2018; Strunk et al., 2011). Considering the great distance (~50 Å) between Rio2 and the site where the Rps3 N-domain contacts Rps20 to facilitate Ltv1 release, we speculated that one or several proteins might physically link these distant sites to allow communication between them. We recognized that two long  $\beta$ -strands of Rps20 protrude deeply into the interior of the mature 40S subunit and an unstructured loop connecting these  $\beta$ -strands reaches almost to the opposite subunit-interface side (Ben-Shem et al., 2011). Remarkably, this loop is in close contact with 18S rRNA helix h31, which also contains one of the rRNA-binding site (nucleotides 1194-1196) of Rio2 in pre-40S particles, suggesting a cross-talk between the Rps20 loop and Rio2 either by a direct interaction or via their rRNA contact with helix h31 (Figure 2d, (Granneman et al., 2010; Scaiola et al., 2018)). The ten-amino-acid-long Rps20 loop (aa 68-78) contains four charged amino acids (R68, K69, K77 and E74), which might establish interactions with rRNA and/or proteins, and is highly conserved among eukaryotes (Figure 2d).

To address the possibility that the Rps20 loop-region participates in 40S biogenesis, we analyzed the phenotypes resulting from deletion of the loop or from point mutations of the charged residues. Simultaneous substitution of amino acids R68, K69, and E74 to opposite charges (*rps20.R68/K69>E/E74K*) was lethal, whereas all other tested mutants were viable

(Figure 2E, S3C and S3D). However, two of the combined point mutants (*rps20.R68/K69>E* and *rps20.R68/K69>A/E74K*), as well as deletion of the Rps20 loop ( $\Delta 68-78$ ), caused a pronounced slow-growth phenotype (Figure 2F, 3C and 3D). Moreover, in contrast to wild-type cells and the *rps20.R68/K69>A* mutant, the *rps20.R68/K69>E* and, to an even greater extent, the *rps20 $\Delta$ loop* mutant displayed a 40S synthesis defect in polysome analyses, as evidenced by a strong increase of free 60S subunits (Figure 2G). Moreover, presumably as a consequence of the severe imbalance between 40S and 60S subunits, the *rps20 $\Delta$ loop* mutant also showed significantly reduced polysome levels. Northern blot analyzes revealed a reduction of the mature 18S rRNA and a substantial accumulation of its direct precursor, the 20S pre-rRNA, in the *rps20.R68/K69>E* and the *rps20 $\Delta$ loop* mutant (Figure 2H). Furthermore, fluorescence *in situ* hybridization showed that the 20S pre-rRNA accumulated in the cytoplasm, demonstrating that the inhibition of the pre-40S maturation pathway in the *rps20* loop mutants occurs, after nuclear export, at the stage of cytoplasmic pre-40S particles (Figure 2I).

### **Multifaceted genetic interplay between the Rps20 loop and 40S maturation mutants**

To get insights into whether the Rps20 loop could participate in the crucial steps leading to Ltv1 and Rio2 release, we undertook genetic analyzes. Intragenic combination of the *rps20 $\Delta$ loop* deletion or the *rps20.R68/K69>E* mutation with the *rps20.D113/E115>K* mutation, which prevents binding of Rps20 to the Rps3 N-domain (Mitterer et al., 2016), abolished cell growth (Figure 3A). In line with this, we also observed synthetically enhanced growth phenotypes when combining the *rps20* loop-mutants with mutants in which the Rps3-Rps20 contact was reduced from the Rps3 side (Figure 3B). Moreover, polysome analyses revealed that the 40S synthesis defect of the *rps20.D113/E115>K* mutant is strongly enhanced by the *R68/K69>A* loop-mutation (Figure 3C). Remarkably, we also found synthetic lethal phenotypes of *rps20* loop-mutants, including mutants that display no growth phenotype on their own, with the catalytically inactive *rio2.D253A* mutant (Figure 2D). Furthermore, *rps20* loop-mutants severely enhanced the growth defect of the *ltv1.S336/S339/S342>A* phosphomutant (Figure 3E). Taken together, we unraveled a genetic network (schematically depicted in Figure 3F) exhibiting multifaceted interconnections between AFs and r-proteins, thus linking the Rps20 loop to cytoplasmic pre-40S restructuring events and Rio2 ATPase activity.

### **The Rps20 loop is required for the release of assembly factors**

To address whether the Rps20-loop participates in release of Rio2 and/or Ltv1, we purified pre-40S particles from *rps20 $\Delta$ loop* cells using again Tsr1-TAP as bait protein. Western blot analyzes revealed that Rio2 strongly accumulated on pre-40S particles isolated from the *rps20 $\Delta$ loop* mutant (Figure 3G). Additionally, the levels of Ltv1 and also of downstream

maturation factors like Nob1 and Pno1 increased, suggesting that the loop deletion blocks pre-40S maturation at an early cytoplasmic step prior to Ltv1 and Rio2 disassembly. The strong accumulation of Rio2 further strengthens the hypothesis that the Rps20 loop-region is directly involved in release of the Rio2 ATPase.

### **Rio2 is in an altered conformation in *rps20*Δloop pre-40S particles**

To obtain an understanding of the molecular basis for the observed AF-release defects, we analyzed and compared the 3D structures of pre-40S particles, purified via the Tsr1 bait (see Material and Methods), from the *rps20*Δloop mutant and wild-type cells by cryo-EM and single particle analysis. Using mature 40S (PDB 4V88; (Ben-Shem et al., 2011)) as reference, we initially computed a "consensus" 3D structure for each of these conditions, solved to 6.1 Å resolution for the wild-type (WT) pre-40S particles and to 6.8 Å for the *rps20*Δloop mutant particles (Figure S4). To identify structural variants within the consensus 3D structures, we submitted these to global 3D classifications assays. These analyses revealed that a vast majority (~68%) of wild-type pre-40S particles presented an incomplete head, with at least a part of the beak missing (Figure S5A, 3D classification (B)). We attributed this missing density to a high degree of flexibility of the beak. The remaining particles were separated into two distinct and stable 3D classes, hereafter named C1-WT and C2-WT (Figure 4A and 4B), which were further refined to 10.3 and 6.6 Å, respectively (Figure S4C). The C1-WT conformer is identical to the 3D structure of early cytoplasmic pre-40S particles (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018) (compare Figure S6A and S6B; see also rigid body fitting in Figure S4A). The main difference between C2-WT and known pre-40S structures (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018) is the lack of Enp1/Ltv1 on the beak in our structure (Figure S4B and S4C). As Enp1 was present in significant amounts in these Tsr1-purified pre-40S particles (Figure 1a), we hypothesize that at least Enp1 (and potentially Ltv1) may be more loosely bound to the pre-40S structure in the C2-WT population. We speculate that these particles correspond to a later population than C1-WT, probably representing a maturation stage shortly before or after Ltv1 release.

3D classification assays of *rps20*Δloop mutant particles revealed no population with missing beaks (see Figure S5B, 3D classification (B)), and particles were regrouped into two stable 3D classes. The first one displayed structural resemblance to C2-WT and was thus named C2-S20Δloop (Figure 4C), while the other exhibited striking differences compared to all other pre-40S 3D structures and was thus named C3-S20Δloop (Figure 4D). C2-S20Δloop and C3-S20Δloop were refined to 6.6 Å and 10.8 Å, respectively (Figure S4D). No structural equivalent to the early C1-WT class was found among *rps20*Δloop pre-40S particles, suggesting blockage of pre-40S maturation at a stage later than C1-WT.

C2-S20 $\Delta$ loop is largely similar to C2-WT, except that the tip of the beak (composed of rRNA helix 33, Rps10 (eS10), and Rps12 (eS12) in mature 40S subunits) harbors more density in the C2-S20 $\Delta$ loop structure than its C2-WT counterpart (Figure 4B and 4C, arrowheads). This might reflect a more stable configuration of the beak, perhaps due to Enp1/Ltv1 being blocked in this region of the mutant particles compared to wild-type ones.

C3-S20 $\Delta$ loop displayed several significant differences to all other known pre-40S 3D structures, among them a reduced density in the platform region (compare Pno1 and the surrounding region in Figure 4C to 4D). This loss of density likely reflects a higher dynamism of the platform for particles in the C3-S20 $\Delta$ loop structural state, maybe explaining the deficiencies of S20 $\Delta$ loop mutants in performing the 20S to 18S rRNA maturation step (Figure 2h). The head of C3-S20 $\Delta$ loop has also undergone visible changes and looks, compared to the other states, more similar to that of a mature 40S subunit (as seen in figures 4e and 4h); i.e. rRNA helices h33 and h34, which were reported to be shifted in pre-40S structures (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018), have already moved closer to their mature position (Figure 5A). Moreover, compared to all other classes, a clear density of the Rps3 N-domain was visible in C3-S20 $\Delta$ loop, suggesting that Rps3 N-domain rearrangement has already occurred in this population. Last but not least, C3-S20 $\Delta$ loop harbors a bulging density on top of rRNA helix h34 (Figure 4D, colored in violet). Flexible fitting suggests that this density could well accommodate Enp1 and Ltv1 (Figure S6E). The shape could also correspond to Rps10 and the C-terminal domain of Rps3 (Figure S6F); however we consider this possibility less likely as Ltv1 is accumulated in *rps20* $\Delta$ loop derived pre-40S particles (Figure 3g).

Most strikingly, in C3-S20 $\Delta$ loop particles, Rio2 adopts an altered conformation, and seems to be more loosely connected to the head of the particle than in other pre-40S structures (Figure 4D and Figure 5B and 5C). Furthermore, flexible fitting assays indicate that Rio2 could adopt an “unwound” conformation, with an opening of the flexible F-loop as well as of the nucleotide-binding pocket (Figure 5D). This stretched conformation might impede ATP hydrolysis of Rio2, and/or its subsequent release from the maturing small ribosomal subunit.

### **Rio2 and the Rps20 loop trigger final release of phosphorylated Ltv1**

To study the influence of the different mutants on ATP-dependent Ltv1 phosphorylation and the release of Ltv1 and Rio2, we performed in vitro ATP incubation assays with purified pre-40S subunits. The isolated Tsr1-TAP particles were immobilized on IgG-Sepharose beads, incubated in presence or absence of ATP and, after a subsequent washing step, eluted with TEV-protease. Notably, we observed an Ltv1 double band already in the untreated wild-type particles, likely corresponding to partial phosphorylation of Ltv1 in a subpopulation of the preparation (Figure 6A, *LTV1* wt, 6B, *RPS20* wt and 6C, *RIO2* wt). We speculate that the unphosphorylated population may correspond to the C1-WT pre-40S particles and the

phosphorylated population to the later C2-WT particle, in which Enp1 and Ltv1 seem to be more flexible (see the cryo-EM in Figure 4A and 4B). After incubation of wild-type particles with ATP, we observed a significant band-shift of both Ltv1 bands due to phosphorylation by Hrr25 (Figure 6A, 6B and 6C); however, the phosphorylated form of the protein was largely released from these particles. In addition, also Rio2 dissociated from wild-type particles upon ATP incubation.

As expected, Ltv1 was neither phosphorylated nor released upon ATP incubation of particles purified from a strain in which serines 336, 339 and 342 of Ltv1 were exchanged for alanines, preventing phosphorylation of Ltv1 by Hrr25 (Figure 6A). Notably, also in pre-40S particles derived from the *rps20.D113/E115>K* and the *rps3.K7/K10>D* mutants, Ltv1 was not phosphorylated and remained fully attached to the particles, confirming that the assembly of the Rps3 N-domain is a prerequisite for Hrr25 recruitment and subsequent Ltv1 phosphorylation (Figure 6B and Figure S7). Moreover, also Rio2 release was inhibited in these particles.

ATP-dependent Rio2 release was also blocked in pre-40S particles derived from the *rps20Δloop* mutant (Figure 6B), as well as the *rio2.D253A* mutant (Figure 6C). Most remarkably however, Ltv1 was not only phosphorylated on but also remained associated with these pre-40S particles; thus, clearly indicating that the Ltv1-release cascade proceeds in *rps20Δloop* and *rio2.D253A* mutants until the Ltv1 phosphorylation step, but its final dissociation from pre-40S particles is not yet enabled.

Together, the results of this assay suggest the following cascade of events culminating in Ltv1 release: the Rps3-N domain re-orientates and forms its contact with Rps20, thereby providing the prerequisites for Ltv1 phosphorylation by Hrr25. Concomitant repositioning of the Rps20-loop and ATP hydrolysis by Rio2 finally promote dissociation of phosphorylated Ltv1 from pre-40S particles.

Since ATP-dependent Rio2 release was not only inhibited in pre-40S particles from the *rio2.D253A* mutant (Figure 6C), but also in both tested *rps20* mutants (Figure 6B), we wondered whether all of these mutations prevented ATP hydrolysis by Rio2 or whether other effects were blocking Rio2 release. To address this question, we analyzed Rio2 ATP hydrolysis in pre-40S particles purified from different mutants by single-turnover experiments (Figure 6D). As expected, wild-type particles were able to hydrolyze ATP, while ATP hydrolysis was largely reduced in the catalytic *rio2.D253A* mutant, confirming that Rio2 is the main protein contributor in the purified pre-40S particles hydrolyzing ATP and releasing the resulting phosphate. Strikingly, ATP hydrolysis was substantially reduced in the *rps20Δloop* mutant, revealing that the Rps20 loop plays an important role in activating the Rio2 ATPase. In contrast, ATP hydrolysis was not reduced in particles from the *rps20.D113/E115>K* mutant, indicating that



Rio2 can hydrolyze ATP but is afterwards kept from dissociating from pre-40S particles (see Figure 6B), probably due to conformational reasons.

In conclusion, our results indicate a strong cooperativity between Ltv1 and Rio2 release, with both events being multi-step processes: the initial steps (Rps3-Rps20-contact formation, phosphorylation of Ltv1, and ATP hydrolysis by Rio2) can occur independently of the events on the respective other side of the 40S head, while the final steps, resulting in the dissociation of both factors, depend on the successful execution of all earlier steps.

Our data suggest that Rps20, by sensing the correct Rps3 N-domain positioning via its Rps3-interacting residues D113 and E115 as well as the correct Rio2 maturation stage via its loop region, coordinates these distantly occurring release events.

## DISCUSSION

In this work, we unraveled the intricate mechanism leading to the release of AFs Ltv1 and Rio2 from pre-40S particles, which is coordinated by the r-protein Rps20 (Figure 7A).

On the solvent-exposed side of pre-40S particles, the Rps3 N-domain re-orient, forming its contact with Rps20 (Figure 7A, upper panel, step 1). This conformational re-arrangement not only presumably weakens Ltv1's interaction with pre-40S particles (Mitterer et al., 2016), but also positions Ltv1 in a way that it can recruit Hrr25 (Figure 7A, upper panel, step 2). Due to competition for overlapping binding sites, Hrr25 likely (partially) disrupts the interaction between Ltv1 and Enp1. Ltv1 phosphorylation by Hrr25 then further destabilizes its interaction with pre-40S particles (Figure 7A, upper panel, step 3).

On the intersubunit side, the Rps20 loop stimulates ATP-hydrolysis by Rio2 (Figure 7A, lower panel, steps 1 and 2).

Most outstandingly, all these above described maturation events on the solvent-exposed and on the intersubunit side can take place independently of each other; however, the ultimate release of both Ltv1 and Rio2 is inhibited as soon as the maturation cascade is disrupted on either side. We propose that only the correct positioning of Rps20 on both sides commits the particles to proceed to Ltv1 and Rio2 dissociation.

The eventual triggers for release of Rio2 and Ltv1 are not known. However, based on this study and recent data from the Ferreira-Cerca group (Knüppel et al., 2018), we speculate that Rps20 and/or rRNA re-arrangements are involved. The two AFs may either dissociate at the same time, or one after the other. Indeed, there is some evidence that Rio2 may dissociate after Ltv1 (Hector et al., 2014; Strunk et al., 2012).

Inspection of recent cryo-EM structures representing different pre-40S maturation intermediates (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018) and of our *rps20Δloop* pre-40S structures (Figures 4 and 5) can help to put our findings into a structural context. Notably, cryo-EM structures of early cytoplasmic pre-40S particles (Figure 4A and 4B, Heuer et al) lack densities for Rps3 and Rps20, despite biochemical evidence that they are already assembled at this maturation stage (see for example Rps3 Western blots in Figure 6A-6C and (Ferreira-Cerca et al., 2007; Strunk et al., 2011)). This suggests high flexibility of the region Rps3 and Rps20 are bound to, probably because a major rRNA re-arrangement, resulting in the joining of helices h34, h35, and h38 into a three way junction, has not yet occurred (Heuer et al., 2017). We speculate that contact formation between the Rps3 N-domain and Rps20, together with rRNA restructuring, lead to their stable accommodation; such a scenario is in line with previously published results showing that both proteins initially bind only loosely to pre-40S particles and their stable incorporation occurs at a later stage (Ferreira-Cerca et al., 2007; Schäfer et al., 2006). Cryo-EM pre-40S structures presumably representing slightly later

maturation stages show the Rps3 N-domain and Rps20 already in their mature position while Ltv1 is still present (Johnson et al., 2017; Scaiola et al., 2018), which is in agreement with our findings that Ltv1 release occurs only after contact formation between the Rps3 N-domain and Rps20. Interestingly, the Rps3 C-domain is still flexible in these structures, suggesting that stable integration of the Rps3 C-domain occurs at an even later maturation stage.

Our cryo-EM structural analysis revealed an unusual positioning of Rio2 in a subpopulation of *rps20* $\Delta$ loop-mutant particles (Figure 5). This suggests that the presence, and presumably also the correct positioning, of the Rps20 loop is important to bring Rio2 into its correct conformation in which it is able to hydrolyze ATP. Our genetic data show that, while mutants lacking the Rps20 loop are viable, as are catalytic Rio2 mutants, the combination of both is lethal. This suggests that the Rps20 loop has, apart from its requirement for ATP hydrolysis, a second role, possibly by establishing the structural context needed for final Rio2 release.

The lack of structural information about the positioning of Rps20 in early pre-40S particles (Heuer et al., 2017) makes it difficult to predict whether the Rps20 loop and Rio2 already communicate in these particles. Analysis of the later pre-40S particle visualized by the Ban laboratory (Scaiola et al., 2018), as well as the structure of mature 40S, reveals two possible scenarios: (1) Both the Rps20 loop and Rio2 directly interact with 18S rRNA helix 31 (Ben-Shem et al., 2011; Scaiola et al., 2018), therefore communication between the Rps20 loop and Rio2 may occur via h31. Notably, a recent study revealed that Rio2 ATPase activity is inhibited by RNA (Knüppel et al., 2018). Hence, re-arrangements in the Rps20 loop may re-position inhibitory rRNA elements, thereby relieving the inhibition of Rio2.

(2) An alternative possibility would be a direct interaction between the Rps20 loop and Rio2. Indeed, also Rio2 contains an unstructured flexible loop, which has not been resolved in any of the so far published X-ray or cryo-EM structures. However, the last two resolved amino acids, lysine 129 and serine 145, are positioned in proximity to the Rps20 loop (Scaiola et al., 2018). To further evaluate the possibility of a direct contact between the two loops, we aligned Phyre 3D predictions of yeast Rio2 (containing the complete, modeled loop) to Rio2 in the pre-40S structure. Interestingly, in this model, the distance between the two loops is short enough to make such a contact theoretically possible (Figure 7B).

While this manuscript was in preparation, a series of human pre-40S structures representing different maturation stages was published (Ameismeier et al., 2018). Although differences between the human and yeast ribosome maturation pathways exist, the principle order of events is similar and comparable intermediates as observed in yeast are also found in this human maturation series. However, despite the great progress in the field gained in the last few months due to high-resolution cryo-EM structures, none of the so far published structures was able to temporally or causally resolve the interdependent, multi-step maturation cascade

described in this study. The static snapshots gained by cryo-EM make it difficult capture the many, presumably very short-lived transitions between two stable intermediates and moreover, the technique fails to visualize flexible regions. Our study exemplifies that only by combining such structural knowledge with in depth functional analyses it is possible to unravel the steps of the pathway at a mechanistic level.

Several hundred maturation factors participate in ribosome biogenesis, and it has to be an immense logistic challenge to coordinate their action. A consecutive order in which the point of action of each factor is precisely defined would be highly inefficient, as every single factor would need to communicate with many different, remote factors. The Rio2/Ltv1 release pathway highlights a much more elegant mechanism to coordinate maturation events. In this setting, physically close events are interconnected, like Rps3/Rps20 repositioning leading to Ltv1 repositioning, leading to Hrr25 recruitment, leading to Ltv1 phosphorylation. Distant events like stimulation of Rio2 ATP hydrolysis by the Rps20 loop can occur independently, but at certain checkpoints, like the Rps20 checkpoint we discovered, the successful completion of assembly events is monitored before pre-ribosomes are licensed to progress in their further maturation.

Communication across the ribosomal subunit as performed by Rps20 is a sophisticated way to coordinate the action of ribosome AFs. Similar mechanisms may also be used by other ribosome maturation factors but also by accessory factors regulating translation.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Yeast strains and plasmids**

*Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table S1 and are, unless otherwise specified, derived from W303. Strains were constructed utilizing established gene disruption, C-terminal tagging and tetrad dissection methods. For yeast-two-hybrid analyses the reporter strain PJ69-4A (Table S1) was used. Plasmids used in this study are listed in Table S2 and were constructed according to standard DNA cloning techniques and verified by sequencing.

### **Plasmid shuffle assays**

Shuffle strains were constructed by knocking out an essential gene in a diploid yeast strain, transformation with a *URA3* plasmid containing the respective wild-type gene and sporulation to generate haploids harboring the gene knockout and the complementing *URA3* plasmid.

These shuffle strains were transformed with *LEU2* or *TRP1* plasmids carrying different alleles of the gene of interest and analyzed on 5-FOA containing plates to select for cells

that have lost the *URA3* plasmid carrying the wild-type gene, allowing to evaluate the phenotype caused by the allele on the *LEU2* or *TRP1* plasmid.

Double shuffle strains contained knockouts of two essential genes complemented by two *URA3* plasmids with wild-type genes and were generated by crossing of two different shuffle strains with opposing mating types and subsequent sporulation and identification of haploids containing both knockouts and both *URA3* plasmids with the corresponding wild-type genes. Double shuffle strains were transformed with combinations of *LEU2* and *TRP1* plasmids carrying different alleles of the two genes of interest. They were also analyzed on 5-FOA containing plates to select for cells that have lost both *URA3* plasmids.

### **Yeast two-hybrid (Y2H) interaction analyses**

Plasmids expressing the bait proteins, fused to the *GAL4* DNA-binding domain (G4BD), and the prey proteins, fused to the *GAL4* activation domain (G4AD), were co-transformed into the reporter strain PJ69-4A. Yeast two-hybrid interactions were documented by spotting representative transformants in 10-fold serial dilution steps on synthetic dextrose complete (SDC)-Trp-Leu, SDC-Trp-Leu-His (*HIS3* reporter), and SDC-Trp-Leu-Ade (*ADE2* reporter) plates. Growth on SDC-Trp-Leu-His plates is indicative of a weak interaction, whereas only relatively strong interactions permit growth on SDC-Trp-Leu-Ade plates.

### **Affinity purification of pre-40S particles**

Pre-40S particles were purified using the AF Tsr1 as bait protein. Cells expressing C-terminally TAP-tagged Tsr1 (Tsr1-TAP) were grown in 2 L YPD medium at 30°C and harvested at an  $OD_{600}$  of ~1.8. *TSR1*-TAP strains expressing mutant variants of Ltv1 from *LEU2* plasmids were grown in 4 L SDC medium lacking leucine and harvested at an  $OD_{600nm}$  of ~0.9. Cell pellets were resuspended in lysis buffer containing 50 mM TRIS pH 7.5, 100 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.075% NP-40, 1 mM DTT, 1x FY protease inhibitor cocktail (Serva). Cells were broken in presence of glass beads by shaking in a bead mill (B. Braun homogenizer 853022) cooled with  $CO_2$ . Lysates were cleared by centrifugation at 4°C for 10 and 30 min at 5,000 and 14,000 rpm respectively. Lysates were incubated with IgG-beads (GE Healthcare) on a rotating wheel at 4°C for 75 min. Beads were washed with 5 ml lysis buffer w/o protease inhibitors, subsequently transferred into Mobicol columns (Mobicol) and washed with 10 ml lysis buffer. After resuspension in lysis buffer, pre-40S particles were eluted by incubation with Tobacco etch virus (TEV) protease at RT on a rotating wheel for 90 min. Eluates were analyzed by SDS-PAGE on 4-12% polyacrylamide gels (Invitrogen) and Coomassie staining or Western blotting with the indicated antibodies.

### **In vitro phosphorylation assay with purified pre-40S particles**

After IgG-incubation and subsequent washing steps, bound Tsr1-TAP particles derived from different mutant strains were divided into two Mobicol columns and incubated on a rotating wheel, in presence or absence of 1 mM ATP, for 30 min at 4°C with buffer containing 50 mM TRIS pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.075% NP-40, 1mM DTT. After washing with 2 ml buffer to remove ATP, TEV-cleavage was performed as described above and eluates were analyzed by SDS-PAGE with 4-12% polyacrylamide gels (Invitrogen) and Western blotting.

### **ATPase activity measurements on purified pre-40S particles**

The corresponding yeast cells (1L) were grown in YPD supplemented with 20 mg/L adenine at 30°C to an OD<sub>600nm</sub> of 1.5 and harvested by centrifugation. Cell pellets were resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol and lysed using a Precellys cell disruptor (Bertin instruments) in 15 ml vials containing 5 ml zirconia beads (Ø 100 µm - Roth) (Lysis settings 6x30s at 6,000 rpm with 30s pause in between – pre-cooled downed with liquid nitrogen).

Cell lysates were clarified by centrifugation (5 min at 4,000 rpm 4°C). IgG-beads (GE Healthcare) were added to the resulting clarified supernatants and incubated for 90 min at 4°C under mild agitation.

The immobilized pre-40S particles were first extensively washed in batch (40 beads volumes) and then on a gravity-flow chromatography column (60 beads volumes). TEV protease cleavage was performed O/N at 4°C in presence of ribonuclease inhibitor.

The resulting TEV eluates were stored at 4°C until used for ATPase assays. The levels of co-purified Rio2 present in the eluates was estimated by western blot analyses and accordingly adjusted in order to use similar amounts of Rio2 in the single turnover assay.

For single turnover analysis, 5% of the Rio2-adjusted eluates were first incubated 10 min at 30°C and then mixed with an equal volume of a pre-warmed  $\gamma^{32}\text{P}$ -labeled ATP (Hartmann Analytic 6,000 Ci/mmol) / ATP mix (ATP end concentration 200 nM). Aliquots (5%) were collected at the indicated time points and prepared for thin-layer chromatography (TLC) analysis as described previously (Ferreira-Cerca et al 2012 and 2014). TLC plates were exposed to a phosphorimager screen and signals were acquired on a Typhoon FLA-9500 (GE Healthcare).

Single-turnover experiment quantifications (Image J) and standard deviations were derived from at least a biological replicate (two different purifications) and a technical replicate (two single turnover experiments per purification). Values are expressed relative to the amounts of P<sub>i</sub> liberated in one wild-type condition after 60 min (set to 100%).

### Western blotting

Western blot analysis was performed using the following antibodies: anti-Rps3 antibody (1:30,000; provided by Matthias Seedorf), anti-Nob1 antibody (1:5,000; provided by David Tollervey), anti-Ltv1 antibody (1:8,000; provided by Katrin Karbstein), anti-Enp1 antibody (1:4,000; provided by Katrin Karbstein), anti-Tsr1 antibody (1:4,000; provided by Katrin Karbstein), anti-Dim1 antibody (1:4,000; provided by Katrin Karbstein), anti-Pno1 antibody (1:2,000; provided by Katrin Karbstein), anti-Rio2-antibody (1:5,000; provided by Katrin Karbstein), anti-CBP antibody (1:5,000; Millipore), secondary anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:15,000; Sigma) .

### Polysome profile analyzes

Cells expressing wild-type *RPS20* or the indicated *rps20* mutants were grown at 25 °C in 80 ml of YPD medium to logarithmic growth phase ( $OD_{600nm}$  of ~0.6). 100 µg/ml cycloheximide was added to the cultures and after incubation for 5 min on ice, cells were pelleted and washed with lysis buffer (10 mM TRIS, pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml cycloheximide). After resuspension in lysis buffer and cell lysis with glass beads, 6  $A_{260}$  units of the cell extracts were loaded onto 7–45% sucrose gradients (dissolved in 50 mM TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and centrifuged at 180,000 x *g* for 2 h 45 min at 4 °C. Gradients were analyzed using a UA-6 system (Teledyne ISCO) with continuous monitoring at  $A_{254 nm}$ .

### Northern blot analyzes

Cells expressing wild-type *RPS20* or the indicated *rps20* mutants were grown in YPD medium at 25°C to logarithmic growth phase. Cells were resuspended in lysis buffer containing 10 mM TRIS pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS and lysed by vortexing in presence of glass beads. RNA was extracted in two subsequent steps with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and once with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). RNA was precipitated by addition of 1/10 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and 2.5 volumes of 100% ethanol and after drying dissolved in nuclease-free water. 3 µg of the isolated RNA was denatured at 65°C, separated on 1.5 % agarose gels (containing 20 mM 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 0.75% formaldehyde, pH 7.0) and transferred overnight onto Hybond N<sup>+</sup> nylon membranes (GE Healthcare) by capillary transfer. Hybridization with <sup>32</sup>P 5'-radiolabeled oligonucleotides (probe D/A<sub>2</sub> (20S): 5'-GACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTG-3', probe 18S: 5'-GCATGGCTTAATCTTTGAGAC-3', probe 25S: 5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3') was performed overnight at 42°C in buffer containing 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 7% SDS and

1 mM EDTA. After 3 subsequent washing steps with buffer containing 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 1% SDS, signals were detected by exposing X-ray films.

### **Fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence microscopy**

Fluorescence *in situ* hybridization was carried out as described previously (Grosshans et al., 2000), using a Cy3-labeled ITS1-specific probe (5'-Cy3-ATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATCCA TTTTCAAATTATTAATTTCTT-3') for detection of ITS1-containing pre-rRNAs. Cells were examined by fluorescence microscopy on a Zeiss Axioskop microscope. Live yeast cells expressing GFP fusion proteins were imaged by fluorescence microscopy using a Zeiss Axioskop microscope.

### **Cryo-EM grid preparation and single particle analysis**

#### *Pre-40S particle purification for cryo-EM*

Wild-type (WT) pre-ribosomal particles were purified from a BY4742-derived *S. cerevisiae* strain harboring a C-terminal tandem-affinity purification tag on Tsr1 (Tsr1-FPZ). This FPZ tag is composed of a Flag peptide, a PreScission cleavage site, and a Z-domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A (Belhabich-Baumas et al., 2017). 12 L of yeast cells were grown at 30°C in YPD medium to an OD<sub>600nm</sub> of 0.8 to 1 and harvested by centrifugation at 4,000 rpm for 10 minutes at 4°C. Pellets were washed twice with ddH<sub>2</sub>O and flash frozen in liquid nitrogen. Frozen yeast cells were then lysed by cryogenic grinding, using a Planetary Ball Mill PM100 (Retsch). The yeast lysate was then resuspended in ice-cold buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal supplemented with Complete EDTA free protease inhibitor (Roche)), and cleared by centrifugation (4°C, 15 min, 10,000 g). The supernatant was incubated on IgG-Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h on a rocking table at 4°C. Beads were washed with buffer B (20 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 100 mM KOAc, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.02% Tween 20, 0.1% Triton), and IgG-bound complexes were subsequently eluted by PreScission-Protease cleavage (2 h, 4°C). This eluate was subjected to a second affinity purification step by incubation with Anti-Flag® M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) in buffer C (20 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 100 mM KOAc, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% Tween 20, 0.1% Triton) at 4°C, washed in buffer D (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and immediately eluted in the same buffer supplemented with 0.2 mg/mL 2X Flag peptide (custom-made, IGBMC, Strasbourg).

*rps20Δloop* pre-40S particles were purified via Tsr1-TAP as described above (see section: Affinity purification of pre-40S particles).



After affinity purification, eluted WT or *rps20Δloop* pre-40S particles were deposited on a 10-30% sucrose gradient in buffer E (20 mM HEPES, pH7.6, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT supplemented with 0.1% glutaraldehyde) according to the GraFix method (Kastner et al., 2008). 11 mL-containing gradient tubes were submitted to ultracentrifugation on a Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge, using a SW41 rotor (3 h 20 min, 38,000 rpm, 4°C). Gradient fractions were subsequently scanned at A<sub>254nm</sub> and collected using a Fraction Collector system (Foxy R1, Teledyne Isco). Fractions of interest were pooled and sucrose was removed by 5 successive series of concentrating/washing with Buffer E without glutaraldehyde on Vivacon 2 centrifugal devices (Sartorius).

#### *Grid preparation and cryo-EM image acquisition.*

Cryo-EM grids were prepared and systematically checked at METI, the Toulouse cryo-EM facility. 3.5 μL of purified pre-40S particles (with RNA concentrations ranging from 25 to 35 ng/μL as estimated by NanoDrop measurement) were deposited onto freshly glow-discharged holey carbon grids (QUANTIFOIL<sup>®</sup> R2/1, 300 mesh with a 2 nm continuous layer of carbon on top). Grids were plunge-frozen using a Leica EM-GP; temperature and humidity level of the loading chamber were maintained at 20°C and 95%, respectively. Excess of solution was blotted with a Whatman filter paper no.1 for 1.7-1.9 sec and grids were immediately plunged into liquid ethan (-183 °C).

For pre-40S particles purified from Tsr1-FPZ WT cells, the best cryo-EM grids were sent to the Netherlands Center for Electron Nanoscopy (NeCEN), to perform image acquisition on a Cs-corrected FEI Titan Krios microscope (FEI, Thermo Fisher Scientific) operating at 300 kV. Using the FEI EPU software, images were automatically recorded on a Falcon II direct electron detector at a nominal magnification of 59,000× (corresponding to a calibrated pixel size of 1.12 Å) and a total electron dose of 45.6 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> over 7 frames. Images of pre-40S particles purified from Tsr1-TAP *rps20Δloop* cells were recorded at the cryo-TEM platform of IECB, Bordeaux, France, on a Talos Arctica operating at 200 kV, equipped with a Falcon III direct electron detector (FEI, Thermo Fisher Scientific). Automatic image acquisition was performed with EPU, at a nominal magnification of 120,000× corresponding to a calibrated pixel size of 1.24 Å and a total electron dose of 45.5 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> over 20 frames. For both data acquisitions, defoci values ranged from -1 μm to -3 μm.

#### *Single particle analysis.*

For Tsr1-FPZ WT pre-40S particles, a total number of 5,122 stacks of frames was collected in two successive sessions at NeCEN (Leiden, The Netherlands). Frames stacks were aligned to correct for beam-induced motion using Motioncor2 (Zheng et al., 2017). Contrast Transfer Function (CTF) and defocus estimation was performed on the realigned stacks using

CTFFIND4 (Rohou and Grigorieff, 2015). After selection upon CTF estimation quality, maximum resolution on their power spectra and visual checking, 2,866 good micrographs were retained for further analysis. 228,349 particles were automatically picked, then extracted in boxes of 360x360 pixels, using RELION 2.1 autopick option. All subsequent image analysis was performed using RELION 2.1 (Scheres, 2012) (Figure S5A). A first 2D classification was performed (on particle images binned by a factor of 9) to sort out ill-picked particles. The 86,372 remaining particles were binned by a factor of 2 and subjected to a 3D classification in 5 classes, using the 40S subunit extracted from the crystal structure of the *S. cerevisiae* 80S ribosome (PDB-ID 4V88)(Ben-Shem et al., 2011), low-pass filtered to 60 Å, as initial reference. This resulted in 3 classes with full 40S morphology. Particles from these classes were grouped and re-extracted without imposing any binning factor, and a consensus 3D structure was obtained using 3D auto-refinement in RELION, with an overall resolution of 8.2 Å for FSC=0.143 according to gold-standard FSC procedure. This resolution was improved to 6.1 Å by (1) re-centering and re-extracting the particles according to their new origins, and (2) using the solvent-flattened FSC option in a new round of 3D auto-refinement. Subsequent rounds of global 3D classifications followed by 3D auto-refinements were then performed, using a 40 Å low-pass filtered version of the consensus 3D structure as initial reference.

Images of Tsr1-TAP *rps20Δ*loop pre-40S particles were acquired in two successive sessions at IECB (Bordeaux, France), using the same purification and cryo-EM grid batch. Images were processed with the same approach as described above for the WT pre-40S particles (Figure S5B).

#### *Map interpretation.*

Atomic models of pre-40S particles (PDB-ID 6EML, PDB-ID 6FAI) (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018) or mature 40S subunit (PDB-ID 4V88) (Ben-Shem et al., 2011) were fitted in the 3D maps of interest as rigid body using the “fit” command in UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Segmentation of the 3D maps was performed with the Segger option in Chimera. After rigid body docking, the pre-40S atomic model 6FAI, either as such (Figure 4, Figure S6F) or devoid of Enp1 and Ltv1 supplemented with Rps10 from the mature 40S atomic model 4V88 (Figure S6E) was further fitted into the K3mut 3D map using MDFF (Trabuco et al., 2008). A first relaxation cycle was run using 700,000 steps and a G-scale value of 0.3, followed by an energy minimization of 40,000 steps and a G-scale value of 10. All the cryo-EM maps were displayed in Chimera, with a surface threshold of  $3\sigma$  unless otherwise stated.

## Figure legends

### Figure 1. Rps3 N-domain assembly promotes Hrr25 recruitment, thereby disturbing the Ltv1-Enp1 interaction

(A) Hrr25 is not bound to particles impaired in contact formation of the Rps3 N-domain with Rps20. Tsr1-TAP particles were isolated from wild-type cells or from cells expressing the indicated *rps3* (left panel) or *rps20* (right panel) mutant alleles and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. MS analyzes revealed that, while Hrr25 is present on particles isolated from wild-type strains, it is absent or strongly reduced from particles on which the Rps3 N-domain is not assembled (i.e. *rps20*.D113/E115>K) and *rps3*.K7/K10>ED)). (B and C) Characterization of the interaction between Ltv1 and Hrr25. A C-terminal Hrr25 truncation (Hrr25(1-394)) and a mutant version thereof (Hrr25(1-394).K38R) fused to the Gal4 DNA-binding domain (BD) was tested for Y2H interaction with Ltv1 (B) and Ltv1 phosphomutants (Ltv1.S6>A and Ltv1.S6>E) (C) fused to the Gal4 activation domain (AD). Cells were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu-Trp, SDC-His-Leu-Trp (-his; growth on this medium indicates a weak interaction), and SDC-Ade-Leu-Trp (-ade; growth on this medium indicates a strong interaction) plates. (D) Ltv1 is required to recruit Hrr25. Tsr1-TAP particles were isolated from *ltv1*Δ cells expressing plasmid-borne wild-type *LTV1*, the *ltv1*(S336/S339/S342>A) phosphomutant, or harbouring an empty plasmid (Δ*ltv1*). Eluates were analyzed by SDS-PAGE, Coomassie staining and MS. (E) Hrr25(1-394).K38R (left panel) and Enp1 (right panel) fused to the BD were tested for Y2H interaction with the indicated Ltv1 fragments fused to the AD. (F) The deduced, minimal binding sites for Hrr25 and Enp1 on Ltv1 are indicated. In addition the sites on Ltv1 for Rps3 binding, Rps20 binding, phosphorylation by Hrr25 (Mitterer et al., 2016), and the nuclear export sequence (Merwin et al., 2014) are depicted. (G) Enp1 over-expression weakens the Hrr25-Ltv1 interaction. Y2H strains expressing Hrr25(1-394).K38R fused to the BD in combination with the indicated Ltv1 constructs fused to the AD were transformed with empty plasmid (left panel) or with a plasmid for *ENP1* over-expression under control of the *ADH1* promoter (right panel).

### Figure 2. A conserved loop in Rps20 promotes cytoplasmic 40S subunit maturation

(A-C) Crucial cytoplasmic pre-40S maturation steps are functionally interconnected. A *RIO2* (*rio2*Δ) shuffle *ltv1*Δ strain (A), a *RIO2* (*rio2*Δ) *RPS3* (*rps3*Δ) double shuffle strain (B), and a *RIO2* (*rio2*Δ) *RPS20* (*rps20*Δ) double shuffle strain (C) were transformed with plasmids carrying the indicated wild-type and mutant alleles. Transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu-Trp (-leu-trp) or 5-FOA containing medium (to select for cells that have lost the respective *URA3* plasmid(s) harboring the wild-type gene(s)) and growth was

monitored after incubation at 30°C for the indicated days. (D) Rps20 loop protrudes through the pre-40S subunit towards Rio2 on the intersubunit side. Rps20 (green), Rps3 N-domain (red), and Rio2 (blue) in the pre-40S structure (PDB 6FAI) (Scaiola et al., 2018) (upper panel). Sequence alignment reveals conservation of the Rps20 loop between eukaryotes and archaea (lower panel). (E and F) Rps20 loop is crucial for cell growth. An *RPS20* (*rps20Δ*) shuffle strain was transformed with the indicated plasmid-based alleles and transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu and SDC+5-FOA plates (E) or, after plasmid shuffling on 5-FOA, on YPD plates (F). Growth was monitored after incubation at 30°C for the indicated days. (G-I) Rps20 loop mutants strongly impair 40S subunit synthesis. (G) Polysome profiles of the indicated *rps20* loop mutants were recorded after centrifugation on 7-45% sucrose gradients. (H) Northern blot analyzes of total RNA extracts from wild-type *RPS20* or the indicated *rps20* mutant cells using probes detecting the 20S pre-rRNA, mature 18S rRNA, and 25S rRNA (left panel). Simplified pre-rRNA processing scheme (right panel). All detected (pre-)rRNA species are indicated in bold letters. (i) Cells expressing wild-type *RPS20* or the indicated *rps20* alleles were analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a Cy3-labeled probe specific to the D/A2 segment of ITS1. The nucleoplasm was stained with DAPI. PC, phase contrast.

### Figure 3. A genetic network between Rps20 loop and 40S maturation mutants

(A-C) *rps20* loop alleles enhance the phenotypes of mutants that impair Rps3-N domain-assembly. (A) An *RPS20* (*rps20Δ*) shuffle strain was transformed with the indicated plasmid-based *rps20* alleles. Transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu and SDC+5-FOA plates and growth at 30°C was monitored after 3 and 5 days, respectively. (B) An *RPS20* (*rps20Δ*) *RPS3* (*rps3Δ*) double shuffle strain was transformed with the indicated plasmid-based *RPS20* and *RPS3* wild-type and mutant alleles. Transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu-Trp and SDC+5-FOA plates and growth at 30°C was monitored after 3 and 5 days, respectively. (C) Polysome profiles of cells expressing the indicated *rps20* alleles, revealing an increased 40S synthesis defect when a Rps20 loop mutation is combined with a *rps20* allele that affects the interaction with the Rps3 N-domain (R68/K69>A D113/E115>K mutant). The panels below the profiles show growth of the respective strains on YPD plates incubated for 2 days at 30°C. (D and E) Genetic interactions between *rps20* loop alleles and mutants of pre-40S AFs. An *RPS20* (*rps20Δ*) *RIO2* (*rio2Δ*) double shuffle strain (D) and an *RPS20* (*rps20Δ*) shuffle *Itv1Δ* strain (E) were transformed with the indicated plasmid-based alleles. Transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu-Trp (-leu-trp) or 5-FOA-containing medium and growth at 30°C was monitored at the indicated days. (F) Genetic network illustrating the interplay of the Rps20 loop with AFs and r-proteins at distant sites on the preribosome. All genetic interactions discovered in this study

(Figures 2 and 3) and in our previous study (Mitterer et al., 2016) are indicated by dashed lines. (G) The Rps20 loop is required for AF release from cytoplasmic pre-40S particles. Tsr1-TAP particles were purified from wild-type *RPS20* or *rps20* $\Delta$ loop yeast strains. Eluates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting using the indicated specific antibodies.

#### **Figure 4: Cryo-EM analysis of wild-type and *rps20* $\Delta$ loop pre-40S particles.**

Surface views of the 3D cryo-EM map of (A) C1-WT, (B) C2-WT, (C) C2-S20 $\Delta$ loop, (D) C3-S20 $\Delta$ loop. Ptf: platform; bk: beak; lf: left foot; rf: right foot. Arrowheads on panels (B) and (C) indicate an increased density on the beak of C2-S20 $\Delta$ loop compared to C2-WT. Left panel (first two columns): solvent and 60S interface views of segmented cryo-EM maps. Densities corresponding to AFs and r-proteins of interest were segmented and color-coded as follows: Rps20, green; Tsr1, pink; Rio2, blue; Rps20, green; Enp1/Ltv1, violet; Rps3 N-domain, bright red; Rps3 C-domain, dark red. Right panel (last two columns): fitting of a pre-40S atomic model PDB 6FAI (Scaiola et al., 2018) into each cryo-EM map, performed either by rigid body docking (A-C) or flexible fitting (D) using the MDFF software (Trabuco et al., 2008).

#### **Figure 5: Analysis of the C3-S20 $\Delta$ loop cryo-EM map.**

(A) Left panel: flexible fitting of 6FAI into C3-S20 $\Delta$ loop; for simplification, only the head of the particle as seen from the beak is displayed, and the cryo-EM map surface view is shown with a high voxel value threshold ( $\sim 4.5\sigma$ ), to emphasize rRNA position. Similarly, only rRNA from model 6FAI after flexible fitting is displayed (blue ribbon). Right panel: rigid body fittings of 6FAI (yellow) and mature 40S subunit atomic model (PDB ID 4V88) (magenta) into the C3-S20 $\Delta$ loop cryo-EM map have been superimposed. (B, C) Slices through the "neck" region (viewed from the body, as indicated on the left panel) of C2-S20 $\Delta$ loop (B) and C3-S20 $\Delta$ loop (C). The pre-40S atomic model with PDB code 6FAI (Scaiola et al., 2018) was fitted as rigid body into both aligned cryo-EM structures. Rio2 is represented by blue ribbons, Tsr1 in pink and the rest of the pre-40S components are in pale blue. The arrowhead points towards differences in cryo-EM densities of C2-S20 $\Delta$ loop and C3-S20 $\Delta$ loop particles. F and  $\alpha$ C indicate unstructured flexible loop and the N-terminal end of the "C"  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ C) of Rio2, respectively. (D) Atomic models of Rio2 as found in pre-40S atomic model 6FAI (left panel) and after flexible fitting into cryo-EM map C3-S20 $\Delta$ loop (right panel). The active site, containing catalytic aspartate D229, metal-binding aspartate D253, and nucleotide-binding lysine K123 (Ferreira-Cerca et al., 2012) is highlighted by a red dotted circle. The unstructured, flexible loop (F) is indicated by arrowheads.

#### **Figure 6. Rio2 ATP hydrolysis stimulated by the Rps20 loop triggers release of phosphorylated Ltv1**

(A-C) In vitro phosphorylated Ltv1 remains trapped on pre-40S particles containing the catalytically inactive Rio2.D253A or the mutant Rps20 $\Delta$ loop protein. Tsr1-TAP particles from cells expressing wild-type or mutant alleles of *LTV1* (left panel), *RPS20* (middle panel), and *RIO2* (right panel) were immobilized on IgG-beads. Particles were incubated in absence (-) or presence (ATP) of ATP, washed, and eluted with TEV protease. Eluates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. (D) The Rps20 loop stimulates Rio2 ATPase activity. Relative ATPase activity obtained from purified Tsr1-TAP particles, carrying the indicated *RIO2* or *RPS20* alleles, was monitored by single-turnover experiment. The input was adjusted to equal amounts of Rio2 (right panel). An exemplary thin layer chromatography showing ATP and released phosphate (Pi) is depicted (upper left panel) and quantification and standard deviation of results obtained from 2 biological and 2 technical replicates is provided (lower left panel).

**Figure 7. Model of Rps20-mediated coordination of cytoplasmic pre-40S maturation events by Rps20**

(A) Maturation events on the solvent-exposed and intersubunit side of pre-40S subunits converge into a final maturation event leading to the release of Ltv1 and Rio2 (see Discussion). (B) Possible steric clashes between the Rps20 loop and the flexible loop of Rio2. Left panel: Rps20 and Rio2, as found in the pre-40S atomic model 6FAI (Scaiola et al., 2018), are displayed in light green and light blue ribbons, respectively. Rps20's loop (amino acids 68-78, linking two  $\beta$ -strands) is in dark green. Rio2's flexible loop (amino acids 129-145), missing in this atomic model, is represented by a dotted line. To visualize the length of this loop, a Phyre 3D structure prediction of *S. cerevisiae* Rio2 (dark blue ribbon) has been aligned to the Rio2 structure in 6FAI. Putative steric clashes between the Rps20 loop and Rio2's flexible loop were searched with the Chimera "find clashes/contacts" utility (orange lines). Right panel: close-up on the region contoured by a black rectangle. rRNA as found in the 6FAI atomic model is represented by grey ribbons.

**Figure S1. Related to Figure 1. Interaction of Ltv1 with Hrr25 and Enp1**

(A) Ltv1 is the main interaction partner of Hrr25 on the pre-40S particle. Full-length Hrr25, fused to the Gal4 DNA-binding domain (Hrr25-BD), was tested for Y2H interaction with the depicted AFs and r-proteins located at the head of the 40S subunit, fused to the Gal4 activation domain (AD). Cells were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu-Trp, SDC-His-Leu-Trp (-his; growth on this medium indicates a weak interaction), and SDC-Ade-Leu-Trp (-ade; growth on this medium indicates a strong interaction) plates. Note that full-length Hrr25 shows some self-activation of the *HIS3* reporter gene (left panel). The interactions were also tested using a C-terminally truncated Hrr25 variant (1-394) carrying additionally an exchange in the

catalytic residue (K38R), which showed almost no self-interaction (right panel). Note that Ltv1 was the only protein showing a strong interaction with Hrr25 in both conditions. A weaker interaction was observed between Hrr25 and Rps15, which was however lost with the truncated Hrr25 variant. (B) The bystin domain of Enp1 mediates the interaction with Ltv1. The indicated Enp1 Gal4 DNA-binding domain fusions (Enp1-BD) were tested for Y2H interaction with an Ltv1 Gal4 activation domain fusion (Ltv1-AD). See (A) for a detailed description.

**Figure S2. Related to Figure 1. Ltv1 has two minimal, largely overlapping Hrr25 and Enp1 binding sites.** The indicated Ltv1 truncation variants, fused to the Gal4 DNA binding domain (Ltv1-AD), were tested for interaction with Hrr25(1-394).K38R, full-length Enp1 and Enp1.155C (amino acids 155-483), fused to the Gal4 DNA binding domain (BD). See legend of Figure S1 for a detailed description.

**Figure S3. Related to Figure 2. Localization of Ltv1 and Enp1 in *rio2.D253A* mutants and growth phenotype of *rps20* loop mutants**

(A) Alignment of the C-terminal sequence of Ltv1. The amino acids comprising its nuclear export sequence (NES) are marked in red and the three exchanges in the Ltv1-NES3>A reporter construct are indicated. (B) The subcellular localization of Enp1-GFP and the Ltv1-NES3>A-GFP reporter construct (the point mutations in the C-terminal NES of Ltv1 lead to a predominantly nuclear steady-state localization of the protein), was assessed by fluorescence microscopy in cells expressing wild-type *RIO2* or the catalytically inactive *rio2.D253A* allele, revealing that recycling of these AFs back to the nucleus relies on the ATPase activity of Rio2. (C and D) An *RPS20* (*rps20Δ*) shuffle strain was transformed with plasmid-based wild-type *RPS20* or the indicated *rps20* mutant alleles. Representative transformants were spotted in 10-fold serial dilutions on SDC-Leu and SDC+5-FOA plates and incubated at 30°C for 2 days (left panels). After plasmid shuffling on 5-FOA, strains were spotted on YPD plates and incubated at the indicated temperatures for 2 days (right panels).

**Figure S4. Related to Figure 4. 3D Structure determination of wild-type and *rps20Δ/loop* pre-40S particles by cryo-EM and single particle analysis.** (A) Surface views from the beak (upper panel) and from the 60S interface (lower panel) of the consensus 3D structures of the wild-type (WT, left) and the *rps20Δ/loop* (middle) pre-40S particles, compared to identical views of an early cytoplasmic pre-40S particle, purified via Ltv1-FTpA, low-pass filtered to ~7 Å resolution (EMDB ID: 3886) (Heuer et al., 2017). On the latter, contours of densities corresponding to the presence of Enp1/Ltv1, Rio2, and Tsr1 are indicated by dashed lines. Arrows point to zones of increased density in the beak of the mutant structure compared to the

wild-type one. (B) Sections of the consensus 3D structures of the WT (left) and the *rps20Δloop* (right) pre-40S particles. (C and D) Fourier Shell Correlation plots showing average resolutions of the various WT (C) and *rps20Δloop* (D) pre-40S particle maps according to the 'gold standard' criterion (FSC=0.143).

**Figure S5. Related to Figure 4. Cryo-EM image processing scheme.**

(A) Wild-type pre-40S particle dataset. (B) *rps20Δloop* pre-40S particle dataset.

**Figure S6. Related to Figure 4. Cryo-EM maps analysis.**

(A-D) Comparison between cryo-EM maps obtained in this study and other available 3D structures. (A) Surface views from the solvent (left panel) and 60S-interface (right panel) of the C1-WT map. This Figure is identical to the left part of Figure 4A and is shown here in order to allow direct comparison with the cryo-EM map in (B). (B) identical views of the cryo-EM map of early cytoplasmic pre-40S particle low-pass filtered to ~7 Å resolution (EMDB ID: 3886)(Heuer et al., 2017). (C) Solvent view of the C3-S20Δloop cryo-EM map. The Figure is identical to the very left part of Figure 4D and is shown here in order to allow direct comparison with the cryo-EM map in (D). (D) identical view of the mature 40S subunit (PDB ID: 4V88) (Ben-Shem et al., 2011), low-pass filtered to 11 Å resolution. Maps have been segmented and color-coded as indicated on the right. (E-F) Flexible fitting assays into the C3-S20Δloop cryo-EM map. (E) MDFF of the pre-40S particle atomic model with PDB ID 6FAI (Scaiola et al., 2018) devoid of Enp1 and Ltv1 and supplemented with Rps10 (turquoise ribbons). (F) MDFF of the original atomic model (PDB 6FAI) featuring Enp1 (yellow ribbons), and a fragment of Ltv1 (purple ribbons) was fitted on the same cryo-EM map. Color codes for other components of the 6FAI atomic model are indicated on the right.

**Figure S7. Related to Figure 6. The *rps3.K7/K10ED* N-domain-assembly mutant prevents Ltv1 phosphorylation and release**

Tsr1-TAP particles were isolated from *RPS3* (*rps3Δ*) shuffle cells expressing plasmid-based wild-type *RPS3* or the *rps3(K7E/K10D)* mutant and the *in vitro* phosphorylation assay was performed as described in Figure 6. Eluates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.



Figure 1

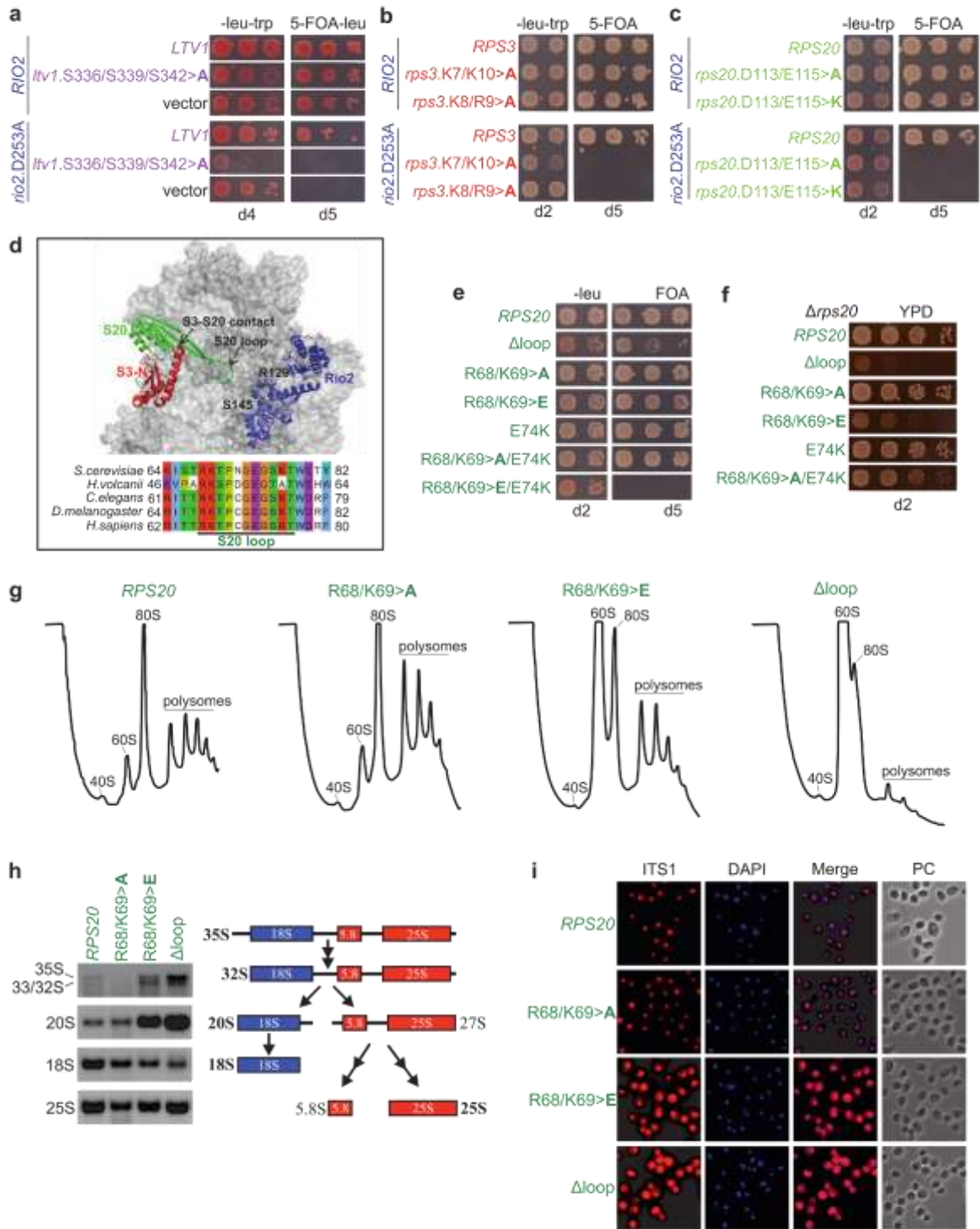


Figure 2

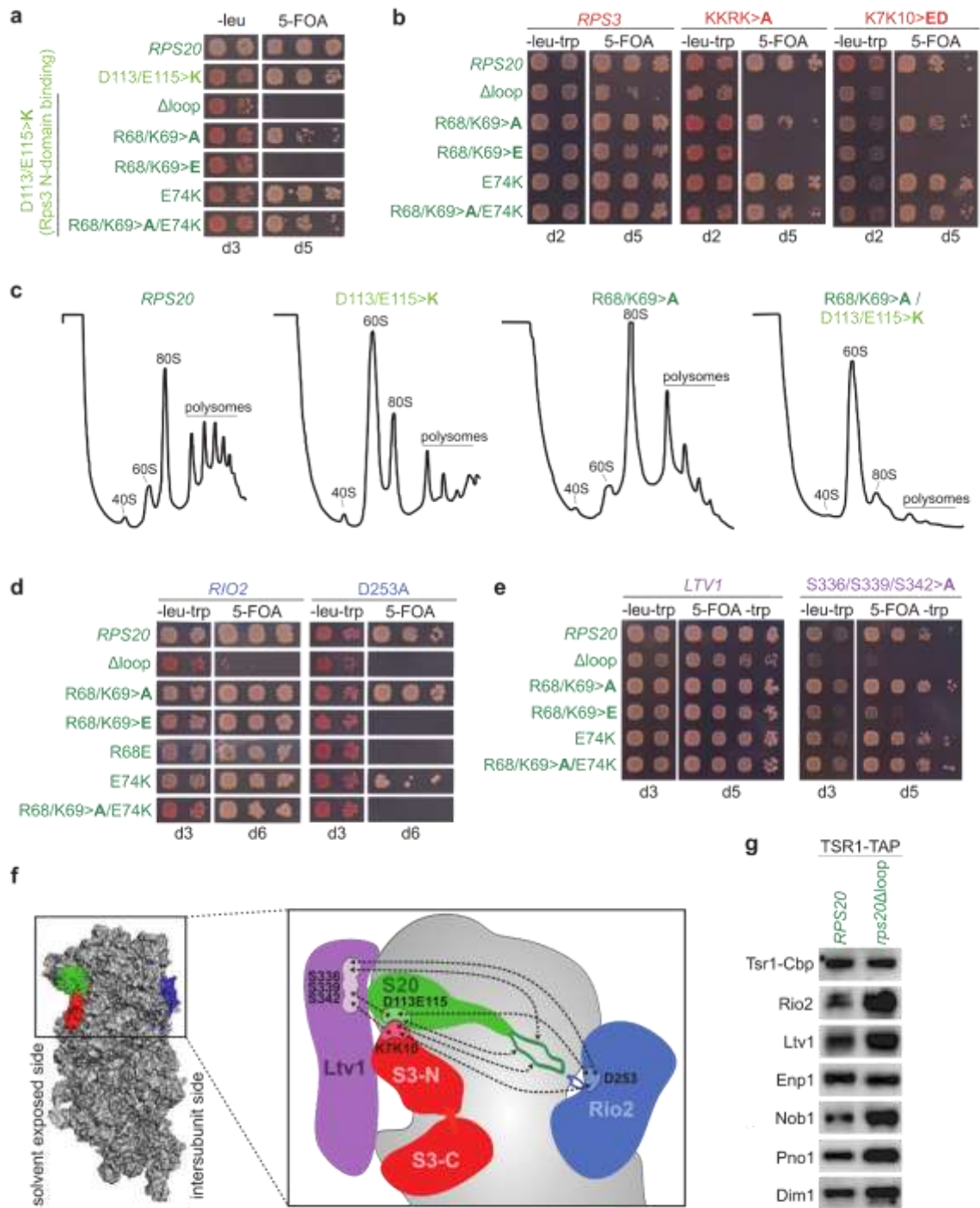


Figure 4

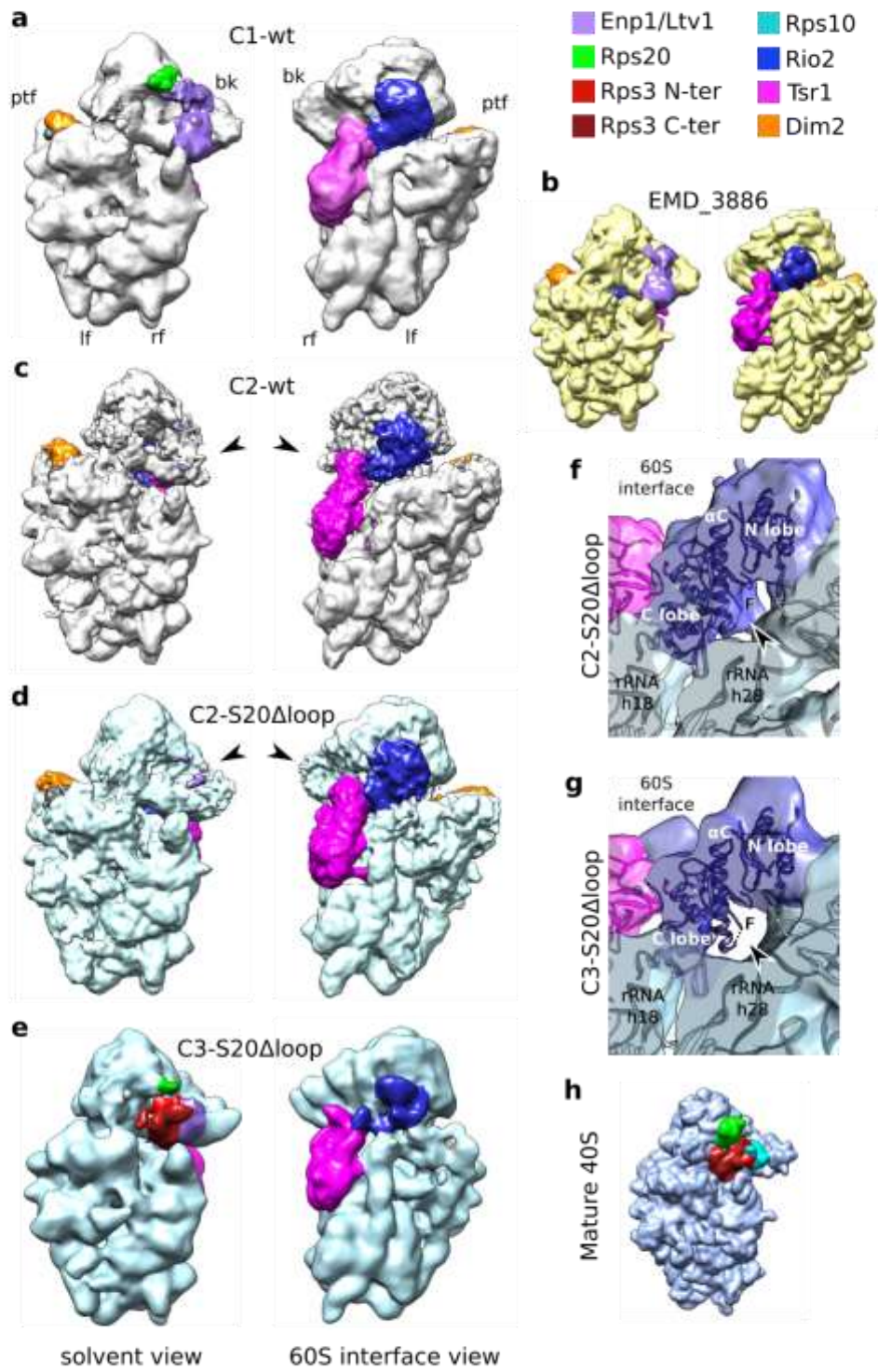


Figure 4

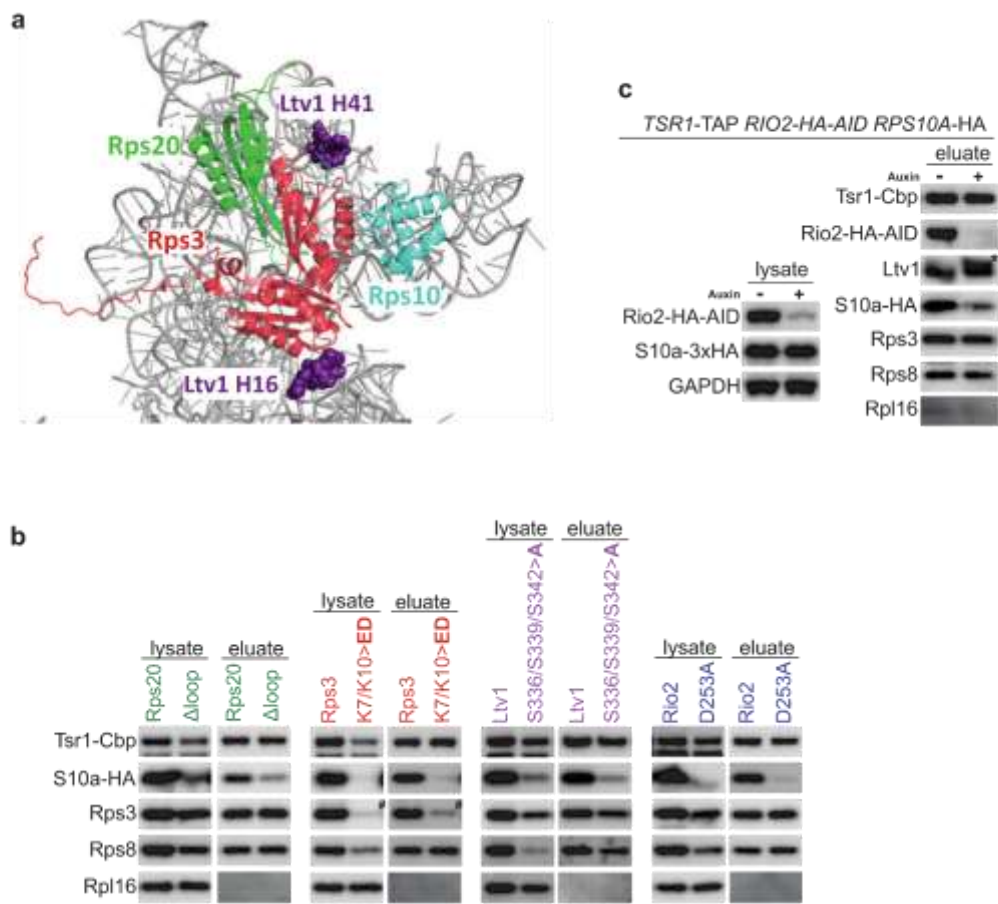


Figure 5

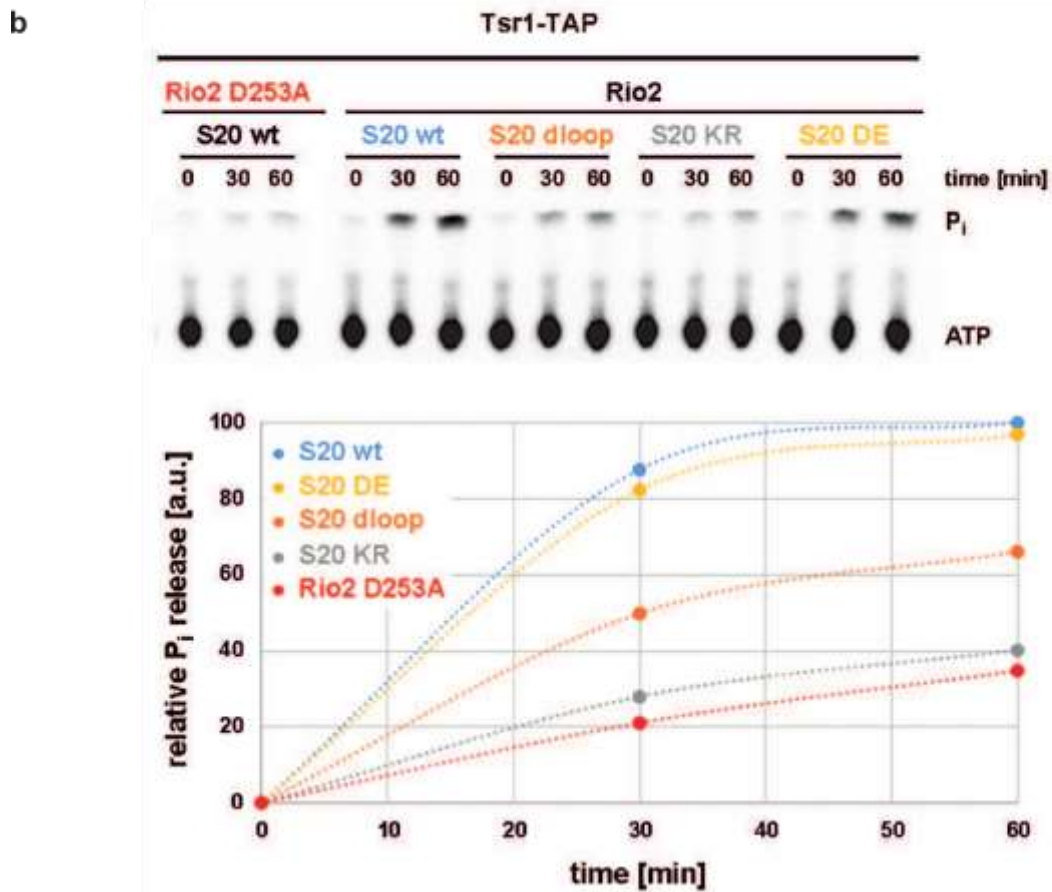
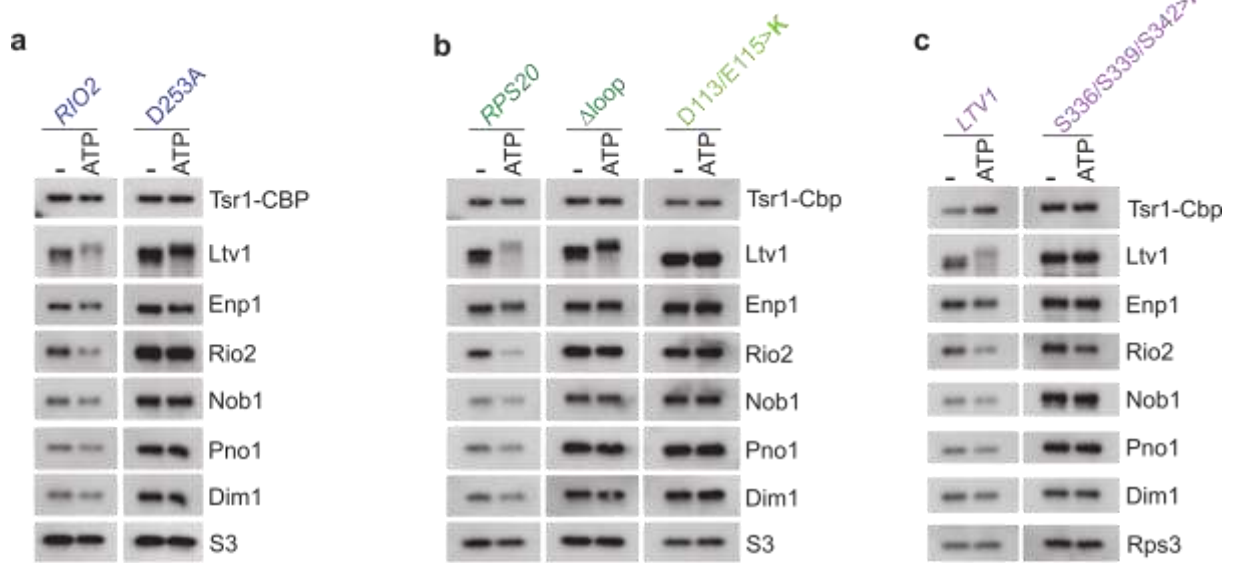


Figure 6

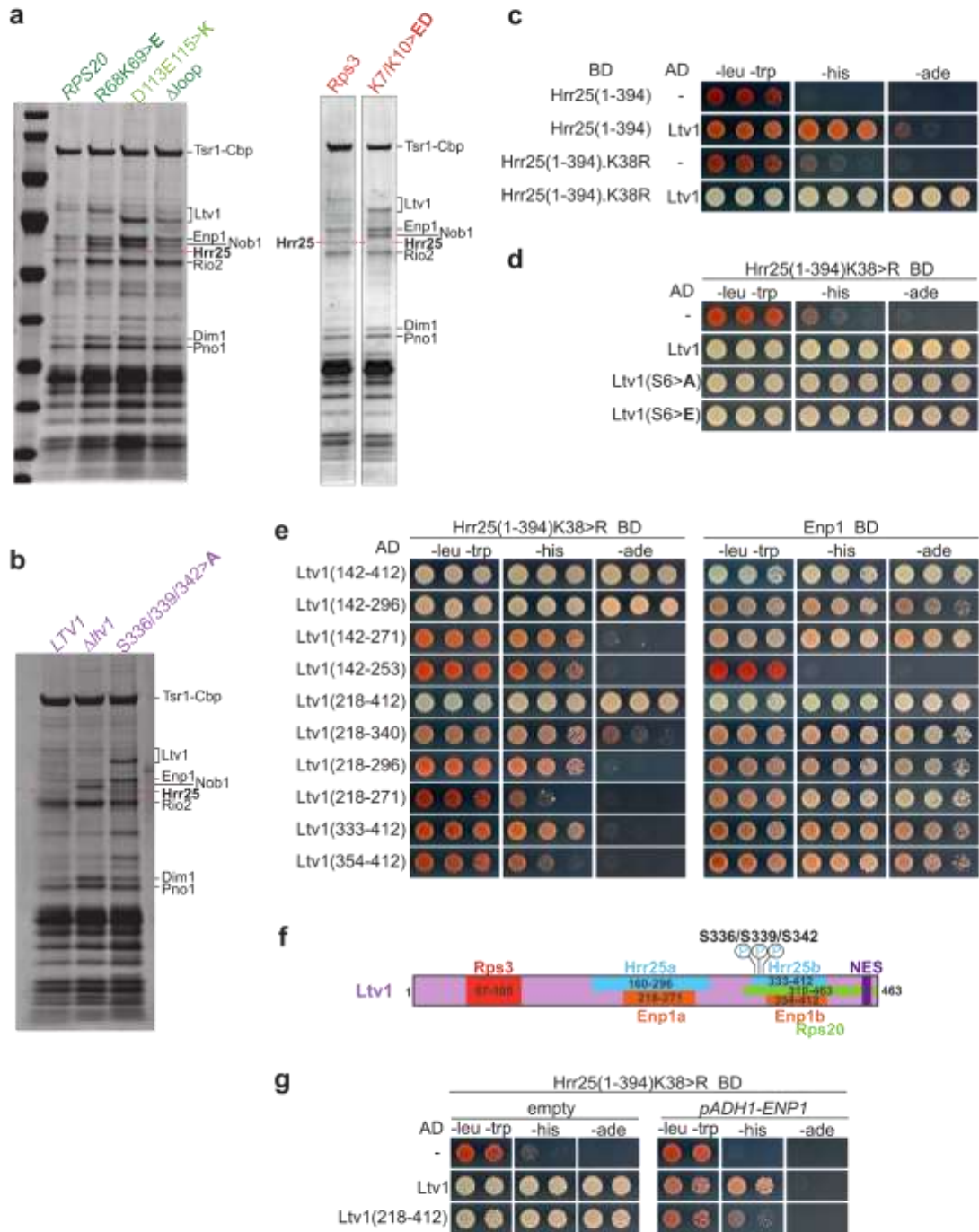
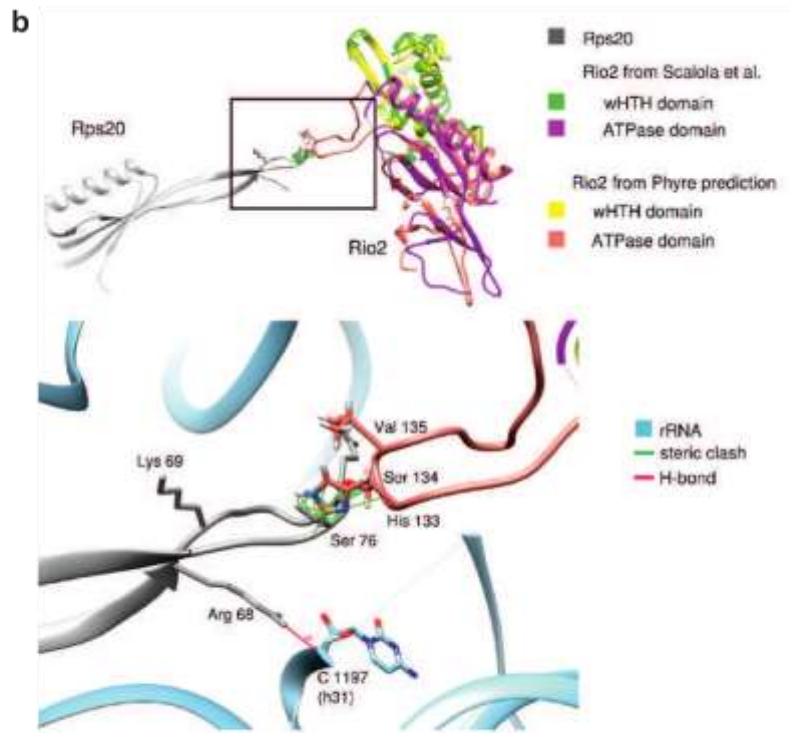
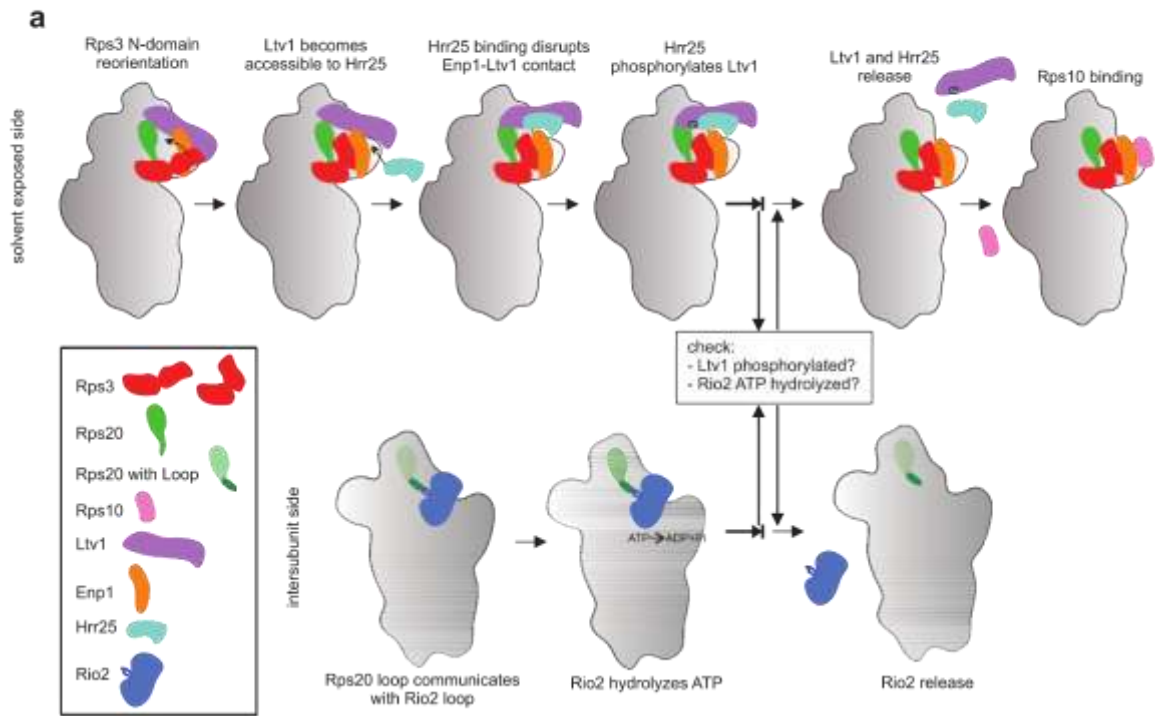


Figure 7

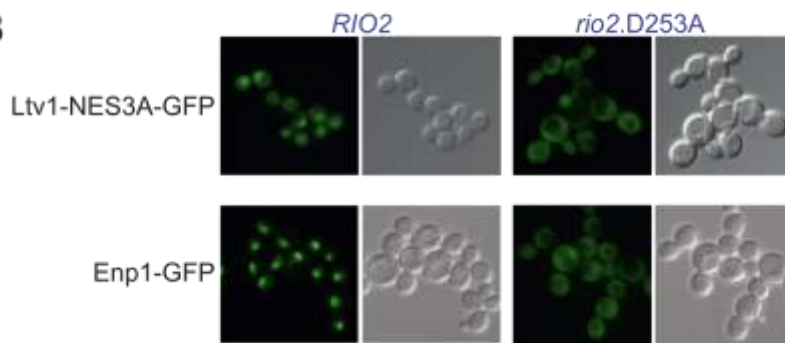


# Supplemental Figure 1

A

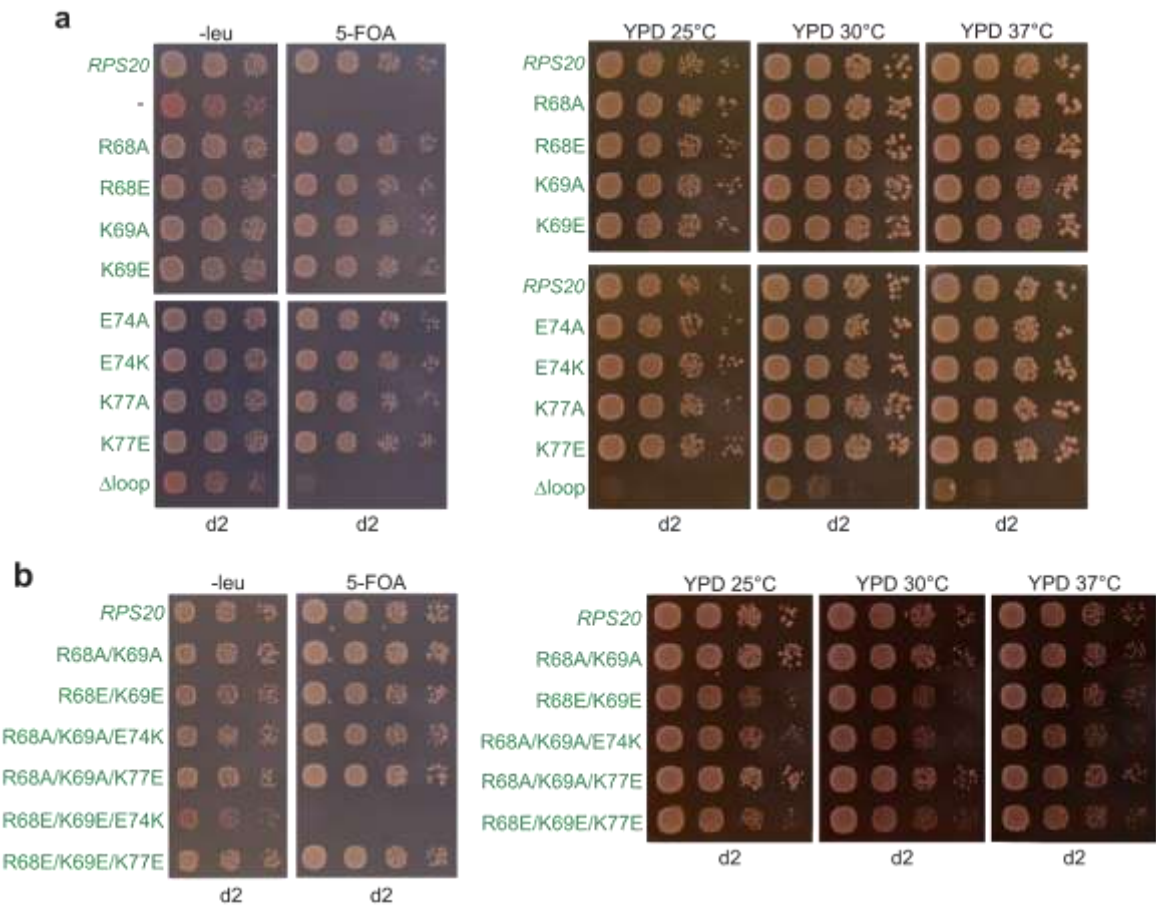
			A	A	A						
<i>S.cerevisiae</i>	448	KKK	E	K	T	T	F	S	S	K	463
<i>S.pombe</i>	371	LEE	G	N	R	K	M				386
<i>H.sapiens</i>	460	EKE	L	N	K	K	N	E	G	K	475

B

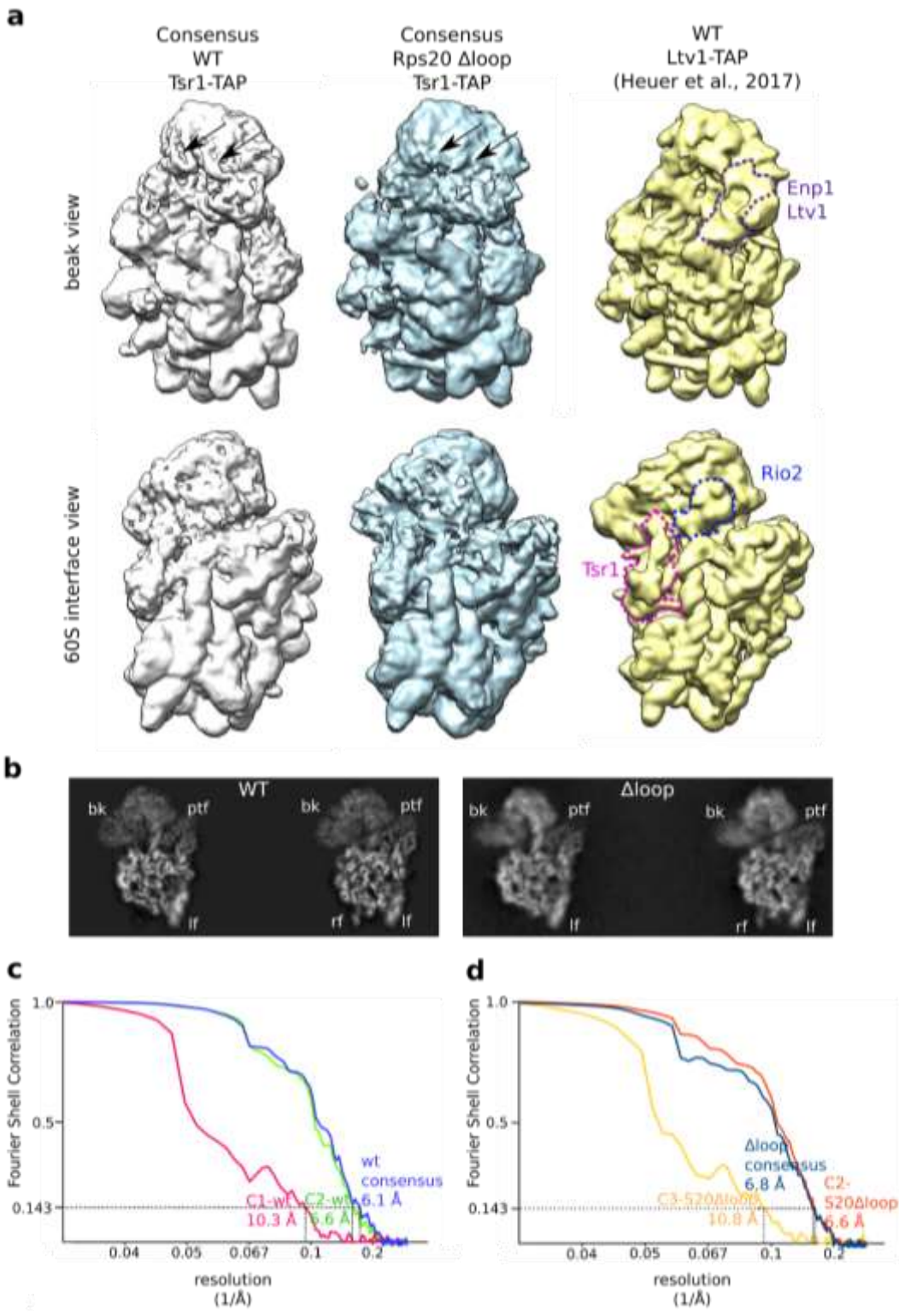




Supplemental Figure 2

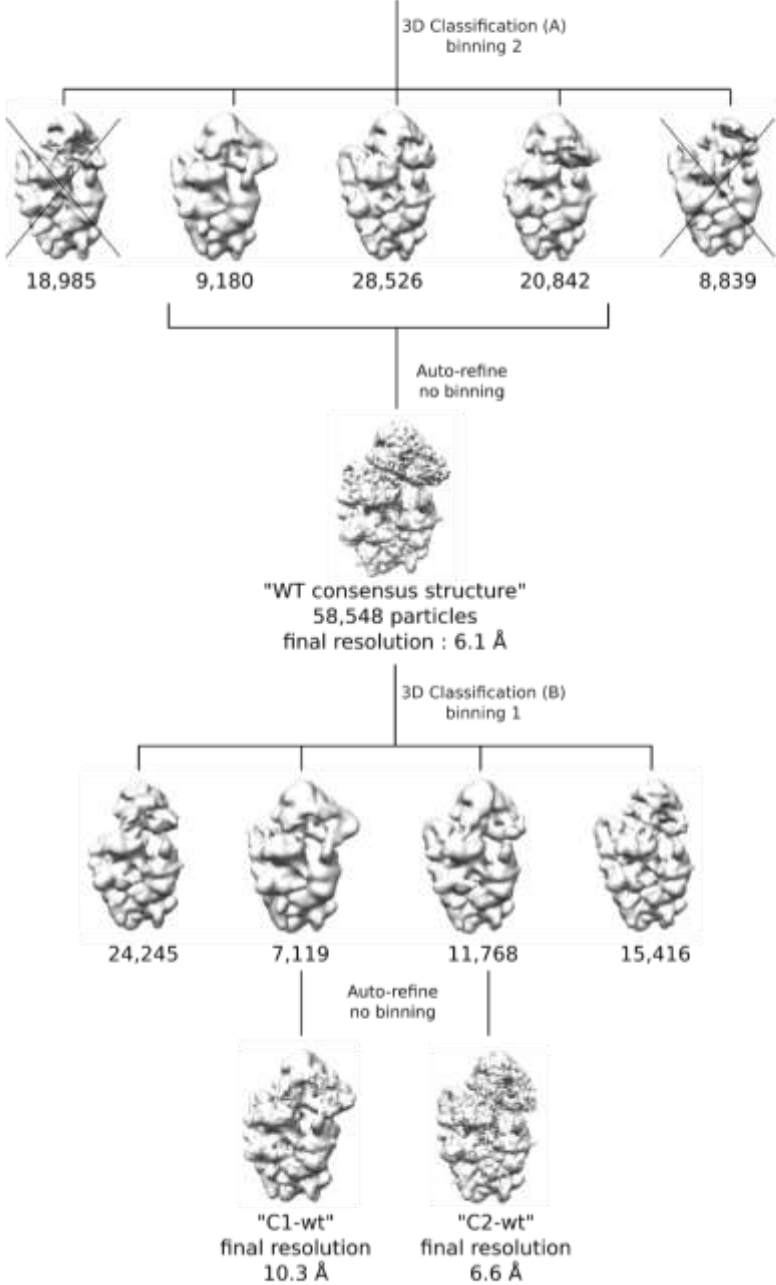


Supplemental Figure 3



# Supplemental Figure 4

WT::Tsr1-TAP pre-40S particles  
Data collection on Titan Krios + Falcon II, 5122 frames  
Frame alignment w. Motioncorr2  
Ctf estimation w. Ctffind4  
Kept frames w. Thon rings beyond 5 Å resolution: 2866 frames left  
Autopick : 228,349 particles. 2D Classification + Sorting : 86,372 particles



## Supplemental Figure 5

Rps20( $\Delta$ loop)::Tsr1-TAP pre-40S particles

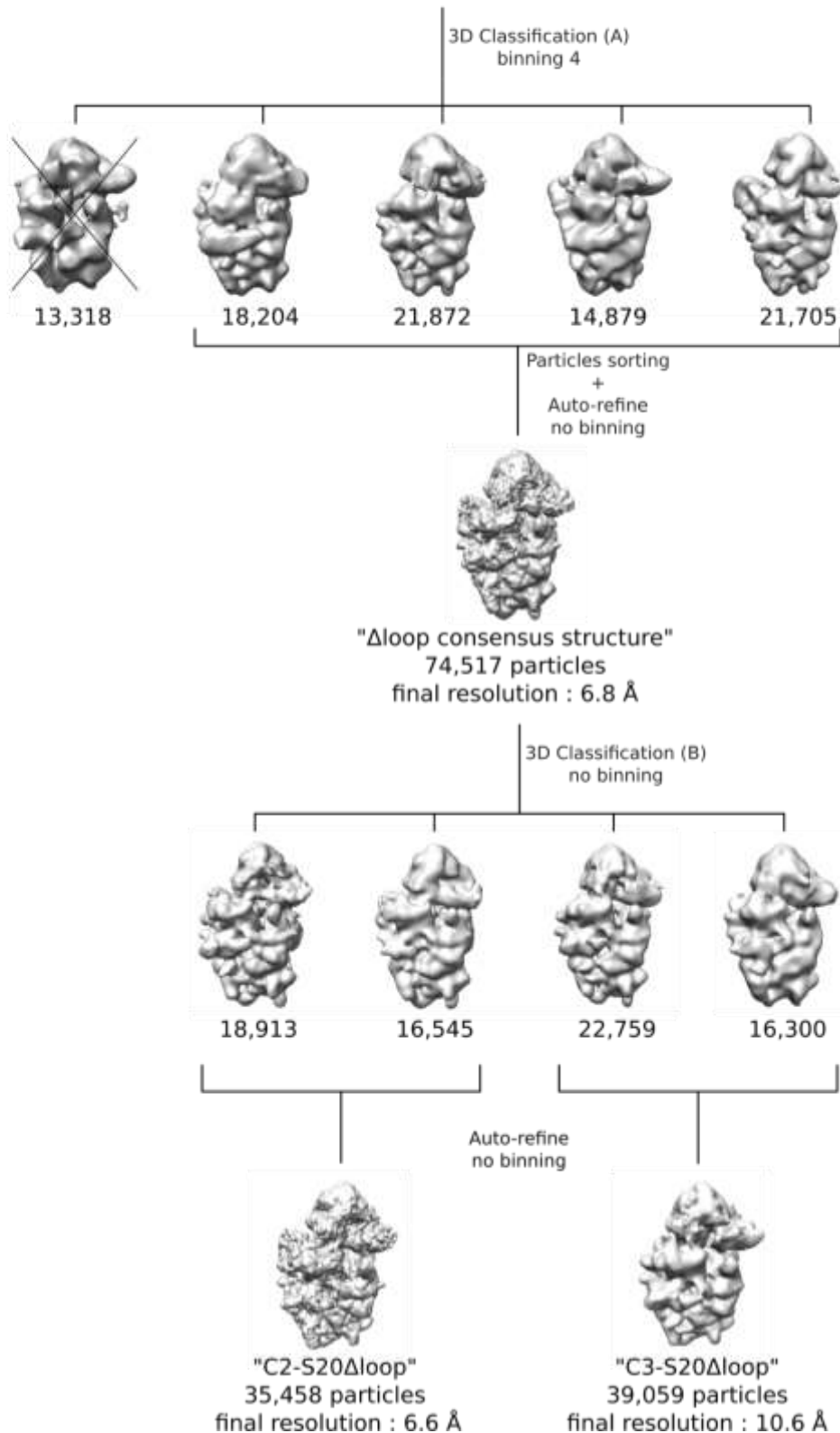
Data collection on Talos Arctica + Falcon III: 4037 frames

Frame alignment: Motioncorr2

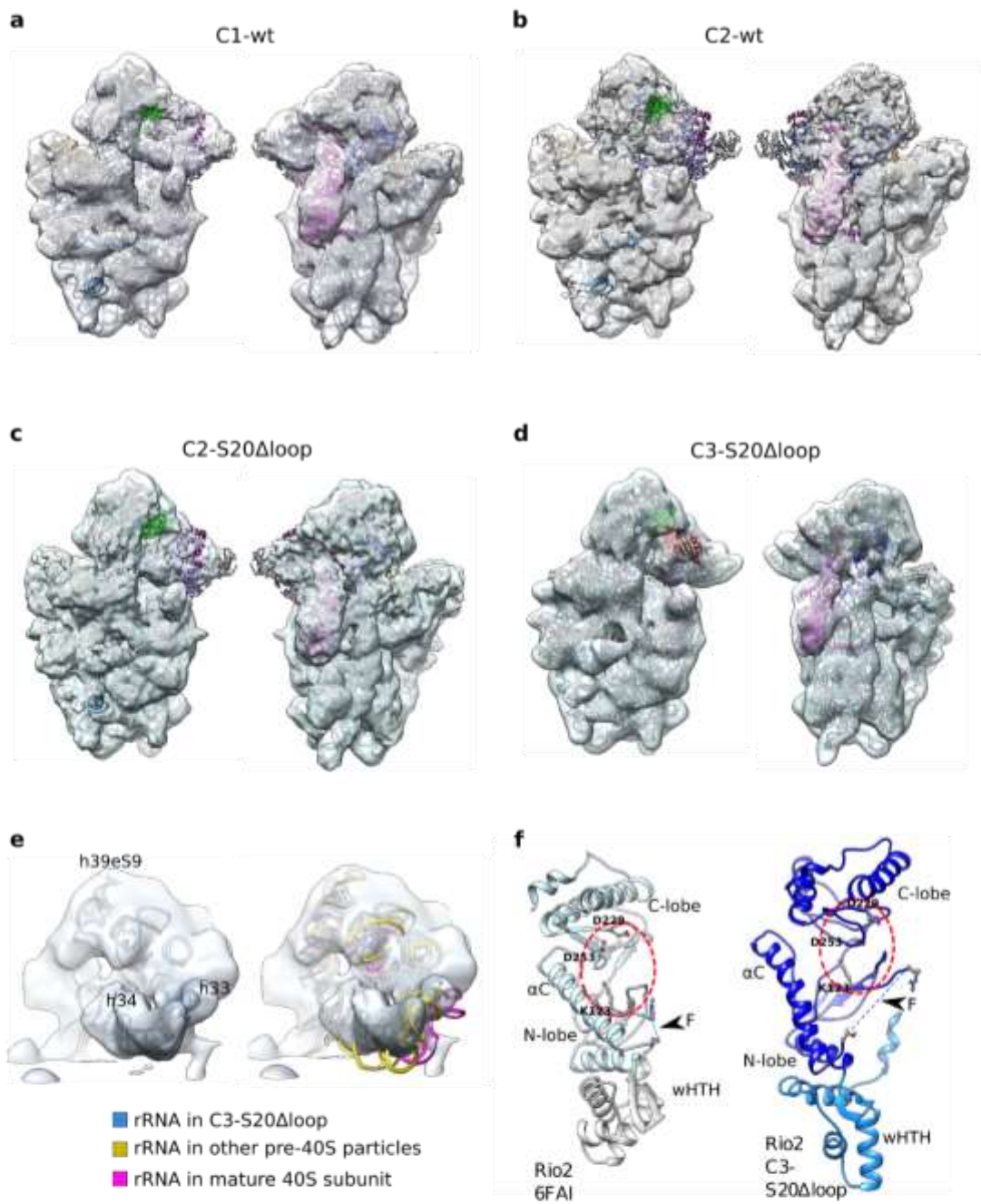
Ctf estimation: Ctffind4

Kept frames w. Thon rings beyond 5 Å resolution: 2725 frames left

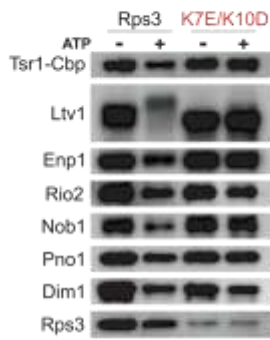
Autopick : 168,192 particles. 2D Classification + Sorting : 89,978 particles



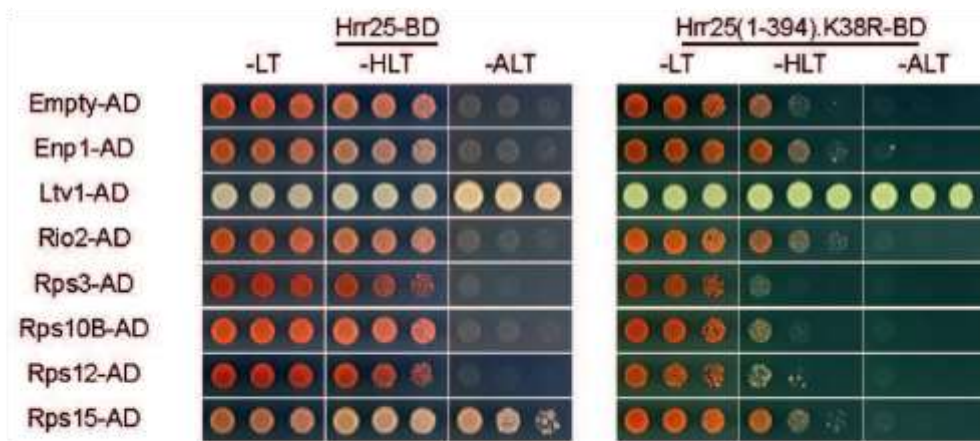
Supplemental Figure 6



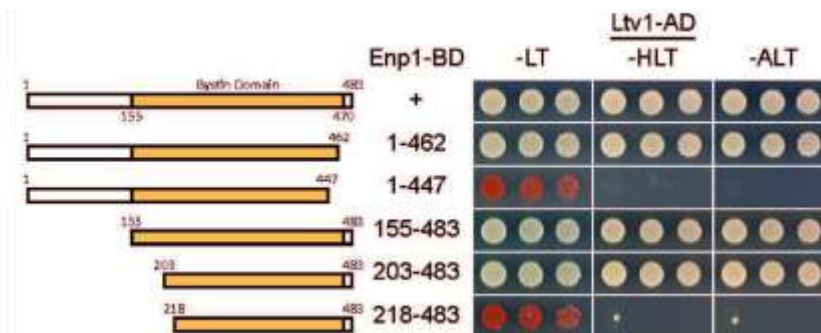
Supplemental Figure 7



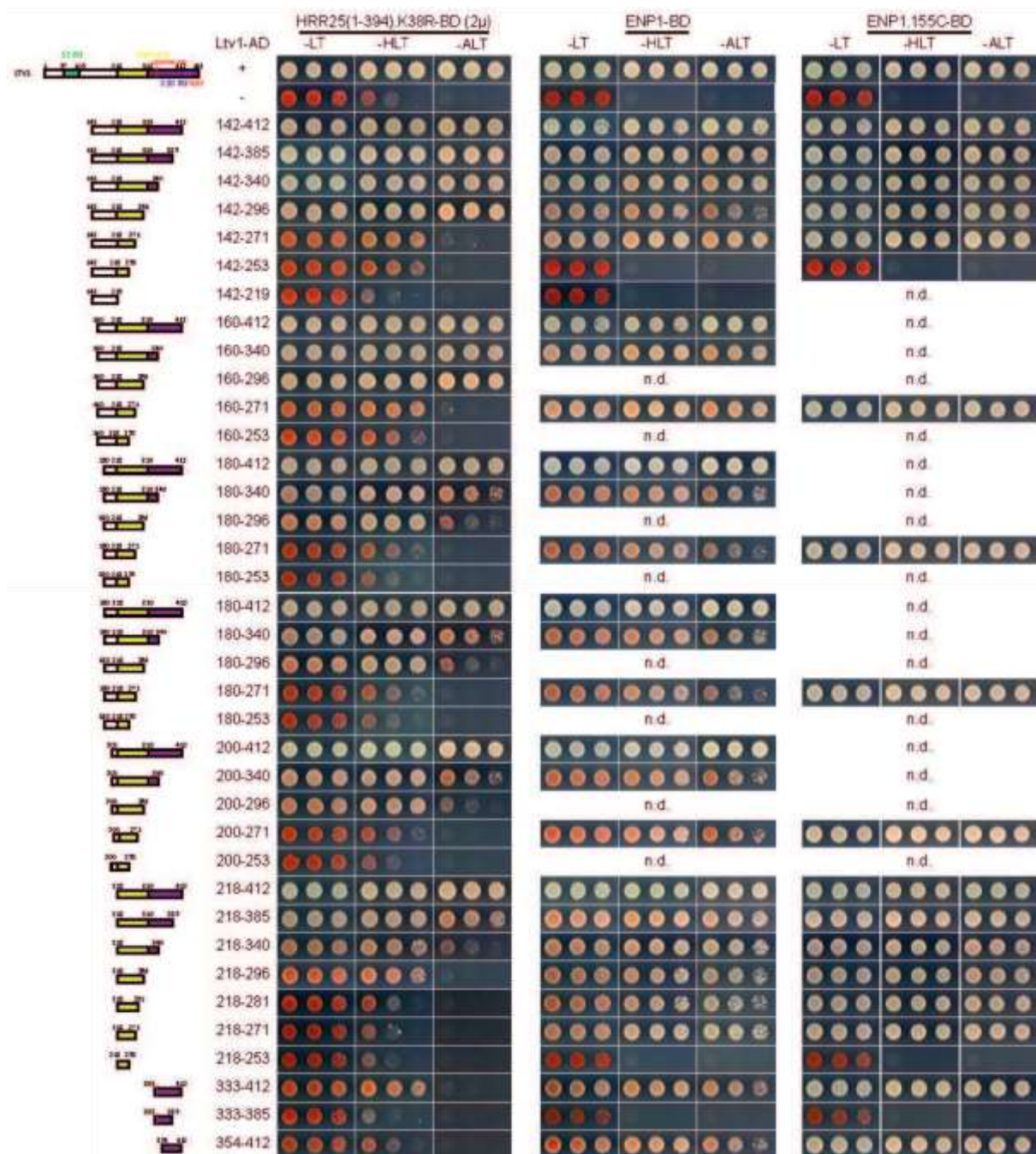
Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 9



Supplemental Figure 10



**Table S2. Plasmids**

<b>Name</b>	<b>relevant information</b>	<b>source</b>
YCplac111	CEN, <i>LEU2</i>	
pRS316- <i>RIO2</i> -GFP	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Schäfer et al., 2003)
pRS315- <i>RIO2</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Schäfer et al., 2003)
pRS315- <i>rio2</i> .D253A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Ferreira-Cerca et al., 2012)
pRS314- <i>RIO2</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	this study
pRS314- <i>rio2</i> .D253A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	this study
YCplac111-LTV1	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>ltv1</i> .S336/S339/S342>A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22-LTV1	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac22- <i>ltv1</i> .S336/S339/S342>A	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>ltv1</i> .NES3A-(GA) <sub>5</sub> -yEGFP	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
pHT4467Δ- <i>RPS3</i>	CEN6 (instable), <i>URA3</i> , <i>ADE3</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>RPS3</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps3</i> .K7/K10>ED	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>RPS3</i>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K10>A	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K8/R9>A	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K10>ED	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K8/R9/K10>A	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
pHT4467Δ- <i>RPS20</i>	CEN6 (instable), <i>URA3</i> , <i>ADE3</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>RPS20</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> .D113/E115>A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> .D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> Δ68-78-GAGA ( <i>rps20</i> Δloop)	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i> , aminoacids 68-78 replaced by GAGA linker	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .E74A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>A/E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>E/E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study



**Table S2. Plasmids**

<b>Name</b>	<b>relevant information</b>	<b>source</b>
YCplac111	CEN, <i>LEU2</i>	
pRS316- <i>RIO2</i> -GFP	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Schäfer et al., 2003)
pRS315- <i>RIO2</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Schäfer et al., 2003)
pRS315- <i>rio2</i> .D253A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	(Ferreira-Cerca et al., 2012)
pRS314- <i>RIO2</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	this study
pRS314- <i>rio2</i> .D253A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRIO2</i> , <i>TRIO2</i>	this study
YCplac111- <i>LTV1</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>ltv1</i> .S336/S339/S342> <b>A</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>LTV1</i>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac22- <i>ltv1</i> .S336/S339/S342> <b>A</b>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>ltv1</i> .NES3A-(GA) <sub>5</sub> -yEGFP	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PLTV1</i> , <i>TADH1</i>	this study
pHT4467Δ- <i>RPS3</i>	CEN6 (instable), <i>URA3</i> , <i>ADE3</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>RPS3</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps3</i> .K7/K10> <b>ED</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>RPS3</i>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K10> <b>A</b>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K8/R9> <b>A</b>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K10> <b>ED</b>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac22- <i>rps3</i> .K7/K8/R9/K10> <b>A</b>	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PRPS3</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
pHT4467Δ- <i>RPS20</i>	CEN6 (instable), <i>URA3</i> , <i>ADE3</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>RPS20</i>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> .D113/E115> <b>A</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> .D113/E115> <b>K</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	(Mitterer et al., 2016)
YCplac111- <i>rps20</i> Δ68-78-GAGA ( <i>rps20</i> Δloop)	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i> , aminoacids 68-78 replaced by GAGA linker	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69> <b>A</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69> <b>E</b>	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .E74A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69> <b>A</b> /E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69> <b>E</b> /E74K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study

YCplac111- <i>rps20</i> .K69E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .K69A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .K77E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .K77A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>A/K77E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69/K77>E	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>A/D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>E/D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .E74K/D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>A/E74K/D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> Δ68-78-GAGA/D113/E115>K	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
YCplac111- <i>rps20</i> .R68/K69>E/D113/E115>A	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PRPS20</i> , <i>TADH1</i>	this study
pGAG4BDC112-HRR25 *	2μ, <i>TRP1</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4BD	this study
pGAG4BDC22-ENP1 *	CEN, <i>TRP1</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4BD	this study
pGAG4ADC111-ENP1	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pGAG4ADC111-LTV1 *	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	(Mitterer et al., 2016)
pGAG4ADC111-RIO2	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pGAG4ADC111-RPS3	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pGAG4ADC111-RPS10B	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pGAG4ADC111-RPS12	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pGAG4ADC111-RPS15	CEN, <i>LEU2</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i> , C-terminal (GA) <sub>5</sub> -G4AD	this study
pADH195-ENP1	2μ, <i>URA3</i> , <i>PADH1</i> , <i>TADH1</i>	this study

P denotes the promoter, T the terminator; \* for simplicity, only the yeast two-hybrid (Y2H) plasmids containing the respective wild-type genes are listed. The mutant and deletion variants thereof used in the Y2H were cloned into the listed plasmids.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

V.M., S.F.-C., D.K., C.P.-C., and B.P. designed the experiments and interpreted the results. V.M., D.R., C.P.-C., and B.P. purified pre-40S particles for cryo-EM. R.S. and C.P.-C. prepared cryo-EM grids and collected and processed cryo-EM images. R.S., P.-E.G., and C.P.-C. analyzed 3D structures.

V.M., G.M., T.E., S.W., H.O., D.K., and B.P. constructed strains and plasmids. V.M., T.E., S.W., H.O., and B.P. analyzed genetic interactions. G.M. and D.K. performed Y2H experiments. V.M. performed fluorescence microscopy, northern blots, FISH analyses, and polysome profile analyses. V.M. and B.P. performed ATP incubation/phosphorylation assays with pre-40S particles. S.F.-C. performed single-turnover ATPase assays with pre-40S particles. V.M., G.M., D.K., S.F.-C., C.P.-C., and B.P. prepared the Figures. V.M., S.F.-C., C.P.-C., D.K. and B.P. wrote the manuscript. All authors commented on the manuscript.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Paloma Toedtli for the construction of plasmids. We thank P. Ihrig and J. Reichert from the MS facility, BZH Heidelberg, for performing MS analyses. We are grateful to K. Karbstein, M. Seedorf, and D. Tollervey for the generous gift of antibodies.

Cryo-EM image acquisition and analysis benefited from technical and financial support from: METI platform, Toulouse, France; Biophysical and Structural Chemistry platform (BPCS) at IECB, CNRS UMS3033, Inserm US001, Bordeaux University, France; iNext funding (Instruct-ERIC) for access to NeCEN, Leiden, the Netherlands. Cryo-EM image analysis was performed using HPC resources from CALMIP (Grant 2018-[P1406]). We would like to thank all the engineers and staff associated to these facilities for their help.

This work was funded by grants P27996-B21 and P28874-B21 from the Austrian Science Fund (FWF) to B.P. and grants 31003A\_156764 and 31003A\_175547 from the Swiss National Science Foundation (SNSF) to D.K. S.F.-C. is supported by the Department of Biochemistry III “House of the Ribosome” and by the DFG collaborative research center (SFB960-AP1) “Ribosome formation: principles of RNP biogenesis and control of their function”. C.P.-C was supported by the grant “RIBOMAN” from the *French National Research Agency (ANR)*.

## Literature

- Ameisemeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2018). Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature*.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H.D., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L.J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *24*, 165–169.
- Belhabich-Baumas, K., Joret, C., Jády, B.E., Plisson-Chastang, C., Shayan, R., Klopp, C., Henras, A.K., Henry, Y., and Mougín, A. (2017). The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles. *Nucleic Acids Res.* *45*, 10824–10836.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* *334*, 1524–1529.
- Campbell, M.G., and Karbstein, K. (2011). Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes. *PLoS One* *6*, e16194.
- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science* *355*, eaal1880.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., and Woolford, J.L. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 93–129.
- Dragon, F., Gallagher, J.E.G., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., et al. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* *417*, 967–970.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1798–1807.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol. Cell* *28*, 446–457.
- Ferreira-Cerca, S., Sagar, V., Schäfer, T., Diop, M., Wesseling, A.-M., Lu, H., Chai, E., Hurt, E., and LaRonde-LeBlanc, N. (2012). ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1316–1323.
- Ferreira-Cerca, S., Kiburu, I., Thomson, E., LaRonde, N., and Hurt, E. (2014). Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes. *Nucleic Acids Res.* *42*, 8635–8647.
- Ghalei, H., Schaub, F.X., Doherty, J.R., Noguchi, Y., Roush, W.R., Cleveland, J.L., Stroupe, M.E., and Karbstein, K. (2015). Hrr25/CK1δ-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth. *J. Cell Biol.* *208*, 745–759.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., et al. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA,

the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell* *10*, 105–115.

Granneman, S., Petfalski, E., Swiatkowska, A., and Tollervey, D. (2010). Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA-protein cross-linking. *EMBO J.* *29*, 2026–2036.

Grosshans, H., Hurt, E., and Simos, G. (2000). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev.* *14*, 830–840.

Hector, R.D., Burlacu, E., Aitken, S., Le Bihan, T., Tuijtel, M., Zaplatina, A., Cook, A.G., and Granneman, S. (2014). Snapshots of pre-rRNA structural flexibility reveal eukaryotic 40S assembly dynamics at nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res.* *42*, 12138–12154.

Heuer, A., Thomson, E., Schmidt, C., Berninghausen, O., Becker, T., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017). Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *ELife* *6*.

Johnson, M.C., Ghalei, H., Doxtader, K.A., Karbstein, K., and Stroupe, M.E. (2017). Structural Heterogeneity in Pre-40S Ribosomes. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *25*, 329–340.

Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., et al. (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods* *5*, 53–55.

Knüppel, R., Christensen, R.H., Gray, F.C., Esser, D., Strauß, D., Medenbach, J., Siebers, B., MacNeill, S.A., LaRonde, N., and Ferreira-Cerca, S. (2018). Insights into the evolutionary conserved regulation of Rio ATPase activity. *Nucleic Acids Res.* *46*, 1441–1456.

Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2016). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* *166*, 380–393.

Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 640–654.

Larburu, N., Montellese, C., O'Donohue, M.-F., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and Plisson-Chastang, C. (2016). Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* *44*, 8465–8478.

Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., and Tollervey, D. (2012). Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 744–753.

Merwin, J.R., Bogar, L.C., Poggi, S.B., Fitch, R.M., Johnson, A.W., and Lycan, D.E. (2014). Genetic Analysis of the Ribosome Biogenesis Factor Ltv1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.

Mitterer, V., Murat, G., Réty, S., Bland, M., Delbos, L., Stanborough, T., Bergler, H., Leulliot, N., Kressler, D., and Pertschy, B. (2016). Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation. *Nat. Commun.* *7*, 10336.

Peña, C., Hurt, E., and Panse, V.G. (2017). Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 689–699.

- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* *284*, 35079–35091.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* *25*, 1605–1612.
- Rohou, A., and Grigorieff, N. (2015). CTFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct. Biol.* *192*, 216–221.
- Scaiola, A., Peña, C., Weisser, M., Böhringer, D., Leibundgut, M., Klingauf-Nerurkar, P., Gerhardy, S., Panse, V.G., and Ban, N. (2018). Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *EMBO J.* *37*.
- Schäfer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* *22*, 1370–1380.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* *441*, 651–655.
- Scheres, S.H.W. (2012). RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* *180*, 519–530.
- Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L., Karbstein, K., and Skiniotis, G. (2011). Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science* *333*, 1449–1453.
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., and Karbstein, K. (2012). A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* *150*, 111–121.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C., et al. (2017). Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *ELife* *6*.
- Trabuco, L.G., Villa, E., Mitra, K., Frank, J., and Schulten, K. (2008). Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *16*, 673–683.
- Woolford, J.L., Jr, and Baserga, S.J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *195*, 643–681.
- Ye, Q., Ur, S.N., Su, T.Y., and Corbett, K.D. (2016). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Hrr25:Mam1 monopolin subcomplex reveals a novel kinase regulator. *EMBO J.* *35*, 2139–2151.
- Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K.A., Cheng, Y., and Agard, D.A. (2017). MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* *14*, 331–332.

Nous avons reçu les revues des referees fin Aout ; si leurs critiques sont dans l'ensemble plutôt positives, tous ont insisté sur la nécessité d'améliorer la résolution des structures présentées, afin d'étayer les résultats fonctionnels présentés dans la publication. C'est pourquoi j'ai entrepris une deuxième acquisition d'images des particules pré-40S Tsr1-TAP S20□Loop, mais cette fois sur le microscope Titan Krios CM01 de l'ESRF (Grenoble). L'analyse des images que j'ai effectuée m'a permis là aussi d'obtenir deux structures, très semblables aux deux variants structuraux décrits ci-dessus, mais cette fois résolues à 3,5 et 3.7 Å, respectivement.

Ces données structurales apportent un autre éclairage sur les données fonctionnelles obtenues par nos collaborateurs. Ainsi, nos observations confirment que la délétion de la boucle flexible de Rps20 bloque Rio2 et Dim1 sur les particules pré-40S cytoplasmiques. Elles suggèrent également que la conformation adoptée par Rio2 dans ces particules empêche l'hydrolyse de l'ATP. Elles révèlent en outre l'existence d'un stade de maturation similaire au stade tardif observé chez des particules pré-40S humaines (State E in Ameismeier et al., 2018), mais avec une plateforme extrêmement labile.

Les révisions à l'article, notamment les modèles atomiques obtenus grâce à cette nouvelle acquisition d'images seront détaillés durant ma soutenance de thèse.

## Résultats

### III. Détermination de la structure de particules pré-40S cytoplasmiques humaines tardives (RIO1(kd)-TAP) :

Dans cette dernière partie de ma thèse, j'ai étudié la structure de particules pré-ribosomiques humaines. Comme on l'a vu en introduction, du fait de sa plus grande complexité, mais aussi d'outils génétiques moins aisés à employer, l'étude de la biogenèse des ribosomes chez l'Homme (et d'autres mammifères) a longtemps été en retard derrière celle d'organismes eucaryotes modèles comme la levure. L'équipe du Pr Ulrike Kutay (ETH, Zürich) est l'une des précurseurs dans ce domaine, et a notamment proposé une méthodologie permettant de purifier des particules pré-ribosomiques à partir de cellules humaines (Wyler et al., 2011). Mon équipe d'accueil et celle du Pr Kutay avons établi une collaboration fructueuse depuis plusieurs années. Ceci nous a par exemple permis de mettre en évidence des mécanismes de maturation différents entre l'Homme et la levure, mais aussi de proposer la première structure 3D d'une particule pré-40S humaine, purifiée à un stade cytoplasmique précoce de sa maturation (Larburu et al., 2016).

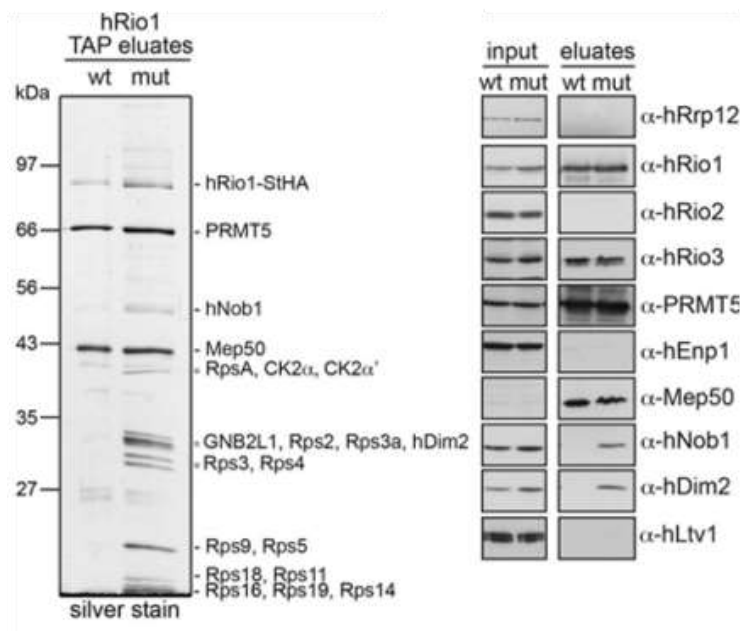


Figure 57. Etude de la composition protéique des particules pré-40S purifiées par le CFM RIO1-WT ou RIO1(kd) par gel SDS-PAGE (panel de gauche) et Western-Blot (panel de droite) (Widmann et al., 2012).



Grâce à cette collaboration, l'un des objectifs de ma thèse était de déterminer la structure 3D d'une particule pré-40S cytoplasmique tardive, à la plus haute résolution possible. Pour cela, nous devons utiliser un mutant catalytiquement inactif de la kinase RIO1 comme appât de purification. Ces particules pré-40S, ci-après nommées RIO1(kd)-TAP, ont déjà été caractérisées d'un point de vue biochimique par nos collaborateurs (Widmann et al., 2012). Celles-ci sont composées de la totalité des protéines ribosomiques, et sont stablement associées aux CFM DIM2, NOB1 et RIO1(kd) (Figure 57).

L'activité kinase de RIO1 est requise pour la dernière étape de maturation de la sous-unité 40S, qui consiste à cliver l'extrémité 3' du pré-ARNr 18S-E, et à libérer les CFM NOB1, DIM2 et RIO1 (Widmann et al., 2012). Cependant les mécanismes moléculaires précis qui sous-tendent ces dernières étapes de maturation restent mal définis.

D'un point de vue structural, la maturation de la petite sous-unité ribosomique humaine a récemment été étudiée par l'équipe de Roland Beckmann. En effet, Ameismeier et ses collaborateurs ont publié plusieurs structures de particules pré-40S humaines purifiées en utilisant le CFM DIM2 comme appât. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas observé de particules pré-40S natif à une étape de maturation tardive et par conséquent ont essayé de les reconstituer *in vitro* à partir de sous-unités 40S matures et de CFM surexprimés (Ameismeier et al., 2018 (cf. Introduction, partie D.4)).

L'analyse de particules pré-40S RIO1(kd)-TAP, bloquées et purifiées à un stade cytoplasmique tardif que nous proposons est donc une première dans l'étude structurale de la maturation de la petite sous-unité ribosomique humaine.

## A. Purification et analyse compositionnelle des particules RIO1(kd)-TAP

Nous avons repris le protocole de purification de ces particules pré-40S humaines mis au point dans l'équipe du Pr Kutay (Wyler et al., 2011 ; Widmann et al., 2012), pour purifier dans notre équipe ces particules pré-40S humaines tardives RIO1(kd)-TAP (cf. matériel et méthodes). La composition de l'éluat en ARNr et protéines est déterminée par Northern-Blot (Figure 58 A), sur gel après coloration par nitrate d'argent (Figure 58 B), et par spectrométrie de masse (Bottom-Up) (Figure 58 C). Ces données indiquent que les particules pré-40S RIO1(kd)-TAP sont composées de l'ARNr 18S-E, de la totalité des protéines ribosomiques et sont associées au cofacteurs de maturation NOB1, RIO1 et DIM2. De plus ces données confirment également la présence des protéines PRMT5 et MEP50 composant du méthylosome indiquant la présence de ce complexe dans l'échantillon purifié.

De plus, l'échantillon est observé en MET après coloration négative (Figure 58 D) afin d'inspecter la morphologie ainsi que la monodispersité des particules pré-40S purifiées. L'analyse visuelle montre que les particules observées sont de forme allongées avec une morphologie similaire aux sous-unités 40S. (environ 30 nm de long et 15 nm de large). Par ailleurs nous avons constaté, encore une fois, la présence d'autres complexes, de plus petites tailles (d'environ 15 nm de diamètre), correspondant, au complexe de méthylosomes. Ce complexe se forme, à l'état natif, par l'association des CFM RIO1, PRMT5 (Proteine Arginin MethylTransferase), ainsi que Mep50. Associé au méthylosome, RIO1 jouerait un rôle d'adaptateur et permettrait le recrutement de la nucléoline pour sa méthylation par PRMT5 (Guderian et al., 2011 ; Widmann et al., 2012).

Ces données confirment que le protocole de purification que nous avons utilisé nous permet de purifier des particules pré-40S humaines, bloquées à un stade de maturation cytoplasmique tardif ; en outre, la qualité et la quantité des particules purifiées nous a permis de réaliser leur étude structurale par cryo-EM.

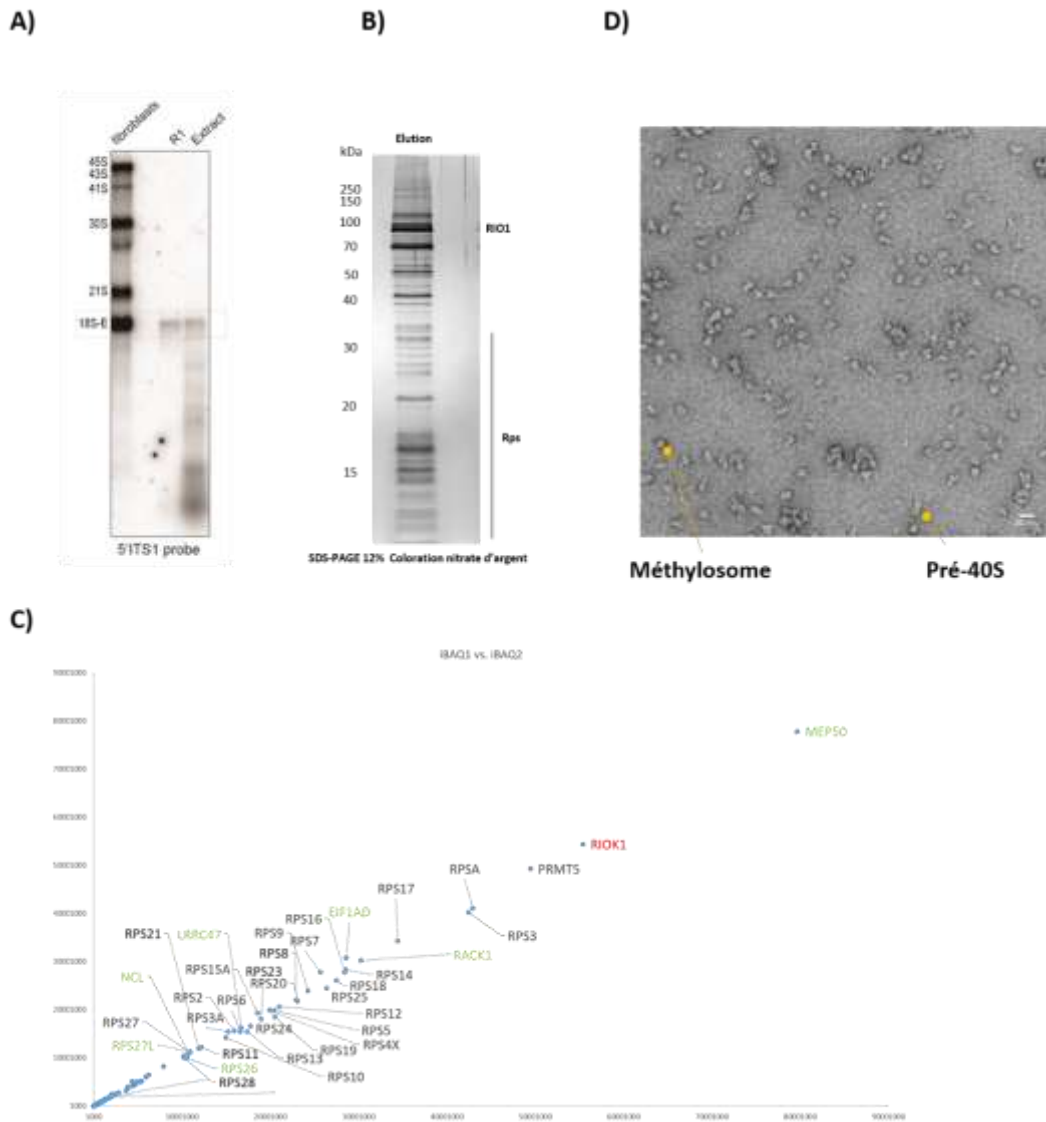


Figure 58. La composition et morphologie des particules RIO1(kd)-TAP. (A), Northern Blot (panel de gauche) révélé par une sonde s'hybridant dans la partie 5' de l'ITS1 montrant les précurseurs de l'ARNr 18S dans un extrait total de fibroblastes et dans l'éluat de la purification de particules RIO1(kd)-TAP. (B), Analyse des protéines de l'éluat sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'Argent. (C), composition en protéines de l'éluat analysé par bottom up mass spectrometry. La somme des signaux des peptides est divisée par le nombre de peptide théoriquement observable. (D) Observation de l'éluat en MET après coloration négative

## B. Analyse structurale des particules pré-40S RIO1(kd)-TAP par Cryo-EM :

### B.1 Analyse du modèle « consensus » :

Nous avons effectué une analyse structurale par cryo-EM des particules RIO1(kd)-TAP. Nous avons acquis 9494 images, sur le Titan Krios de l'EMBL Heidelberg, (grâce à un financement iNext). Nous avons traité ces images avec Relion 2.1 (cf. Figure 59).

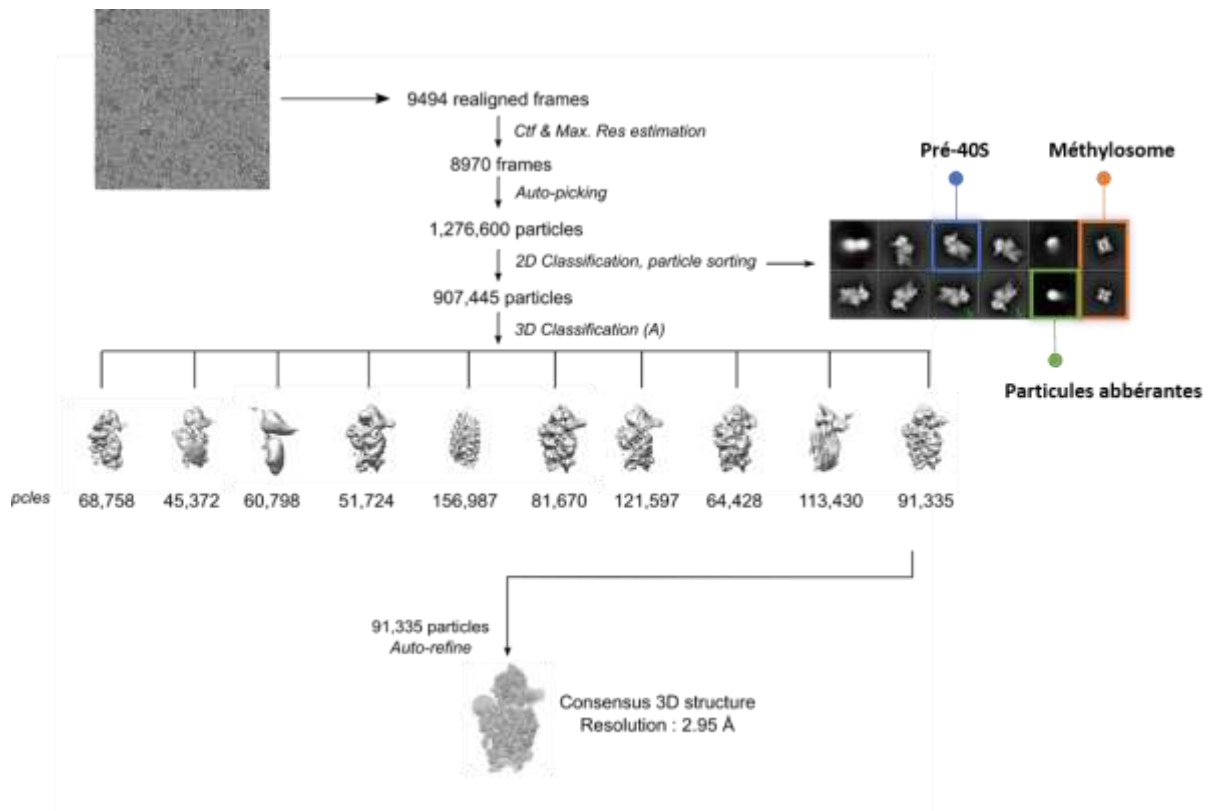


Figure 59. Schéma récapitulatif des grandes étapes de l'analyse d'images des particules RIO1(KD)-TAP. La classification 3D (A) a permis l'obtention du modèle 3D consensus à une résolution de 2,95 Å après post-traitement.

Les premières étapes de classification 2D montrent la présence de 2 types de particules : pré-40S et méthylosome (Figure 59 panel de droite), qui représentent 46 % et 15% des particules, respectivement. Le reste des particules sélectionnées par l'auto-picking de Relion sont des contaminations dans la glace ou des bords de carbone. Ces articles « aberrantes » ont été éliminées dans les premières étapes après la classification 2D de l'analyse d'images. Je me suis par la suite focalisé uniquement sur l'analyse structurale des particules pré-40S. Ceci m'a permis d'obtenir un premier modèle « consensus » avec une résolution globale de 2,98 Å selon le « gold standard FSC de Relion (cf. matériel et méthodes partie D.2.4 et Figure 60 B).

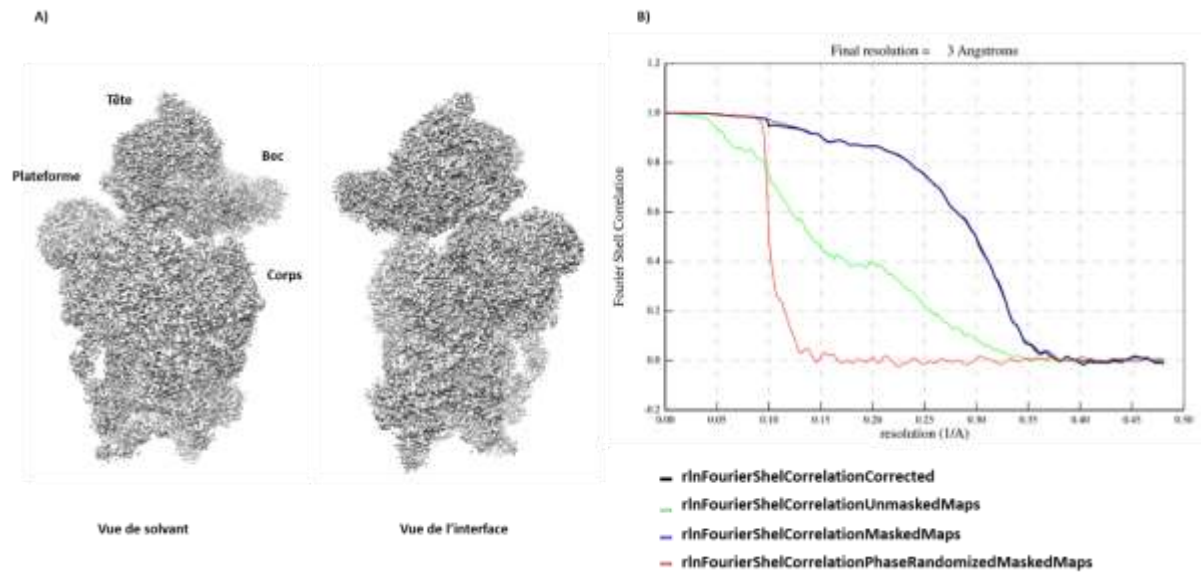


Figure 60. **A)** Carte de densité électronique des particules pré-40S RIO1(KD), en vue de solvant et de l'interface. **B)** Détermination de la résolution selon « gold standard FSC » de Relion.

Le calcul de la résolution locale (Figure 61 A) ainsi que l'inspection des sections de ce volume (Figure 61 B) montrent, encore une fois, que le corps est le domaine le mieux résolu. Pour analyser cette carte de densité électronique, nous avons ajusté par Rigid Body Docking (RBD) dans chimera, le modèle atomique de particules pré-40S humaine, PDB : 6G5I (Ameismeier et al., 2018), dans la carte de densité électronique. Ensuite, nous avons effectué une simulation dynamique par MDFF puis un ajustement manuel du modèle PDB, en utilisant le logiciel Coot. (Figure 61 A). Contrairement aux autres structures 3D étudiées dans ce manuscrit, l'hélice 44 du pré-ARNr 18S-E semble être dans sa conformation mature (Figure 61 C), ce qui indique que le corps de ces particules pré-40S tardives est totalement mûré.

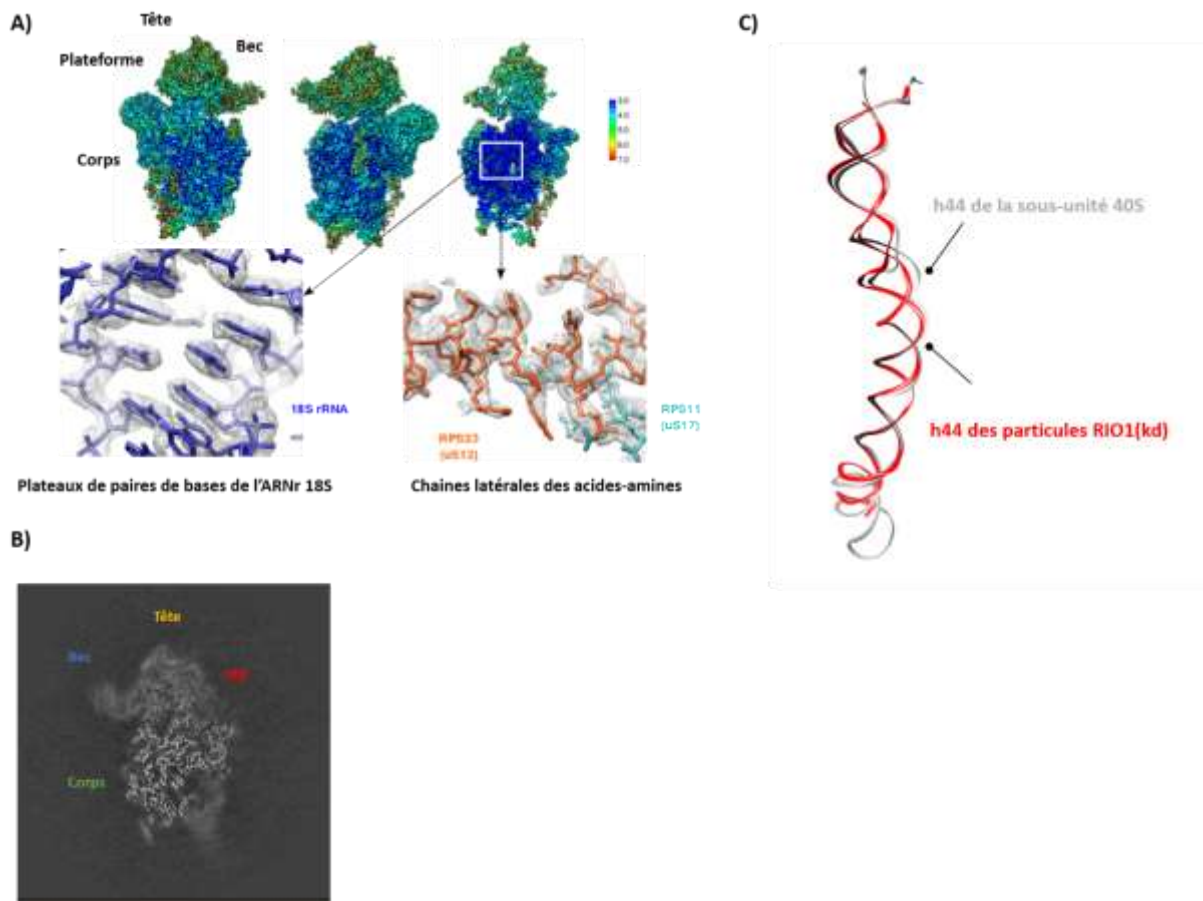


Figure 61. Résolution locale du modèle 3D consensus Tsr1-TAP. **A)** Observation des chaînes latérales des acides-aminés et les plateaux des paires de bases de l'ARNr, dans les régions du corps les mieux résolus. La tête, le bec et la plateforme sont des régions à plus faible résolution **B)** Section centrale du volume 3D RIO1(kd)-TAP. **C)** Comparaison de l'hélice h44 de l'ARNr entre la petite sous-unité mature (gris) et les particules pré-40S (rouge).

Comme pour les analyses structurales menées sur les particules pré-40S de levures, la tête et la plateforme sont plus floutées que le corps, ce qui indique que ces régions sont les plus dynamiques de la structure formée par la particule pré-40S. Cependant, leur résolution moyenne est comprise entre 5 et 7 Å, ce qui permet un premier niveau d'analyse des densités observées sur la tête et la plateforme. Les classifications focalisées menées sur la tête et sur la plateforme seront présentées ci-après.

La comparaison de la structure de la petite sous-unité ribosomique mature par rapport à notre structure consensus révèle une densité supplémentaire fragmentée, au niveau du bec des particules (en rouge sur la Figure 62). Cette densité est également présente sur les particules pré-40S humaines déjà publiées, et a été attribuée à la présence d'un « Facteur X », dont l'identité n'est pas connue à ce jour (Ameismeier et al. 2018).

Des expériences de classification localisée autour de ce facteur seront présentées ci-après.

Enfin, du côté interface avec la 60S, entre la tête et le corps des particules, on note la présence de densité éparses, que nous avons attribuée à la présence de RIO1(kd) grâce aux données de CRAC et de cryo-EM existant (Granneman et al., 2010 ; Turowski et al., 2014 ; Ameismeier et al., 2018).

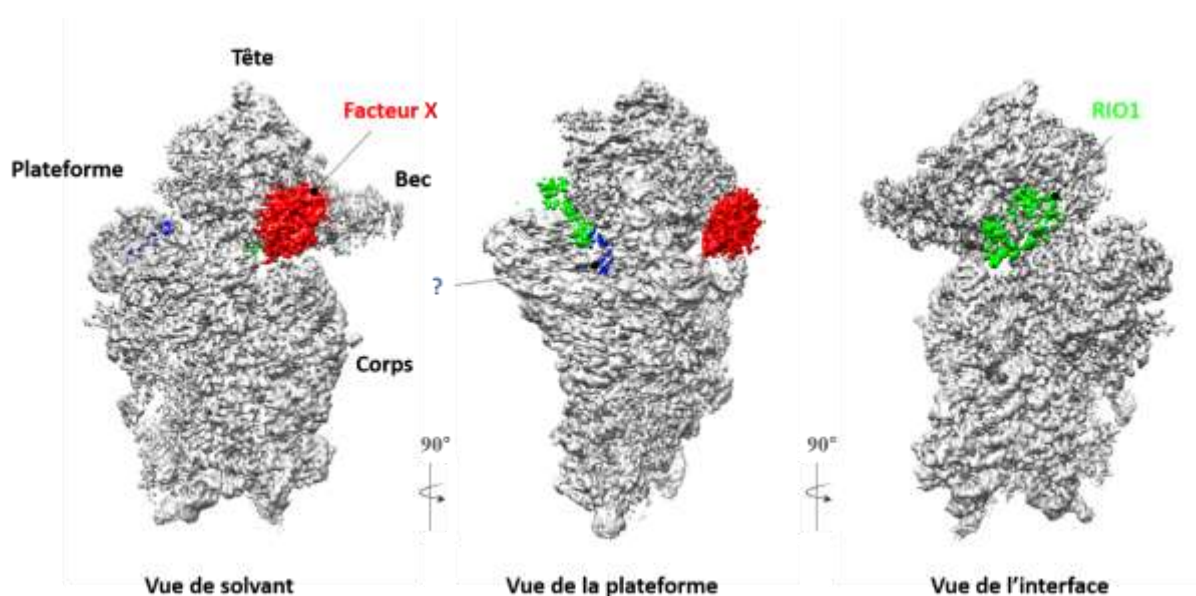


Figure 62. Segmentation des densités supplémentaires (par rapport à la petite sous-unité ribosomiale mature) sur la structure « consensus ». La densité localisée au niveau du bec (en rouge) a été attribuée au Facteur X, la densité entre la tête et le corps (en vert) à RIO1. La densité fragmentée présente sur la plateforme (par un point d'interrogation en bleu) est floue et par conséquent non interprétable. Afin de pouvoir interpréter ces densités supplémentaires nous avons entrepris des démarches de classification globale et localisée.

Afin de trier l'hétérogénéité structurale, et d'améliorer la résolution des zones présentant un signal flouté, j'ai ensuite entrepris des analyses de classification 3D globale et localisées.

## B.2 Analyse par classification 3D globale :

### B.2.1 Présence d'au moins deux variants structuraux dans les particules RIO1(KD)-TAP :

La classification 3D globale, en 5 classes, a révélé la présence d'au moins deux variants structuraux majoritaires, nommés K2 et K3, résolus à 3,38 et 3,69 Å respectivement (Figure 63). Les classes K2 et K3 (41,906 particules) ainsi que K4 et K5 (39,746 particules) étant similaires

elles ont été regroupées pour les étapes d'auto-raffinement et de post-traitement. La classe K1, qui représente environ 11 % des particules, est mal définie/mal résolue comparée aux autres, et par conséquent pas n'a pas été raffinée.

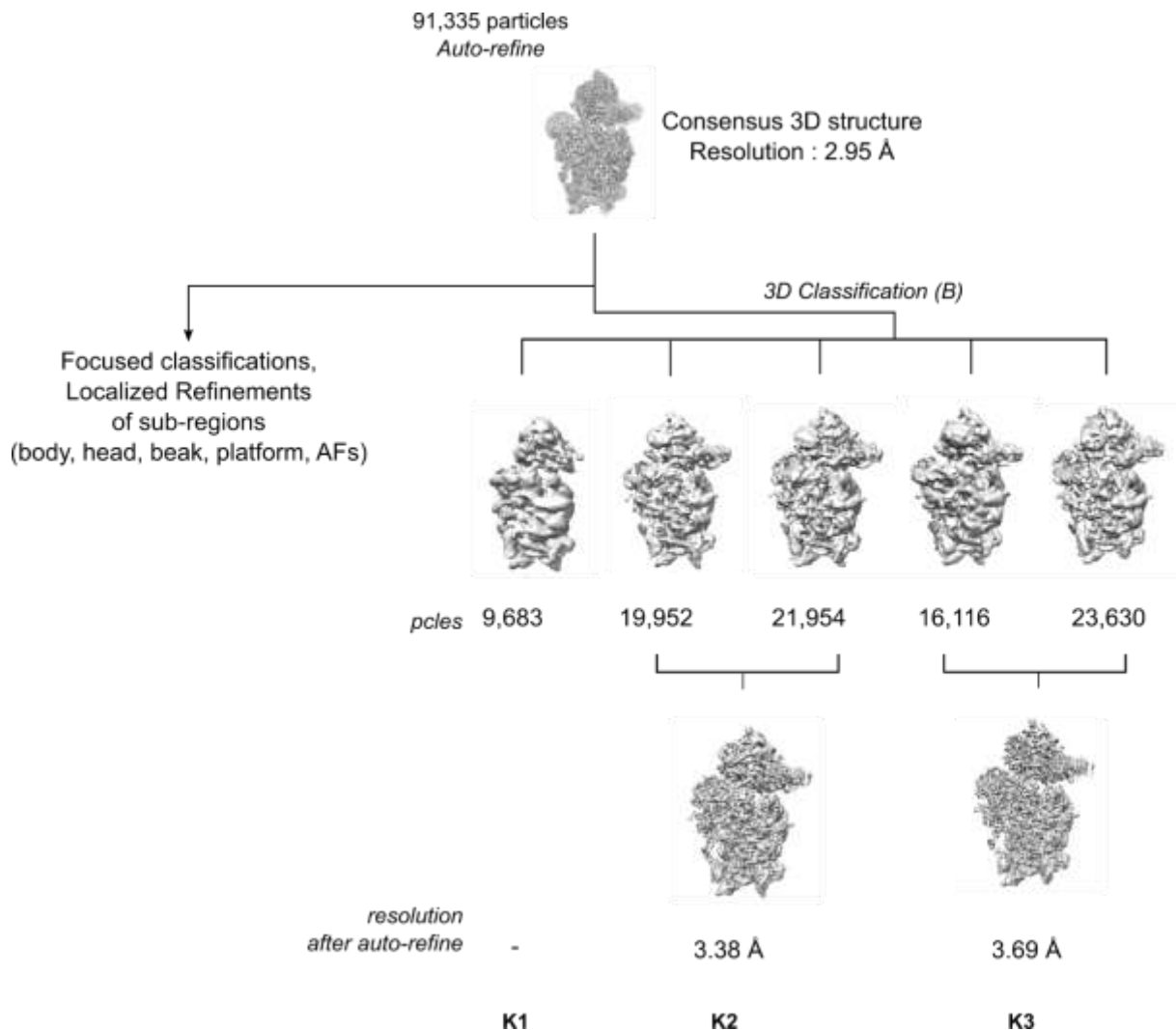


Figure 63. Tri de l'hétérogénéité structurale des particules RIO1(kd) par classification 3D globale. Cette analyse a mis en évidence la présence d'au moins deux variants structuraux nommées K2 et K3.

Les corps des classes K2 (41,906 particules) et K3 (39,746 particules) sont identiques entre eux et à celui de la petite sous-unité ribosomique mature. La tête semble très semblable à l'état mature pour ces deux classes. Leurs becs présentent tous les deux la densité supplémentaire correspondant au « Facteur X » (en rouge sur la Figure 64). Les différences majeures entre ces deux classes sont localisées au niveau de la plateforme, puisque K3 semble avoir plus de densité dans cette région comparée à K2. Une densité éparses est présente sur les deux classes, entre la tête et le corps du côté de l'interface avec la sous-unité 60S (Figure 64,



densité colorée en vert), qui pourrait être attribuée à la présence de RIO1. La classe K2 semble avoir un peu plus de densité dans cette région comparée à la classe K3 (cf. Figure 64 partie droite, vues de la plateforme). Cependant, la mauvaise résolution de ces zones ne nous a pas permis d'interpréter avec certitude ces densités, ni la différence entre les deux classes K2 et K3.

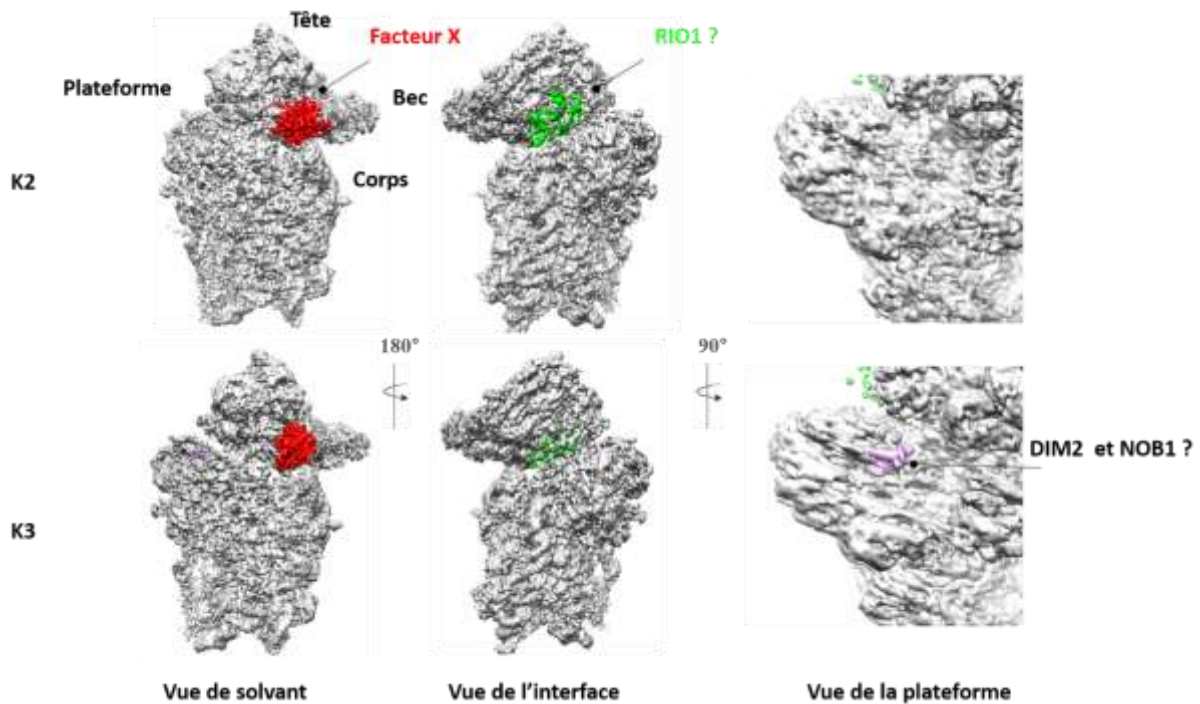


Figure 64. Comparaison des variants K2 et K3 sur une vue de solvant, de l'interface et une vue de la plateforme. De la densité éparsée est présente entre la tête et le corps, sur les deux structures (en vert). La classe K3 dispose d'une densité supplémentaire (en rose), en comparaison avec la classe K2 sur une vue de la plateforme. Les deux classes disposent de la densité correspondant au facteur X, au niveau du bec.

Afin de pouvoir améliorer la résolution de ces régions dynamiques et d'interpréter les densités supplémentaires, nous avons entrepris des démarches d'auto-raffinement et de classification 3D masqué avec ou sans soustraction du signal, autour de la tête, de la plateforme et des CFM (cf. matériels et méthodes) (Figure 65).

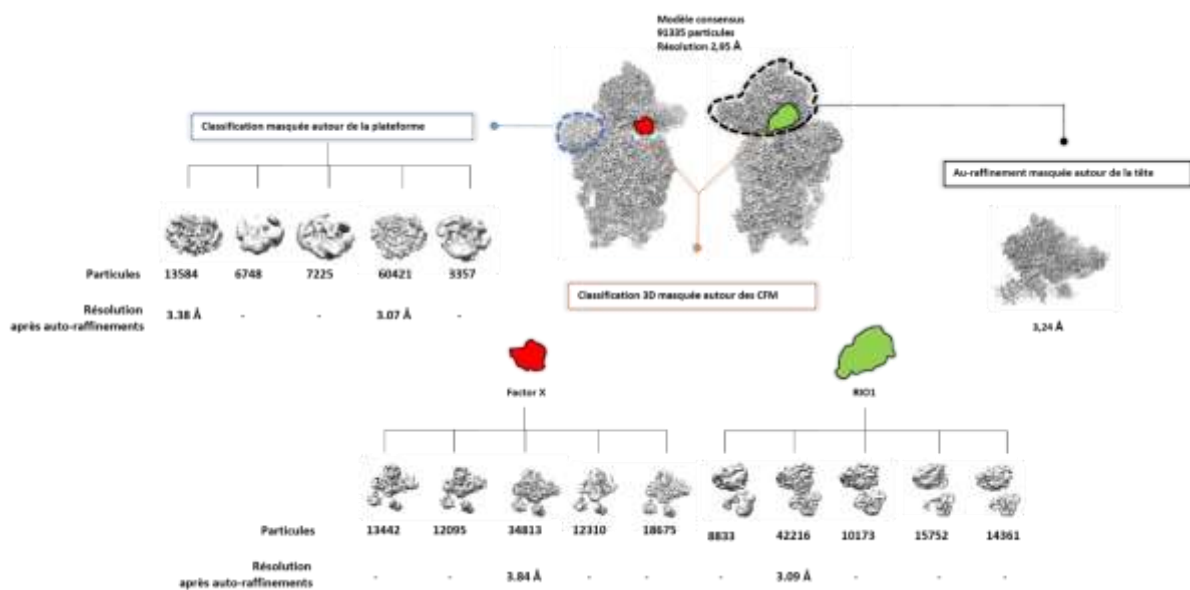


Figure 65. Les grandes étapes de classification/auto-raffinement masqués au tour de la tête, la plateforme et les CFM RIO1 et le facteur X.

### B.3 Analyse par auto-raffinement et classification localisé :

#### B.3.1 La tête des particules pré-40S RIO1(kd)-TAP est dans un état mature :

L'auto-raffinement masqué autour de la tête du modèle consensus a permis d'obtenir une carte de densité électronique à une résolution de 3,24 Å (Figure 66 A). Cette structure 3D révèle que la tête des particules pré-40S est dans un état mature avec l'intégration stable des protéines Rps3, Rps10, Rps20, ainsi que les hélices de l'ARNr h33 et h34 formant le bec des particules pré40S (Figure 66 B). Le Facteur X, est bien présent sur le bec, et interagit avec Rps3 et Rps10. Cependant l'attribution de cette densité supplémentaire à un cofacteur de maturation, qui pourrait jouer un rôle déterminant dans les dernières étapes de maturation des particules pré-40S, nécessite une meilleure résolution (cf. discussion). La faible résolution de cette densité suggère une dynamique importante de ce CFM sur le bec des particules pré-40S.

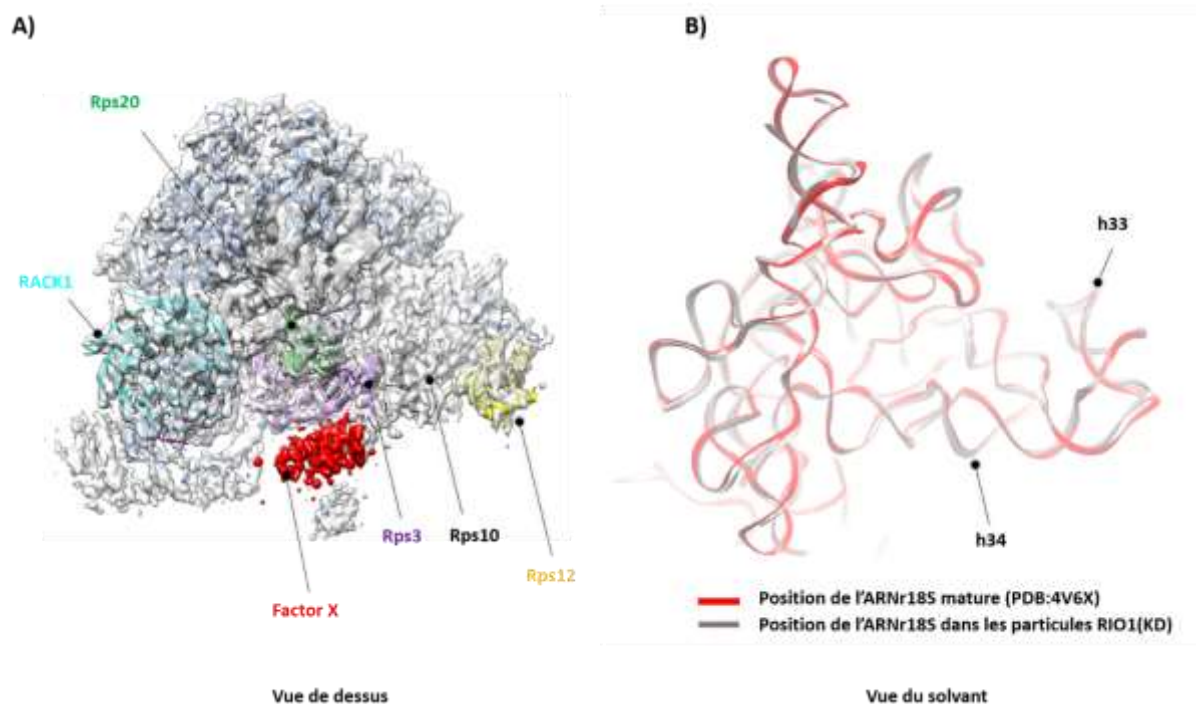


Figure 66. Auto-raffinement masqué autour de la tête des particules pré-40S RIO1(kd)-TAP. **A)** Ajustement du modèle atomique (PDB : 4V6X) par RBD et MDFF dans la carte de densité électronique **B)** la superposition de l'ARNr 18S (au niveau de la tête) entre les particules RIO1(kd) (en gris) et la sous-unité mature (en rouge). Les hélices de l'ARNr h33 et h34 sont dans leur conformation mature dans les particules pré-40S.

### B.3.2 Deux états de maturation distincts pour la plateforme des particules RIO1(kd)-TAP :

Nous avons également effectué des classifications masquées, sans soustraction du signal, autour de la plateforme des particules pré-40S. De manière intéressante, deux classes majoritaires, nommées K1 et K4 ont montrés une région de plateforme bien définie, avec des caractéristiques structurées pour Rps1, Rps14, l'hélice 23. Pour analyser ces deux classes, nous avons entrepris la démarche utilisée pour l'étude du modèle consensus. En outre, le modèle atomique de particules pré-40S, PDB : 6G5I (Ameismeier et al., 2018), est ajusté dans les cartes de densités électroniques par RBD. Ensuite, nous avons effectué une simulation dynamique par MDFF puis un ajustement manuel, en utilisant le logiciel Coot du modèle 6G5I (avec ou sans la protéines Rps26) dans les classes K1 et K4.

La classe K1 (représentant 20% des particules) dispose d'une densité supplémentaire sur la plateforme, à proximité du site de clivage 3 (correspondant au nucléotide A1869) de

l'ARNr 18S, pouvant héberger le CFM DIM2 (acides-aminés 73 à 247) et une partie du CFM NOB1 (acides-aminés 116 à 130 ; 206 à 217 ; 266 à 412), tandis que la classe K4 (représentant 40 % des particules) semble être dans un état mature, pour la plateforme, pouvant héberger la protéine Rps26 (Figure 67). Les autres classes (représentant 25 % des particules) affichent des zones floues pour la plateforme et par conséquent ne sont pas interprétables.

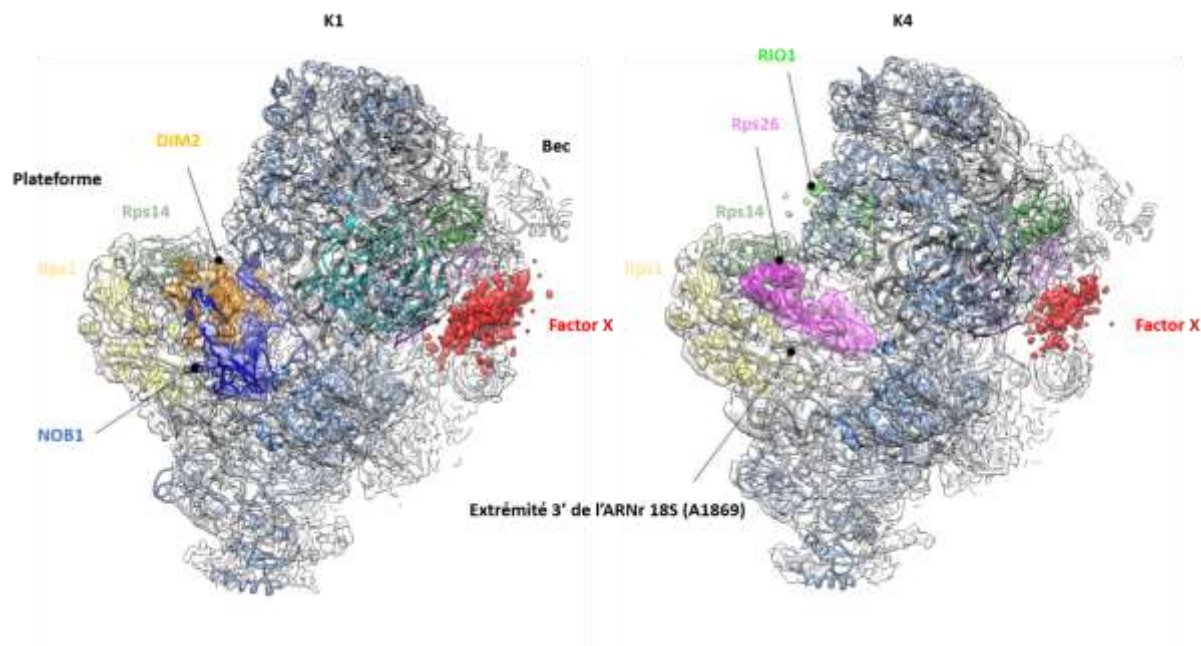


Figure 67. Classification masquée autour de la plateforme. Dans la classe K1 les particules RIO1(kd) sont associées aux CFM NOB1 (bleu), DIM2 (orange) et facteur X (rouge). Il n'y a pas de densité attribuable à RIO1 pour K1 suggérant son association labile à cette étape de maturation. Dans la classe K4, Rps26 (rose) remplace les CFM DIM2 et NOB1. Une densité partiellement visible, correspondant à RIO1 est présente dans la classe K4. Le facteur X est positionné sur le bec des deux classes des particules pré-40S.

Contrairement à la classe K1, K4 dispose d'une densité éparse, entre la tête et le corps, correspondant à l'emplacement de RIO1. Néanmoins l'interprétation de cette densité nécessite l'augmentation du signal dans cette région par une démarche localisée (voir ci-dessous). Par ailleurs l'absence de cette densité sur K1 suggère une association labile de RIO1 à cette étape de maturation.

L'analyse localisée de la plateforme a mis en évidence la cohabitation d'au moins deux types de particules pré-40S distinctes. Dans le premier type, les particules sont associées avec NOB1, DIM2, Facteur X et de manière dynamique avec RIO1. Le deuxième type se caractérise par une association stable de RIO1, un relargage de DIM2 et NOB1 et une intégration stable de Rps26.

### B.3.3 Localisation du CFM RIO :

Afin de localiser précisément et augmenter la résolution du CFM RIO1, nous avons procédé à une classification des particules pré-40S, venant du modèle consensus, en masquant la région entre la tête et le corps dans le sillon de l'ARNm (cf. Figure 68, région colorée en vert). Par la suite nous avons effectué l'auto-raffinement puis le post-traitement de la classe ayant le plus de signal dans cette région. De cette façon, nous avons obtenu une structure 3D avec un bon rapport signal/bruit. Ceci nous a permis d'ajuster par RBD et manuellement par Coot, les acides-aminés 163 à 430 venant de la structure atomique du CFM RIO1 (PDB : 4OTP). Cela nous a permis de positionner, sans ambiguïté et pour la première fois, le CFM RIO1 sur les particules pré-40S humaines (Figure 68). RIO1 est positionné au-dessus de l'hélice 44, à l'interface de l'interaction des deux sous-unités ribosomiques (Figure 68). De manière surprenante, cette protéine partage la même localisation que le CFM RIO2. Cela suggère que le départ de RIO2 serait nécessaire pour l'association de RIO1 aux particules pré-40S. Cela est en accord avec les données de la littérature indiquant l'absence du CFM RIO2 lorsque les particules pré-40S sont purifiées avec RIO1 comme appât (Widmann et al., 2012).

De manière intéressante, sur cette classe de particules, l'association stable de RIO1 semble être accompagnée par l'intégration, sur la plateforme, de la protéine Rps26, alors que DIM2 et NOB1 en sont absents. Cela signifierait que ces deux CFM auraient été relargués de la particule pré-40S, et que NOB1 aurait donc déjà effectué son rôle d'endonucléase, et mûri l'extrémité 3' de l'ARNr. Nos données structurales ne nous permettent pas de distinguer d'extension en 3' du dernier nucléotide de l'ARNr 18S, mais ce fragment étant hautement dynamique, cela pourrait expliquer son absence sur la carte de densité électronique des particules pré-40S. Les mécanismes permettant le relargage des CFM DIM2 et NOB1 et l'association de Rps26 restent à élucider (cf. discussion).

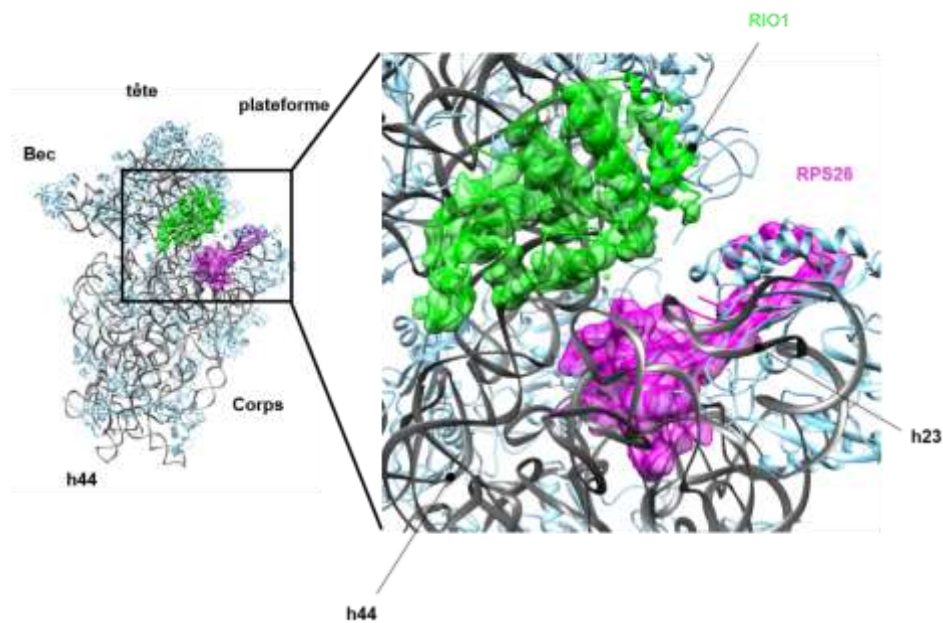


Figure 68. Localisation du CFM RIO1 (en vert) sur les particules RIO1(kd). RIO1 est situé en haut de l'hélice h44 dans le sillon de l'ARNm. L'association stable de RIO1 est accompagnée de l'intégration de la protéine Rps26 (en rose). L'ARNr est coloré en gris et les protéines ribosomiques en bleu clair.

#### B.3.4 Facteur X, un CFM hautement dynamique :

Dans but d'augmenter le signal de la densité correspondant au facteur X, nous avons effectué une classification masquée autour de ce facteur. Parmi les classes sortantes, la classe K3 (cf. Figure 65) majoritaire, représentant 29 % des particules a été raffinée à une résolution de 3,84 Å. La structure 3D de cette classe ne nous a pas permis d'augmenter significativement la résolution de la densité correspondant au facteur X. Cela suggère une association très dynamique et labile de ce facteur sur les particules pré-40S. Néanmoins, cette structure 3D a montré, encore une fois, la présence de RIO1 ainsi que Rps26 ensemble. Pour aller plus loin dans l'analyse structurale de ce facteur il serait intéressant d'entreprendre une démarche de classification avec soustraction du signal autour du facteur X.

#### B.3.5 Cohabitation de deux types de particules pré-40S :

La classification autour de la plateforme a révélé la présence d'une classe, minoritaire, composée de DIM2, NOB1 et du Facteur X (« état A », cf. ci-après). Le CFM RIO1 étant l'appât de purification, la présence de densités fragmentées partielle pour ce CFM dans l'état A suggère

une association dynamique et labile de cette protéine aux particules pré-40S à cette étape de maturation. De manière frappante, nous avons constaté que, quel que soit la méthode de classification utilisée (globale ou locale), une deuxième classe majoritaire se distingue, où les particules pré-40S sont stablement associées à RIO1, au Facteur X et à la protéine Rps26 (ci-après dénommé « état B »). En intégrant les données moléculaires et fonctionnels, cela correspond à deux étapes de maturations successives, avec le relargage des CFM DIM et NOB1 et l'intégration de la protéine Rps26.

### C. Discussion

:

Dans cette analyse nous avons entrepris une étude structurale des particules pré-40S cytoplasmiques humaines, purifiées en utilisant le CFM RIO1(kd) comme appât. La suppression de l'activité kinase a permis l'accumulation des particules pré-40S à une étape de maturation cytoplasmique tardive. L'analyse compositionnelle de ces complexes a révélé qu'elles sont composées du pré-ARNr 18S-E, de la totalité des protéines ribosomiques, incluant Rps10 et Rps26 et sont stablement associées aux CFM RIO1, DIM2, et NOB1. Ces CFM sont nécessaires pour la dernière étape de maturation qui consiste à un clivage, au site 3, du pré-ARNr 18S-E, par NOB1, et le relargage/recyclage des CFM.

Notre analyse structurale a dévoilé une première carte de densité électronique « consensus » à une résolution globale de 2,95 Å. Cette carte montre que le corps et la tête sont des régions stablement structurées contrairement au bec, la plateforme et au-dessus de l'hélice h44 qui sont des régions plus dynamiques. En comparaison avec la sous-unité ribosomique 40S, les particules RIO1(kd) présentent une densité supplémentaire au niveau du bec, devant Rps3 et Rps10, que nous n'avons pas attribué à un CFM précis, et donc gardé l'appellation de facteur X, en analogie avec les données de cryo-EM existantes (Ameismeier et al., 2018). Cependant, nos analyses de protéomique ainsi que des données de la littérature nous permettent de proposer que ce facteur puisse être la kinase CK1  $\delta$  et  $\epsilon$ , qui phosphoryle Enp1 et Ltv1 (situés à ce niveau du bec, cf. ci-avant) (Zemp et al., 2014) et qui est présent dans nos purifications de particules, ainsi que dans les particules purifiées par DIM2 (Ameismeier et al., 2018). Une autre possibilité est que ce facteur X corresponde à la protéine USP16, responsable de la dé-ubiquitinylation de RPS27A (Rps31 chez la levure). Nos données de spectrométrie de masse, même si elles ne sont que semi-quantitatives, montrent que CK1e serait présent en plus grande quantité dans nos purifications comparées à USP16. En outre, le domaine C-terminal de RPS27A, qui est le

domaine où est fixé l'ubiquitine, est placé de l'autre côté de la tête des particules pré-40S. Des analyses de classification masquées avec soustraction de signal sont en cours afin de gagner en résolution sur cette zone, et tenter d'identifier définitivement le Facteur X.

De plus, l'analyse structurale des particules pré-40S nous a permis de localiser avec précision le CFM RIO1 sur la tête des particules pré-40S au-dessus de l'hélice 44, à l'interface de l'interaction des deux sous-unités ribosomiques. De manière intéressante, cette protéine partage le même emplacement que RIO2, confirmant les données de la littérature sur la nécessité d'une dissociation préalable de RIO2 pour l'intégration de RIO1 (Widmann et al., 2012). Toutefois, nous n'avons pas observé de densité supplémentaire sur le corps des particules pré-40S, correspondant au domaine C-ter de RIO1, comme cela a été montré par Ameismeier et ses collaborateurs (Ameismeier et al., 2018). Cette différence pourrait être dû au fait que pour localiser RIO1, cette équipe a reconstitué des particules pré-40S *in vitro* en incubant des sous-unités 40S matures avec RIO1 surexprimé (Ameismeier et al., 2018).

L'analyse statistique des régions dynamiques, par classification globale et localisée, a mis en évidence la cohabitation d'au moins deux types de particules pré-40S nommés état « A » et « B ». A l'état « A » les particules sont stablement associées aux CFM DIM2, NOB1, Facteur X et faiblement liées à RIO1. A l'état « B » elles sont stablement associées à RIO1, Facteur X et la protéine Rps26.

Dans l'état A, comme dans les particules pré-40S de levure, DIM2 bloque l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et empêche donc NOB1 d'effectuer son activité endonucléasique. Cette conformation est accompagnée de la présence du facteur X et d'une association labile de RIO1. Par ailleurs, de par sa position, DIM2 partage le même emplacement que la protéine Rps26. Cela suggère la nécessité du relargage des CFM DIM2 et NOB1, par un remodelage structural de la plateforme, afin de permettre l'intégration stable de Rps26 à l'état B. Cependant les mécanismes permettant ce changement de conformation restent à élucider. D'autre part, il n'est pas clair si le clivage au site 3 du pré-ARNr 18S-E a eu lieu dans ces particules. Pour cela il est nécessaire d'étudier la composition en ARNr des particules pré-40S purifiées par des expériences de Northern-Blot ou 3' race.

De plus il semblerait que la stabilisation de RIO1 soit un élément essentiel pour le relargage de DIM2 et NOB1 et l'intégration de Rps26. RIO1 étant catalytiquement inactif dans les particules étudiées, le relargage de ces CFM s'avère indépendant de cette activité. Il est possible que Rps26 enclenche la libération des CFM et la stabilisation de RIO1, par son

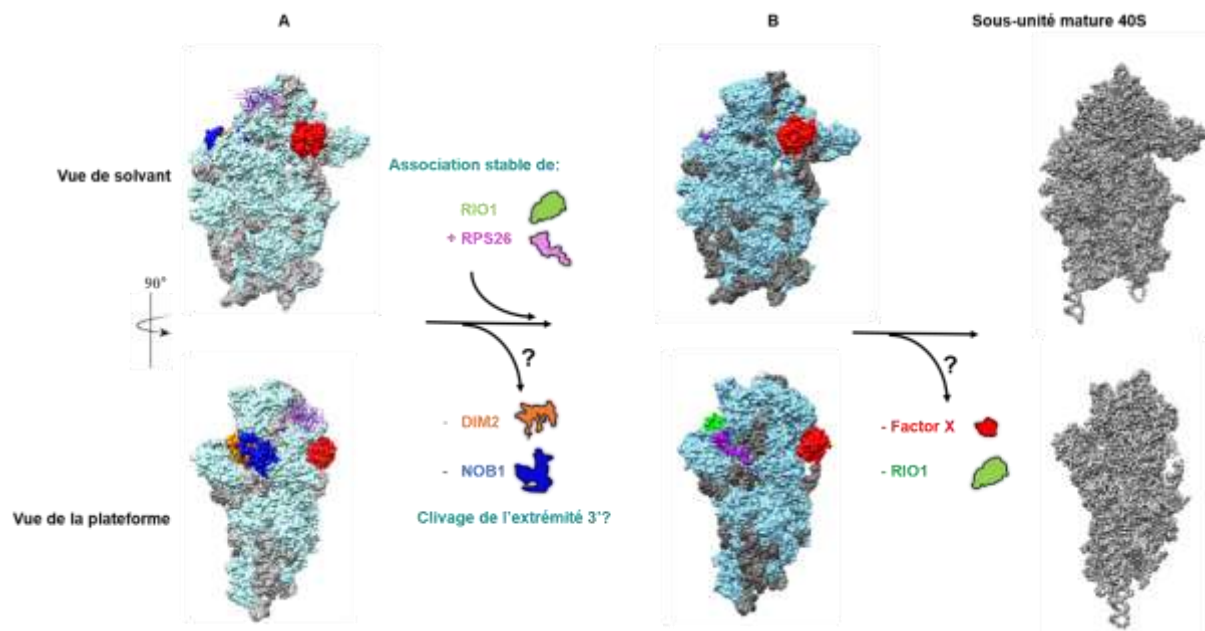


intégration au niveau de la plateforme. De même la stabilisation de RIO1 par Rps26 pourrait être nécessaire pour son autophosphorylation et son relargage. Néanmoins, ces mécanismes restent à étudier.

Enfin une dernière étape de maturation serait nécessaire au relargage et au recyclage de RIO1 et du Facteur X, et à la formation de la sous-unité 40S fonctionnelle. Toutefois les signaux permettant la dissociation des CFM et la chronologie de dissociation de ces événements restent à clarifier. En intégrant les données de cryo-EM existantes, cette étude permet de mieux caractériser les événements qui se produisent dans les dernières étapes de maturation. En effet, cette analyse souligne la présence du facteur X jusqu'aux dernières étapes de maturation suggérant un rôle tardif de ce CFM dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S.

En intégrant l'ensemble de ces données, nous proposons un modèle de morphogénèse des particules pré-40S humaines dans les dernières étapes de maturations cytoplasmiques

(Figure 69).



Par ailleurs, la comparaison de cette étude avec les données de levure met en évidence des divergences dans l'assemblage de la sous-unité 40S entre ces deux espèces. Contrairement à la levure, nous n'avons pas observé de particule pseudo-80S (issu de l'association de particules pré-40S et la sous-unité 60S). Cela indique que, soit cette étape de maturation a disparu avec l'évolution chez l'Homme, soit les particules RIO1(kd) sont dans une étape de maturation plus avancée. De plus, la plateforme des particules RIO1(kd) est toujours bien structurée en comparaison avec la levure. Cela suggère que, soit on est à un état plus tardif de maturation ou la plateforme s'est « re-structurée » par rapport au corps, soit c'est une différence de maturation de la structure entre les particules humaines et celles de la levure.

#### **D. Perspectives :**

Afin de continuer l'analyse structurale des particules RIO1(kd), il est important d'entreprendre des analyses de classification et de raffinement localisées avec soustraction du signal. Cette démarche pourrait notamment améliorer la résolution de la densité correspondant au facteur X et ainsi de mieux caractériser son rôle dans l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique.

D'autre part, pour aller plus loin de cette étude il est important de confirmer les hypothèses amenées dans cette étude par des données fonctionnelles. Notamment, pour comprendre le rôle de Rps26 dans les dernières étapes de maturations il serait intéressant, de faire une analyse structurale et fonctionnelle des particules pré-40S mutantes pour la protéine Rps26. Ceci permet d'observer l'effet de cette mutation sur la synthèse de la petite sous-unité 40S et sur une accumulation éventuelle des CFM DIM2 et NOB1. Il est également important de savoir si le clivage au site 3 a eu lieu dans les particules RIO1(kd). On peut vérifier ce phénomène par un clivage *in vitro*. Pour ce faire les particules pré-40S sont étiquetées et purifiées par le tag st-HA. Puis elles sont lavées en présence de  $Mg^{2+}$  (inhibe l'activité endonucléase de NOB1) puis  $Mn^{2+}$  (activation de NOB1). Ensuite, l'ARNr est extrait et analysé par primer extension. D'autre part, des expériences de phosphorylation sur les particules RIO1(kd) (qui ne peuvent pas associer l'ATP), permettrait de comprendre le rôle de l'intégration et l'hydrolyse de l'ATP par RIO1.

Par ailleurs la déplétion de l'expression de Rps26, par des ARN interférant (siRNA), et l'analyse compositionnelle des particules pré-40S RIO1(kd)-TAP et DIM2-TAP permettrait de mieux caractériser le rôle de cette protéine de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ces travaux sont actuellement en cours dans notre équipe.

# Conclusion générale



## Conclusion générale

Durant ma thèse, j'ai utilisé la cryo-EM et l'analyse d'images pour déterminer la structure 3D de plusieurs particules pré-40S cytoplasmiques, chez l'Homme et la levure. La cryo-EM s'est distinguée, en 2017, par le prestigieux prix Nobel de chimie, et révolutionne aujourd'hui l'étude structurale des complexes biologiques. Durant mes travaux de recherches j'ai assisté en temps réel à l'évolution des méthodes d'analyse d'image, mais aussi à l'apparition de détecteurs directs d'électrons toujours plus performants. Ainsi, j'ai dû constamment m'adapter et intégrer tout au long de ma thèse ces avancées méthodologiques dans mes démarches scientifiques. En effet, durant mon stage de master, j'ai obtenu mes premières reconstructions 3D de particules pré-ribosomiques humaines, à basse résolution (20-15 Å). Ensuite, au cours de ma thèse, cette résolution n'a cessé de progresser, pour atteindre d'abord 10-6 Å pour les particules pré-ribosomiques de levure, puis récemment des résolutions quasi-atomiques sur toutes les particules pré-ribosomiques imagées sur des Titan Krios équipés de caméras de type K2 Summit (Gatan). Grâce à ce niveau de détails, j'ai pu analyser des cartes de densités électroniques, émettre des hypothèses quant aux rôles de certains CFM, et proposer de nouvelles étapes dans la maturation cytoplasmique des particules pré-40S eucaryotes.

Mon travail m'a également conduit à étudier la structure de particules pré-40S, purifiées/bloquées à différentes étapes de leur maturation. Ceci a mis en lumière les remodelages structuraux et des changements conformationnels durant l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique. Cela m'a permis notamment de proposer une chronologie d'évènements commençant par la phosphorylation du CFM Ltv1 et aboutissant à une dynamique de la plateforme des particules pré-ribosomiques de levure. Cette même démarche a mis en évidence des variants structuraux dans les particules mutantes pour la protéine Rps20, soulignant le rôle de cette protéine dans la mise en place du bec de la petite sous-unité ribosomique et le relargage des CFM Rio2 et Ltv1.

Mes travaux ont également révélé des divergences dans l'assemblage de la sous-unité 40S chez l'Homme et la levure. Ces différences se caractérisent par une absence de particules pseudo-80S (issue de l'association de particule pré-40S avec la sous-unité 60S) dans les étapes de maturations cytoplasmiques, chez l'Homme. Par ailleurs, mes travaux de recherche ont permis de constater une absence de la mobilité sur la plateforme des particules pré-40S humaines, phénomène toutefois observé dans les particules cytoplasmiques de levure.

D'autre part, les structures que j'ai obtenu mettent en lumière de potentielles nouvelles fonctions de certaines protéines telles que Hrr25, Fap7, Rps26, RIO1, et l'existence d'un facteur X chez la levure comme chez l'humain. Ainsi, l'étude des mécanismes cytoplasmiques conduisant à la maturation des petites sous-unités ribosomiques ne fait sans doute que commencer !

L'analyse structurale des particules pré-40S humaines a permis pour la première fois de localiser avec précision le CFM RIO1 et de mettre en évidence au moins deux évènements supplémentaires dans les dernières étapes de maturation cytoplasmique de la sous-unité 40S. Dans ce modèle, le relargage des CFM NOB1 et DIM2 s'accompagne de l'association stable de RIO1 et de l'intégration de Rps26. Afin de confirmer les hypothèses proposées dans cette étude structurale, nous avons entamé un ensemble d'expériences fonctionnelles dans l'équipe. Ceci constitue une avancée réelle dans la démarche de biologie intégrative de notre équipe, puisque nous pouvons enfin relier nos données structurales à des fonctions des acteurs de l'assemblage des ribosomes.

L'un des avantages de la cryo-EM par rapport à la cristallographie aux rayons X est l'accès à la caractérisation de l'hétérogénéité structurale des complexes macromoléculaires d'intérêt. L'analyse haute résolution de domaines dynamiques a toutefois été jusqu'à présent relativement limitée en cryo-EM, comme le montre en partie mes travaux : certaines particules pré-40S présentent par exemple une plateforme tellement mobile qu'elle en devient floutée voire totalement effacée lors de l'étape de reconstruction 3D. Cependant, le développement de nouvelles méthodes d'analyse d'image comme le raffinement simultané des zones dynamiques (multi-body refinement), couplées à une augmentation des performances de calcul et de capacité de traitement de jeu de données devraient considérablement contribuer à l'amélioration de la résolution de ces zones dynamiques.

A plus long terme, de nouveaux développements en cryo-tomographie électronique, couplés à la corrélation avec des microscopies photoniques devraient permettre aux générations futures de réaliser le rêve de nombreux biologistes structuraux : accéder à la structure atomique de complexes biologiques *in vivo*, ou au moins *in cellulo*.

# Bibliographie





- Adams, P. D. *et al.* (2010) 'PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), pp. 213–221. doi: 10.1107/S0907444909052925.
- Adams, D. R., Ron, D. and Kiely, P. A. (2011) 'RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function', *Cell Communication and Signaling*, 9(1), p. 22. doi: 10.1186/1478-811X-9-22.
- Afonine, P. V. *et al.* (2018) 'Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography', *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 74(6), pp. 531–544. doi: 10.1107/S2059798318006551.
- Ameismeier, M. *et al.* (2018) 'Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation.', *Nature*, 558(7709), pp. 249–253. doi: 10.1038/s41586-018-0193-0.
- Amunts, A. *et al.* (2014) 'Structure of the Yeast Mitochondrial Large Ribosomal Subunit', *Science*, 343(6178), pp. 1485–1489. doi: 10.1126/science.1249410.
- Anger, A. M. *et al.* (2013) 'Structures of the human and Drosophila 80S ribosome', *Nature*, 497(7447), pp. 80–85. doi: 10.1038/nature12104.
- Armache, J.-P. *et al.* (2010) 'Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution'. doi: 10.1073/pnas.1009999107/-/DCSupplemental.
- Armache, J.-P. *et al.* (2013) 'Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: Implications for eukaryotic ribosome evolution', *Nucleic Acids Research*, 41(2), pp. 1284–1293. doi: 10.1093/nar/gks1259.
- Badertscher, L. *et al.* (2015) 'Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells', *Cell Reports*. Cell Press, 13(12), pp. 2879–2891. doi: 10.1016/J.CELREP.2015.11.061.
- Bai, X. *et al.* (2013) 'Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles', *eLife*, 2, p. e00461. doi: 10.7554/eLife.00461.
- Ban, N. *et al.* (1998) 'A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit.', *Cell*, 93(7), pp. 1105–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657144> (Accessed: 28 January 2019).
- Ban, N. *et al.* (1998) *of ribosomes were illuminated by electron microscopy*, *Cell*. Available at: [https://ac-els-cdn-com.insb.bib.cnrs.fr/S0092867400814555/1-s2.0-S0092867400814555-main.pdf?\\_tid=04fb6161-210e-4ead-b99b-6ee8af78d682&acdnat=1543245002\\_49e88be9c3c507a5629631096fd9a318](https://ac-els-cdn-com.insb.bib.cnrs.fr/S0092867400814555/1-s2.0-S0092867400814555-main.pdf?_tid=04fb6161-210e-4ead-b99b-6ee8af78d682&acdnat=1543245002_49e88be9c3c507a5629631096fd9a318) (Accessed: 26 November 2018).
- Ban, N. *et al.* (1999) 'Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit', *Nature*, 400(6747), pp. 841–847. doi: 10.1038/23641.
- Ban, N. *et al.* (2000) 'The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution.', *Science (New York, N.Y.)*, 289(5481), pp. 905–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10937989> (Accessed: 28 January 2019).
- Bastien Ferreira-Cerca, S. *et al.* (no date) 'Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins'. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.029.
- Baumas, K. *et al.* (2012) 'Human RioK3 is a novel component of cytoplasmic pre-40S pre-ribosomal particles.', *RNA biology*, 9(2), pp. 162–74. doi: 10.4161/rna.18810.

- Baxter-Roshek, J. L., Petrov, A. N. and Dinman, J. D. (2007) 'Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification.', *PLoS one*. Edited by T. Preiss, 2(1), p. e174. doi: 10.1371/journal.pone.0000174.
- Beck, M. and Hurt, E. (2016) 'The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight', *Nature Publishing Group*, 18. doi: 10.1038/nrm.2016.147.
- Belhabich-Baumans, K. *et al.* (2017) 'The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles.', *Nucleic acids research*, 45(18), pp. 10824–10836. doi: 10.1093/nar/gkx734.
- Ben-Shem, A. *et al.* (2011) 'The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution', *Science*, 334(6062), pp. 1524–1529. doi: 10.1126/science.1212642.
- Ben-Shem, A. *et al.* (2010) *Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome*. Available at: <http://science.sciencemag.org/> (Accessed: 26 November 2018).
- Del Bene, F. *et al.* (2010) 'Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit', *Science*. doi: 10.1126/science.1192949.
- Bernstein, K. A. *et al.* (2007) 'Ribosome Biogenesis Is Sensed at the Start Cell Cycle Checkpoint □ D', *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 953–964. doi: 10.1091/mbc.E06.
- Bohnsack, M. T. *et al.* (2009) 'Prp43 Bound at Different Sites on the Pre-rRNA Performs Distinct Functions in Ribosome Synthesis', *Molecular Cell*, 36(4), pp. 583–592. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.039.
- BRENNER, S. and HORNE, R. W. (1959) 'A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.', *Biochimica et biophysica acta*, 34, pp. 103–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13804200> (Accessed: 4 February 2019).
- Brilot, A. F. *et al.* (2012) 'Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film.', *Journal of structural biology*, 177(3), pp. 630–7. doi: 10.1016/j.jsb.2012.02.003.
- Brown, A. *et al.* (2014) 'Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria.', *Science (New York, N.Y.)*. Europe PMC Funders, 346(6210), pp. 718–722. doi: 10.1126/science.1258026.
- Brown, A. *et al.* (2015) 'Tools for macromolecular model building and refinement into electron cryo-microscopy reconstructions', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 71(1), pp. 136–153. doi: 10.1107/S1399004714021683.
- Carron, C. *et al.* (2011) 'Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 39(1), pp. 280–91. doi: 10.1093/nar/gkq734.
- Chaker-Margot, M. *et al.* (2017) 'Architecture of the yeast small subunit processome', *Science*, 355(6321), p. eaal1880. doi: 10.1126/science.aal1880.
- Chandramouli, P. *et al.* (2008) 'Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution.', *Structure (London, England : 1993)*, 16(4), pp. 535–48. doi: 10.1016/j.str.2008.01.007.
- Chen, V. B. *et al.* (2010) 'MolProbity : all-atom structure validation for macromolecular crystallography', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(1), pp. 12–21. doi: 10.1107/S0907444909042073.
- Cheng, J. *et al.* (2017) '3.2-Å-resolution structure of the 90S preribosome before A1 pre-rRNA cleavage', *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(11), pp. 954–964. doi: 10.1038/nsmb.3476.

- Davis, J. H. and Williamson, J. R. (2017) 'Structure and dynamics of bacterial ribosome biogenesis', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1716), p. 20160181. doi: 10.1098/rstb.2016.0181.
- Decatur, W. A. *et al.* (2007) 'Identifying Effects of snoRNA-Guided Modifications on the Synthesis and Function of the Yeast Ribosome', in *Methods in enzymology*, pp. 283–316. doi: 10.1016/S0076-6879(07)25013-X.
- Decatur, W. A. and Fournier, M. J. (2002) 'rRNA modifications and ribosome function.', *Trends in biochemical sciences*, 27(7), pp. 344–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114023> (Accessed: 30 October 2018).
- Delprato, A. *et al.* (2014) 'Crucial role of the Rcl1p-Bms1p interaction for yeast pre-ribosomal RNA processing.', *Nucleic acids research*, 42(15), pp. 10161–72. doi: 10.1093/nar/gku682.
- Dever, T. E. and Green, R. (2012) 'The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes'. doi: 10.1101/cshperspect.a013706.
- Dragon, F. *et al.* (2002) 'A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis', *Nature*, 417(6892), pp. 967–970. doi: 10.1038/nature00769.
- Dubochet, J. *et al.* (1988) 'Cryo-electron microscopy of vitrified specimens.', *Quarterly reviews of biophysics*, 21(2), pp. 129–228. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3043536> (Accessed: 28 January 2019).
- Emsley, P. *et al.* (2010) 'Features and development of *Coot*', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(4), pp. 486–501. doi: 10.1107/S0907444910007493.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) '*Coot* : model-building tools for molecular graphics', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(12), pp. 2126–2132. doi: 10.1107/S0907444904019158.
- Farley-Barnes, K. I. *et al.* (2018) 'Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number.', *Cell reports*. NIH Public Access, 22(7), pp. 1923–1934. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.056.
- Fatica, A. and Tollervey, D. (2002) 'Making ribosomes', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00336-8.
- Fatica, A. and Tollervey, D. (2003) 'Insights into the structure and function of a guide RNP', *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(4), pp. 237–239. doi: 10.1038/nsb0403-237.
- Faza, M. B. *et al.* (2012) 'Role of Mex67-Mtr2 in the nuclear export of 40S pre-ribosomes.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 8(8), p. e1002915. doi: 10.1371/journal.pgen.1002915.
- Fernández, I. S. *et al.* (2014) 'Initiation of Translation by Cricket Paralysis Virus IRES Requires Its Translocation in the Ribosome', *Cell*, 157(4), pp. 823–831. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.015.
- Ferreira-Cerca, S. *et al.* (2005) 'Roles of Eukaryotic Ribosomal Proteins in Maturation and Transport of Pre-18S rRNA and Ribosome Function', *Molecular Cell*, 20, pp. 263–275. doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.005.
- Ferreira-Cerca, S. *et al.* (2007) 'Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins', *Molecular Cell*, 28(3), pp. 446–457. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.029.
- Ferreira-Cerca, S. *et al.* (2012) 'ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit', *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), pp. 1316–1323. doi: 10.1038/nsmb.2403.

- Ferreira-Cerca, S. *et al.* (2014) 'Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes.', *Nucleic acids research*, 42(13), pp. 8635–47. doi: 10.1093/nar/gku542.
- Fischer, U. *et al.* (2015) 'A non-canonical mechanism for Crm1-export cargo complex assembly.', *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 4. doi: 10.7554/eLife.05745.
- Gabashvili, I. S. *et al.* (2000) 'Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution.', *Cell*, 100(5), pp. 537–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721991> (Accessed: 28 January 2019).
- Gandin, V. *et al.* (2013) 'RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis', *Genes & Cancer*, 4(9–10), pp. 369–377. doi: 10.1177/1947601913486348.
- García-Gómez, J. J. *et al.* (2014) 'Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3.', *PLoS genetics*. Edited by J. Warner, 10(3), p. e1004205. doi: 10.1371/journal.pgen.1004205.
- Gazda, H. T. *et al.* (2012) 'Frameshift mutation in p53 regulator *RPL26* is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia', *Human Mutation*, 33(7), pp. 1037–1044. doi: 10.1002/humu.22081.
- Geerlings, T. H. *et al.* (2003) 'Rio2p, an Evolutionarily Conserved, Low Abundant Protein Kinase Essential for Processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp. 22537–22545. doi: 10.1074/jbc.M300759200.
- Ghalei, H. *et al.* (2015) 'Hrr25/CK1δ-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth.', *The Journal of cell biology*, 208(6), pp. 745–59. doi: 10.1083/jcb.201409056.
- Ghalei, H. *et al.* (2017) 'The ATPase Fap7 Tests the Ability to Carry Out Translocation-like Conformational Changes and Releases Dim1 during 40S Ribosome Maturation', *Molecular Cell*, 68(6), p. 1155. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.001.
- Gleizes, P.-E. *et al.* (2001) 'Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex', *The Journal of Cell Biology*, 155(6), pp. 923–936. doi: 10.1083/jcb.200108142.
- Gonzalez, T. N. *et al.* (1999) 'Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway', *The EMBO Journal*, 18(11), pp. 3119–3132. doi: 10.1093/emboj/18.11.3119.
- Grandi, P. *et al.* (2002) '90S Pre-Ribosomes Include the 35S Pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S Subunit Processing Factors but Predominantly Lack 60S Synthesis Factors', *Molecular Cell*, 10(1), pp. 105–115. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00579-8.
- Granneman, S. *et al.* (2010) 'Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA–protein cross-linking', *The EMBO Journal*, 29(12), pp. 2026–2036. doi: 10.1038/emboj.2010.86.
- Granneman, S. and Baserga, S. J. (2005) 'Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing', *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3), pp. 281–286. doi: 10.1016/j.ceb.2005.04.001.
- Granneman, S., Nandineni, M. R. and Baserga, S. J. (2005) 'The Putative NTPase Fap7 Mediates Cytoplasmic 20S Pre-rRNA Processing through a Direct Interaction with Rps14', *Molecular and Cellular Biology*, 25(23), pp. 10352–10364. doi: 10.1128/MCB.25.23.10352-10364.2005.
- Greber, B. J. (2016) 'Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy', *RNA*, 22(11), pp. 1643–1662. doi: 10.1261/rna.057927.116.

- Hannon, G. J. *et al.* (1989) 'Accurate processing of human pre-rRNA in vitro.', *Molecular and cellular biology*, 9(10), pp. 4422–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2586517> (Accessed: 29 January 2019).
- Hector, R. D. *et al.* (2014) 'Snapshots of pre-rRNA structural flexibility reveal eukaryotic 40S assembly dynamics at nucleotide resolution.', *Nucleic acids research*, 42(19), pp. 12138–54. doi: 10.1093/nar/gku815.
- Hellmich, U. A. *et al.* (2013) 'Essential ribosome assembly factor Fap7 regulates a hierarchy of RNA-protein interactions during small ribosomal subunit biogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), pp. 15253–15258. doi: 10.1073/pnas.1306389110.
- Hellmich, U. A. and Wöhnert, J. (2013) 'Backbone resonance assignments for a homolog of the essential ribosome biogenesis factor Fap7 from *P. horikoshii* in its nucleotide-free and -bound forms', *Biomolecular NMR Assignments*, 7(2), pp. 261–265. doi: 10.1007/s12104-012-9423-9.
- Henras, A. K. *et al.* (2008) 'The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis.', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(15), pp. 2334–59. doi: 10.1007/s00018-008-8027-0.
- Henras, A. K. *et al.* (2015) 'An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes', *WIREs RNA*, 6, pp. 225–242. doi: 10.1002/wrna.1269.
- Heuer, A., Thomson, E., *et al.* (2017) 'Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*', *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.30189.
- Horn, D. M., Mason, S. L. and Karbstein, K. (2011) 'Rcl1 Protein, a Novel Nuclease for 18 S Ribosomal RNA Production \* □ S'. doi: 10.1074/jbc.M111.268649.
- Huang, C., Karijolic, J. and Yu, Y.-T. (2016) 'Detection and quantification of RNA 2â€²-O-methylation and pseudouridylation', *Methods*, 103, pp. 68–76. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.02.003.
- Hurt, E. *et al.* (1999) 'A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants.', *The Journal of cell biology*, 144(3), pp. 389–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971735> (Accessed: 26 January 2019).
- Jenner, L. *et al.* (2012) 'Crystal structure of the 80S yeast ribosome', *Current Opinion in Structural Biology*, 22, pp. 759–767. doi: 10.1016/j.sbi.2012.07.013.
- Johnson, M. C. *et al.* (2017) 'Structural Heterogeneity in Pre-40S Ribosomes', *Structure*, 25(2), pp. 329–340. doi: 10.1016/j.str.2016.12.011.
- Karbstein, K., Jonas, S. and Doudna, J. A. (2005) 'An Essential GTPase Promotes Assembly of Preribosomal RNA Processing Complexes', *Molecular Cell*, 20(4), pp. 633–643. doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.017.
- Kass, S., Craig, N. and SOLLNER WEBBI, B. (1987) *Primary Processing of Mammalian rRNA Involves Two Adjacent Cleavages and Is Not Species Specific*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/pmc/articles/PMC367908/pdf/molcellb00080-0249.pdf> (Accessed: 29 October 2018).
- Katherine E. Sloan, Sandy Mattijssen, Simon Lebaron, David Tollervey, Ger J.M. Pruijn, N. J. W. (2013) 'Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing'. doi: 10.1083/jcb.201207131.
- Kent, T., Lapik, Y. R. and Pestov, D. G. (2008) 'The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites', *RNA*, 15(1), pp. 14–20. doi: 10.1261/rna.1384709.

- Khatter, H. *et al.* (2015) 'Structure of the human 80S ribosome', *Nature*, 520(7549), pp. 640–645. doi: 10.1038/nature14427.
- Kimanius, D. *et al.* (2016) 'Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.18722.
- King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., *et al.* (2003) 'Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center.', *Molecular cell*, 11(2), pp. 425–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620230> (Accessed: 29 January 2019).
- Kiss-László, Z. *et al.* (1996) 'Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs.', *Cell*, 85(7), pp. 1077–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674114> (Accessed: 4 February 2019).
- KISS, T. *et al.* (2006) 'Biogenesis and Intranuclear Trafficking of Human Box C/D and H/ACA RNPs', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71(0), pp. 407–417. doi: 10.1101/sqb.2006.71.025.
- Kiss, T., Bortolin, M. L. and Filipowicz, W. (1996) 'Characterization of the intron-encoded U19 RNA, a new mammalian small nucleolar RNA that is not associated with fibrillarin.', *Molecular and cellular biology*, 16(4), pp. 1391–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657112> (Accessed: 29 January 2019).
- Klinge, S. *et al.* (2012) 'Atomic structures of the eukaryotic ribosome', *Trends in Biochemical Sciences*, 37(5), pp. 189–198. doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.007.
- Klinge, S. and Woolford, J. L. (2019) 'Ribosome assembly coming into focus.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(2), pp. 116–131. doi: 10.1038/s41580-018-0078-y.
- Kornprobst, M. *et al.* (2016) 'Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome In Brief The co-transcriptional folding environment for rRNA is reminiscent of chaperone chambers for protein folding. Accession Numbers 5JPQ Kornprobst *et al.*', *Cell*, 166, pp. 380–393. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.014.
- Korostelev, A., Ermolenko, D. N. and Noller, H. F. (2008) 'Structural dynamics of the ribosome', *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(6), pp. 674–683. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.08.037.
- Kressler, D., Hurt, E. and Baßler, J. (2010) 'Driving ribosome assembly', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1803(6), pp. 673–683. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2009.10.009.
- Krogan, N. J. *et al.* (2004) 'High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes.', *Molecular cell*, 13(2), pp. 225–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759368> (Accessed: 29 January 2019).
- Kucukelbir, A., Sigworth, F. J. and Tagare, H. D. (2014) 'Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps', *Nature Methods*, 11(1), pp. 63–65. doi: 10.1038/nmeth.2727.
- Kundhavi Natchiar, S. *et al.* (2017) 'Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure', *Nature Publishing Group*, 551. doi: 10.1038/nature24482.
- Lafontaine, D. L. J., Preiss, T. and Tollervey, D. (1998) *Yeast 18S rRNA Dimethylase Dim1p: a Quality Control Mechanism in Ribosome Synthesis?*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. Available at: <http://mcb.asm.org/> (Accessed: 31 October 2018).
- Lafontaine, D. and Tollervey, D. (1995) 'Trans-acting factors in yeast pre-rRNA and pre-snoRNA processing.', *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 73(11–12), pp. 803–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721996> (Accessed: 26 January 2019).

- Lafontaine, D., Vandenhoute, J. and Tollervey, D. (1995) 'The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast.', *Genes & development*, 9(20), pp. 2470–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590228> (Accessed: 31 October 2018).
- Lake, J. A. *et al.* (1974) 'Localization of Escherichia coli ribosomal proteins S4 and S14 by electron microscopy of antibody-labeled subunits.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(12), pp. 4688–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4140507> (Accessed: 28 January 2019).
- Lake, J. A. *et al.* (1974) 'Ribosome structure: Three-dimensional distribution of proteins S14 and S4', *Journal of Supramolecular Structure*, 2(2–4), pp. 189–195. doi: 10.1002/jss.400020213.
- Lamanna, A. C. and Karbstein, K. (2009) 'Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), pp. 14259–64. doi: 10.1073/pnas.0905403106.
- Lamanna, A. C. and Karbstein, K. (2011) 'An RNA Conformational Switch Regulates Pre-18S rRNA Cleavage', *Journal of Molecular Biology*, 405(1), pp. 3–17. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.064.
- Larburu, N. *et al.* (2016) 'Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing', *Nucleic Acids Research*, 44(17), pp. 8465–8478. doi: 10.1093/nar/gkw714.
- LaRonde-LeBlanc, N. *et al.* (2005) 'Structure and activity of the atypical serine kinase Rio1', *FEBS Journal*, 272(14), pp. 3698–3713. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04796.x.
- LaRonde-LeBlanc, N. and Wlodawer, A. (2005a) 'A Family Portrait of the RIO Kinases', *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), pp. 37297–37300. doi: 10.1074/jbc.R500013200.
- LaRonde-LeBlanc, N. and Wlodawer, A. (2005b) 'The RIO kinases: An atypical protein kinase family required for ribosome biogenesis and cell cycle progression', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1754(1–2), pp. 14–24. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.037.
- Lazdins, I. B., Delannoy, M. and Sollner-Webb, B. (1997) 'Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization.', *Chromosoma*, 105(7–8), pp. 481–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211976> (Accessed: 15 November 2018).
- Lé Ger-Silvestre, I. *et al.* (2004) 'The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast', *The EMBO Journal*, 23, pp. 2336–2347. doi: 10.1038/sj.emboj.7600252.
- Lé Ger-Silvestre, I. *et al.* (2005) 'Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis \*'. doi: 10.1074/jbc.M506916200.
- Lebaron, S. *et al.* (2012) 'Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits.', *Nature structural & molecular biology*, 19(8), pp. 744–53. doi: 10.1038/nsmb.2308.
- Lecompte, O. *et al.* (2002) 'Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale.', *Nucleic acids research*, 30(24), pp. 5382–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490706> (Accessed: 4 February 2019).
- Leidig, C. *et al.* (2014) '60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle.', *Nature communications*, 5(1), p. 3491. doi: 10.1038/ncomms4491.
- LESCOUTE, A. (2006) 'Topology of three-way junctions in folded RNAs', *RNA*, 12(1), pp. 83–93. doi: 10.1261/rna.2208106.

- Li, X. *et al.* (2013) 'Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM.', *Nature methods*. NIH Public Access, 10(6), pp. 584–90. doi: 10.1038/nmeth.2472.
- Liang, X., Liu, Q. and Fournier, M. J. (2007) 'rRNA Modifications in an Intersubunit Bridge of the Ribosome Strongly Affect Both Ribosome Biogenesis and Activity', *Molecular Cell*, 28(6), pp. 965–977. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.012.
- Loc'h, J. *et al.* (2014) 'RNA mimicry by the fap7 adenylate kinase in ribosome biogenesis.', *PLoS biology*. Edited by G. A. Petsko, 12(5), p. e1001860. doi: 10.1371/journal.pbio.1001860.
- Longtine, M. S. *et al.* (1998) 'Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 14(10), pp. 953–961. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U.
- Löwe, J. *et al.* (2016) 'X-ray and cryo-EM structures of monomeric and filamentous actin-like protein MamK reveal changes associated with polymerization.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(47), pp. 13396–13401. doi: 10.1073/pnas.1612034113.
- Mancera-Martínez, E. *et al.* (2017) 'RNA Biology ABCE1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation ABCE1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation'. doi: 10.1080/15476286.2016.1269993.
- Marshall, R. A., Dorywalska, M. and Puglisi, J. D. (2008) 'Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), pp. 15364–15369. doi: 10.1073/pnas.0805299105.
- McCaughan, U. M. *et al.* (2016) 'Pre-40S ribosome biogenesis factor Tsr1 is an inactive structural mimic of translational GTPases.', *Nature communications*, 7(1), p. 11789. doi: 10.1038/ncomms11789.
- McQuillen, K., Roberts, R. B. and Britten, R. J. (1959) 'SYNTHESIS OF NASCENT PROTEIN BY RIBOSOMES IN *ESCHERICHIA COLI*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 45(9), pp. 1437–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16590524> (Accessed: 29 January 2019).
- Meier, U. T. (2005) 'The many facets of H/ACA ribonucleoproteins.', *Chromosoma*, 114(1), pp. 1–14. doi: 10.1007/s00412-005-0333-9.
- Melnikov, S. *et al.* (2015) 'Insights into the origin of the nuclear localization signals in conserved ribosomal proteins.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 7382. doi: 10.1038/ncomms8382.
- Melnikov, S., Mailliot, J., Shin, B.-S., *et al.* (2016) 'Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome.', *Journal of molecular biology*. Europe PMC Funders, 428(18), pp. 3570–3576. doi: 10.1016/j.jmb.2016.05.011.
- Melnikov, S., Mailliot, J., Rigger, L., *et al.* (2016) 'Molecular insights into protein synthesis with proline residues.', *EMBO reports*. European Molecular Biology Organization, 17(12), pp. 1776–1784. doi: 10.15252/embr.201642943.
- Merk, A. *et al.* (2016) 'Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery Accession Numbers 5K0Z 5K10 5K11 5K12 Merk et al Article Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery', *Cell*, 165, pp. 1698–1707. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.040.



- Michot, B. and Bachellerie, J. P. (1991) 'Secondary structure of the 5' external transcribed spacer of vertebrate pre-rRNA. Presence of phylogenetically conserved features.', *European journal of biochemistry*, 195(3), pp. 601–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1999184> (Accessed: 29 January 2019).
- Miller, L. and Brown, D. D. (1969) 'Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content.', *Chromosoma*, 28(4), pp. 430–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5364411> (Accessed: 29 January 2019).
- Mitterer, V., Gantenbein, N., *et al.* (2016) 'Nuclear import of dimerized ribosomal protein Rps3 in complex with its chaperone Yar1', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 36714. doi: 10.1038/srep36714.
- Mitterer, V., Murat, G., *et al.* (2016) 'Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 10336. doi: 10.1038/ncomms10336.
- Mohan, S., Donohue, J. P. and Noller, H. F. (2014a) 'Molecular mechanics of 30S subunit head rotation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), pp. 13325–13330. doi: 10.1073/pnas.1413731111.
- Montellese, C. *et al.* (2017) 'Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation', *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp. 6822–6836. doi: 10.1093/nar/gkx253.
- Morello, L. G. *et al.* (2011) 'The Human Nucleolar Protein FTSJ3 Associates with NIP7 and Functions in Pre-rRNA Processing', *PLoS ONE*. Edited by G. Kudla, 6(12), p. e29174. doi: 10.1371/journal.pone.0029174.
- Mougey, E. B. *et al.* (1993) 'The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes.', *Genes & development*, 7(8), pp. 1609–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8339936> (Accessed: 29 January 2019).
- Mougey, E. B., Pape, L. K. and Sollner-Webb, B. (1993) 'A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA.', *Molecular and cellular biology*, 13(10), pp. 5990–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8413202> (Accessed: 29 January 2019).
- Mulder, A. M. *et al.* (2010) 'Visualizing Ribosome Biogenesis: Parallel Assembly Pathways for the 30 S Subunit', *Science*, 330(6004), pp. 673–677. doi: 10.1126/science.1193220.
- Müller, M. *et al.* (2001) 'Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane.', *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 66, pp. 107–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051763> (Accessed: 27 January 2019).
- Mullineux, S.-T. and Lafontaine, D. L. J. (2012) 'Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand?', *Biochimie*, 94, pp. 1521–1532. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.001.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) 'Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 53(3), pp. 240–255. doi: 10.1107/S0907444996012255.
- Nicastro, G., Taylor, I. A. and Ramos, A. (2015) 'KH-RNA interactions: back in the groove', *Current Opinion in Structural Biology*, 30, pp. 63–70. doi: 10.1016/j.sbi.2015.01.002.

- Nierhaus, K. H. *et al.* (1998) 'Structure of the elongating ribosome: arrangement of the two tRNAs before and after translocation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 95(3), pp. 945–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9448265> (Accessed: 29 January 2019).
- Nissan, T. A. (2002) '60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm', *The EMBO Journal*, 21(20), pp. 5539–5547. doi: 10.1093/emboj/cdf547.
- Nissen, P. *et al.* (2000) 'The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis.', *Science (New York, N.Y.)*, 289(5481), pp. 920–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10937990> (Accessed: 29 January 2019).
- Nomura, M. (1970) 'Bacterial ribosome.', *Bacteriological reviews*. American Society for Microbiology Journals, 34(3), pp. 228–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16350216> (Accessed: 6 November 2018).
- O'Donohue, M.-F. *et al.* (2010) 'Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 190(5), pp. 853–66. doi: 10.1083/jcb.201005117.
- Oeffinger, M., Dlakic, M. and Tollervey, D. (2004) 'A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(2), pp. 196–209. doi: 10.1101/gad.285604.
- Ofengand, J. (2002) 'Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases.', *FEBS letters*, 514(1), pp. 17–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904174> (Accessed: 30 October 2018).
- Ogle, J. M., Carter, A. P. and Ramakrishnan, V. (2003) 'Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures', *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), pp. 259–266. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00066-5.
- Osheim, Y. N. *et al.* (2004) 'Pre-18S Ribosomal RNA Is Structurally Compacted into the SSU Processome Prior to Being Cleaved from Nascent Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular Cell*, 16(6), pp. 943–954. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.031.
- Orlova, E. V and Saibil, H. R. (2011) 'Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy.', *Chemical reviews*, 111(12), pp. 7710–48. doi: 10.1021/cr100353t.
- (Orlova and Saibil, 2011)
- Palade, G. (1975) 'Intracellular aspects of the process of protein synthesis.', *Science (New York, N.Y.)*, 189(4200), pp. 347–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1096303> (Accessed: 29 January 2019).
- PALADE, G. E. (1955) 'Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ.', *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. The Rockefeller University Press, 1(6), pp. 567–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13278367> (Accessed: 29 January 2019).
- Pang, Y. *et al.* (2015) 'Structure of the apoptosome: mechanistic insights into activation of an initiator caspase from *Drosophila*.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 29(3), pp. 277–87. doi: 10.1101/gad.255877.114.
- Panse, V. G. and Johnson, A. W. (2010) 'Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality.', *Trends in biochemical sciences*, 35(5), pp. 260–6. doi: 10.1016/j.tibs.2010.01.001.
- Peña, C. *et al.* (2016) 'Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation.', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.21755.

- Penczek, P. *et al.* (1999) 'Haloarcula marismortui 50S Subunit—Complementarity of Electron Microscopy and X-Ray Crystallographic Information', *Journal of Structural Biology*, 128(1), pp. 44–50. doi: 10.1006/jsbi.1999.4157.
- Pérez-Fernández, J. *et al.* (2007) 'The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism.', *Molecular and cellular biology*, 27(15), pp. 5414–29. doi: 10.1128/MCB.00380-07.
- Pérez-Fernández, J., Martín-Marcos, P. and Dosil, M. (2011) 'Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes', *Nucleic Acids Research*, 39(18), pp. 8105–8121. doi: 10.1093/nar/gkr508.
- Pertschy, B. *et al.* (2009) 'RNA Helicase Prp43 and Its Co-factor Pfa1 Promote 20 to 18 S rRNA Processing Catalyzed by the Endonuclease Nob1', *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), pp. 35079–35091. doi: 10.1074/jbc.M109.040774.
- Pettersen, E. F. *et al.* (2004) 'UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084.
- Phipps, K. R., Charette, J. M. and Baserga, S. J. (2011) 'The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects.', *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(1), pp. 1–21. doi: 10.1002/wrna.57.
- Pintilie, G. D. *et al.* (2010) 'Quantitative analysis of cryo-EM density map segmentation by watershed and scale-space filtering, and fitting of structures by alignment to regions', *Journal of Structural Biology*, 170(3), pp. 427–438. doi: 10.1016/j.jsb.2010.03.007.
- Preti, M. *et al.* (2013) 'Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA.', *Nucleic acids research*, 41(8), pp. 4709–23. doi: 10.1093/nar/gkt160.
- Puig, O. *et al.* (2001) 'The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification', *Methods*, 24(3), pp. 218–229. doi: 10.1006/meth.2001.1183.
- Rabl, J. *et al.* (2011) 'Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1.', *Science (New York, N.Y.)*, 331(6018), pp. 730–6. doi: 10.1126/science.1198308.
- Ratje, A. H. *et al.* (2010) 'Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites', *Nature*, 468. doi: 10.1038/nature09547.
- Razi, A., Guarné, A. and Ortega, J. (2017) 'The cryo-EM structure of YjeQ bound to the 30S subunit suggests a fidelity checkpoint function for this protein in ribosome assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), pp. E3396–E3403. doi: 10.1073/pnas.1618016114.
- Reichow, S. L. *et al.* (2007) 'The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins', *Nucleic Acids Research*, 35(5), pp. 1452–1464. doi: 10.1093/nar/gkl1172.
- Renalier, M.-H. *et al.* (1989) 'Structure of the 5'-external transcribed spacer of the human ribosomal RNA gene', *FEBS Letters*. Wiley-Blackwell, 249(2), pp. 279–284. doi: 10.1016/0014-5793(89)80641-6.
- Reshef, D. N. *et al.* (2011) 'Detecting novel associations in large data sets', *Science*. doi: 10.1126/science.1205438.
- Rothblum, L. (1986) 'The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. A. A. Hadjiolov', *The Quarterly Review of Biology*. Stony Brook Foundation, Inc. , 61(1), pp. 89–89. doi: 10.1086/414760.

- Rouquette, J., Choismel, V. and Gleizes, P.-E. (2005) 'Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells', *The EMBO Journal*, 24(16), pp. 2862–2872. doi: 10.1038/sj.emboj.7600752.
- Sanghai, Z. A. *et al.* (2018) 'Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit.', *Nature*, 556(7699), pp. 126–129. doi: 10.1038/nature26156.
- Saveanu, C. *et al.* (2001) 'Identification of 12 New Yeast Mitochondrial Ribosomal Proteins Including 6 That Have No Prokaryotic Homologues', *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), pp. 15861–15867. doi: 10.1074/jbc.M010864200.
- Saveanu, C. *et al.* (2001) 'Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps', *The EMBO Journal*, 20(22), pp. 6475–6484. doi: 10.1093/emboj/20.22.6475.
- Scaiola, A. *et al.* (2018) 'Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit'. doi: 10.15252/embj.201798499.
- Schafer, T. (2003) 'The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes', *The EMBO Journal*, 22(6), pp. 1370–1380. doi: 10.1093/emboj/cdg121.
- Schäfer, T. *et al.* (2006) 'Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit', *Nature*, 441(7093), pp. 651–655. doi: 10.1038/nature04840.
- Scheres, S. H. W. (2012) 'RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination', *Journal of Structural Biology*, 180, pp. 519–530. doi: 10.1016/j.jsb.2012.09.006.
- Scheres, S. H. W. (2016) 'Processing of Structurally Heterogeneous Cryo-EM Data in RELION', in *Methods in enzymology*, pp. 125–157. doi: 10.1016/bs.mie.2016.04.012.
- Schlutzen, F. *et al.* (2000) 'Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution.', *Cell*, 102(5), pp. 615–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007480> (Accessed: 28 January 2019).
- Seiser, R. M. *et al.* (2006) 'Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*, 174(2), pp. 679–91. doi: 10.1534/genetics.106.062117.
- Spahn, C. M. *et al.* (2001) 'Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions.', *Cell*, 107(3), pp. 373–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701127> (Accessed: 28 January 2019).
- Srivastava, L. *et al.* (2010) 'Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA.', *Molecular and cellular biology*, 30(12), pp. 2947–56. doi: 10.1128/MCB.00226-10.
- Stark, H. *et al.* (1995) 'The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA.', *Structure (London, England : 1993)*, 3(8), pp. 815–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582898> (Accessed: 28 January 2019).
- Strunk, B. S. *et al.* (1994) 'Supporting Online Material Ribosome Assembly Factors Prevent Premature Translation Initiation by 40S Assembly Intermediates', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Wiley-VCH, 58(9), p. 20. doi: 10.1126/science.1128794.
- Strunk, B. S. *et al.* (2011) 'Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates.', *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), pp. 1449–53. doi: 10.1126/science.1208245.

- Strunk, B. S. *et al.* (2012a) 'A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits.', *Cell*, 150(1), pp. 111–21. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.044.
- Strunk, B. S. *et al.* (2012b) 'Joining of 60S subunits and a translation-like cycle in 40S ribosome maturation'. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.044.
- Stuwe, T. *et al.* (2015) 'Architecture of the fungal nuclear pore inner ring complex', *Science*, 350(6256), pp. 56–64. doi: 10.1126/science.aac9176.
- Sun, Q. *et al.* (2017) 'Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome', *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.22086.
- Tafforeau, L. *et al.* (2013) 'The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors', *Molecular Cell*, 51(4), pp. 539–551. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.011.
- Taoka, M. *et al.* (2018) 'Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome', *Nucleic Acids Research*, 46(18), pp. 9289–9298. doi: 10.1093/nar/gky811.
- Thomas, F. and Kutay, U. (2003) 'Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway', *Journal of Cell Science*, 116(12), pp. 2409–2419. doi: 10.1242/jcs.00464.
- Tomecki, R. *et al.* (2015) 'hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A<sub>1</sub>, but not at site A<sub>0</sub>', *RNA Biology*, 12(9), pp. 1010–1029. doi: 10.1080/15476286.2015.1073437.
- Trabuco, L. G. *et al.* (2008) 'Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics.', *Structure (London, England : 1993)*, 16(5), pp. 673–83. doi: 10.1016/j.str.2008.03.005.
- Turowski, T. W. *et al.* (2014) 'Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 42(19), pp. 12189–99. doi: 10.1093/nar/gku878.
- Tycowski, K. T. *et al.* (1996) *A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in Xenopus [nucleolusUHG (U22 host gene)RNA duplexfibrillar]*, *Biochemistry*. Available at: <http://www.pnas.org.insb.bib.cnrs.fr/content/pnas/93/25/14480.full.pdf> (Accessed: 30 October 2018).
- Vanrobays, E. *et al.* (2003) 'Late Cytoplasmic Maturation of the Small Ribosomal Subunit Requires RIO Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), pp. 2083–2095. doi: 10.1128/MCB.23.6.2083-2095.2003.
- VANROBAYS, E. (2004) 'Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis', *RNA*, 10(4), pp. 645–656. doi: 10.1261/rna.5162204.
- Vasiliev, V. D. (1974) 'Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data.', *Acta biologica et medica Germanica*, 33(5–6), pp. 779–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4143298> (Accessed: 28 January 2019).
- Voorhees, R. M. *et al.* (2014) 'Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution.', *Cell*. Elsevier, 157(7), pp. 1632–43. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.024.
- Walls, A. C. *et al.* (2016) 'Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer.', *Nature*. NIH Public Access, 531(7592), pp. 114–117. doi: 10.1038/nature16988.

- Warner, J. R. (1999) 'The economics of ribosome biosynthesis in yeast.', *Trends in biochemical sciences*, 24(11), pp. 437–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542411> (Accessed: 26 January 2019).
- Watkins, N. J. and Bohnsack, M. T. (2012) 'The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA.', *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(3), pp. 397–414. doi: 10.1002/wrna.117.
- Wegierski, T. *et al.* (2001) 'Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast.', *RNA (New York, N.Y.)*, 7(9), pp. 1254–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565748> (Accessed: 26 January 2019).
- Wells, G. R. *et al.* (2016) 'The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans', *Nucleic Acids Research*, 44(11), pp. 5399–5409. doi: 10.1093/nar/gkw213.
- Wells, G. R. *et al.* (2017) 'The ribosome biogenesis factor yUtp23/hUTP23 coordinates key interactions in the yeast and human pre-40S particle and hUTP23 contains an essential PIN domain.', *Nucleic acids research*, 45(8), pp. 4796–4809. doi: 10.1093/nar/gkw1344.
- White, J. *et al.* (2008) 'Bud23 Methylates G1575 of 18S rRNA and Is Required for Efficient Nuclear Export of Pre-40S Subunits', *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), pp. 3151–3161. doi: 10.1128/MCB.01674-07.
- Widmann, B. *et al.* (2012) 'The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by A. G. Matera, 23(1), pp. 22–35. doi: 10.1091/mbc.e11-07-0639.
- Wild, T. *et al.* (2010) 'A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export.', *PLoS biology*. Public Library of Science, 8(10), p. e1000522. doi: 10.1371/journal.pbio.1000522.
- Williamson, J. R. and Davis, J. H. (2017) 'Structure and dynamics of bacterial ribosome biogenesis'. doi: 10.1098/rstb.2016.0181.
- Wimberly, B. T. *et al.* (2000) *Structure of the 30S ribosomal subunit*, *NATURE*. Available at: [www.nature.com](http://www.nature.com) (Accessed: 26 November 2018).
- Woolford, J. L. and Baserga, S. J. (2013) 'Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 195(3), pp. 643–681. doi: 10.1534/genetics.113.153197.
- Woolls, H. A., Lamanna, A. C. and Karbstein, K. (2011) 'Roles of Dim2 in Ribosome Assembly', *Journal of Biological Chemistry*, 286(4), pp. 2578–2586. doi: 10.1074/jbc.M110.191494.
- Wu, S. *et al.* (2016) 'Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes', *Nature*, 534(7605), pp. 133–137. doi: 10.1038/nature17942.
- Wu, S. *et al.* (2017) 'Atomic modeling of the ITS2 ribosome assembly subcomplex from cryo-EM together with mass spectrometry-identified protein-protein crosslinks', *Protein Science*, 26(1), pp. 103–112. doi: 10.1002/pro.3045.
- Wyler, E. *et al.* (2011) 'Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies.', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(1), pp. 189–200. doi: 10.1261/rna.2325911.
- Yan, Z. *et al.* (2015) 'Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution.', *Nature*. Europe PMC Funders, 517(7532), pp. 50–55. doi: 10.1038/nature14063.

- Yoshikawa, H. *et al.* (2015) 'Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis', *Nucleic Acids Research*, 43(11), pp. 5524–5536. doi: 10.1093/nar/gkv470.
- Yu, Y. T. and Nilsen, T. W. (1992) 'Sequence requirements for maturation of the 5' terminus of human 18 S rRNA in vitro.', *The Journal of biological chemistry*, 267(13), pp. 9264–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577760> (Accessed: 29 January 2019).
- Yusupov, M. M. *et al.* (2001) 'Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution', *Science*, 292(5518), pp. 883–896. doi: 10.1126/science.1060089.
- Yusupova, G. and Yusupov, M. (2017) 'Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1716), p. 20160184. doi: 10.1098/rstb.2016.0184.
- Zemp, I. *et al.* (2009) 'Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2.', *The Journal of cell biology*, 185(7), pp. 1167–80. doi: 10.1083/jcb.200904048.
- Zemp, I. *et al.* (2014) 'CK1δ and CK1ε are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation.', *Journal of cell science*, 127(Pt 6), pp. 1242–53. doi: 10.1242/jcs.138719.
- Zemp, I. and Kutay, U. (2007) 'Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits', *FEBS Letters*, 581(15), pp. 2783–2793. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.013.
- Zhang, K. (2016) 'Gctf: Real-time CTF determination and correction', *Journal of Structural Biology*, 193(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.jsb.2015.11.003.
- Zheng, S. Q. *et al.* (2017) 'MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy', *Nature Methods*, 14(4), pp. 331–332. doi: 10.1038/nmeth.4193.
- Zorbas, C. *et al.* (2015) 'The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 26(11), pp. 2080–95. doi: 10.1091/mbc.E15-02-0073.

## Liste des abréviations :

<b>2D</b>	Bidimensionnel
<b>3D</b>	Tridimensionnel
<b>Å</b>	Angström
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNr</b>	ADN ribosomique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARN POL I</b>	ARN polymérase I
<b>ARN POL II</b>	ARN polymérase II
<b>ARN POL III</b>	ARN polymérase III
<b>ARNr</b>	ARN ribosomique
<b>ARNt</b>	ARN de transfert
<b>AU</b>	Acétate d'uranyle
<b>CCD</b>	Charge Coupled Device
<b>CFM</b>	Co-facteur de maturation
<b>CMOS</b>	Complementary Meta Oxide Semiconductor
<b>CPN</b>	Complexe de pore nucléaire
<b>CTF</b>	Fonction de Transfert de Contraste
<b>DQE</b>	Detective quantum Efficiency
<b>FEG</b>	« Field Emission Gun »
<b>FOM</b>	« Figure Of Merit »
<b>FSC</b>	« Fourier Shell Correlation »
<b>iRPS</b>	Initiation RPS
<b>ITS</b>	« Internal Transcribed Spacer »
<b>Lab6</b>	Hexaborure de lanthane
<b>MDFE</b>	Molecular Dynamics Flexible Fitting
<b>MET</b>	Microscopie électronique en transmission
<b>Meti</b>	Microscopie électronique intégrative de toulouse
<b>NES</b>	Nuclear Export Signal



<b>NLS</b>	Nuclear Localisation Signal
<b>Nup</b>	Nucléoporines
<b>pRPS</b>	Progression RPS
<b>RanGAP</b>	RanGTPAase Activating Protein
<b>RanGEF</b>	RanGTPase exchange Factor
<b>RBD</b>	Rigid Body Docking
<b>RELION</b>	Regularised Likelihood optimisation
<b>RIO1(kd)</b>	RIO1 Kinase Dead
<b>RNP</b>	Particule RibonucléoProtéique
<b>RP</b>	Protéines ribosomiques
<b>RPL</b>	« Ribosomal Protein of Large Subunit »
<b>RPS</b>	« Ribosomal Protein of Small Subunit »
<b>S</b>	Svedberg
<b>SnoRNP</b>	Small Nucleolar RNP
<b>SNR</b>	Signal to Noise Ratio
<b>TF</b>	Transformé de Fourier

# Annexe



**I. Projet annexe :**

**A. Article : The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles**

10824–10836 *Nucleic Acids Research*, 2017, Vol. 45, No. 18  
doi: 10.1093/nar/gkx734

Published online 25 August 2017

## **The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles**

**Kamila Belhabich-Baumas<sup>1</sup>, Clément Joret<sup>1,†</sup>, Beáta E. Jády<sup>1,†</sup>, Célia Plisson-Chastang<sup>1</sup>, Ramtin Shayan<sup>1</sup>, Christophe Klopp<sup>2</sup>, Anthony K. Henras<sup>1,\*</sup>, Yves Henry<sup>1,\*</sup> and Annie Mougín<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France and <sup>2</sup>Unité de Mathématiques et Informatique Appliquées, INRA, 31320 Castanet Tolosan, France

Received May 02, 2017; Revised August 08, 2017; Editorial Decision August 10, 2017; Accepted August 17, 2017

# The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles

Kamila Belhabich-Baumas<sup>1</sup>, Clément Joret<sup>1,†</sup>, Beáta E. Jády<sup>1,‡</sup>, Célia Plisson-Chastang<sup>1</sup>, Ramtin Shayan<sup>1</sup>, Christophe Klopp<sup>2</sup>, Anthony K. Henras<sup>1,\*</sup>, Yves Henry<sup>1,\*</sup> and Annie Mougín<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France and <sup>2</sup>Unité de Mathématiques et Informatique Appliquées, INRA, 31320 Castanet Tolosan, France

Received May 02, 2017; Revised August 08, 2017; Editorial Decision August 10, 2017; Accepted August 17, 2017

## ABSTRACT

**Cytoplasmic maturation of precursors to the small ribosomal subunit in yeast requires the intervention of a dozen assembly factors (AFs), the precise roles of which remain elusive. One of these is Rio1p that seems to intervene at a late step of pre-40S particle maturation. We have investigated the role played by Rio1p in the dynamic association and dissociation of AFs with and from pre-40S particles. Our results indicate that Rio1p depletion leads to the stalling of at least 4 AFs (Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p) in 80S-like particles. We conclude that Rio1p is important for the timely release of these factors from 80S-like particles. In addition, we present immunoprecipitation and electron microscopy evidence suggesting that when Rio1p is depleted, a subset of Nob1p-containing pre-40S particles associate with translating polysomes. Using Nob1p as bait, we purified pre-40S particles from cells lacking Rio1p and performed ribosome profiling experiments which suggest that immature 40S subunits can carry out translation elongation. We conclude that lack of Rio1p allows premature entry of pre-40S particles in the translation process and that the presence of Nob1p and of the 18S rRNA 3' extension in the 20S pre-rRNA is not incompatible with translation elongation.**

## INTRODUCTION

Production of the small ribosomal subunit in yeast starts in the nucleolus with the formation on the nascent RNA pol I transcript of a ribonucleoprotein particle termed the

small subunit processome (SSU processome) (1) that can be visualized on chromatin spreads as terminal balls (2) (for reviews, see (3,4)). The SSU processome contains small subunit ribosomal proteins, small nucleolar ribonucleoprotein particles (snoRNPs) and scores of proteins not present in the mature ribosomal subunits, diversely called non ribosomal proteins or maturation/assembly factors (AFs) (5–7). SnoRNPs and AFs assemble in a stepwise fashion as transcription of the nascent pre-rRNA proceeds (8–10). The first pre-40S pre-ribosomal particles are released in the nucleus by Utp24p-catalyzed endonucleolytic cleavage (11) of the RNA pol I transcript at site A2 within the internal transcribed spacer 1 that separates the sequences of the 18S and 5.8S rRNAs. These early nuclear pre-40S particles contain the 20S pre-rRNA and a subset of AFs already present in the SSU processome, including Enp1p, the endonuclease Nob1p and its partner Pno1p/Dim2p, the methyltransferase Dim1p, the GTPase-like Tsr1p and the kinase Hrr25p. Prior to their export to the cytoplasm, nuclear pre-40S particles acquire, in addition to the previously mentioned AFs, Ltv1p and the ATPase/kinase Rio2p. Once in the cytoplasm, pre-40S particles undergo final maturation steps leading to the production of the mature small ribosomal subunits. These maturation steps include RNA restructuring events coupled with the stepwise dissociation of most AFs and the proper positioning of several ribosomal proteins (12). Prior to cleavage of the 20S pre-rRNA by Nob1p at the D site to yield mature 18S rRNA (13), late cytoplasmic pre-40S particles undergo a quality control step involving transient interaction with a mature 60S ribosomal subunit (14,15) in the absence of mRNA. This interaction is promoted by Fun12p/eIF5B and the resulting so-called 80S-like particles are then disrupted by the intervention of Rli1p (15).

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 561 335 953; Fax: +33 561 335 886; Email: henry@ibcg.biotoul.fr  
Correspondence may also be addressed to Annie Mougín. Tel: +33 561 335 953; Fax: +33 561 335 886; Email: ani.moug@hotmail.fr  
Correspondence may also be addressed to Anthony Henras. Tel: +33 561 335 955; Fax: +33 561 335 886; Email: henras@ibcg.biotoul.fr  
†These authors contributed equally to this work as second authors.

© The Author(s) 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

The timing of intervention and dissociation of AFs and their precise molecular roles remain uncertain and the subject of intense research. The first AF to dissociate following export to the cytoplasm may be Ltv1p. Ltv1p is phosphorylated by the Hrr25p kinase in yeast (16–18) or the casein kinase I isoforms  $\zeta$  and  $\delta$  in humans (19). Ltv1p phosphorylation by Hrr25p promotes its dissociation from pre-40S particles prior to 80S-like particle formation (17). In addition, correct Ltv1p release seems to require Tsr1p, since Ltv1p shifts to 80S-containing fractions when extracted from Tsr1p-depleted cells (20). Ltv1p forms a complex with Enp1p and ribosomal protein Rps3 (21), both of which are also phosphorylated, probably by Hrr25p (16,21) or CK1  $\zeta$  and  $\delta$  in the case of human ENP1 (19), although this remains disputed (17). Whether Enp1p is released together with Ltv1p is debated, some authors proposing that Enp1p remains present until 80S-like particle formation (15,17). Rio2p release could occur following that of Ltv1p. Rio2p may function as an ATPase rather than a kinase and while its catalytic activity is not required for its association with pre-40S particles, it promotes Rio2p dissociation (16). Tsr1p release then occurs following 80S-like ribosome formation and requires the intervention of the adenylate kinase/ATPase Fap7p (15). The last AFs to remain in 80S-like particles are likely Rio1p, Pno1p/Dim2p and Nob1p (22). D site cleavage requires nucleotide binding by Rio1p which may induce removal of Dim2p from the D site to allow access of the Nob1p endonuclease (7,22).

Several roles have been attributed to AFs during cytoplasmic maturation of pre-40S particles. High-throughput probing of pre-rRNA structure suggests that AFs in early and intermediate cytoplasmic pre-40S particles maintain a flexible pre-rRNA structure, in particular in the 3' end domain, and delay access of some ribosomal proteins to their final binding site (12). Some AFs seem to participate in the control of the stepwise incorporation of a subset of ribosomal proteins by direct protein-protein interactions, as in the case of Fap7p and Rps14 (23,24) or Ltv1p and Rps3 (17,18). The CRAC analyses of the binding sites of AFs (25) and the resolution of the cryo-EM structures of early cytoplasmic yeast pre-40S particles purified via Ltv1p or Rio2p as bait (20) show that Rio2p, Tsr1p and Dim1p binding sites overlap those of translation initiation factors eIF1 and eIF1A on the mature 40S subunits. Nob1p and Pno1p/Dim2p are positioned over the binding site of translation initiation factor eIF3 and the binding of Enp1p and Ltv1p is incompatible with mRNA channel opening. Likewise, TSR1 in early cytoplasmic human pre-40S particles is expected to block binding of translation initiation factors eIF1A, DHX29 and eIF5b, while RIO2 likely inhibits tRNA loading (26). Thus, early cytoplasmic pre-40S particles are prevented from engaging in translation by all the AFs they contain.

Strikingly, Lacombe and colleagues showed that removal of the ubiquitin-coding sequence from the *UBI3* gene encoding the Ubi3-Rps31 fusion protein (*ubi3 $\Delta$ ub* mutant) led to the appearance of 20S pre-rRNA in all polysome fractions of sucrose gradients (27). Moreover, the sedimentation of 20S pre-rRNA in heavy gradient fractions was lost under polysome run-off conditions. This led the authors to the conclusion that in the *ubi3 $\Delta$ ub* mutant, aberrant pre-

40S particles could engage in translation initiation and possibly elongation (27). Likewise, sedimentation of 20S pre-rRNA in polysome fractions was detected when using extracts from certain mutant strains impaired in 20S pre-rRNA processing, including a strain depleted for the assembly factors Ltv1p and Pfa1p (13) or the *rpl3[W255C]* strain expressing a mutant Rpl3 ribosomal protein (28). Moreover, we showed that a small proportion of 20S pre-rRNA sediments on sucrose gradients in fractions containing 80S ribosomes or polysomes in wild-type yeast cells and that it almost entirely shifts to these fractions when Rio1p or the Nob1p endonuclease is depleted (29). We also detected an association between 20S pre-rRNA and the poly-A binding protein or several translation initiation factors and reported that several abundant mRNAs can be precipitated together with Nob1p. Collectively, these data lead us to propose that a minority of late pre-40S particles can engage in translation in wild-type cells and that this phenomenon is exacerbated in certain mutant conditions that impair pre-40S particle maturation. It remained unclear whether these particles could engage in productive translation elongation, although Garcia-Gomez *et al.* argue that pre-40S particles that accumulate in *rpl3[W255C]* cells can support translation elongation since 20S/18S and 20S/25S ratios are similar for light and heavy polysome fractions (28).

In the present work, we set out to characterize further the pre-40S particle maturation defects caused by Rio1p depletion. We show that Rio1p depletion affects the correct release of AFs Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p and we provide strong evidence that a subset of Nob1p-containing pre-40S particles carry out productive translation elongation under these conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strains and plasmids

A *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ Saccharomyces cerevisiae* strain was constructed as follows. A plasmid encoding the FPZ-tag (Flag–PreScission protease cleavage site—Z sequence derived from *S. aureus* Protein A) was constructed by hybridizing two kinased complementary primers (Primers 2XFlag FW / 2XFlag Rev, see Table 1) to create two tandem repeats of the Flag DNA sequence flanked at the 5' end by the overhang of a cut NcoI restriction site and at the 3' end by the overhang of a cut NheI restriction site, allowing their insertion into the dephosphorylated pBS1539 plasmid (30) at NcoI/NheI restriction sites, leading to the substitution of the CBP sequence by the 2 x Flag sequence. The new plasmid was called pBS1539Flag. The PreScission protease cleavage site was then constructed by hybridizing two complementary primers (Primers PPX\_FW / PPX\_REV, see Table 1) to create the PreScission protease cleavage site DNA sequence flanked at the 5' side by the overhang of a cut NheI restriction site. This fragment was then inserted into pBS1539Flag cut at the NheI/Ecl136II restriction sites, to substitute the sequence encoding the TEV cleavage site by the PreScission protease cleavage site. The plasmid obtained was named pBS1539-FPZ.

A derivative of TAP-tag encoding plasmid pBS1479 (30) containing the nourseothricin resistance gene *NAT* instead

**Table 1.** Oligonucleotides used

2XFlag FW	5 CATGGACTACAAGGACGACGATGACAAAGGTACCGATTACAAAGATGATGACGACAAA G3
2XFlag Rev	5 CTAGCTTTGTCGTCATCATCTTTGTAATCGGTACCTTTGTCATCGTCGTCCTTG TAGTC3
PPX.FW	5 CTAGCCTGGAAGTTCTGTTCAGGGGCCGAG3
PPX.REV	5 CTCGGGCCCTGGAACAGAACTTCCAGG3
Nob1 MFM Tag-Nat-Fd	5 ACGTCCGCATTGGTAAGGGAAAGGTACGTCAACAGTTCCAAAAGGAGAAAGTTCCATGGA CTACAAGGACGAC3
Nob1 MFM Tag-Nat-Rev	5 TCTTCAAAGTGCTGTAACACCATTTCATCTCATAAGGGGAGGGCATACTGAGCAATTAC GACTCACTATAGG3
Nob1-1081 FD	5 AACAGATATTCTGTAGCCAG3
tRNAiMet probe	5 TCGGTTTCGATCCGAGGACATCAGGGTTATGA3'

of the *TRP1* gene was produced by inserting a NotI/EcoRV fragment containing the *NAT* gene extracted from plasmid pAG25 (Euroscarf) into pBS1479 cut at EcoRV/Bsp120I sites, creating pBS1479-NAT. In order to replace the TAP-tag sequence of pBS1479-NAT by the FPZ-tag sequence, the PciI/EcoRV fragment of pBS1539-FPZ containing the FPZ sequence was inserted into pBS1479-NAT digested by the same enzymes, creating plasmid pBS1479-FPZ-NAT.

Finally, a *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* strain was constructed by the substitution of the TAP tag sequence by the FPZ tag sequence in the *TetO7-RIO1, NOB1-TAP* strain (29). To this end, a fragment containing the FPZ tag sequence and the *NAT* gene was PCR amplified using oligonucleotides Nob1 MFM Tag-Nat-Fd and Nob1 MFM Tag-Nat-Rev (see Table 1) and plasmid pBS1479-FPZ-NAT as template and transformed into the *TetO7-RIO1, NOB1-TAP* strain. Transformants were selected for resistance to 80  $\mu$ g/ml nourseothricin and screened by PCR (oligonucleotides Nob1-1081 FD and Nob1 MFM Tag-Nat-Rev, see Table 1) and western blot.

*Saccharomyces cerevisiae* strains were grown in YP medium (1% yeast extract, 1% peptone) supplemented with 2% glucose as the carbon source (YPD). When required, doxycycline was added at 200  $\mu$ g/ml final concentration.

#### Sucrose gradient fractionation of cells extracts

Yeast cells grown in 400 ml YPD medium to an optical density (O.D.) of 0.6–0.9 (600 nm) and treated with 100  $\mu$ g/ml cycloheximide (CH) for 10 min were harvested by centrifugation and washed in 4 ml ice-cold H<sub>2</sub>O (MilliQ) containing 100  $\mu$ g/ml CH. After centrifugation, the pellet was washed in 2 ml buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal) containing 100  $\mu$ g/ml CH. The cell pellet was resuspended in an equivalent volume of buffer A containing the same concentration of CH plus 0.1 unit/1 RNasin (Promega), protease inhibitors (Complete EDTA free, Roche) and 1 mM DTT. Whole cell extracts (WCE) were prepared by breaking the cells by vortexing with glass beads (425–600  $\mu$ m, Sigma). Lysates were cleared briefly at 9300  $\times$  g for 5 min followed by a 10 min 9300  $\times$  g centrifugation (Eppendorf 5415D) to obtain the final WCEs. WCEs weighing 1 mg of proteins were layered on a 10–50% sucrose gradient prepared in buffer K (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and centrifuged for 2 h 40 min at 36 000 rpm in a Beckman SW41 rotor. Positions of 40S, 60S ribosomal subunits, 80S ribosomes and polysomes in the gradient were determined by A<sub>254</sub> scanning with the ISCO UA-6 gradient fraction collector. Fractions

of 500  $\mu$ l were collected. 100  $\mu$ l of each fraction were precipitated with 400  $\mu$ l of 25% trichloroacetic acid (TCA) in the presence of 0.6  $\mu$ l of glycogen (20  $\mu$ g/  $\mu$ l). After 20 min on ice, samples were centrifuged 15 min at 4°C and 16 000  $\times$  g in a microcentrifuge (Eppendorf 5415D). The supernatants were removed and the pellets were washed once with 1 ml acetone and centrifuged 5 min at 4°C. Pellets were dried and resuspended in 30  $\mu$ l of loading buffer (19.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 7.5  $\mu$ l NuPAGE LDS sample buffer 4 $\times$ , 3  $\mu$ l NuPAGE sample reducing agent 10 $\times$ , Life Technology). Samples were heated at 72°C for 10 min before proceeding to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

#### Western analysis

Proteins obtained from gradient fractions after TCA precipitation were subjected to PAGE in 4–20% or 8% pre-cast NuPAGE Bis Tris gels (Life technology) and transferred to nitrocellulose membranes (ThermoFisher Scientific, iBlot Gel Transfer Stacks). Nob1p-FPZ protein was detected either by using monoclonal anti-FLAG® M2-Peroxidase (HRP) antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich) and diluted 5000-fold, or anti-Nob1p serum diluted 1000-fold. Ltv1p, Tsr1p, Dim1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p were detected by use of sera diluted 1000-fold. Rio2p and Enp1p were detected by use of anti-Rio2p and anti-Enp1p sera diluted 5000- and 20 000-fold, respectively. The anti-Ltv1p, anti-Tsr1p, anti-Dim1p, anti-Pno1p/Dim2p and anti-Rio2p antibodies were raised in rabbits and a kind gift of Katrin Karbstein (15). The anti-Nob1p, anti-Enp1p and anti-Fap7p antibodies were raised in rabbits against purified proteins by Eurogentec (Speedy program). The primary antibodies were detected using anti-rabbit IgG-HRP conjugate (Promega) diluted 10 000-fold.

#### Total RNA extractions and Northern hybridizations

RNA extractions from sucrose gradient fractions were performed using the phenol-chloroform method. 200  $\mu$ l of 4 M guanidinium isothiocyanate solution, 2  $\mu$ l glycogen (Roche, 20 mg/ml), 150  $\mu$ l of a 100 mM NaAc (pH 5), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA solution, 225  $\mu$ l water-saturated phenol, 225  $\mu$ l chloroform were added to 150  $\mu$ l of each gradient fraction, vortexed 30 s, incubated at 65°C during 5 min and placed on ice 5 min. After 5 min centrifugation at 14 000 rpm, 4°C, 400  $\mu$ l of aqueous phase were recovered and precipitated with 1 ml absolute ethanol overnight at –20°C. After 45 min centrifugation at 14 000

rpm, 4°C, the pellet was washed with 1 ml 70% ethanol. After 5 min centrifugation at 14 000 rpm, 4°C, the supernatant was removed and the pellet was dried at room temperature during 5–10 min and then dissolved in 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Electrophoresis of glyoxal-treated RNAs through agarose gels was performed as reported (29). Northern analyses of pre-rRNAs, mature rRNAs and tRNA<sup>iMet</sup> were carried out by use of <sup>32</sup>P-labelled oligodeoxynucleotide probes. Sequences of antisense oligonucleotides used to detect pre- and mature rRNAs have been reported earlier (31,32). The sequence of the probe used to detect tRNA<sup>iMet</sup> is indicated in Table 1. Blots were hybridized with 5' end-labelled oligonucleotide probes using Rapid-Hyb Buffer (GE Healthcare).

#### Tandem-affinity purification of Nob1p-containing pre-40S particles

Particles containing Nob1p-FPZ expressed in *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* strain grown without or with 200  $\mu$ g/ml doxycycline (Dox) during 6 and 16 h, respectively, were affinity purified from 70 g (without Dox) or 30 g (with Dox) of cells grown to mid log phase. Cells were quickly cooled on ice and harvested by centrifugation after a 10 min treatment with CH (100  $\mu$ g/ml). Cell pellets rinsed with one cell volume of lysis buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal, 100  $\mu$ g/ml CH) were directly frozen as noodles in liquid nitrogen and were crushed in liquid nitrogen for nine cycles, each of 3 min/1 min reverse rotation at 15 Hz, on a Retsch PM100 planetary ball mill. Sample chamber and grinding stainless steel balls were pre-chilled in liquid nitrogen and re-chilled between each pulverization cycle. Broken cell powder was stored at -80°C or immediately thawed in 10 ml (per 10 g of powder) buffer A plus 100 units/ml RNasin (Promega), protease inhibitors (Complete EDTA free, Roche) and 1 mM DTT. Cell debris were removed by spinning at 4°C, 25 000  $\times$  g for 25 min. The supernatant was recovered and pH adjusted to 7.5. Aliquots of this extract were flash-frozen in liquid nitrogen. Small amounts (50  $\mu$ l) of each extract were phenol-chloroform extracted for RNA analysis or precipitated with TCA for further protein analysis as described below. Typical yields were 20–120 ml of extract with an estimated protein concentration at 15–20 mg/ml. 20 ml extract aliquots were incubated with 600  $\mu$ l of IgG sepharose beads (GE Healthcare) in buffer A (plus RNasin, protease inhibitors and DTT) under agitation for 1 h 15 min at 4°C. Beads were washed three times in 20 ml cold buffer B (20 mM Hepes pH 7.4, 100 mM KoAc, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.02% Tween 20, 0.1% Triton), resuspended in 800  $\mu$ l of buffer B containing 50  $\mu$ l PreScission protease (100 units, Sigma) plus 100 units/ml RNasin. Protease digestion was carried out under agitation during 2 h at 4°C. The bead eluate was recovered and pooled with three bead washing (200  $\mu$ l of buffer B each). Pooled eluate was carefully added to the surface of an anti-Flag M2 affinity gel (500  $\mu$ l, Sigma) packed in buffer B in a 2 ml column. Flow-through was recovered and beads washed four times with 1 ml cold buffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT). Elution of the particles was obtained by adding five times 300  $\mu$ l FLAG elution buffer

(buffer C containing 2 $\times$  Flag peptide (IGBMC synthesis) at 200  $\mu$ g/ml). At each step of the purification, small amounts (50  $\mu$ l) of each sample was phenol-chloroform extracted for RNA analysis or precipitated with TCA for further protein analysis.

#### Electron microscopy

3.5  $\mu$ l of purified particles were deposited onto glow-discharged, 300 Mesh Copper carbon-coated grids (Quantifoil, Germany). After a 1 min incubation at room temperature, excess liquid was blotted and the grids were stained with two successive drops of 1% uranyl acetate (3.5  $\mu$ l each). The first drop was immediately blotted, the second was left for ~20 s on the grids before blotting. Finally, the grids were air-dried before observation on a Jeol 2100 microscope of the METI platform (Centre de Biologie Intégrative, Toulouse, France), equipped with a LaB<sub>6</sub> cathode and operating at 200 kV. Images were recorded with defocus ranging from 0.6 to 2.0  $\mu$ m, on a Gatan US1000 CCD digital camera and DigitalMicrograph (Gatan, Inc.), at various magnifications corresponding to calibrated pixel sizes of 3.4, 1.7 and 1.1 Å.

#### Ribosome protected fragments (RPF) purification

Total RPFs from strain *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* expressing or depleted of Rio1p were obtained as follows. Six liters cultures of this strain were grown to an O.D. 600 of 0.8 in YPD medium without or with 200  $\mu$ g/ml doxycycline during 8 or 20 h, respectively. CH was added to a final concentration of 100  $\mu$ g/ml and culturing was continued for 10 min. Cells were collected by centrifugation at 6000 rpm, 10 min at 4°C and rapidly frozen as 'spaghettis' in liquid nitrogen. Cells were crushed in liquid nitrogen for nine cycles, each of 3 min/1 min reverse rotation at 15 Hz, on a Retsch PM100 planetary ball mill. Total cellular extracts were then prepared as described in the 'sucrose gradient fractionation of cells extracts' paragraph above. RPFs were obtained by incubation of a volume of extract corresponding to 500–1000  $\mu$ g of total proteins with 750 units of RNase I (Ambion) during 1 h, 20°C. Digestion was stopped by addition of 100 units of SUPERase<sup>•</sup>In RNase inhibitor (Ambion). Monosomes thus obtained were centrifuged in a 4.5–45% sucrose gradient for 2.5 h at 39 000 rpm in a Beckman SW41 rotor. RNAs present in the 80S gradient fractions were then extracted using hot phenol as described in the 'total RNA extractions' paragraph above. 15–20  $\mu$ g of RNAs obtained were treated with the 'RiboZero Magnetic Gold' solution and beads (Illumina) following the manufacturer's protocol to remove rRNA fragments. The remaining RNA fragments were then ethanol precipitated, RNA pellets were washed, dried and dissolved in 10  $\mu$ l 110 mM Tris-HCl pH 7.4. RNAs were denatured by incubation at 80°C for 90 s and cooled for 2 min at 37°C. 33  $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l 10 $\times$  T4 polynucleotide kinase (PNK, Thermo Scientific) buffer, 1  $\mu$ l SUPERase<sup>•</sup>In RNase inhibitor and 1  $\mu$ l (10 units) PNK were then added. The resulting solution was incubated 30 min at 37°C. 4  $\mu$ l of 10 mM ATP were then added and the 37°C incubation was continued for an additional 30 min. The reaction was stopped by a



5 min incubation step at 70°C and the 3 dephosphorylated, 5 phosphorylated RNA fragments were precipitated at –20°C overnight after addition of 2 µl glycogen (Roche, 20 mg/ml), 5 µl of a 100 mM NaAc (pH 5), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA solution and 500 µl ethanol. The RNA pellets were washed with 70% ethanol, dried and dissolved in 5 µl RNase-free H<sub>2</sub>O. RNA fragments were submitted to PAGE in a 15% acrylamide/8M urea denaturing gel. A gel slice containing RNA fragments of 28–32 nucleotides was cut out and RNA fragments present in the slice were eluted using the ‘crushed acryl’ solution from the ‘ARTseq Ribosome Profiling (yeast)’ kit (Illumina) following the manufacturer’s recommendations. RNAs were extracted with phenol/chloroform and precipitated with ethanol as described in (33). 60 ng of purified total RPFs from Rio1p-expressing or Rio1p-depleted cells were used for deep-sequencing library construction (called ‘+ Rio1’ and ‘– Rio1’, respectively) by the IMAGIF platform using the TruSeq Small RNA kit (Illumina). Banks were sequenced on a HiSeq (SNL176) line in 51 cycles 51 bases single read, producing ~240 million sequences per bank.

RPFs due to Nob1p-containing pre-40S particles were purified and identified as follows. Two 12 L YPD/200 µg/ml doxycycline cultures of *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* cells were grown during 20 h to an O.D. 600 of 0.8. Samples derived from these two cultures were processed in parallel throughout. Cells were harvested and total cellular extracts were prepared as described in the ‘tandem-affinity purification’ paragraph above. The extracts were treated with RNase I as described for total RPFs above. Affinity purification on IgG-sepharose beads followed by a PreScission protease digestion step were then carried out as described in the ‘tandem-affinity purification’ paragraph above. Purified RNA fragments were then extracted using the hot phenol procedure. The rest of the procedure is identical to that described for total RPFs above.

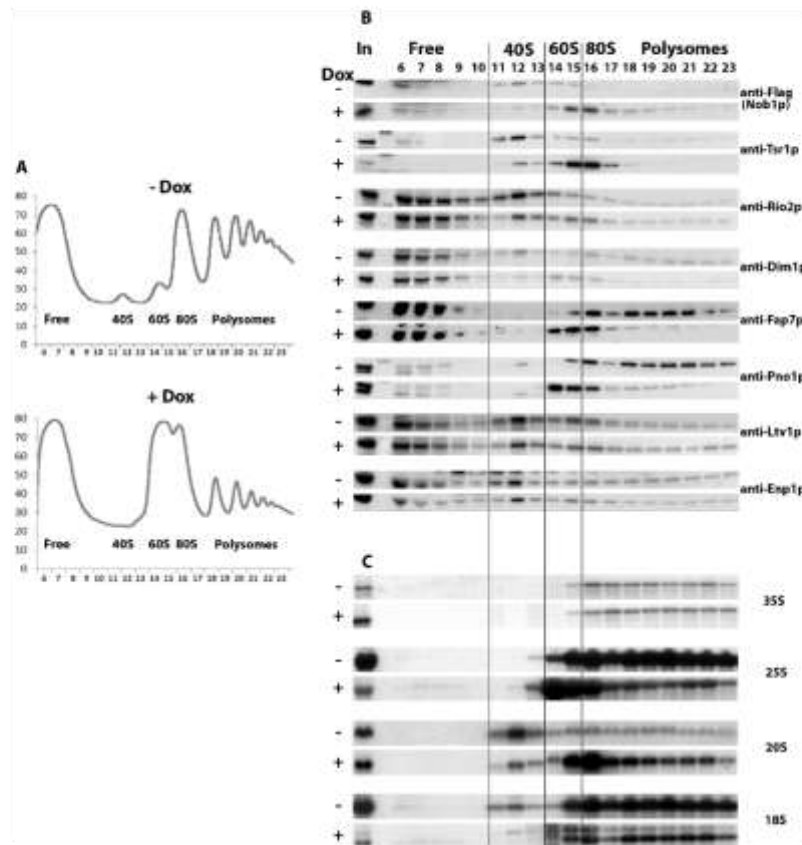
#### Analysis of deep sequencing data

Reads from Next-Generation Sequencing (NGS) were trimmed by Trim Galore! (Galaxy v0.4.2) in order to remove Illumina small RNA adapters and were aligned to the *S. cerevisiae* sacCer3 reference genome by Hisat (Galaxy v2.0.3,  $k = 5$ ). The aligned reads were filtered for MapQ  $\geq 30$  by BamFilter (Galaxy v0.0.2) and sorted with Samtools (Galaxy v2.0). The genomic regions corresponding to the aligned reads were intersected with the regions of known yeast mRNA coding sequences (Bedtools v2.25.0; CDS intervals, positions of stop and start codons of SGD genes were downloaded from UCSC Genome Browser as a gtf file). For each aligned read corresponding to an mRNA CDS, the middle position of the corresponding genomic interval was calculated using R (RStudio v0.99.896 with R v3.3.2). The distance between the middle positions and either the translation start site or the position of the stop codon of the corresponding mRNA was calculated. The distribution of obtained distances from the translation start site or the stop codon were visualized on a density plot using ggplot2 (v2.2.0). Code for distance calculation and plots is published on <https://github.com/jadybea/Rio1p>.

## RESULTS

### A subset of pre-40S AFs accumulate in gradient fractions containing 80S ribosomes when Rio1p is depleted

To investigate the effects of Rio1p depletion on the dynamics of association and dissociation of AFs with and from pre-40S particles, we fractionated extracts from *TetO7-RIO1* cells grown in the absence (Rio1p expressed) or presence of doxycycline (Rio1p depleted) on sucrose gradients and assessed the sedimentation pattern of AFs by western blot using specific antibodies. Cycloheximide was added shortly before cell harvest and during extract preparation to stabilize the polysome complexes. Depletion of Rio1p leads to a striking decrease and increase in the 40S and 60S peaks, respectively and a strong reduction of polysomes (Figure 1A). Whereas Nob1p and Tsr1p sediment predominantly in the 40S fractions when Rio1p is present, they accumulate in 80S fractions when Rio1p is depleted (Figure 1B). A similar phenomenon is observed for Rio2p, although to a far lesser extent. Dim1p from non depleted extracts displays a complex sedimentation pattern, being present in light fractions, 40S, 60S, 80S and polysome fractions. The presence of Dim1p in the latter fractions may reflect its early incorporation in 90S pre-ribosomal particles. Depletion of Rio1p does not dramatically alter Dim1p sedimentation pattern, although the proportion of the protein in the 60S fractions increases while that in the 40S fractions decreases. Fap7p and Pno1p/Dim2p sediment in 80S and polysome fractions when extracted from Rio1p-expressing cells and become concentrated in 60S fractions and 80S fractions, when extracted from Rio1p-depleted cells. In contrast, the sedimentation pattern of Ltv1p and Enp1p is little affected by Rio1p depletion, suggesting that Rio1p is not essential for their association with and dissociation from pre-40S particles. Northern analysis shows that 20S pre-rRNA, the RNA component of pre-40S particles strongly increases in the 80S and polysome fractions when Rio1p is absent (Figure 1C). These results suggest that depletion of Rio1p leads to the stalling of a subset of AFs in pre-40S particles that co-sediment with 80S ribosomes and likely correspond to the previously described 80S-like particles (14,15). These particles contain at least Nob1p, Tsr1p, Dim1p, Pno1p/Dim2p, Rio2p and Fap7p. Such retention is most evident for Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p. Surprisingly, we also noted that Nob1p, Tsr1p, Fap7p and Pno1p accumulate in 60S fractions upon Rio1p depletion. This may reflect the presence of 80S-like particles in the 60S fractions due to insufficient separation of the 60S and 80S peaks. To determine whether this is the case, we repeated the fractionation experiment using slightly altered conditions to improve resolution (lower amounts of total extracts and higher centrifugation speed). This led to an improved resolution of the 60S and 80S peaks in the Rio1p-depleted conditions (Supplementary Figure S1A). Strikingly, in these conditions, the 20S pre-rRNA is present in the 60S fractions (12 and 13), as well as the AFs tested (Nob1p, Tsr1p and Fap7p), while little 18S rRNA is found in these fractions, showing that they contain few 80S ribosomes, if at all (Supplementary Figure S1B and C). These results lend support to the notion that Rio1p depletion leads to the accumula-



**Figure 1.** Sucrose gradient fractionation of total extracts from a *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* strain grown in YPD or in YPD plus doxycycline for 16 h to repress *RIO1* expression. (A) Recording of A254 nm profiles. Top: Rio1p-expressing cells (-Dox); bottom: Rio1p-depleted cells (+Dox). The peaks of free proteins, free 40S and 60S subunits, 80S ribosomes and polysomes are indicated as well as fraction numbers. (B) Sedimentation profile of pre-40S particle AFs analyzed by western blot. Proteins were purified from the indicated fractions (top) of gradients loaded with extracts from Rio1p-expressing cells (-Dox) or Rio1p-depleted cells (+Dox). The antibodies used for the detection of specific factors are indicated. The anti-FLAG antibody allows the detection of tagged Nob1p. (C) Sedimentation profile of (pre)-rRNAs analyzed by northern. Same as in (B) except that RNAs were extracted from gradient fractions, separated by agarose gel electrophoresis in denaturing conditions, transferred to a nylon membrane and detected using various specific oligonucleotide probes.

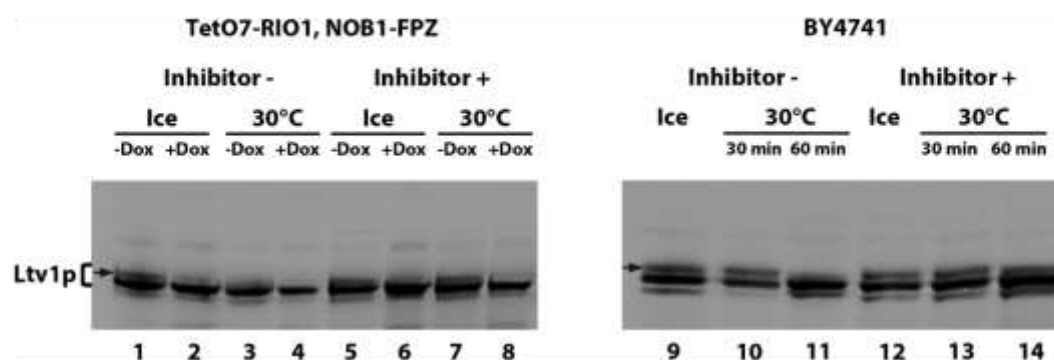
tion of not only 80S-like particles but also to pre-40S particles that co-sediment with 60S particles, although we cannot totally rule out the possibility that the presence of 20S pre-rRNA in 60S fractions results from a spill over of the 40S and 80S fractions.

Rio1p depletion leads to a significant increase of 20S pre-rRNA in polysome-containing fractions. Strikingly, none of the tested AFs show a clear increase in polysome fractions following Rio1p depletion, with the exception of Nob1p, suggesting that such depletion leads to the formation of a third type of pre-40S particles that can engage in translation and contain few AFs.

#### Ltv1p is underphosphorylated in Rio1p-depleted cells

Ltv1p extracted from Rio1p-expressing cells, but not Rio1p-depleted cells, appears as a doublet in the 40S, 80S and polysome-containing gradient fractions (Figure 1B). As Ltv1p has been described as a phosphorylated protein,

we reasoned that the upper band of the doublet may correspond to a (pluri)-phosphorylated form of Ltv1p, that is not formed when Rio1p is absent. To confirm this hypothesis, we treated Rio1p-expressing cell extracts with phosphatase and tested by western blot whether the upper Ltv1p band could still be detected. However, the incubation of the extract at 30°C led to the disappearance of the upper band, whether the phosphatase was added or not, probably due to the action of endogenous phosphatases present in the extract (data not shown). We thus decided to use phosphatase inhibitors to counteract the action of such endogenous phosphatases. Extracts from *TetO7-RIO1* cells grown with or without doxycycline were incubated at 30°C in the presence or absence of phosphatase inhibitors. As seen previously, the 30°C incubation step without inhibitor led to the disappearance of the upper Ltv1p band (Figure 2, lane 3). Strikingly, the addition of phosphate inhibitors prevented the disappearance of the upper Ltv1p band (Figure 2, lane 7), strongly suggesting that it corre-



**Figure 2.** Rio1p-dependent formation of phosphorylated form(s) of Ltv1p. Total protein extracts from *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* strain grown with or without doxycycline as indicated (lanes 1–8) or BY4741 (lanes 9–14) were incubated at 30°C for 30 min (lanes 3, 4, 7, 8, 10 and 13) or 1 h (lanes 11 and 14) or stored on ice as control (lanes 1, 2, 5, 6, 9 and 12), in the presence (lanes 5–8, 12–14) or absence (lanes 1–4, 9–11) of phosphatase inhibitors (50 mM  $\alpha$ -glycerophosphate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate). The extracts were analyzed by western blot using anti-Ltv1p antibodies. The putative phosphorylated form(s) of Ltv1p are indicated by an arrow.

sponds to (a) phosphorylated form(s) of Ltv1p. Since the strain used for these experiments (*TetO7-RIO1*) might over-express Rio1p when grown without doxycycline, leading to abnormal levels and/or forms of phosphorylated Ltv1p, we tested whether equivalent levels of differentially migrating forms of Ltv1p could also be detected in a standard laboratory strain (BY4741). Faster and slower migrating forms of Ltv1p could also be detected using a total BY4741 extract (Figure 2, lane 9), of similar relative intensities to those observed in the case of the *TetO7-RIO1* strain. Again, the disappearance of the upper band after incubation at 30°C was prevented by addition of phosphatase inhibitors (Figure 2, lane 14). Collectively, these results strongly suggest that Rio1p is involved in the production of at least some phosphorylated form(s) of Ltv1p.

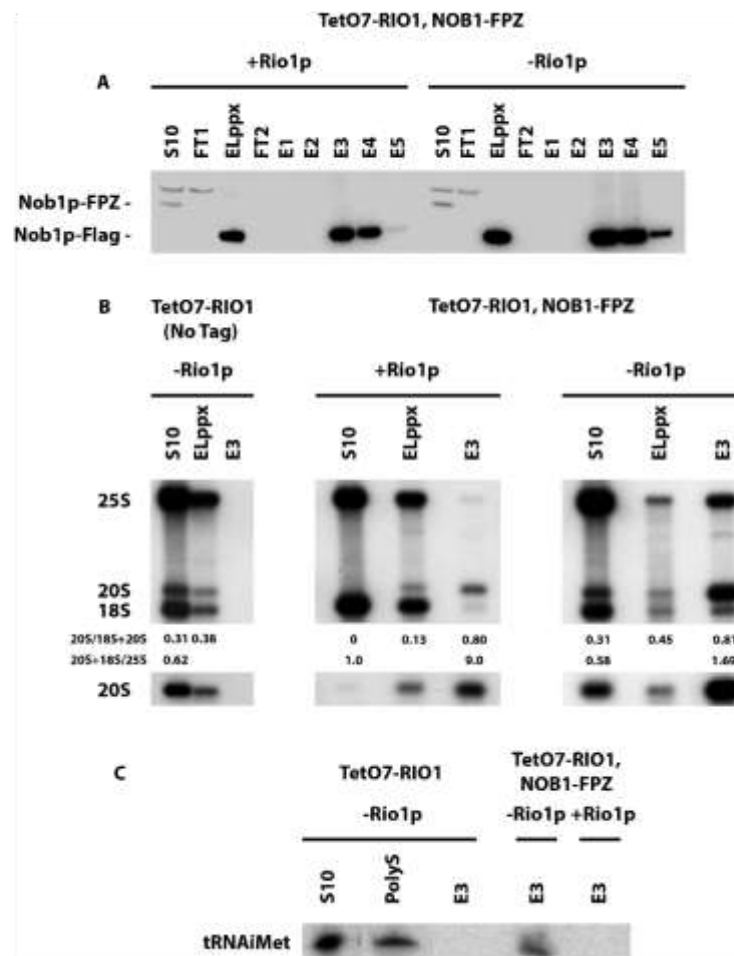
#### A subset of Nob1p-containing pre-40S particles are incorporated into polysomes when Rio1p is depleted

To further characterize the nature of pre-40S particles containing Nob1p that accumulate in Rio1p-depleted cells, we purified these particles by tandem affinity purification via Nob1p fused to the FPZ tag (Flag-PreScission cleavage site-ZZ) from cells containing or lacking Rio1p, under conditions of polysome stabilization (cycloheximide addition). Western blot analysis shows an equivalent recovery of Nob1p at the end of the purification procedure from extracts containing or lacking Rio1p (Figure 3A). 20S pre-rRNA is strongly enriched under both conditions (Figure 3B). Strikingly, 25S rRNA is recovered with Nob1p to a far greater extent from cells lacking Rio1p (Figure 3B). This is compatible with Nob1p being present in the previously described 80S-like particles (14,15), as well as in pre-40S particle-containing ribosomes formed on mRNAs undergoing translation. To investigate the second possibility, the presence of initiator tRNA (tRNA<sup>iMet</sup>) in the purified samples was tested by northern blot, since tRNA<sup>iMet</sup> is not present in the 80S-like particles in which pre-40S particles undergo quality control. Indeed, initiator tRNA was detected in the purified sample obtained from Rio1p-depleted cells, but not from cells expressing the protein (Fig-

ure 3C). To obtain more direct evidence for the presence of Nob1p-containing pre-40S particles in polysomes when Rio1p is depleted, the Nob1p-FPZ tandem affinity purification samples were imaged following negative staining by transmission electron microscopy. Images of purified samples obtained from Rio1p-expressing cells show mostly isolated particles of the size and shape of 40S subunits that most likely correspond to pre-40S particles (Figure 4A). In contrast, images of samples obtained from Rio1p-depleted extracts show a mixture of isolated particles the size and shape of 40S subunits (20%) or 80S ribosomes (60%), as well as concatenated 80S ribosomes (20%) (Figure 4B and C). These particles likely correspond to pre-40S particles, 80S-like ribosomes (pre-40S + 60S subunits) and polysomes, respectively. Indeed, the concatenated 80S ribosome structures are very similar to the polysomes observed by negative staining by Kopeina *et al.* (34) as well as Bonderoff *et al.* (35). The interpretation that the concatenated 80S ribosomes (Figure 4D) correspond to polysomes is reinforced by the finding that mRNAs can be detected by RT-PCR in the purified samples obtained from Rio1p-depleted extracts (Supplementary Figure S2). Since they were purified via Nob1p-FPZ, the detected polysomes must comprise at least one Nob1p-containing pre-40S particle. We conclude that Rio1p depletion leads to both the accumulation 80S-like particles as well as premature entry of Nob1p-containing pre-40S particles into translation.

#### Nob1p-containing pre-40S particles engage in translation elongation

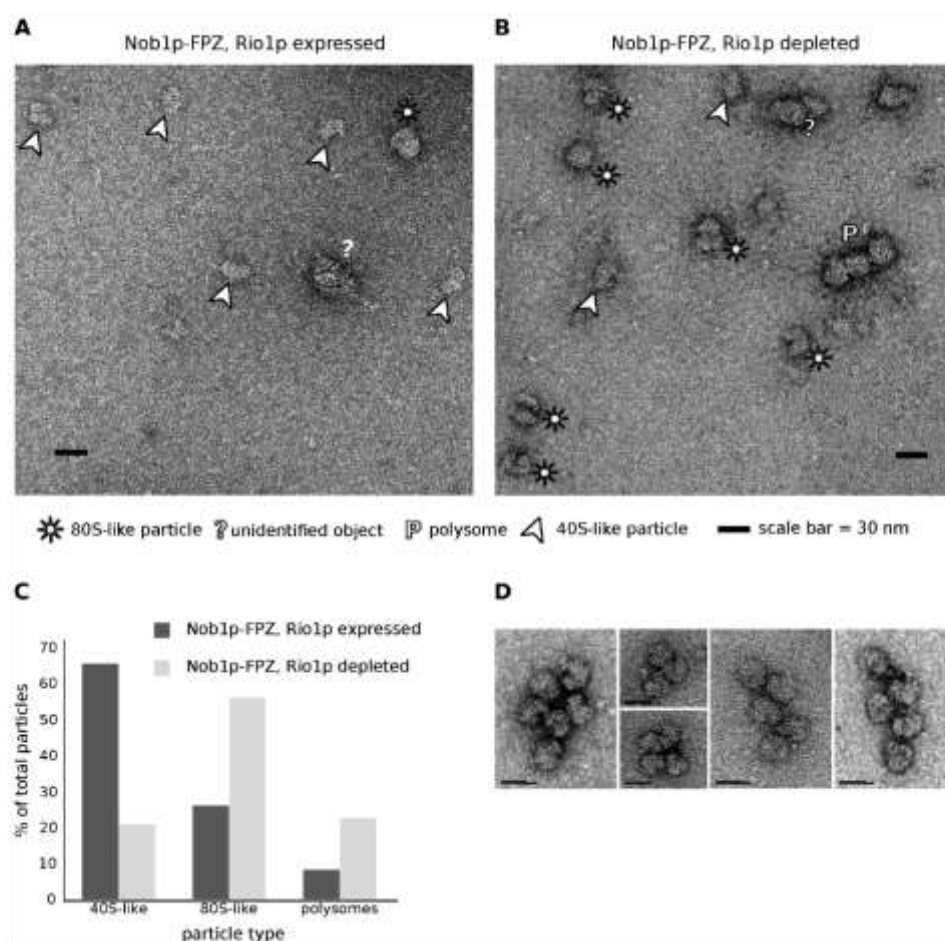
To determine whether Nob1p-containing pre-40S particles can carry out translation elongation, we adapted the ribosome profiling experiment protocol to map the mRNA fragments protected by ribosomes containing immature 40S particles (see Materials and Methods for details) (33,36). Briefly, the total extract obtained from *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* cells grown with doxycycline to repress Rio1p expression and harvested in the presence of cycloheximide to stabilize polysome complexes was treated with RNase I to digest mRNA regions not protected by translat-



**Figure 3.** Tandem-affinity purification of Nob1p-containing pre-40S particles. Purification was performed using extracts from the *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* strain, grown in YPD (+ Rio1p) or in YPD plus doxycycline for 16 h (- Rio1p) to repress *RIO1* expression. (A) Western analysis of tagged Nob1p purification. Aliquots from the initial extract (S10), flow-through of the first IgG-sepharose column (FT1), eluted sample from the IgG-sepharose affinity column (ELppx), flow-through of the second anti-Flag column (FT2), eluted samples from the anti-Flag column (E1–E5) were subjected to western analysis using anti-Flag antibodies. The positions of Nob1p-FPZ and Nob1p-Flag are indicated. (B) Northern analysis of 20S pre-rRNA, 18S and 25S rRNA levels in aliquots of the S10, ELppx and E3 samples from purification experiments performed with the *TetO7-RIO1* strain grown in the presence of doxycycline as control (left), the *TetO7-RIO1, NOB1-FPZ* strain grown in the absence (middle) or presence (right) of doxycycline. Quantifications of the 20S/(18S+20S) and the (20S+18S)/25S ratios were performed by phosphorimager analysis. (C) Northern blot analysis of initiator tRNA levels in aliquots of the E3 anti-Flag affinity column elutions from the three purifications described in (B). Aliquots of S10 and polysomal gradient fraction (PolyS) are used as control.

ing ribosomes. Nob1p-containing ribosomes were then purified using IgG-sepharose beads. The purified RNAs were extracted and rRNA fragments present in the sample were eliminated using the 'RiboZero' procedure. The remaining 28–32 nt long RNA fragments (Ribosome Protected Fragments, RPFs) were then identified by NGS. As controls, total RPFs obtained using a standard ribosome profiling protocol from Rio1p-expressing or Rio1p-depleted cells were also identified. Analysis of the reads corresponding to the immuno-purified RPFs does not point to a preferential association of Nob1p-containing ribosomes with a specific subset of mRNAs (data not shown). The distribution of total and purified RPFs with respect to the trans-

lation initiation codon was analyzed genome wide (Figure 5A). This analysis shows that purified RPFs globally display a density profile somewhat similar to that of total RPFs. Likewise, mapping of purified RPFs on the corresponding yeast coding DNA sequences shows that pre-40S particle-containing ribosomes are present throughout the body of mRNAs (Supplementary Figure S3). In addition, for several mRNAs, the density profile of purified RPFs follows that of total RPFs. These data strongly suggest that pre-40S particle-containing ribosomes can carry out translation elongation. Nevertheless, the genome-wide analysis (Figure 5A) also reveals that the ratio of purified RPFs positioned inside open reading frames relative to those placed close to



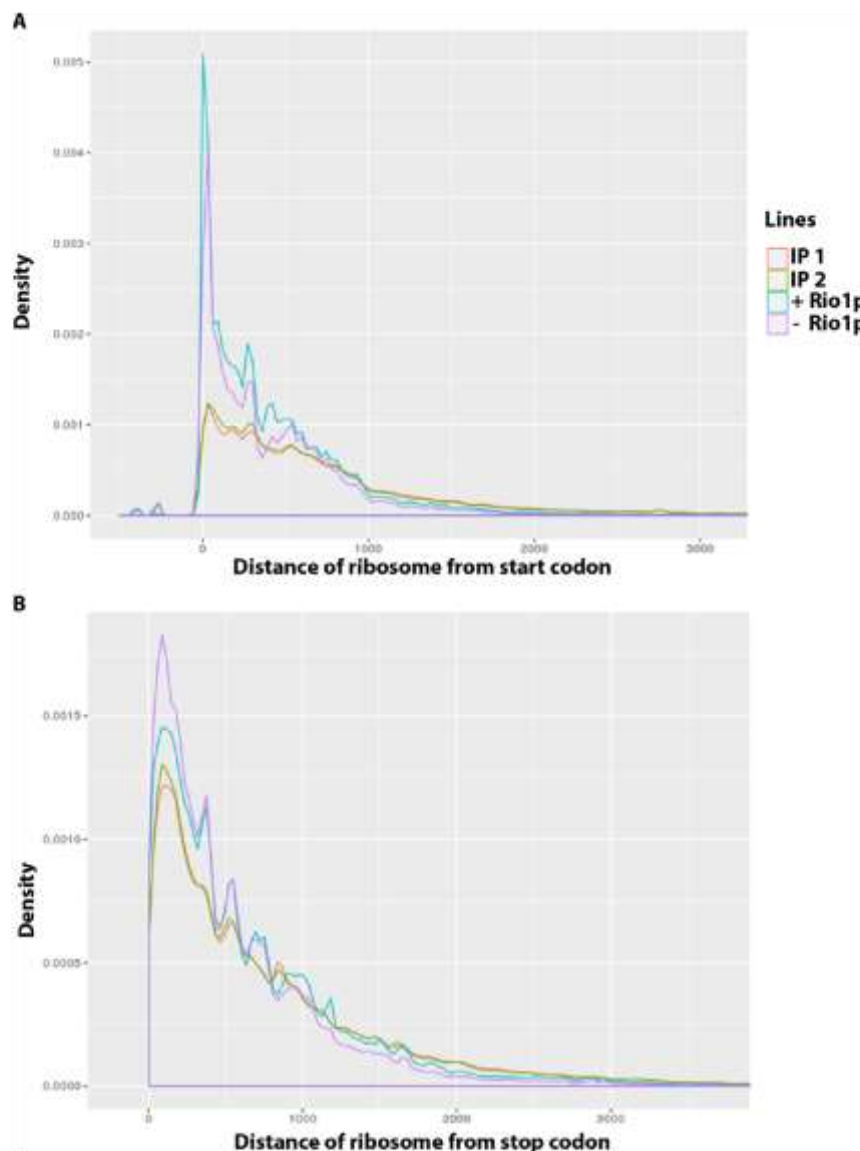
**Figure 4.** Negative staining electron microscopy images of Nob1p-containing particles obtained by tandem affinity purification from (A) *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* cells grown in YPD without doxycycline (Rio1p expressed), or (B) *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* cells grown in YPD plus doxycycline for 16 h (Rio1p depleted). Putative pre-40S particles (40S-like particles), 80S-like particles and polysomes are highlighted as indicated below the images. (C) Percentage of 40S-like, 80S-like particles and putative polysomes in Rio1p-expressing and Rio1p-depleted cells. (D) Examples of polysomes seen in images obtained from *TetO7-RIO1*, *NOB1-FPZ* cells grown in YPD plus doxycycline.

the initiation codon is higher than in the case of total RPFs. For total RPFs of Rio1p-expressing and Rio1p-depleted cells, 16.17% and 13.77% of mapped reads were positioned in close vicinity of  $\pm 15$  nucleotides to start codons, respectively. In contrast, only 4.61% and 4.21% of mapped reads of purified RPFs were localised in close vicinity to start codons. Moreover, we note that the density of Nob1p-containing ribosomes at the initiation codon of the open reading frames specifically analyzed is systematically lower than that of non-selected ribosomes (Supplementary Figure S3). Altogether, these findings may indicate that Nob1p-containing pre-40S particles carry out translation initiation at a reduced pace and/or that the kinetics of translation elongation of pre-40S particle-containing ribosomes are slower than those of wild-type ribosomes. In contrast to the distribution relative to the start codon, the RPF distribution relative to the stop codon is not significantly dif-

ferent between the total RPFs and purified RPFs (Figure 5B). In addition, no significant amount of purified RPFs were mapped to genomic regions following coding DNA sequences (data not shown). These data suggest that ribosomes containing pre-40S particles can recognise and dissociate at canonical stop codons.

## DISCUSSION

The timing of Rio1p association with pre-40S particles and its mode(s) of action still remain ill defined. Analysis of pre-40S particles purified using Rio1p as bait suggests that in wild-type conditions, Rio1p is mostly associated with 80S-like particles containing Nob1p and Dim2p (12,22). Studies on human cells also demonstrate that hRio1 is present in late pre-40S particles containing hDim2/PNO1 and hNob1 (37). Our results indicate that lack of Rio1p leads to the retention of Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p within



**Figure 5.** Genome-wide distribution relative to the start codon (A) or the stop codon (B) of total ribosome protected fragments (RPFs) from Rio1p-expressing cells (+ Rio1) or Rio1p-depleted cells (– Rio1) or immuno-purified RPFs via Nob1p-FPZ from Rio1p-depleted cells (two separate experiments termed IP1 and IP2).

80S-like particles. This strongly suggests that Rio1p joins 80S-like particles prior to or concomitant with Tsr1p dissociation and moreover, that Rio1p is required not only for Pno1p/Dim2p and Nob1p release as previously proposed (22,37), but also for Fap7p and Tsr1p dissociation. Rio1p and Tsr1p binding sites determined by CRAC are partially overlapping or very close in the structure of mature 18S rRNA (20,22,25) and a recent modelling study led to the conclusion that Tsr1p occludes Rio1p binding site (38). Hence our results are best explained by the proposal that Rio1p integration in pre-40S particles drives Tsr1p evic-

tion. While our work was in progress, the distribution on sucrose gradients of AFs extracted from cells over-expressing a catalytically inactive version of Rio1p was determined (39). This analysis showed that the catalytic activity of Rio1p is required for efficient release of Nob1p, Tsr1p and Pno1p/Dim2p from 80S-like ribosomes (Fap7p was not analyzed). Unexpectedly, we observed that a sizable proportion of 20S pre-rRNA extracted from Rio1p-depleted cells sediments in fractions containing 60S subunits. Moreover, these fractions are also enriched for AFs Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p. It seems as

if Rio1p depletion leads not only to the accumulation of 80S-like particles containing Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p, but also to that of particles co-sedimenting with 60S ribosomal subunits containing the very same AFs and the 20S pre-rRNA. The latter particles have not been described before and it remains a mystery, how they can acquire such sedimentation behavior. However, we note that a substantial amount of 20S pre-rRNA sediments in 60S-containing fractions when extracted from Tsr1p depleted cells (20), Fap7p depleted cells (15), from cells expressing the Rpl3 W255C mutant (28) or a catalytically inactive version of Rio1p (39). One possibility is that these unknown particles correspond to pre-40S particles stalled with translation initiation factors at the 48S pre-initiation complex stage on large ribosome-free mRNAs.

Our finding that the accumulation of (a) phosphatase-sensitive form(s) of Ltv1p is dependent upon the presence of Rio1p was unexpected since it suggested that Rio1p could be involved in Ltv1p phosphorylation events. Indeed, it has been proposed that Rio1p, like Rio2p, functions primarily as an ATPase rather than a kinase (16,39). Moreover, as discussed previously, it is currently thought that Rio1p associates with pre-40S particles after the dissociation of Ltv1p promoted by its phosphorylation by Hrr25p (17). Nevertheless, the possibility that Rio1p can function as a kinase *in vivo* cannot be ruled out, since Rio1p from *C. thermophilum* displays weak auto-phosphorylation activity *in vitro* (39). Of course, whether Rio1p is directly involved in Ltv1p phosphorylation remains to be determined. If that is the case, Rio1p must phosphorylate Ltv1p outside pre-40S particles, unless contrary to current thinking, Rio1p in fact associates with pre-40S particles prior to Ltv1p departure. Interestingly, our data suggest that such phosphorylated form(s) of Ltv1p can be maintained in pre-ribosomal particles since they are found in 40S gradient fractions (Figure 1).

In addition to 80S-like particles and pre-40S particles co-sedimenting with 60S ribosomal subunits that contain AFs Nob1p, Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p, Rio1p-depleted cells also accumulate pre-40S particles that sediment in polysome-containing fractions. Our previous studies (29) and the present work clearly establish that the majority of these latter particles are engaged in translation. At least a subset of these translating pre-40S particles contain Nob1p, since Nob1p associates with mRNAs as well as the initiator tRNA (Supplementary Figure S2 and Figure 3C) and polysomes can be directly visualised by electron microscopy in tandem affinity purification samples obtained from Rio1p-depleted cells using Nob1p as bait (Figure 4). The presence of additional AFs in pre-40S particles engaged in translation remains unknown but is unlikely. Fap7p, Tsr1p and Pno1p/Dim2p are found in heavy gradient fractions when extracted from Rio1p-expressing cells, likely reflecting, at least for Tsr1p and Pno1p/Dim2p, their integration within early nuclear pre-ribosomal particles since these fractions contain 35S pre-rRNA. The sedimentation of these AFs in polysome-containing fractions is strongly reduced when they are extracted from Rio1p-depleted cells, suggesting they are not part of pre-40S particles engaged in translation. This is fully in accordance with the hypothesis that the simultaneous binding of Tsr1p and Pno1p/Dim2p

would prevent the interaction with translation initiation factors (20). Our data therefore suggest that while Rio1p depletion affects Tsr1p, Pno1p/Dim2p and Fap7p dissociation from 80S-like particles, the block is not complete and that some 80S-like particles manage to shed these assembly factors. The Nob1p-containing pre-40S particles that are released can enter translation. While initial structural work suggested that Nob1p position within early pre-40S particles blocks the association of translation initiation factor eIF3 (20), more recent data point to an inherent flexibility of Nob1p and the platform region on which it is bound (40), leading us to propose that some conformations adopted by Nob1p may allow eIF3 binding. The Nob1p-containing pre-40S particles that enter translation are unable to carry out D site cleavage, suggesting that Rio1p action is not restricted to late AF removal but also induces conformational changes within pre-40S particles that are required for cleavage to occur. In addition, or alternatively, translation may promote Nob1p dissociation as proposed by Garcia-Gomez *et al.*, rendering D site cleavage impossible (28). They found that cells expressing the mutant ribosomal protein gene allele *rpl3[W255C]* display a very similar phenotype to the one of Rio1p-depleted cells, with accumulation of 20S pre-rRNA in 60S, 80S and polysome-containing fractions. Strikingly, they noticed that reducing translation by various means lowers 20S accumulation in *rpl3[W255C]* cells, hence the proposal that translation induces Nob1p loss. However, our data clearly indicate that translation does not lead to the dissociation of all Nob1p molecules from pre-40S particles.

Whether immature pre-40S particles could support translation elongation remained unclear until now. Garcia-Gomez and colleagues argued that pre-40S particles from *rpl3[W255C]* cells could support translation elongation since the 20S/18S and 20S/25S ratios remained constant for most polysomal fractions. This is also what we find for polysomal fractions obtained from Rio1p-depleted extracts, supporting the view that pre-40S particles from cells lacking Rio1p can also perform translation elongation. This conclusion is strongly reinforced by our mapping of mRNA fragments protected by pre-40S particle-containing ribosomes. Thus it appears that the presence of Nob1p and of 20S pre-rRNA instead of 18S rRNA does not block translation elongation, although our data suggest that the pace of translation initiation and/or elongation may be slowed. Our data argue that even if pre-40S particle-containing ribosomes move on mRNAs with altered kinetics, they are able to recognise and dissociate at canonical stop codons. Remarkably, it was recently proposed that immature large ribosomal subunits containing various 5.8S rRNA 3 extended precursors can also support translation elongation (41). Thus, the phenomenon of premature entry into translation is not restricted to small ribosomal subunit precursors.

Our previous results suggest that pre-40S particles containing Nob1p can enter translation even in wild-type cells. This conclusion stems from the findings that in wild-type conditions, a small amount of 20S pre-rRNA is found in polysome-containing fractions, associates with polyA-binding protein and translation initiation factors and that certain abundant mRNAs can be co-precipitated with

Nob1p (29). Whether pre-40S particles can support translation elongation under wild-type conditions remains to be formally established but is likely in light of the present study. Pre-40S particles entering translation in wild-type cells may serve a regulatory purpose or correspond to aberrant pre-40S particles that have improperly shed most of their AFs and retain an incorrectly positioned Nob1p protein unable to process 20S pre-rRNA. Cytoplasmic steps of pre-40S particle maturation may be intrinsically error prone, in spite of quality control steps, such as 80S-like particle formation.

## AVAILABILITY

Analysis of ribosome profile data: code for distance calculation and plots is published on <https://github.com/jadybea/Rio1p>. NGS analysis files of raw and processed data were deposited in Gene Expression Omnibus database under the accession number GEO: GSE98333.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

With thank Katrin Karbstein for the gift of antibodies, Marlène Faubladié for plasmid construction, Natacha Pérébasquine and Sébastien Fribourg for the gift of purified proteins, Stéphanie Balor and Vanessa Soldan (METI platform, Toulouse) for technical support in electron microscopy, Yves Romeo and Jean-Paul Gélugne for helpful discussions.

## FUNDING

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); The University of Toulouse; Agence Nationale de la Recherche (ANR) [ANR-2010-BLAN-1224 to Y.H.]. Funding for open access charge: ANR.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y. *et al.* (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, **417**, 967–970.
- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J. and Beyer, A.L. (2004) Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, **16**, 943–954.
- Henras, A.K., Soudet, J., Gêrus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougïn, A. and Henry, Y. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2334–2359.
- Woolford, J.L. Jr and Baserga, S.J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **195**, 643–681.
- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M. and Klinge, S. (2016) Architecture of the yeast small subunit processome. *Science*, aal1880.
- Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Kos-Braun, I., Kos, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R. *et al.* (2016) Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell*, **166**, 380–393.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C. *et al.* (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife*, **6**, e22086.
- Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Barandun, J., Dill, B.D. and Klinge, S. (2015) Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 920–923.
- Perez-Fernandez, J., Roman, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R. and Dosil, M. (2007) The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 5414–5429.
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S. and Ye, K. (2016) Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes Dev.*, **30**, 718–732.
- Wells, G.R., Weichmann, F., Colvin, D., Sloan, K.E., Kudla, G., Tollervey, D., Watkins, N.J. and Schneider, C. (2016) The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 5399–5409.
- Hector, R.D., Burlacu, E., Aitken, S., Le Bihan, T., Tuijtel, M., Zaplatina, A., Cook, A.G. and Granneman, S. (2014) Snapshots of pre-rRNA structural flexibility reveal eukaryotic 40S assembly dynamics at nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12138–12154.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnadig, M., Schafer, T., Tollervey, D. and Hurt, E. (2009) RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35079–35091.
- Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Bottcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J. and Tollervey, D. (2012) Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 744–753.
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L. and Karbstein, K. (2012) A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell*, **150**, 111–121.
- Ferreira-Cerca, S., Sagar, V., Schafer, T., Diop, M., Wesseling, A.M., Lu, H., Chai, E., Hurt, E. and LaRonde-LeBlanc, N. (2012) ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1316–1323.
- Ghalei, H., Schaub, F.X., Doherty, J.R., Noguchi, Y., Roush, W.R., Cleveland, J.L., Stroupe, M.E. and Karbstein, K. (2015) Hrr25/CK1delta-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth. *J. Cell Biol.*, **208**, 745–759.
- Mitterer, V., Murat, G., Réty, S., Blaud, M., Delbos, L., Stanborough, T., Bergler, H., Leulliot, N., Kressler, D. and Pertschy, B. (2016) Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation. *Nat. Commun.*, **7**, 10336.
- Zemp, J., Wandrey, F., Rao, S., Ashiono, C., Wyler, E., Montellese, C. and Kutay, U. (2014) CK1delta and CK1epsilon are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation. *J. Cell Sci.*, **127**, 1242–1253.
- Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L. 3rd, Karbstein, K. and Skiniotis, G. (2011) Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science*, **333**, 1449–1453.
- Schafer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Bottcher, B., Aebi, U. and Hurt, E. (2006) Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, **441**, 651–655.
- Turowski, T.W., Lebaron, S., Zhang, E., Peil, L., Dudnakova, T., Petfalski, E., Granneman, S., Rappsilber, J. and Tollervey, D. (2014) Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12189–12199.
- Hellmich, U.A., Weis, B.L., Lioutikov, A., Wurm, J.P., Kaiser, M., Christ, N.A., Hantke, K., Kotter, P., Entian, K.D., Schleiff, E. *et al.* (2013) Essential ribosome assembly factor Fap7 regulates a hierarchy of RNA-protein interactions during small ribosomal subunit biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 15253–15258.
- Loeh, J., Blaud, M., Réty, S., Lebaron, S., Deschamps, P., Bareille, J., Jombart, J., Robert-Paganin, J., Delbos, L., Chardon, F. *et al.* (2014) RNA mimicry by the fap7 adenylate kinase in ribosome biogenesis. *PLoS Biol.*, **12**, e1001860.



25. Granneman,S., Petfalski,E., Swiatkowska,A. and Tollervey,D. (2010) Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA-protein cross-linking. *EMBO J.*, **29**, 2026–2036.
26. Larburu,N., Montellese,C., O'Donohue,M.F., Kutay,U., Gleizes,P.E. and Plisson-Chastang,C. (2016) Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 8465–8478.
27. Lacombe,T., Garcia-Gomez,J.J., de la Cruz,J., Roser,D., Hurt,E., Linder,P. and Kressler,D. (2009) Linear ubiquitin fusion to Rps31 and its subsequent cleavage are required for the efficient production and functional integrity of 40S ribosomal subunits. *Mol. Microbiol.*, **72**, 69–84.
28. Garcia-Gomez,J.J., Fernandez-Pevida,A., Lebaron,S., Rosado,I.V., Tollervey,D., Kressler,D. and de la Cruz,J. (2014) Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3. *PLoS Genet.*, **10**, e1004205.
29. Soudet,J., Gélugne,J.P., Belhabib-Baumas,K., Caizergues-Ferrer,M. and Mougin,A. (2010) Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **29**, 80–92.
30. Puig,O., Caspary,F., Rigaut,G., Rutz,B., Bouveret,E., Bragado-Nilsson,E., Wilm,M. and Séraphin,B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218–229.
31. Henras,A., Henry,Y., Bousquet-Antonelli,C., Noailac-Depeyre,J., Gélugne,J.P. and Caizergues-Ferrer,M. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.*, **17**, 7078–7090.
32. Lebaron,S., Froment,C., Fromont-Racine,M., Rain,J.C., Monsarrat,B., Caizergues-Ferrer,M. and Henry,Y. (2005) The splicing ATPase prp43p is a component of multiple preribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9269–9282.
33. Ingolia,N.T., Ghaemmaghami,S., Newman,J.R. and Weissman,J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, **324**, 218–223.
34. Kopeina,G.S., Afonina,Z.A., Gromova,K.V., Shirokov,V.A., Vasiliev,V.D. and Spirin,A.S. (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2476–2488.
35. Bonderoff,J.M. and Lloyd,R.E. (2010) Time-dependent increase in ribosome processivity. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7054–7067.
36. Oh,E., Becker,A.H., Sandikci,A., Huber,D., Chaba,R., Glöge,F., Nichols,R.J., Typas,A., Gross,C.A., Kramer,G. et al. (2011) Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell*, **147**, 1295–1308.
37. Widmann,B., Wandrey,F., Badertscher,L., Wyler,E., Pfannstiel,J., Zemp,I. and Kutay,U. (2012) The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 22–35.
38. McCaughan,U.M., Jayachandran,U., Shepachev,V., Chen,Z.A., Rappsilber,J., Tollervey,D. and Cook,A.G. (2016) Pre-40S ribosome biogenesis factor Tsr1 is an inactive structural mimic of translational GTPases. *Nat. Commun.*, **7**, 11789.
39. Ferreira-Cerca,S., Kiburu,I., Thomson,E., LaRonde,N. and Hurt,E. (2014) Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8635–8647.
40. Johnson,M.C., Ghalei,H., Duxtader,K.A., Karbstein,K. and Stroupe,M.E. (2017) Structural heterogeneity in pre-40S ribosomes. *Structure*, **25**, 329–340.
41. Rodriguez-Galan,O., Garcia-Gomez,J.J., Kressler,D. and de la Cruz,J. (2015) Immature large ribosomal subunits containing the 7S pre-rRNA can engage in translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.*, **12**, 838–846.