

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
RÉSUMÉ	8
ABSTRACT	9
 <u>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</u>	 <u>11</u>
 I. LE RIBOSOME	 13
1. HISTORIQUE	13
2. STRUCTURE ET COMPOSITION DU RIBOSOME	14
II. LA BIOGENÈSE DES RIBOSOMES EUCARYOTES	23
1. GÉNÉRALITÉS	23
2. LES ACTEURS DE LA BIOGENÈSE DE LA PETITE SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE	25
a. L'ARNr 18S	25
b. Les protéines ribosomiques	33
c. Les facteurs de maturation	36
3. LES ÉTAPES DE LA MATURATION CYTOPLASMIQUE DE LA PETITE SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE	39
4. PROCESSUS DE CONTRÔLE QUALITÉ	43
III. LA TRADUCTION PAR LE RIBOSOME EUCARYOTE	46
1. VUE D'ENSEMBLE DU PROCESSUS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE	46
a. L'initiation de la traduction	47
b. L'élongation de la traduction	48
c. La terminaison de la traduction	49
2. FOCUS SUR L'ÉTAPE D'ÉLONGATION DE LA TRADUCTION	50
a. Reconnaissance du codon	51
b. Accommodation de l'ARNt-aa dans le site A et formation de la liaison peptidique	57
c. Translocation de l'ARNt et de l'ARNm	61
IV. LES MALADIES ASSOCIÉES À DES DÉFAUTS DU RIBOSOME	68
1. MANIFESTATIONS DES DÉFAUTS DE LA BIOGENÈSE DES RIBOSOMES	68
a. Cas des ribosomopathies dues à une haplo-insuffisance	68

b. Haplo-insuffisance de RPS20, un cas particulier de ribosomopathie	72
2. MUTATIONS RIBOSOMIQUES IMPLIQUANT DES DÉFAUTS DE TRADUCTION	73
a. Mutations impactant la fidélité de la traduction.....	73
b. Mutations entraînant la traduction spécialisée de certains ARNm.....	74
3. ALTÉRATION DES FONCTIONS EXTRA-RIBOSOMIQUES DE PROTÉINES RIBOSOMIQUES DÉFECTUEUSES.	76
4. L'ÉNIGME DE DAMESHEK OU COMMENT LA CELLULE EST CAPABLE DE PASSER D'UN ÉTAT D'HYPOTRIFICATION À UN ÉTAT D'HYPER-PROLIFÉRATION ?	79
V. PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE THÈSE	81
<u>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	<u>83</u>
I. PURIFICATION ET ANALYSES DES PARTICULES PRÉ-40S HUMAINES	85
1. CULTURE CELLULAIRE ET TRAITEMENT AVEC siARN	85
2. PURIFICATION PAR AFFINITÉ DES PARTICULES PRÉ-40S HUMAINES	85
a. Analyse des protéines	86
b. Analyse des ARN	87
3. SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE HRPS26-HIS.....	88
4. EXPÉRIENCE DE CLIVAGE <i>IN VITRO</i>	88
5. IMMUNOPRÉCIPITATION AVEC L'ANTICORPS α -EIF1AD	89
II. PURIFICATION ET ANALYSE DE POLYSOMES À PARTIR DE CELLULES BA/F3 WT OU MUTANTES.....	90
1. CULTURE CELLULAIRE DES CELLULES BA/F3	90
2. PURIFICATION DES POLYSOMES SUR GRADIENT DE SACCHAROSE 10-50 %	90
3. PURIFICATION DES POLYSOMES AVEC TRAITEMENT AU CYCLOHEXIMIDE	91
III. LE MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (MET)	92
1. PRINCIPES GÉNÉRAUX	92
2. QUELS SONT LES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS COMPOSANT LE MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE ?.....	93
3. COMMENT SE FORME UNE IMAGE ?	96
4. QUELLES SONT LES LIMITES DE LA RÉOLUTION ?.....	99
5. LA FONCTION DE TRANSFERT DE CONTRASTE (CTF)	102
IV. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	104
1. COLORATION NÉGATIVE	104
2. CRYO-CONGÉLATION	105
V. ANALYSE D'IMAGES.....	108
1. PRINCIPES GÉNÉRAUX	108

2. ÉTAPES DE TRAITEMENT DES IMAGES	109
a. Pré-traitement.....	110
b. Classification 2D.....	112
c. Classification 3D	113
d. Auto-raffinement 3D	115
e. Post-traitement.....	116
f. Classification 3D masquée.....	117
g. Polishing des particules.....	117
h. Interprétation des cartes de densité électronique : construction des modèles atomiques	118
<u>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</u>	121
I. ANALYSES FONCTIONNELLES DES PARTICULES PRÉ-40S TARDIVES HUMAINES	123
1.CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE.....	123
2. <u>ARTICLE</u> : THE FINAL STEP OF 40S RIBOSOMAL SUBUNIT MATURATION IS CONTROLLED BY A DUAL KEY LOCK.....	125
3. BILAN ET PERSPECTIVES	174
II. CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE RIBOSOMES MUTANTS RPS15-P131S, "ONCORIBOSOMES"	176
1.PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES POLYSOMES DE Ba/F3	177
a. Préparation des polysomes.....	177
b. Caractérisation des polysomes de Ba/F3 WT et RPS15-P131S.....	178
2. ANALYSE STRUCTURALE DES POLYSOMES	180
a. Acquisition des images	180
b. Analyse d'images.....	180
c. Modèles atomiques.....	184
d. Interprétation des cartes.....	186
e. Effet de la mutation RPS15-P131S sur le ribosome en cours de traduction	188
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	191
4. CONCLUSION.....	196
<u>CHAPITRE 4 : CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	199
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	205

Liste des abréviations

2D : Bidimensionnel	IP : Immunoprécipitation
3D : Tridimensionnel	IRES : Internal ribosome entry site
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	iRPs : initiation RPS
ARN : Acide RiboNucléique	ITS : Internal Transcribed Spacer
ARNm : ARN messenger	LoG : Laplacian-of-Gaussian
ARNr : ARN ribosomique	MET : Microscope électronique à transmission
ARNt : ARN de transfert	MWCO : Molecular weight cut-off
ARNt-aa : ARNt-aminoacylé	NES : Nuclear Export Signal
ASL : Tige Boucle de l'anticodon	NPC : Nuclear Pore Complex
ATP : Adénosine TriPhosphate	PDB : Protein Data Bank
AMP-PNP : Adénylyl-imidodiphosphate	pRPs : progression RPS
CCD : Charge Couple Device	PTC : centre de peptidyl-transférase
CHH : Hypoplasie cartilage-cheveux	RNP : Particule RibonucléoProtéique
CHX : Cycloheximide	RP : Protéine Ribosomique
CLL : Leucémies lymphocytaires chroniques	RPL : Ribosomal Protein of the Large subunit
CMOS : Complementary Metal Oxide Semiconductor	RPS : Ribosomal Protein of the Small subunit
Cryo-EM : Cryo-microscopie électronique	S : Svelberg
CTF : Fonction de transfert de contraste	SBDS : Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome
DBA : Anémie de Blackfan-Diamond	SDS : Syndrome de Shwachman-Diamond
DC : Dyskeratose Congénitale	siARN : petits ARN interférents
DDE : Détecteurs directs d'électrons	snoRNP : small nucleolar RNP
eEF : eukaryotic Elongation Factors	SPA : Single Particle Analysis
eIF : eukaryotic Initiation Factors	SRL : Sarcin-Ricin Loop
ePK : eucaryotic Proteins Kinases	St-HA : Streptavidine-hemagglutinine
eRF : eukaryotic Release Factors	T-ALL : Leucémie lymphoblastique aigüe
ETS : External Transcribed Spacer	TCS : Syndrome de Treacher Collins
FEG : Field Emission Gun	TF : Transformée de Fourier
smFRET : single molecule Förster Resonance Energy Transfert	TF-1 : Transformée de Fourier inverse
FSC : Fourier Shell Correlation	WT : Wild Type
GTP : Guanosine Triphosphate	
GMP-PNP : Guanylyl-imidodiphosphate	

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Structures des sous-unités ribosomiques ainsi que du ribosome mature humain	16
Figure 2 : Emplacement des sites de liaisons des ARNt, ainsi que des centres d'activités de traduction des deux sous-unités ribosomiques	17
Figure 3 : Comparaison des sous-unités ribosomiques bactérienne, eucaryote, eucaryote supérieure.....	18
Figure 4 : Aperçu des avancées majeures de la microscopie électronique et de l'évolution de la résolution au fil des années	21
Figure 5 : Schéma général de la biogenèse des ribosomes chez la levure.....	25
Figure 6 : L'ARNr 47S polycistronique.....	27
Figure 7 : Modèle de la formation de la particule 90S et les réarrangements à l'origine de la formation de la particule pré-40S.....	28
Figure 8 : Les étapes de maturation de l'ARNr 18S chez l'Homme	29
Figure 9 : Visualisation des modifications des ARNr chez l'Homme	32
Figure 10 : Localisation des protéines ribosomiques nécessaires pour les étapes précoces de maturation du pré-ARNr (iRPs) ou pour des étapes plus tardives (pRPs).....	34
Figure 11 : Ordre d'association des protéines ribosomiques iRPs et pRPs dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S chez l'Homme.....	35
Figure 12 : Structure de RIO1 humaine (hsRIO1) déterminée par cristallographie aux rayons X	38
Figure 13 : Détails moléculaires de l'interaction entre DIM2, NOB1 ainsi que le pré-ARNr 18S-E	42
Figure 14 : Etapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique 40S humaine	43
Figure 15 : Les étapes de la traduction chez les eucaryotes	44
Figure 16 : Cycle de l'élongation de la traduction chez les eucaryotes	51
Figure 17 : Représentation des ARNt et de l'ARNm impliqués dans l'élongation de la traduction	52
Figure 18 : Interaction du facteur eEF1A avec le ribosome et l'ARNt-aa lors de l'étape de décodage de l'ARNm.....	54
Figure 19 : Interactions mises en jeu dans le centre de décodage lors de la reconnaissance du codon par l'ARNt-aa	56
Figure 20 : Complexe d'élongation superposé à un ribosome avec un site A vide.....	57
Figure 21 : Accommodation de l'ARNt-aa dans le site A après reconnaissance de l'anticodon par l'ARNm.....	58
Figure 22 : Etats hybride-PRE/Rotation-PRE du ribosome lors du repositionnement des ARNt.....	60
Figure 23 : Association d'eEF2 au niveau du site A du ribosome	62
Figure 24 : Réarrangements structuraux de la 40S à l'origine de la translocation du duplex ARNt-ARNm	64
Figure 25 : Déclenchement de l'hydrolyse du GTP par l'interactions entre eEF2 et la protéine RPS23 de l'épaule de la sous-unité 40S lors de la rotation inverse du corps de la 40S.....	65
Figure 26 : Vue d'ensemble des réarrangements impliqués dans l'étape de translocation	66
Figure 27 : Aperçu des ribosomopathies associées aux différentes étapes de la maturation des ribosomes.....	71

Figure 28 : Régulation du complexe MDM2-p53 par l'intermédiaire de protéines ribosomiques	78
Figure 29 : Modèle de la transition cellulaire d'un état hypo-prolifératif vers un état hyper-prolifératif.....	80
Figure 30 : Schéma du microscope électronique en transmission.....	92
Figure 31 : Sources et canons à électrons.....	94
Figure 32 : Les deux types de capteurs.....	96
Figure 33 : Interactions des électrons avec l'échantillon.....	96
Figure 34 : Types de contraste permettant la formation d'une image en microscopie électronique	98
Figure 35 : Schéma de formation d'une image en microscopie électronique à transmission	99
Figure 36 : Limite de résolution et tâche d'Airy	100
Figure 37 : Représentation schématique des aberrations des lentilles électromagnétiques	101
Figure 38 : La fonction de transfert de contraste (CTF)	103
Figure 39 : Représentation schématique de la préparation des échantillons en coloration négative	105
Figure 40 : Préparation des échantillons en cryo-EM	106
Figure 41 : Workflow utilisé lors de la détermination des structures 3D en cryo-EM.....	109
Figure 42 : Représentation schématique de films de micrographes avant et après alignement par Motion Correction.....	110
Figure 43 : Correction de la CTF.....	111
Figure 44 : Principe du « projection matching »	114
Figure 45 : Biais de référence.....	115
Figure 46 : Structure des particules pré-40S humaines à différentes étapes de maturation	124
Figure 47 : Workflow de la préparation des polysomes à partir de cellules de Ba/F3	177
Figure 48 : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et RPS15-P131S	178
Figure 49 : Schéma récapitulatif des étapes de traitement des images cryo-EM des ribosomes WT	181
Figure 50 : Schéma récapitulatif des étapes de traitement des images cryo-EM des ribosomes mutants RPS15-P131S.....	182
Figure 51 : Détails de la carte de densité électronique et des modèles atomiques dérivés	185
Figure 52 : Caractéristiques structurales des états Hybride-PRE et POST du ribosome WT.....	187
Figure 53 : Effet de la mutation RPS15-P131S sur la structure du ribosome	189
Figure 54 : : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et WT + cycloheximide.....	193
Figure 55 : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et mutante (RPS15-P131S) après traitement au cycloheximide.....	194
 Tableau 1 : Récapitulatif de la composition des ribosomes dans les 3 domaines du vivant.....	15
Tableau 2 : Anticorps utilisés pour les Western Blot	86
Tableau 3 : Pourcentage de particules retrouvées dans les différents états structuraux identifiés, des conditions WT et mutantes (RPS15 –P131S)	190

Résumé

Le ribosome, qui traduit le code génétique en protéines, est une machinerie moléculaire essentielle au fonctionnement optimal des cellules. La formation, ou biogenèse, de ces ribosomes est un processus très complexe, qui doit être finement contrôlé et régulé pour produire rapidement des sous-unités ribosomiques matures et fonctionnelles. Des mutations dans des composants de cet appareil cellulaire essentiel sont à l'origine de diverses maladies, comme des anémies, des retards de croissance mais aussi certains cancers. Dans ce contexte, la caractérisation précise de l'ensemble des mécanismes d'assemblage et de fonctionnement des ribosomes en conditions normales et pathologiques devient un enjeu primordial. Ces questions scientifiques ont récemment connu des avancées majeures, notamment grâce à l'utilisation de la cryo-microscopie électronique (cryo-EM). En effet, couplée à des analyses fonctionnelles, la résolution de différents états structuraux du ribosome a permis la description de nombreux mécanismes moléculaires responsables de la biogenèse des ribosomes, ainsi que de différentes étapes de la traduction. Mon projet de thèse s'inscrit pleinement dans ces analyses structure/fonction de l'assemblage et du fonctionnement des ribosomes.

Mon premier projet de thèse s'est focalisé sur les étapes finales de la maturation de la petite sous-unité ribosomique humaine, aussi appelée sous-unité 40S. Pour cela, en me basant sur des analyses structurales par cryo-EM, j'ai mené des études fonctionnelles sur des particules pré-40S purifiées à une étape tardive de leur maturation, grâce à la forme catalytiquement inactive de l'ATPase RIO1. Ce travail m'a permis de mettre en évidence les rôles combinés de RIO1 et de la protéine ribosomique RPS26 dans le déclenchement du clivage du pré-ARNr 18S-E par l'endonucléase NOB1, entraînant la maturation finale de l'ARNr 18S.

Mon second projet de thèse visait à comprendre les effets d'une mutation ponctuelle de la protéine ribosomique RPS15 (mutation RPS15-P131S) sur les mécanismes de traduction. Des mutations ponctuelles dans le domaine C-terminal de cette protéine de la petite sous-unité ribosomique sont en effet retrouvées dans de nombreux cas de leucémies et de tumeurs solides. Pour cela, j'ai entamé une analyse structure/fonction de ces ribosomes mutants. J'ai purifié et déterminé par cryo-EM les structures 3D de ribosomes en cours de traduction. J'ai comparé les structures de ribosomes « sauvages » à leurs homologues mutants, portant la mutation RPS15-P131S. Mes résultats montrent que la mutation provoque la déstabilisation structurale du domaine C-terminal de RPS15, ce qui entraînerait un ralentissement de l'étape d'élongation de la traduction. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que la déstructuration du domaine C-ter de RPS15 empêche l'accommodation correcte des ARNt amino-acylés dans le site A du ribosome.

Abstract

The ribosome, which translates the genetic code into proteins, is an essential molecular machinery for the optimal functioning of cells. The formation, or biogenesis, of these ribosomes is a very complex process, which must be finely tuned to rapidly produce mature and functional ribosomal subunits. Mutations in components of this essential cellular apparatus are at the origin of various diseases, such as anemia, growth retardation but also some cancers. In this context, the precise characterization of the assembly and functioning mechanisms of ribosomes in normal and pathological conditions becomes crucial. This topic has recently seen major advances, notably thanks to the use of cryo-electron microscopy (cryo-EM). Indeed, coupled with functional analyses, the resolution of different structural states of ribosomes or precursors of ribosomal subunits has allowed to describe many molecular mechanisms responsible for ribosome biogenesis, as well as different steps of translation. My thesis project is fully in line with these structure/function analyses of ribosome assembly and function.

My first thesis project focused on the final maturation steps of the human small ribosomal subunit, also called 40S subunit. For this purpose, based on structural analysis by cryo-EM, I conducted functional studies on pre-40S particles purified at a late stage of their maturation, thanks to a tagged and catalytically inactive form of the ATPase RIO1. This work allowed to demonstrate the combined action of both RIO1 with the ribosomal protein RPS26 in triggering the cleavage of the pre-rRNA 18S-E by the NOB1 endonuclease, leading to the final maturation of 18S rRNA.

My second thesis project aimed at understanding the effects of a point mutation in the ribosomal protein RPS15 (S15-P131S mutation) on translation mechanisms. Point mutations in the C-terminal domain of this protein of the small ribosomal subunit are indeed found in many cases of leukemia and solid tumors. For this purpose, I initiated a structure/function analysis of these mutant ribosomes. I purified and determined the cryo-EM 3D structures of translating ribosomes. I compared the structures of wild type ribosomes to their mutant counterparts, carrying the S15-P131S mutation. My results show that the mutation causes structural destabilization of the C-terminal domain of RPS15, which results in a slowing down of the elongation step of translation. One hypothesis to explain this phenomenon would be that the destructuring of the C-terminal domain of RPS15 prevents the proper accommodation of aminoacylated tRNAs in the A-site of the ribosome.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I. Le ribosome

Le ribosome est un complexe macromoléculaire formé de deux sous-unités et composé d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines ribosomiques (RP). Il est présent dans tous les domaines du vivant et est responsable de la traduction de l'information génétique contenu dans l'ARN messager (ARNm), pour cela il a pour rôle de décoder l'ARNm puis de synthétiser les protéines.

1. Historique

C'est en 1955 que Georges E. Palade découvrit pour la première fois les ribosomes par observation de cellules de rats par microscopie électronique en transmission. Il les décrivit comme des petites particules granulaires d'environ 20 nanomètres entourant le réticulum endoplasmique, qu'il appela initialement microsomes (Palade, 1955). Cette découverte lui a d'ailleurs valu le prix Nobel de médecine en 1974. Par la suite, plusieurs études biochimiques et fonctionnelles ont été menées et ont permis d'identifier que ces microsomes étaient des complexes ribonucléo-protéiques (RNP). C'est dans ce contexte que Richard B. Roberts renomma ces particules des ribosomes, lors du congrès « Microsomal Particles and Protein Synthesis » en 1958. Durant les années 60, ces études ont aussi pu mettre en évidence le rôle des ribosomes dans la synthèse protéique (Kirsch et al., 1960; McQuillen et al., 1959; Palade, 1975).

La détermination de la structure tridimensionnelle des ribosomes a été essentielle dans la compréhension des mécanismes entourant le décodage de l'information génétique porté par l'ARNm et la synthèse des chaînes d'acides aminés. Les toutes premières observations des sous-unités ribosomiques ont été réalisées en microscopie électronique par coloration négative. Ces observations ont permis de donner un premier aperçu de la morphologie du ribosome en générant les tous premiers modèles 3D « fait à la main » (Lake, 1976; Vasil'ev, 1974). Les ribosomes étant des complexes de très grosse taille, ils ont été très largement utilisés en tant « qu'outil » afin de développer les techniques structurales, cet aspect sera plus largement décrit par la suite. Dans les années 1980-90, grâce aux avancées technologiques des méthodes de cristallographies aux rayons X ainsi que de cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) (Dubochet et al., 1981) la recherche des premières structures de ribosomes a pu rapidement progresser. En effet, à la fin des années 1990, la cristallographie aux rayons X a permis l'élucidation de plusieurs structures de sous-unités ribosomiques procaryotes, améliorant à chaque fois leur résolution. L'exemple de la détermination de structures de la grande sous-unité ribosomique de l'archée *Haloarcula marismortui* permet d'illustrer cette rapide évolution, passant d'une structure basse résolution (9 Å) (Ban et al., 1998), à moyenne résolution (5 Å) (Ban et al., 1999) jusqu'à atteindre une structure haute résolution de

3,5 Å en 2000 (Ban et al., 2000). Et c'est au début des années 2000, par cristallographie aux rayons X, que les premières structures à l'échelle atomique de ribosomes entiers procaryotes ont été résolues. En 2001, Noller et ses collaborateurs ont rapporté la structure cristalline du ribosome entier de *Thermus thermophilus* à une résolution de 5,5 Å (Yusupov et al., 2001), mais la toute première structure haute résolution (3,5 Å) d'un ribosome entier a été obtenue par Cate et ses collaborateurs pour un ribosome vide d'*Escherichia coli* (Schuwirth et al., 2005). L'ensemble de ces travaux a été essentiel dans la compréhension des mécanismes de la synthèse protéique ainsi que dans la mise en évidence de la complexité structurale du ribosome. La détermination de ces modèles a permis une découverte majeure, en montrant que le centre de peptidyl-transférase, où la formation des liaisons peptidiques est catalysée, est formé exclusivement d'ARNr, aucune chaîne peptidique n'étant visible à moins de 18 Å de ce centre catalytique (Ban et al., 2000; Muth et al., 2000; Nissen et al., 2000). Il a donc été possible de démontrer que le ribosome est en fait un ribozyme, c'est-à-dire une enzyme tirant son pouvoir catalytique de l'ARN et non des protéines.

2. Composition et structure des ribosomes

Les ribosomes sont des complexes ribonucléo-protéiques (RNP) composés de deux sous-unités asymétriques appelées grande et petite sous-unité. Ces sous-unités sont définies par leur coefficient de sédimentation, chez les eucaryotes la grande sous-unité est la 60S (Svedberg) (50S chez les procaryotes) et la petite sous-unité est la 40S (30S chez les procaryotes). Lorsque ces deux sous-unités s'assemblent, elles forment le ribosome mature aussi appelé 80S (70S chez les procaryotes). Cette particule 80S est composée de quatre ARNr, formant le squelette du ribosome et qui représente 60 % de la masse totale de ce dernier, ainsi que 80 protéines ribosomiques (**Tableau 1**).

Chez les eucaryotes, la grande sous-unité ribosomique 60S est composée de trois ARNr qui sont les ARNr 5S, 5.8S et 25S/28S ainsi que 47 protéines (RPL). Quant à la petite sous-unité ribosomique 40S, elle comprend un seul ARNr le 18S associé à 33 protéines (RPS).

		Procaryotes		Eucaryotes	
		Bactérie	Archée	Levure	Mammifère
Espèce		<i>E. coli</i>	<i>H. marismortui</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
Ribosome mature	Coefficient Sédimentation	70S		80S	
	Masse (MDa)	2,4	2,6	3,3	4,3
	Nb protéines	54	57	79	80
	ARNr	3 ARNr: 4566 nt	3 ARNr: 4517 nt	4 ARNr: 5472 nt	4 ARNr: 7223 nt
Grande sous-unité	Coefficient Sédimentation	50S		60S	
	Nb protéines	33	33	46	47
	ARNr	23S: 2904 nt	23S: 2923 nt	25S: 3396 nt	28S: 5076 nt
		5S: 120 nt	5S: 122 nt	5S: 118 nt	5S: 121 nt
		-		5,8S: 158 nt	5,8S: 157 nt
Petite sous-unité	Coefficient Sédimentation	30S		40S	
	Nb protéines	21	24	33	33
	ARNr	16S: 1542 nt	16S: 1472 nt	18S: 1800 nt	18S: 1869 nt

Tableau 1 : Récapitulatif de la composition des ribosomes dans les 3 domaines du vivant.

Ces deux sous-unités ont des activités distinctes dans la traduction de l'information génétique des ARNm en protéine. En effet, la petite sous-unité est essentielle au décodage de l'ARNm en permettant l'appariement correct des ARN de transfert (ARNt) sur l'ARNm. Cette sous-unité est donc impliquée dans la fidélité de la traduction. Elle se caractérise par sa forme allongée et ses cinq domaines structuraux : la tête avec le bec, le corps, la plateforme et les pieds droit et gauche (**Figure 1A**). Dans la petite sous-unité se trouve également le sillon d'entrée de l'ARNm à décoder localisé entre la tête et le corps de la particule (**Figure 2 A, B**).

La grande sous-unité, est de forme globulaire et se compose d'un domaine central ainsi que trois protubérances qui sont la protubérance centrale, les tiges P et L1 (**Figure 1B**). Elle possède un centre peptidyl-transférase (PTC), qui permet de catalyser la formation des liaisons polypeptidiques entre les acides aminés. Cette activité est donc essentielle à l'élongation de la chaîne polypeptidique, aboutissant à la synthèse des protéines. À proximité du PTC, et traversant toute la grande sous-unité, se trouve aussi le tunnel de sortie des protéines néo-synthétisées (**Figure 2 B, C**).

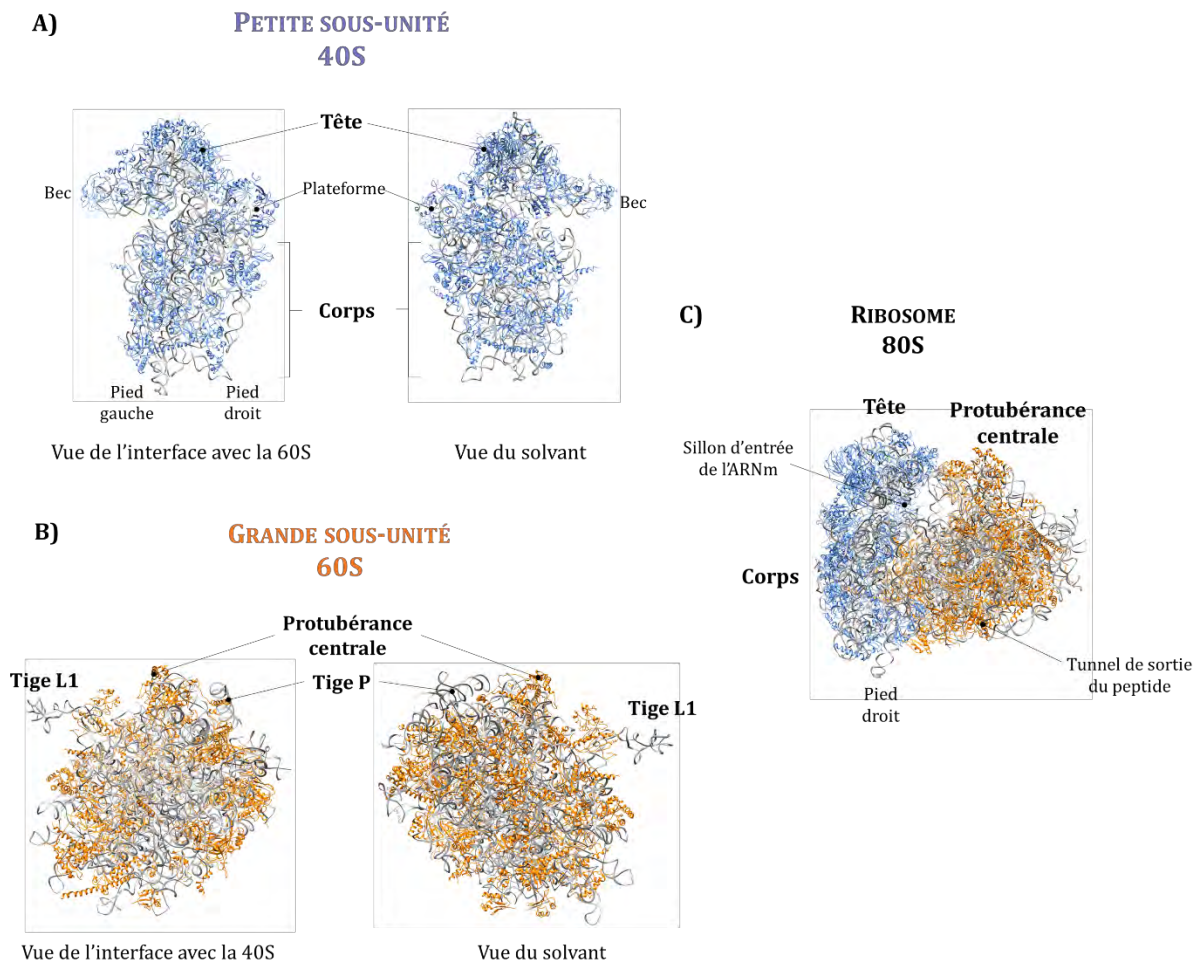


Figure 1 : Structures des sous-unités ribosomiques ainsi que du ribosome mature humain.

A) La petite sous-unité ribosomique 40S avec les protéines ribosomiques représentées en bleu et l'ARNr en gris. Les domaines caractéristiques sont annotés : la tête, le bec, la plateforme, le corps et les pieds. B) La grande sous-unité ribosomique 60S avec les protéines ribosomiques représentées en orange et l'ARNr en gris. Les domaines caractéristiques sont annotés : la protubérance centrale, les tiges P et L1. C) Le ribosome 80S avec la petite sous-unité en bleu et la grande sous-unité en orange sur lequel sont indiqués le sillon d'entrée de l'ARNm et le tunnel de sortie du peptide. (Réalisé à partir du fichier PDB : 4UG0)

Une fois assemblées en ribosome, à l'interface des deux sous-unités se trouvent les trois sites de liaisons des ARNt portant les acides aminés qui serviront à la synthèse protéique durant la traduction. Lors des étapes de la traduction, le site A (pour Aminoacyl-ARNt) est occupé par un ARNt portant l'acide aminé qui doit être incorporé à la chaîne polypeptidique, ensuite, c'est dans le site P (pour Peptidyl-ARNt) que vient se loger l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, enfin, le site E (pour Exit-ARNt) comprend un ARNt déacylé prêt à se dissocier de l'ARNm et du ribosome (**Figure 2**).

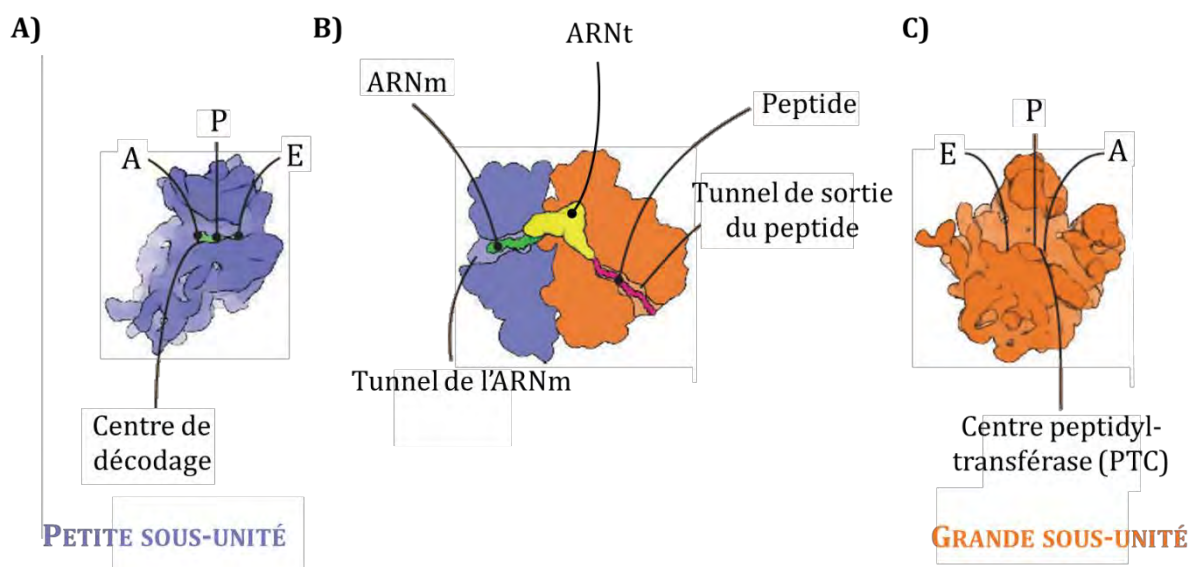


Figure 2 : Emplacement des sites de liaisons des ARNt, ainsi que des centres d'activités de traduction des deux sous-unités ribosomiques. A) Représentation de la petite sous-unité ribosomique en vue d'interface avec les sites de liaisons A, P et E ainsi que le centre d'activité de la traduction. **B)** Structure basse résolution du ribosome, avec la petite sous-unité représentée en bleu et la grande sous-unité en orange. Le sillon d'entrée de l'ARNm et le tunnel de sortie du peptide sont indiqués ainsi que les principaux acteurs de la traduction. **C)** Représentation de la grande sous-unité ribosomique en vue d'interface avec les sites de liaisons A, P et E ainsi que le centre d'activité de la traduction. (Adapté de Melnikov et al., 2012)

Bien que les aspects fondamentaux de la synthèse des protéines soient préservés dans tous les domaines du vivant, les ribosomes eucaryotes sont plus complexes et sont en moyenne 40 % plus gros que leurs homologues procaryotes. En effet, la masse du ribosome bactérien 70S est d'environ 2,5 MDa contre 3,2 MDa pour le ribosome 80S des eucaryotes unicellulaires et jusqu'à 4,3 MDa pour celui des eucaryotes supérieurs (**Tableau 1**). L'ensemble de ces ribosomes partagent un noyau structurel commun, conservé au cours de l'évolution, abritant les principaux centres fonctionnels des ribosomes, tels que le site de décodage, le centre de peptidyl transférase et les sites de liaison à l'ARNt. Mais la différence de taille s'explique par la présence de protéines ribosomiques supplémentaires, ainsi que d'addition de domaines sur des protéines conservées et de par la présence de segments d'extensions sur les ARNr (Anger et al., 2013; Klinge et al., 2012). Ces domaines additionnels spécifiques des eucaryotes forment des couches externes autour du noyau commun du ribosome (**Figure 3**).

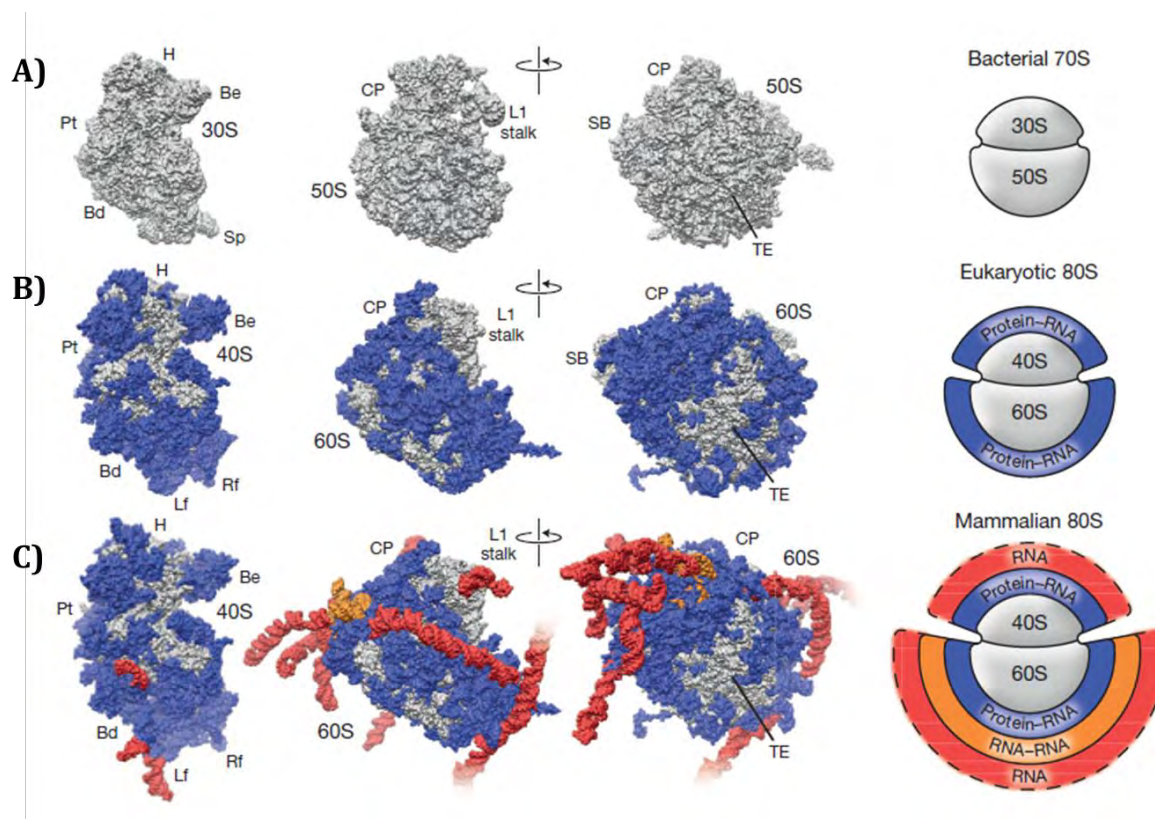


Figure 3 : Comparaison des sous-unités ribosomiques bactériennes (A), eucaryotes (B), eucaryotes supérieures (C). A), B), C) Représentation moléculaire et schématique des deux sous-unités ribosomiques. En A) du ribosome bactérien 70S de *Thermus thermophilus*, en B) du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae* et en C) du ribosome 80S d'*Homo sapiens*. En gris est représenté le cœur conservé du ribosome bactérien, en bleu les éléments protéiques et nucléotidiques supplémentaires chez la levure, en rouge et orange la couche supplémentaire chez les eucaryotes supérieurs. (Adapté d'Anger et al., 2013)

Il a déjà été montré que si tous les composants du ribosome bactérien étaient mélangés ensemble dans un ordre précis, celui-ci pouvait s'auto-assembler *in vitro* (Nomura, 1970). Ceci ne s'applique pas pour le ribosome eucaryote. En effet, la synthèse (biogenèse) des ribosomes eucaryotes requiert plus de 200 facteurs d'assemblage et de maturation, qui ont été caractérisés progressivement par différentes approches méthodologiques (Henras et al., 2008).

Du fait de la complexité des ribosomes eucaryotes, l'élucidation de leur structure a demandé plus de temps. La première structure à haute résolution (4,15 Å) du ribosome de levure a été obtenue en 2010 par cristallographie aux rayons X (Ben-Shem et al., 2010). Puis, un an plus tard, cette même équipe a réussi à obtenir une deuxième structure du ribosome de *S. cerevisiae* cette fois-ci à 3 Å de résolution, permettant ainsi d'acquérir de nouveaux détails structuraux afin de positionner l'ensemble des protéines ribosomiques eucaryotes (Ben-Shem et al., 2011).

La cryo-microscopie électronique (cryo-EM), a quant à elle permis une avancée majeure sur la détermination des structures de ribosomes eucaryotes et en particulier celle des ribosomes humains (**Figure 4**). En effet, les premières structures hautes résolutions de ribosomes humains ont été obtenues par cryo-EM. En 2013, une première structure a été élucidée à moyenne résolution ($\sim 5,4 - 6 \text{ \AA}$) (Anger et al., 2013), et c'est en 2015 que la première structure à l'échelle atomique du ribosome 80S humain a pu être résolue à 3 \AA de résolution (Khatter et al., 2015). La détermination de ces structures hautes résolution a été possible grâce à plusieurs avancées technologiques récentes de la microscopie électronique et de l'analyse d'images. La technique de cryo-microscopie électronique a été mise au point il y a environ 40 ans par Jacques Dubochet et ses collaborateurs (Dubochet et al., 1981). Cette méthode a pour principe de congeler instantanément l'échantillon biologique dans une glace vitreuse. Cette technique permet donc d'observer des particules dans un état hydraté proche de leur état natif, ce qui n'était jusqu'à présent pas le cas, que ce soit lors de l'observation de particules après coloration négative (coloration par des sels de métaux lourds) ou lors de la détermination de structures par cristallographie aux rayons X. Cette technique de préparation des échantillons associée à l'analyse des images par la méthode des particules isolées (SPA) a donc été essentielle dans la détermination des premières structures de complexes macromoléculaires tels que les ribosomes par cryo-EM.

Les toutes premières reconstructions 3D de ribosomes élucidées par cryo-EM ont été obtenues dans les années 90, avec, tout d'abord, le ribosome d'*E. coli* résolue à 40 \AA (Frank et al., 1991). Par la suite deux autres structures de ce même ribosome ont pu être élucidées tout en améliorant à chaque fois leur résolution, avec, en 1995, un modèle 3D obtenu à 23 \AA de résolution (Stark et al., 1995), puis cinq ans plus tard, une structure atteignant 11 \AA de résolution (Gabashvili et al., 2000). Il aura ensuite fallu attendre jusqu'en 2012, avec l'apparition d'un nouveau type de caméra, les détecteurs directs d'électrons, pour que les structures élucidées en cryo-EM puisse atteindre des résolutions comparables à celles obtenues par cristallographie aux rayons X. Ces détecteurs directs d'électrons, contrairement aux caméras CCD, ne nécessitent plus la conversion des électrons en photons. Les images acquises sont ainsi de meilleure qualité grâce à l'augmentation de leur rapport signal sur bruit. De plus, ce nouveau type de caméra permet l'acquisition des images en mode « movie » ce qui signifie qu'à la place de ne prendre qu'une seule image avec un temps d'exposition long, un film composé de plusieurs images rapides d'un même champ va être acquis. Cette nouvelle méthode d'acquisition permet après l'alignement et la somme des images du film, de corriger les mouvements de l'échantillon causés par son exposition au faisceau. Finalement ces détecteurs directs d'électrons permettent d'obtenir des images de plus

haute résolution dans lesquels le contraste et le rapport signal sur bruit sont augmentés (Brilot et al., 2012; Campbell et al., 2012).

Cette avancée technologique, couplée au développement de nouveaux programmes d'analyse d'images, a contribué à l'obtention des premières reconstructions 3D haute résolution par cryo-EM. En effet, un des problèmes majeurs limitant l'accès à la haute résolution vient du fait que la plupart des complexes biologiques possèdent une certaine hétérogénéité compositionnelle et conformationnelle. Cela se traduit par le fait qu'au sein d'un même échantillon, plusieurs états structuraux de l'objet sont présents. Ce phénomène a pour conséquence la perte d'informations au niveau de ces domaines hétérogènes. En effet, sans tri de cette hétérogénéité structurale, les domaines hétérogènes ne pourront pas s'aligner, ils formeront alors des « blobs » de basses résolutions qui ne permettent aucune interprétation, l'information de cette zone étant perdue. Pour pallier ce problème, de nouveaux algorithmes ont été développés sur la base des statistiques bayésiennes et sur le principe de maximum de vraisemblance. Il est depuis possible de trier l'hétérogénéité structurale des complexes biologiques par le biais d'une classification 3D non supervisée, ce qui a permis l'amélioration considérable de la résolution des reconstructions 3D (Scheres, 2012).

L'hétérogénéité structurale de l'échantillon, qui était initialement une limite, est finalement devenue la puissance de la cryo-EM car, contrairement à la cristallographie, il est maintenant possible d'obtenir des reconstructions 3D représentant plusieurs états structuraux d'un complexe présents au sein d'un même échantillon. De ce fait, l'étude structurale de ribosomes par cryo-EM permet de visualiser leur dynamique moléculaire, et ainsi mieux comprendre certains mécanismes tels que leur assemblage ou encore leur mode de fonctionnement dans la traduction (Brown and Shao, 2018).

Lors de ma thèse je me suis intéressée aux mécanismes entourant le ribosome, en partant de sa biogenèse à son rôle fonctionnel dans la synthèse protéique. La cryo-EM combinée à des études fonctionnelles est maintenant devenue une technique de choix dans la compréhension des mécanismes. En effet, on peut donner l'exemple des articles de (Ameismeier et al., 2020, 2018) et (Ma et al., 2017) qui ont pu décrire certaines des étapes de maturation de la petite et de la grande sous-unité ribosomique eucaryote, respectivement, grâce à la détermination de plusieurs structures de pré-ribosomes dans lesquelles des co-facteurs de maturation s'associent et se dissocient. De la même manière plusieurs étapes de l'élongation de la traduction ont pu être mises en évidence grâce à l'identification de différents intermédiaires de la traduction par l'étude des polysomes (Behrmann et al., 2015).

Finalement, l'ensemble de ces avancées a entraîné une révolution en terme de résolution. Par exemple, si l'on prend le cas du ribosome d'*E. coli*, ces progrès ont permis de passer d'une structure à basse résolution (40 Å : Frank et al., 1991) à des reconstructions 3D de très hautes

résolutions (2 Å : Watson et al., 2020). De plus, la détermination de la première structure d'un ribosome 80S humain a aussi été rendue possible par la cryo-EM, avec, en 2013, une première structure obtenue à une résolution moyenne (6 Å) (Anger et al., 2013). Puis deux ans plus tard, la première structure d'un ribosome humain à l'échelle quasi-atomique a été déterminée avec une résolution finale de 3,6 Å. Cela a permis de proposer un modèle atomique de la particule 80S humaine, grâce aux informations obtenues sur l'ARNr, sur les chaînes latérales des protéines ribosomiques ainsi que sur la localisation des sites de liaison des ARNt à l'interface entre les deux sous-unités (Khatter et al., 2015) (Figure 4).

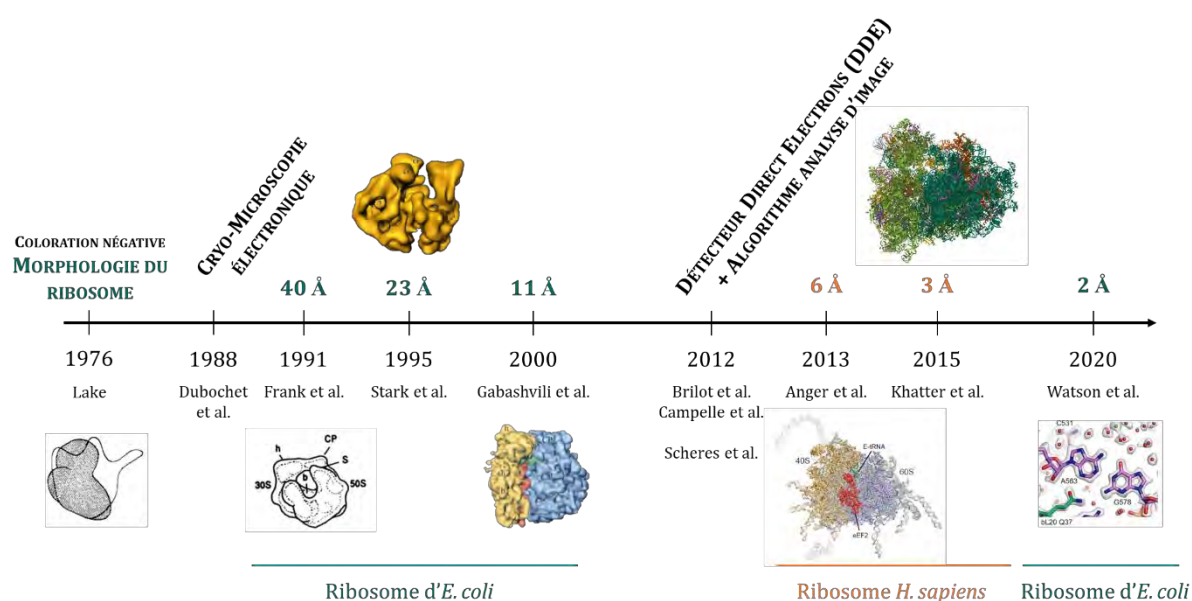


Figure 4 : Aperçu des avancées majeures de la microscopie électronique et de l'évolution de la résolution au fil des années, illustrées par les structures cryo-EM des ribosomes d'*E. coli* (en vert) ainsi que d'*H. sapiens* (en orange).

L'ensemble de ces structures obtenues par cristallographie aux rayons X ainsi que par cryo-microscopie électronique a aussi une importance d'un point de vue médical, elles peuvent aider à comprendre le mécanisme d'action de certains antibiotiques et leur mécanisme de résistance mais peuvent aussi être utiles dans le développement de nouveaux traitements pour des maladies liées aux ribosomes, telles que les ribosomopathies et certains cancers qui seront abordés par la suite (Garreau de Loubresse et al., 2014; Gilles et al., 2020). En effet, le ribosome joue un rôle central dans le fonctionnement normal d'une cellule, et des défauts de son assemblage et/ou de sa fonction dans la synthèse protéique peuvent entraîner une dérégulation de divers mécanismes cellulaires et contribuer à l'apparition de ces pathologies. Dans ce contexte, il est donc primordial d'avoir une connaissance précise des mécanismes moléculaires fondamentaux entourant l'assemblage et le fonctionnement des ribosomes, en conditions normales et

pathologiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit ma thèse. J'ai en effet été amenée à étudier les deux processus fondamentaux du ribosome à savoir sa biogenèse et son rôle dans la traduction, par des approches structures/fonctions. Au cours de mon premier projet, je me suis intéressée à comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les toutes dernières étapes de la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S chez l'humain. Le deuxième projet visait à caractériser les conséquences de mutations de protéines ribosomiques, à l'origine de cancers, dans les processus de traduction.

Par la suite, je m'attacherai donc à décrire de manière plus détaillée les mécanismes s'inscrivant dans mon projet de thèse. Une première partie est donc consacrée à la description de la biogenèse du ribosome et plus particulièrement à la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S, avec un focus sur les toutes dernières étapes se déroulant dans le cytoplasme. Puis dans la deuxième partie sera détaillé le processus de traduction, et plus particulièrement le mécanisme de l'élongation du ribosome en traduction, basé sur les dernières avancées d'un point de vue structural et fonctionnel permettant ainsi la compréhension des mécanismes moléculaires entourant ce processus. Enfin une dernière partie sera consacrée à la description des maladies causées par des défauts présents dans l'un des processus associés au ribosome à savoir sa biogenèse ou son rôle fonctionnel dans la traduction.

II. La biogenèse des ribosomes eucaryotes

1. Généralités

Comme présenté précédemment, le ribosome eucaryote est un complexe de très grande taille composé d'environ 80 protéines et de 4 ARN ribosomiques. Il est primordial que ces constituants s'assemblent de manière précise et contrôlée afin de former un ribosome mature fonctionnel pour la synthèse protéique. La biogenèse des ribosomes est donc un processus complexe, qui fait intervenir plus de 200 facteurs de maturation aussi appelés facteurs d'assemblage. Ces facteurs de maturation peuvent être des protéines ou bien des complexes snoARN/protéines (appelés snoRNPs). Lors de la biogenèse des ribosomes, ces facteurs de maturation s'associent aux pré-ribosomes à diverses étapes de leur maturation, puis se dissocient une fois leur tâche accomplie, ils ne sont donc pas retrouvés dans les sous-unités ribosomiques matures.

La biogenèse des ribosomes eucaryotes a été principalement étudiée chez la levure et plus particulièrement chez *S. cerevisiae*. Ce modèle est très utilisé car il peut être facilement manipulé en terme de génétique. Dans les années 1970, la mise en place de protocoles de purification associés à des analyses biochimiques a permis l'identification des protéines ribosomiques (Gould et al., 1972; Traugh and Traut, 1973). De plus, le marquage et l'analyse des ARNr sur gel d'électrophorèse ou par centrifugation ont aidé à mettre en évidence les principaux intermédiaires de maturation du pré-ARNr (Weinberg et al., 1967; Weinberg and Penman, 1970). Par la suite, plusieurs études menées ont permis l'identification de nombreux facteurs de maturation avec la caractérisation de leur rôle fonctionnel dans l'assemblage et l'export des sous-unités pré-ribosomiques ainsi que dans la maturation des pré-ARNr. Les premiers ont été isolés grâce en particulier à des criblages génétiques, puis la plupart d'entre eux ont été identifiés grâce à la mise en place de protocoles de purification des pré-particules par chromatographie d'affinité en tandem suivie d'analyse par spectrométrie de masse (Johnson et al., 2002; Kressler et al., 1999; Venema and Tollervey, 1999). Plus récemment, des criblages pangénomiques par perte de fonction (grâce à des siARN) ont permis d'établir une longue liste de protéines (plus de 300) impliquées directement ou indirectement dans la synthèse de la petite sous-unité ribosomique (Badertscher et al., 2015; Tafforeau et al., 2013; Wild et al., 2010).

La mise au point des protocoles de purification par affinité des particules pré-ribosomiques a permis par la suite de les caractériser que ce soit d'un point de vue fonctionnel ou structural (Kressler et al., 2008; Wyler et al., 2011). En effet, des particules pré-ribosomiques purifiées ont pu être analysées par cryo-EM afin d'obtenir leur structure, tout d'abord à moyenne résolution

(Johnson et al., 2017; Larburu et al., 2016; Sengupta et al., 2010; Strunk et al., 2011). Ensuite, grâce aux différents progrès de la cryo-EM (détaillés précédemment ; **Figure 4**), des structures de ces particules pré-ribosomiques ont pu être déterminées à des résolutions atomiques (Ameismeier et al., 2020, 2018; Cheng et al., 2020; Mitterer et al., 2019; Sanghai et al., 2018; Shayan et al., 2020). Les études structures/fonctions menées ont fourni des images spatio-temporelles détaillées des intermédiaires pré-ribosomiques et de leur composition, grâce notamment à la visualisation de l'architecture de ces pré-ribosomes ainsi que la présence de nombreux facteurs de maturation.

La formation des ribosomes chez les eucaryotes est un processus compartimenté, commençant dans le noyau et se terminant dans le cytoplasme. Schématiquement, la biogenèse des ribosomes débute dans le nucléole avec la transcription par l'ARN polymérase I de l'ADN ribosomique en un long précurseur polycistronique : le pré-ARNr (appelé 35S chez la levure et 47S chez l'Homme). Ce pré-ARNr primaire possède l'ensemble des séquences des ARNr formant le ribosome (18S, 25/28S, 5,8S) excepté l'ARNr 5S. Ce dernier est, quant à lui, transcrit par l'ARN polymérase III. Parallèlement, les ARNm codant pour les protéines ribosomiques ainsi que les facteurs de maturations sont eux transcrits par l'ARN polymérase II. Une fois ces ARNm transcrits, ils sont traduits dans le cytoplasme, afin de synthétiser les protéines ribosomiques et les facteurs de maturations qui seront ensuite, pour une grande partie, transportés dans le nucléole. Certaines des protéines ribosomiques vont être prises en charge par des protéines chaperons de leur synthèse à leur incorporation dans les pré-particules ribosomiques. C'est par exemple le cas de la protéine Rps3, qui est chaperonnée chez la levure par Yar1 (Koch et al., 2012). Ces protéines chaperons empêchent l'agrégation des protéines (leur évitant ainsi d'être dégradées) et évitent leur interaction prématurée et non spécifique avec des ARN, elles peuvent aussi prendre part à leur transport vers le noyau (pour revue : Pillet et al., 2017).

Chez la levure, les étapes précoces de la maturation du ribosome se déroulent dans le nucléole de manière co-transcriptionnelle. Le pré-ARNr primaire en cours de transcription s'associe donc à une grande partie des protéines ribosomiques ainsi que plusieurs facteurs de maturations et de snoRNP formant ainsi une particule 90S aussi appelée SSU processome. C'est dans cette particule 90S, que le pré-ARNr se replie correctement et est mûré par l'ajout de modifications médié par des snoRNP ou des enzymes. Par ailleurs, différents clivages sont réalisés par des endo- et exo-ribonucléases, ce qui aboutit à la séparation des deux précurseurs des sous-unités (Aubert et al., 2018). Les précurseurs de la petite sous-unité (pré-40S) ainsi que la grande sous-unité (pré-60S) suivent alors deux voies de maturation distinctes du nucléole vers le cytoplasme. Après l'export des deux particules pré-ribosomiques à travers le complexe de pore nucléaire, leur maturation est finalisée dans le cytoplasme (Henras et al., 2015, 2008). Chez la

levure, une particule pseudo-80S est formée par l'assemblage d'une particule pré-40S et d'une particule 60S pour les dernières étapes de maturation de la sous-unité 40S. Ceci n'a pas été montré chez l'Homme pour l'heure (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012) (**Figure 5**).

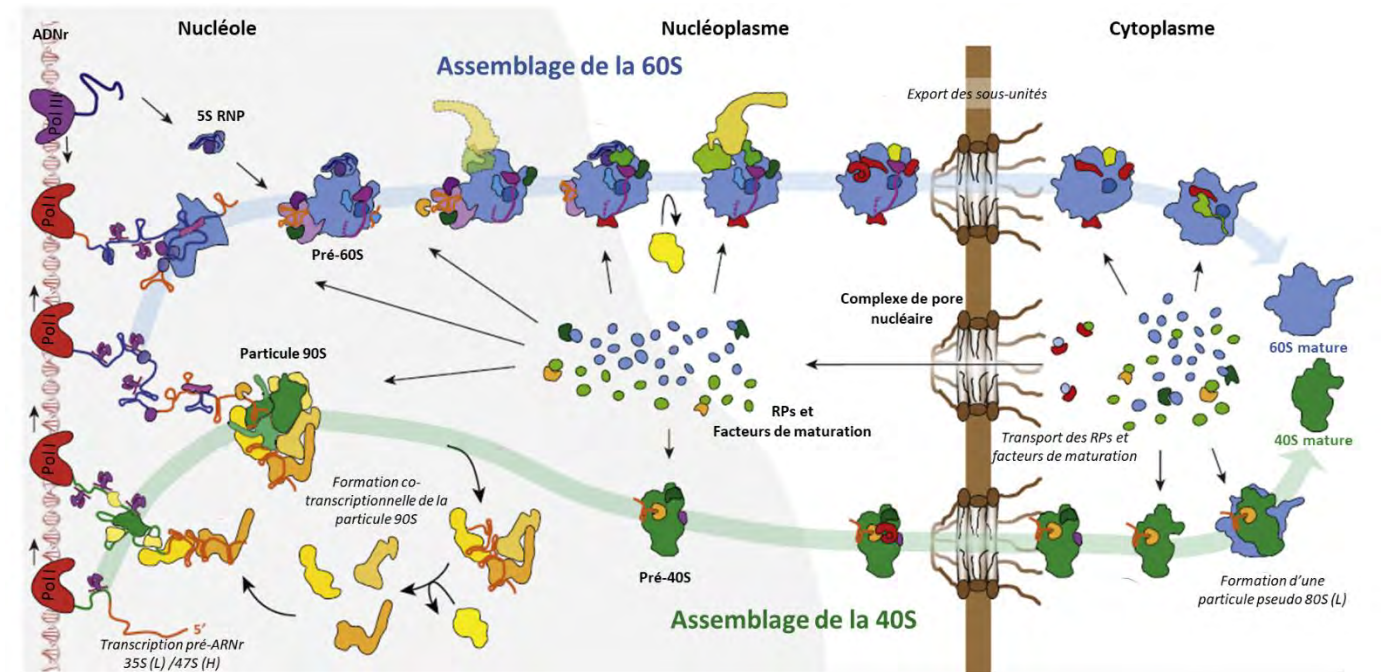


Figure 5 : Schéma général de la biogenèse des ribosomes chez la levure. En bleu sont représentés les étapes de maturation ainsi que les composants de la grande sous-unité ribosomique 60S et en vert les étapes de maturation et les composants de la petite sous-unité ribosomique 40S. En nuance de jaune, ou autres couleurs sont schématisés les facteurs de maturations, ainsi que les complexes snoRNP impliqués dans la maturation. Dans le cas de la levure, le clivage entre précurseurs de la petite et de la grande sous-unité intervient majoritairement pendant la transcription (Adapté de Kressler et al., 2017).

Par la suite, je m'attacherai à décrire les acteurs et la chronologie des étapes de la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S.

2. Les acteurs de la maturation de la petite sous-unité ribosomique

a. L'ARNr 18S

Les deux sous-unités ribosomiques se composent d'ARNr portant l'activité du ribosome ; dans la petite sous-unité ribosomique 40S est retrouvé l'ARNr 18S. La biogenèse des ribosomes débute avec la transcription, par l'ARN polymérase I, du pré-ARNr primaire appelé 47S chez l'Homme et 35S chez la levure. Dans ce long transcrit primaire se trouve (dans l'ordre 5'-3') les

séquences des ARNr 18S, 5.8S et 28S. Ces ARNr sont séparés les uns des autres par des séquences transcrites qui devront être éliminées au cours de la maturation pour pouvoir obtenir des ARNr matures. Concernant l'ARNr 18S, il est entouré de la séquence flanquante en 5' : 5'-ETS et en 3' de l'espaceur : ITS1 (**Figure 6A**).

Chez les eucaryotes, la maturation de l'ARNr 18S peut être décrite en trois grandes étapes : (i) la maturation de l'extrémité 5' avec l'élimination progressive de la séquence 5'-ETS, (ii) le clivage endonucléolytique dans l'ITS1 conduisant à la séparation avec le précurseur des ARNr de la sous-unité 60S (iii) l'élimination de ITS1 restant pour former l'extrémité 3' mature de l'ARNr 18S.

○ *Divergence levure vs humain*

Même si les grandes étapes de la maturation de l'ARNr 18S sont communes et relativement conservées entre la levure et l'Homme, il existe tout de même certaines divergences. Tout d'abord, la taille et la séquence des espaceurs varient d'une espèce à une autre, et même si les sites de clivage se trouvent localisés au niveau de structures secondaires similaires, ceci peut avoir pour conséquences la complexification des étapes de maturation chez l'Homme (Henras et al., 2015; Mullineux and Lafontaine, 2012). En effet, il a été montré que chez la levure, l'élimination de ces séquences se fait exclusivement grâce à l'intervention d'endoribonucléases, alors que chez l'Homme, la maturation de l'ARNr 18S fait intervenir à la fois des endoribonucléases et des exoribonucléases 3'-5' (Carron et al., 2011; Montellèse et al., 2017; Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013; Tafforeau et al., 2013). De plus, chez la levure les grandes étapes de la maturation de l'ARNr 18S présentés ci-dessus sont réalisés dans un ordre hiérarchique bien défini alors que chez l'Homme certaines des étapes semblent intervenir indépendamment les unes des autres, donnant lieu à plusieurs voies de maturation différentes (**Figure 8**).

Chez la levure, il a été montré que les étapes précoces de la maturation de l'ARNr se déroulent co-transcriptionnellement. En effet, une étude a montré qu'en phase exponentielle de croissance chez *S. cerevisiae*, 70 % des transcrits primaires sont clivés de manière co-transcriptionnelle dans l'ITS1 (Kos and Tollervey, 2010). Ce processus a pu être observé par microscopie électronique à transmission par étalement des gènes ribosomiques en transcription permettant la visualisation « d'arbres de Miller » (Miller and Brown, 1969; Osheim et al., 2004) (**Figure 6B**). Ces observations ont aussi permis de montrer que le pré-ARNr 18S se retrouve compacté en une grosse particule (appelée particule 90S ou SSU processome) pendant sa transcription pour ensuite être libéré de manière co-transcriptionnelle après clivage dans l'ITS1.

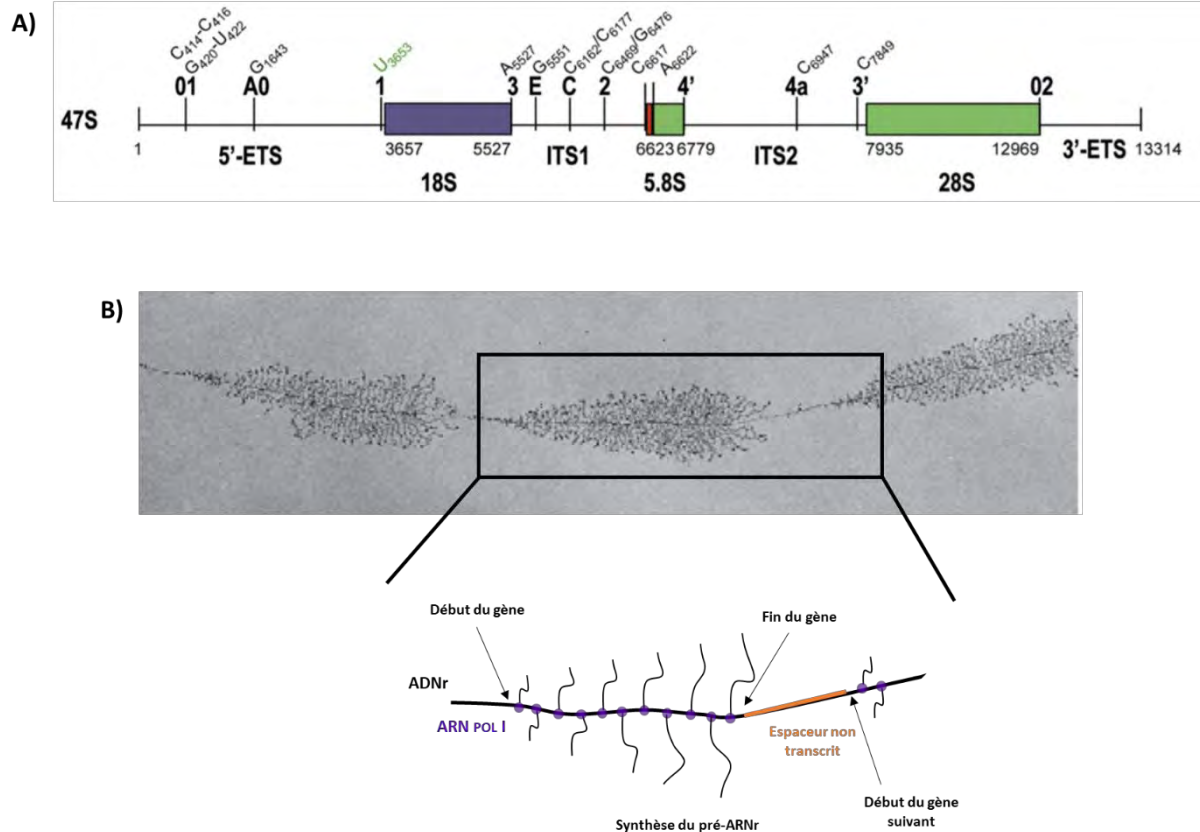


Figure 6 : L'ARNr 47S polycistronique. **A)** Transcrit primaire de l'ADN ribosomique chez l'humain avec les différents sites de clivages indiqués (Adapté de Mullineux et Lafontaine, 2012). **B)** Observation de l'ARNr en cours de transcription par microscopie électronique par étalement de gènes ribosomiques en cours de transcription (arbre de Miller ou « Christmas Tree ») et la représentation schématique de l'ARNr en cours de transcription.

L'assemblage de cette particule 90S ou SSU processome fait intervenir de nombreuses protéines ribosomiques, ainsi que des facteurs de maturation. La transcription s'effectuant de l'extrémité 5' vers 3', l'émergence du 5'-ETS entraîne le recrutement de plusieurs complexes de protéines appelés UTP (pour U Three Proteins) parmi lesquels UTP-A et UTP-B, ainsi que le snoRNP U3 (**Figure 7**). La formation de ce complexe permet à la fois le repliement correct de l'ARNr 18S, ainsi que les premières étapes de la maturation jusqu'au clivage dans l'ITS1 qui génère la séparation des deux sous-unités (Barandun et al., 2017). En parallèle de ces différents clivages, l'ARNr va aussi subir différentes modifications médiées par des snoRNP ainsi que des enzymes (ces modifications de l'ARNr seront abordées par la suite).

Tout comme chez la levure, la maturation de l'ARNr chez l'Homme comprend les étapes de repliement, de clivage et d'ajout de modifications. Il existe aussi la particule 90S ou SSU processome chez l'Homme jouant un rôle similaire à celui retrouvé chez la levure. De récentes structures cryo-EM de ce complexe SSU processome humain ont d'ailleurs permis de détailler

certaines de ces mécanismes (Singh et al., 2021). Il n'est pas encore clair si ces étapes, comme chez la levure, se font de manière co-transcriptionnelle et plus particulièrement le clivage de l'ITS1. Néanmoins, une étude a montré que chez la souris le clivage dans le 5'ETS se faisait co-transcriptionnellement, laissant penser que cela pourrait aussi arriver sous certaines conditions dans des cellules humaines (Lazdins et al., 1997).

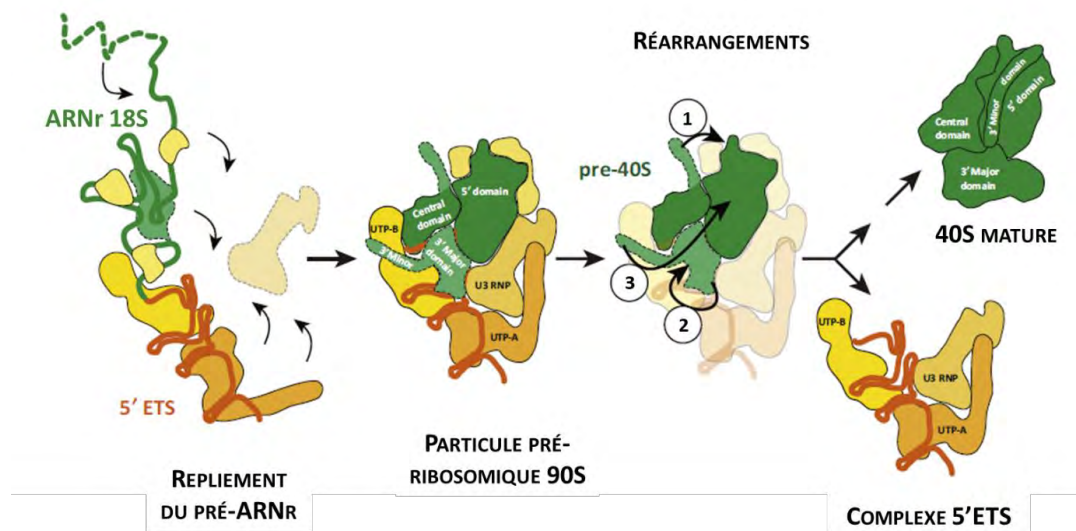
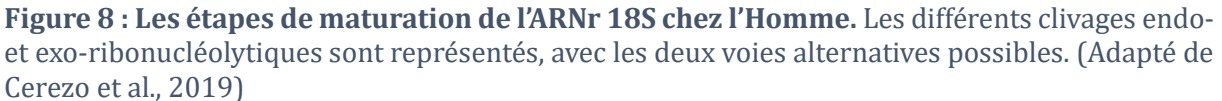


Figure 7 : Modèle de la formation de la particule 90S et les réarrangements à l'origine de la formation de la particule pré-40S. Les facteurs de maturations sont représentés en jaune, les éléments de la sous-unité ribosomique 40S sont quant à eux colorés en vert. L'ordre des réarrangements sont indiqués par des numéros. (Adapté de Kressler et al., 2017).

Par la suite je vais me consacrer à décrire les étapes de la maturation de l'ARNr 18S chez l'Homme, qui est l'organisme étudié dans mes travaux de thèse. Des revues sont disponibles qui détaillent ces étapes chez la levure (Cerezo et al., 2019; Henras et al., 2015).

○ La maturation de l'ARNr 18S chez l'Homme

Dans les cellules humaines, la maturation de l'ARNr 18S débute, une fois le long précurseur primaire 47S transcrit, par les clivages aux sites A' et 02 situés dans le 5'-ETS et 3'-ETS, respectivement, donnant ainsi naissance à un pré-ARNr 45S. Le site A', également appelé 01, se situe à environ 400 nucléotides de l'extrémité 5' du pré-ARNr, proche d'une région très conservée connue pour avoir des sites de liaisons avec le snoARN U3 (Borovjagin and Gerbi, 2004). L'enzyme catalysant ce clivage n'est, à ce jour, pas connue mais pourrait très certainement faire partie du SSU processome. Par la suite, comme indiqué précédemment, la maturation se divise en deux voies alternatives selon l'ordre des clivages suivants (**Figure 8**).



29

clivage est réalisé par la RNase MRP (pour Mitochondrial RNA Processing) ou RMRP (Goldfarb and Cech, 2017). Le pré-ARNr 30S ainsi formé nécessite ensuite l'élimination du reste de la séquence 5'-ETS ainsi que l'ITS1. La séquence 5'-ETS est éliminée grâce à un premier clivage au niveau du site A0 du pré-ARNr 30S, donnant naissance au pré-ARNr 26S. Ce dernier sera ensuite clivé au site 1 afin de générer l'extrémité 5' mature de l'ARNr 18S. Ces clivages aux sites A0 et 1 sont coordonnés entre eux, ceci est indiqué par le fait que le précurseur 26S est retrouvé en faible abondance comparé aux autres pré-ARNr. L'enzyme responsable du clivage au site 1 a été récemment identifiée, il s'agit d'un composant du SSU processome : l'endoribonucléase hUTP24 qui possède un domaine PIN. hUTP24 est aussi impliquée dans le clivage au site E (Tomecki et al., 2015; Wells et al., 2016). Cette enzyme serait aussi requise pour le clivage au site A0, même si son activité catalytique n'est pas nécessaire à cette étape. L'endoribonucléase qui clive le site A0 n'a pas encore été identifiée. La protéine hUTP23, qui possède un domaine PIN spécifique des endoribonucléases, est impliquée dans le clivage au site A0. Néanmoins, ce domaine PIN est dégénéré, et il n'est pour l'instant pas prouvé que hUTP23 est l'enzyme qui effectue directement le clivage, elle pourrait tout aussi bien être un cofacteur nécessaire au clivage (Wells et al., 2017).

La voie alternative, quant à elle, débute par l'élimination du 5'-ETS grâce aux clivages consécutifs aux sites A0 et 1 donnant naissance au pré-ARNr 41S qui sera ensuite clivé au site 2 afin d'être séparé des pré-ARNr de la grande sous-unité ribosomique.

Finalement les deux voies convergent vers la production du pré-ARNr 21S dont l'extrémité 5' correspond à celle de l'ARNr 18S, mais qui possède toujours un morceau d'ITS1 à éliminer en 3'.

Les étapes qui suivent, permettent de générer une extrémité 3' mature de l'ARNr 18S en éliminant l'ITS1, et font intervenir à la fois des endoribonucléases mais aussi des exoribonucléases, ce qui n'est pas le cas pour la levure.

Une fois le clivage au site 2 réalisé, l'extrémité 3' du pré-ARNr 21S est « grignotée », permettant de générer le 21S-C (Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013). Il a été proposé que l'exo-ribonucléase RRP6, qui appartient au complexe de l'exosome, pourrait participer à ce processus sur la base d'expérience de perte de fonction, mais son implication à plusieurs étapes de la maturation des ribosomes et dans le métabolisme des ARN nucléaires rend l'analyse difficile. La progression de l'exoribonucléase semble être stoppée par un domaine hautement conservé présent dans les séquences de l'ITS1 des mammifères, qui peut adopter un repliement particulier et/ou se lier à des facteurs de maturation, bloquant ainsi son activité (Preti et al., 2013). Par la suite, le pré-ARNr 21S-C est clivé au site E par l'endoribonucléase hUTP24, générant le précurseur 18S-E. Ce site E a pu être localisé grâce à des techniques de 3' RACE et extension d'amorces aux nucléotides 78 et 81 (Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013). À cette étape, le pré-ARNr 18S-E possède encore une extension en 3' d'environ 80 nucléotides, cette extension va être en partie grignotée grâce à

l'activité exoribonucléotidase de PARN (pour Poly-A RiboNucléase) (Montellese et al., 2017). Ces particules pré-40S composées du pré-ARNr 18S-E sont ensuite exportées vers le cytoplasme où les dernières étapes de maturation pourront avoir lieu. L'étape catalysée par PARN n'est pas strictement nécessaire à l'export de la pré-40S dans le cytoplasme, mais elle faciliterait tout de même le transport de la particule (Montellese et al., 2017). Une fois que PARN s'est dissociée et la pré-40S exportée dans le cytoplasme, les toutes dernières étapes de la maturation de l'extrémité 3' peuvent avoir lieu. La dégradation par une exoribonucléase 3'-5' se poursuit dans le cytoplasme, ce qui est potentiellement couplé avec l'ajout d'uridines en 3' par une terminal uridyl transférase (TUTase). L'exoribonucléase responsable du grignotage de ce pré-ARNr 18S-E oligo uridylé en 3' n'a pas encore été identifiée (Montellese et al., 2017; Preti et al., 2013).

Enfin, la dernière étape de maturation du pré-ARNr 18S-E consiste en son clivage au site 3 par le domaine PIN de l'endoribonucléase NOB1, formant ainsi un ARNr 18S mature (Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013). L'activité catalytique de NOB1 a été montrée *in vitro* chez la levure (Pertschy et al., 2009) et chez l'humain son activité *in vitro* semble potentialisée en présence du facteur de maturation hCINAP (Bai et al., 2016).

○ Les modifications de l'ARNr

Lors de leur maturation, les ARNr subissent des modifications, les plus abondantes sont la 2'-O méthylation et la pseudo-uridylation. Chez l'Homme, environ 100 modifications de chaque type ont été décrites (Krogh et al., 2016; Lestrade and Weber, 2006; Piekna-Przybylska et al., 2007).

Les 2'-O méthylations et les pseudo-uridylation sont pour la majeure partie apportées par des snoRNP, nommées snoRNP à boîte C/D et à boîte H/ACA respectivement (Ganot et al., 1997; Kiss-László et al., 1996; Ni et al., 1997; Watkins and Bohnsack, 2012). Ces snoRNP sont des complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels se trouvent des snoARN qui ont pour rôle de guider le complexe vers le nucléotide à modifier, en s'appariant sur le pré-ARNr. Les autres composants de ces complexes sont des protéines qui portent pour la plupart des fonctions structurales en stabilisant le snoARN ainsi que le complexe sur le nucléotide à modifier. Pour chaque type de snoRNP se trouve aussi une enzyme qui catalyse la réaction de modification. Concernant les snoRNP à boîte C/D, la fibrillarine ou Nop1 est la méthyltransférase qui permet l'ajout d'un groupement méthyle sur l'oxygène du carbone 2 d'un ribose (Tollervey et al., 1993). Quant aux snoRNP à boîte H/ACA, l'enzyme responsable de l'isomérisation d'une uridine en pseudo-uridine est la pseudo-uridine synthétase appelée dyskérine ou Cbf5p (Lafontaine et al., 1998).

Ces modifications sont principalement présentes dans des zones fonctionnelles du ribosome, tels que les sites de liaisons aux ARNt, le centre de décodage, le centre de peptidyltransférase ainsi

qu'à l'interface entre les sous-unités (**Figure 9**) (Decatur and Fournier, 2002; Natchiar et al., 2017). Des études récentes ont montré l'existence d'une couche supplémentaire de modifications additionnelles de l'ARNr spécifiques à l'humain (Natchiar et al., 2017; Taoka et al., 2018).

La disposition de ces modifications dans le ribosome suggère très fortement qu'elles ont un rôle dans la fonction du ribosome. En effet, certaines modifications ont été montrées importantes pour maintenir la fidélité de la traduction (Baudin-Baillieu et al., 2009; Baxter-Roshek et al., 2007), ainsi que réguler la traduction de certains ARNm par initiation IRES-dépendante. En cas de dérégulation cela pourra donner lieu à l'apparition de ribosomopathies en augmentant la traduction d'oncogènes et en diminuant celle de gènes codant pour des facteurs suppresseurs de tumeurs (ce point sera abordé plus en détail dans la partie IV de l'introduction) (Basu et al., 2011; Yoon et al., 2006). Ces modifications permettraient de stabiliser les structures secondaires et tertiaires de l'ARNr (Decatur et al., 2002), elles seraient donc aussi nécessaires au repliement correct du pré-ARNr et joueraient aussi un rôle dans l'assemblage des ribosomes (King et al., 2003; Natchiar et al., 2017).

Il existe d'autres modifications qui sont ajoutées au pré-ARNr par des enzymes indépendamment de l'intervention des snoRNP. Ainsi, il a été montré chez la levure, que la méthyltransférase Dim1 permettait la diméthylation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme (Lafontaine et al., 1995, 1998). Chez l'Homme, DIM1, l'orthologue de Dim1, est quant à elle responsable de la diméthylation du pré-ARNr dans le noyau. Contrairement à la levure, elle n'est pas retrouvée dans les particules pré-ribosomiques cytoplasmiques (Zorbas et al., 2015). Il est intéressant de préciser que ces facteurs de maturations sont aussi impliqués dans le bon déroulement des étapes de maturation du pré-ARNr, indépendamment de leur activité catalytique.

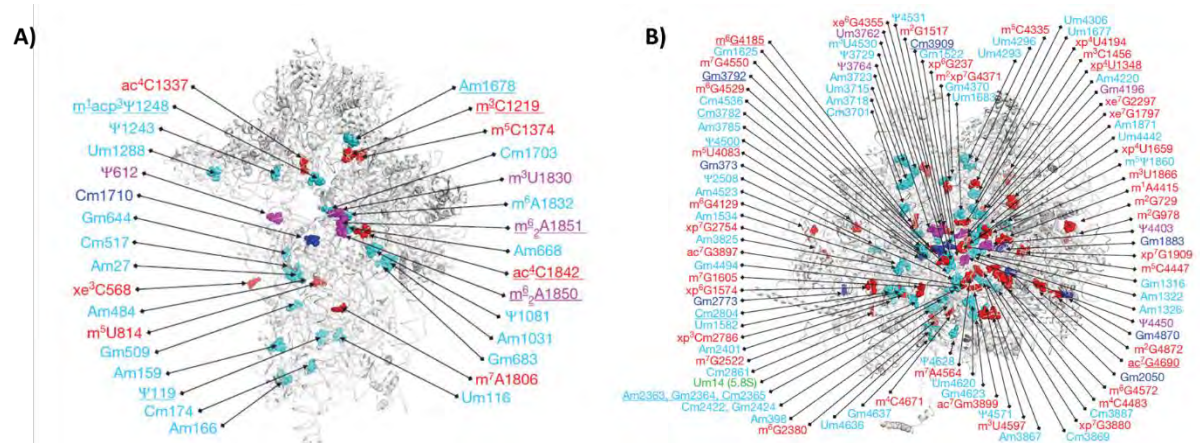


Figure 9 : Visualisation des modifications des ARNr chez l'Homme. A) Modifications présentes sur l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique 40S. B) Modifications apportées sur l'ARNr 28S de la grande sous-unité ribosomique 60S. En violet sont représentés les sites conservés entre la bactérie *E. coli* et l'humain ; en bleu clair, les sites prédits et observés dans la structure ; en bleu foncé les sites de méthylation non prédits mais observés et en rouge les autres sites de modifications de nucléotides non prédits mais observés. (Adapté de Natchiar et al., 2017).

b. Les protéines ribosomiques

Les protéines ribosomiques sont produites dans le cytoplasme une fois leur ARNm transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II. La grande majorité de ces protéines ribosomiques doivent être transportées vers le noyau, au travers du complexe de pore nucléaire, afin de s'assembler aux pré-ARNr à différents stades de maturation et former ainsi des particules pré-ribosomiques.

Lors de la synthèse des RP dans le cytoplasme, certaines d'entre elles vont directement être prises en charge par des protéines chaperons, afin d'être protégées de l'agrégation et/ou de la dégradation. Par exemple, la protéine Rps3 chez la levure s'associe au cours de sa synthèse, avec la protéine chaperon Yar1 (Mitterer et al., 2016; Pausch et al., 2015). Il a été montré que Yar1 protège Rps3 de l'agrégation (Koch et al., 2012). Ce complexe ainsi formé sera ensuite pris en charge par des importines, dont la plus représentée est la caryophérine β , Kap 123, afin de traverser le complexe de pore nucléaire. De manière générale, une fois le transport vers le noyau assuré, l'association de Ran-GTP avec l'importine β entrera en compétition avec le complexe transporté provoquant sa libération dans le noyau. Concernant Rps3, sa protéine chaperon Yar1 pourra ensuite l'emmener jusqu'à la particule pré-40S pour y permettre son intégration (Koch et al., 2012; Mitterer et al., 2016).

Chez la levure, il a été montré que la protéine chaperon Tsr2, de manière différente à Yar1, prenait en charge la protéine ribosomique Rps26 après son importation dans le noyau, et non dès sa traduction dans le cytoplasme. Elle permettrait la dissociation de Rps26 avec l'importine qui l'a transportée, sans l'intervention de Ran-GTP (Schütz et al., 2014). Tsr2 aiderait ensuite le transfert de Rps26 vers les particules pré-ribosomiques et empêcherait sa dégradation (Peña et al., 2016; Schütz et al., 2018).

Pour l'heure les données obtenues chez l'Homme n'ont pas permis l'identification d'un homologue humain de Yar1. En revanche des essais de double hybride ont montré que hTSR2, l'orthologue humain de Tsr2 interagirait avec RPS26 (Rual et al., 2005). Ceci pourrait suggérer qu'elle joue un rôle de chaperone aussi chez l'humain. Mais à ce jour, aucune protéine chaperon impliquée dans la protection de protéine ribosomique de la petite sous-unité, n'a été clairement caractérisée.

Les données *in vitro* obtenues lors de la reconstruction du ribosome bactérien ont mis en évidence le caractère hiérarchique, séquentiel et coopératif de la biogenèse des ribosomes. En effet, les RP s'associent les unes après les autres, les plus précoces permettant aux plus tardives de pouvoir prendre leur place (Nomura, 1970). Même si aucune fonction précise de ces RP n'a encore été réellement montrée à l'échelle moléculaire, leur déplétion induit des problèmes de maturation de l'ARNr, elles sont requises pour la maturation et le repliement correct de l'ARNr

(O'Donohue et al., 2010). Il a aussi été montré que certaines RP pouvaient être requises pour l'export des particules pré-ribosomiques vers le cytoplasme (Ferreira-Cerca et al., 2005; Léger-Silvestre et al., 2004; Rouquette et al., 2005). Il est intéressant de noter que lors de mon projet de thèse j'ai d'ailleurs pu décrire la fonction précise de la protéine ribosomique RPS26 dans la maturation de la petite sous-unité 40S (Cf. Résultat partie I.).

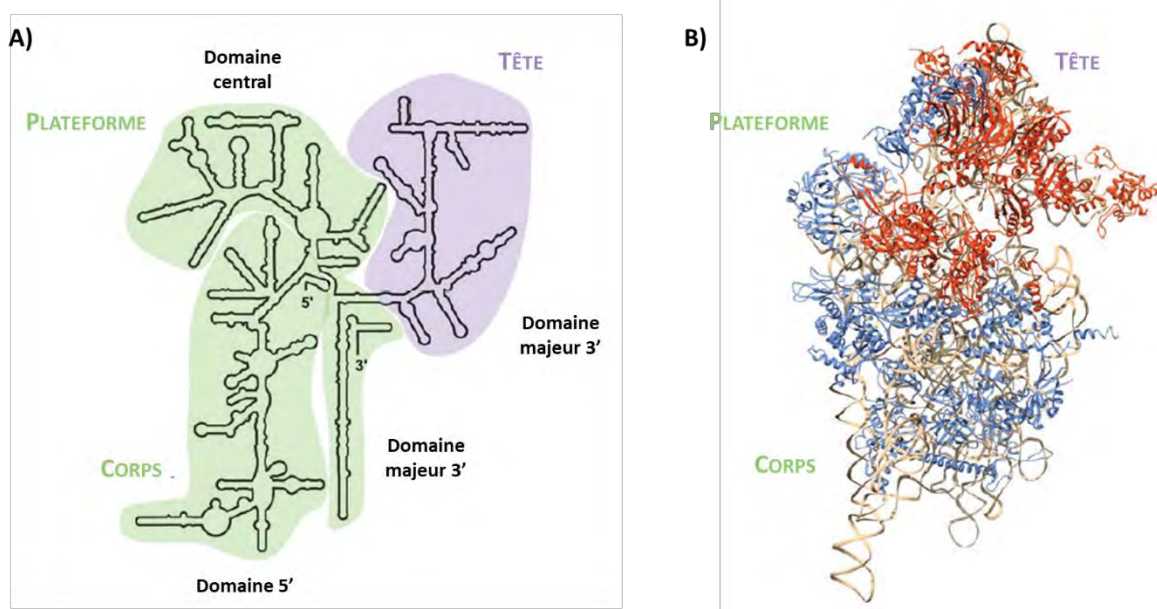


Figure 10 : Localisation des protéines ribosomiques nécessaires pour les étapes précoces de maturation du pré-ARNr (iRPs) ou pour des étapes plus tardives (pRPs). **A)** Structure secondaire de l'ARNr 18S formant les domaines caractéristiques de la sous-unité 40S : la tête, le bec (représentés en violet), et la plateforme ainsi que le corps (représenté en vert). **B)** Localisation des deux catégories de protéines ribosomiques : les iRPs (colorées en bleu) et les pRPs (colorées en rouge) sur la structure de la sous-unité 40S (PDB : 4V6X). L'ARNr 18S est représenté en jaune. (Adapté de Henras et al., 2015)

Comme nous l'avons vu, l'assemblage des RP à l'ARNr lors de la formation des ribosomes est un processus hiérarchique et séquentiel. L'ordre d'assemblage des RPS humaines a été étudié de manière systématique en 2010, en décrivant le rôle des RPS dans la maturation de l'ARNr et l'ordre dans lequel ils intervenaient. Ceci a été rendu possible grâce à la déplétion, par ARN interférent (siARN), de chacune des protéines ribosomiques une à une, suivie par l'analyse de l'ARNr 18S et de ses précurseurs par Northern Blot, et analyse de l'assemblage des sous-unités ribosomiques par gradients de saccharose (O'Donohue et al., 2010). Les premières RP à s'associer, 16 au total, sont nommées iRPs (pour initiation RPs) et s'assemblent dans le noyau au domaine 5' de la séquence de l'ARNr 18S, formant ainsi le corps de la particule (**Figure 10**). La déplétion de ces iRPs entraînent l'accumulation des précurseurs 45S et 30S de l'ARNr 18S, signifiant que ces iRPs sont requises aux étapes de maturation précoces de l'ARNr 18S précédant le clivage au site 2.

Parmi les iRPs, RPS9, RPS11 et RPS23 encadrent l'extrémité 5' de l'ARNr 18S permettant ainsi son positionnement correct pour les clivages en A0 et 1. Vient ensuite la formation de la tête grâce à l'assemblage des pRPs (pour progression RPs) qui se lient au niveau du domaine 3' majeur de l'ARNr 18S dans le nucléoplasme et le cytoplasme (**Figure 10**). Cette catégorie peut être sous-divisée en deux, avec d'un côté les protéines impliquées dans les étapes intermédiaires de clivage, pour lesquels leur déplétion provoque l'accumulation nucléaire du pré-ARNr 21S et donc un défaut de clivage au site E. Parmi ces protéines, RPS15 et RPS17 sont requises à l'export de la pré-40S, confirmé par des études réalisées chez la levure et l'humain (Ferreira-Cerca et al., 2007; Léger-Silvestre et al., 2004; Rouquette et al., 2005). De l'autre côté, les RP requises aux étapes tardives cytoplasmiques de la maturation de l'ARNr 18S montré par l'accumulation du précurseur de l'ARNr 18S-E après leur déplétion indiquant un défaut de clivage au site 3, c'est le cas des protéines ribosomiques RPS10, RPS12 ou encore RPS26 (**Figure 11**). Des données similaires ont été obtenues chez *S. cerevisiae* (Ferreira-Cerca et al., 2007, 2005).

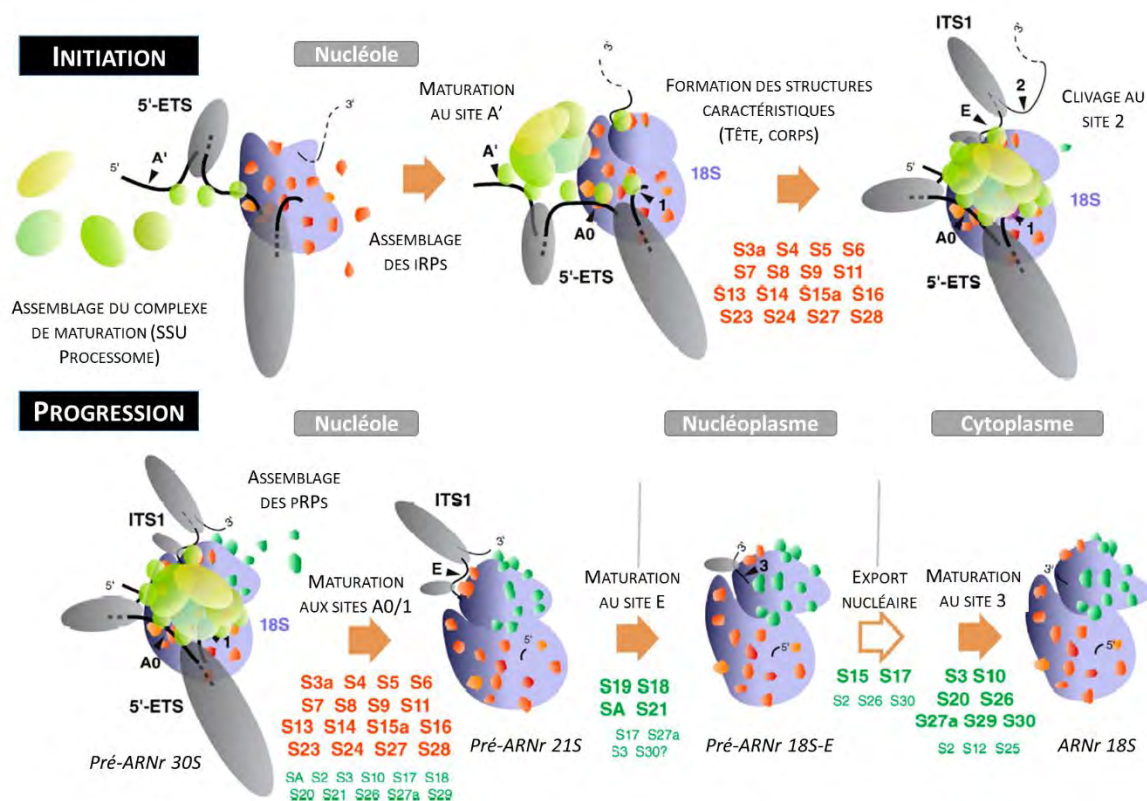


Figure 11 : Ordre d'association des protéines ribosomiques iRPs et pRPs dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S chez l'Homme. Les iRPs sont représentés en rouge et les facteurs de maturation en bleu et s'associent avec le pré-ARNr permettant son repliement correct et le clivage du 5'-ETS. L'association des pRPs représentés en vert entraînent les clivages aux sites A0 et 1 puis le clivage au site E. Les particules pré-40S sont ensuite exportées dans le cytoplasme afin de subir les dernières étapes de maturation (Adapté de O'Donohue et al., 2010).

c. Les facteurs de maturations

La synthèse des ribosomes nécessite, en plus des constituants ribosomiques (RP et ARNr) et des snoRNP, de nombreux facteurs de maturation. Ces facteurs de maturation permettent le repliement et la maturation de l'ARNr, ainsi que l'assemblage des protéines ribosomiques. Ils interagissent de manière transitoire avec le ribosome tout au long des étapes de maturation, du noyau jusqu'au cytoplasme et ne sont pas retrouvés dans les sous-unités ribosomiques matures.

Chez la levure environ 160 à 200 facteurs d'assemblages ont été décrits. Chez l'Homme, l'identification des facteurs de maturation des ribosomes a été possible grâce à plusieurs analyses basées sur l'extinction de gènes (par ARN interférent) couplée à du criblage haut débit. Ces données ont permis de montrer à la fois une certaine conservation entre l'Homme et la levure mais aussi quelques divergences (Badertscher et al., 2015; Farley-Barnes et al., 2018; Tafforeau et al., 2013; Wild et al., 2010). Même si ces criblages haut-débit ont aidé à lister les facteurs de maturation impliqués dans la maturation du ribosome, leur fonction pour une grande majorité d'entre eux reste encore à élucider. Une grande partie des facteurs de maturations caractérisés possèdent une activité enzymatique telle que : GTPase, ATPase, kinase, méthyltransférase, hélicase ou encore nucléase (Strunk and Karbstein, 2009). D'autres facteurs de maturation ne possèdent pas d'activité enzymatique décrite mais sont très souvent des protéines présentant des domaines de liaison aux acides nucléiques (Zinc finger, motif de reconnaissance à l'ARN (ou RRM), domaine KH...) ou aux protéines (HEAT, TPR, HAT).

Par la suite je m'attacherai à décrire certaines de ces activités enzymatiques en m'appuyant sur des exemples concrets de facteurs de maturation impliqués dans les toutes dernières étapes de la maturation de la petite sous-unité ribosomique humaine.

Dans la maturation de la pré-40S, il existe des facteurs de maturation portant une activité **kinase**, c'est le cas chez l'homme des isoformes δ et ϵ de la caséine kinase 1 (CK1 δ/ϵ), protéines orthologues d'Hrr25 chez la levure, qui ont pour rôle de phosphoryler les facteurs de maturation ENP1 et LTV1 permettant ainsi la dissociation de ce dernier des particules pré-40S. Ce processus permet aussi à RPS3 de prendre sa position finale sur la particule pré-40S menant à la formation du bec mature de la 40S grâce à l'association subséquente de la protéine ribosomique RPS10 (Ghalei et al., 2015; Schäfer et al., 2006; Zemp et al., 2014).

Parmi les facteurs de maturation ayant des activités enzymatiques, la famille des protéines RIO est conservée dans les trois domaines du vivant. Dans cette famille, Rio1 et Rio2 sont retrouvées chez les archées et les eucaryotes, et chez les eucaryotes supérieurs RIO3 est aussi

présent. Initialement, la famille des protéines RIO a été classée comme des kinases atypiques sur la base de similarités à la fois structurales et de séquences (Esser and Siebers, 2013; LaRonde-LeBlanc et al., 2005; LaRonde-LeBlanc and Wlodawer, 2005). En effet, ces protéines partagent toutes un domaine catalytique commun, le domaine RIO, structuralement apparenté au domaine des protéines kinases eucaryote (ePK). Tout comme le domaine catalytique des ePKs canoniques, le domaine RIO consiste en un domaine N-terminal formé de 5 feuillets- β antiparallèles (β 1-5) avec une hélice- α (α C) entre les feuillets β 3 et β 4. Ce sous-domaine est connecté au domaine C-terminal, constitué de trois hélices α (α E, α F, α G) et deux brins β en épingle à cheveux (β 6-7), par une région charnière (« hinge region ») (**Figure 12A**). Mais ce domaine RIO correspond à une forme tronquée du domaine des ePKs : il lui manque certaines caractéristiques clés des ePKs canoniques, tels que les sous-domaines impliqués dans l'activation de l'enzyme et dans la liaison au substrat (LaRonde-LeBlanc and Wlodawer, 2005). Dans ce contexte, et grâce à des études structurales et fonctionnelles supplémentaires sur les protéines de la famille Rio chez les eucaryotes, cette classification a été remise en cause, pour classer les protéines Rio comme des **ATPases** (Ferreira-Cerca et al., 2014, 2012; Knüppel et al., 2018; Turowski et al., 2014). Tout d'abord, le domaine RIO, en plus de son domaine ePK raccourci, possède aussi des éléments structuraux spécifiques aux protéines RIO, comme la boucle flexible et la boucle de liaison au phosphate (P-loop) (**Figure 12A**). Ce domaine RIO est aussi flanqué d'autres éléments supplémentaires spécifiques à chacune des sous-familles. Les structures obtenues ont montré la présence d'un intermédiaire dans lequel se trouvait un ADP et un phospho-Aspartate (P-Asp), une caractéristique partagée par les ATPases de type P (Ferreira-Cerca et al., 2014, 2012; Kühlbrandt, 2004) (**Figure 12B**). De plus, à ce jour aucune donnée n'a permis d'identifier de substrats phosphorylable par des protéines RIO. Cependant, l'activité ATPase de Rio1 et Rio2 a pu être mesurée ainsi que leur activité d'autophosphorylation *in vitro* (Ferreira-Cerca et al., 2014, 2012; Widmann et al., 2012). Les protéines RIO1 et RIO2 sont impliquées dans les dernières étapes cytoplasmiques de la maturation de la petite sous-unité ribosomique eucaryote (Geerlings et al., 2003; Rouquette et al., 2005; Vanrobays et al., 2003, 2001; Widmann et al., 2012). De plus, des expériences de co-purification de pré-40S par l'utilisation des protéines RIO1 ou RIO2 comme appât, montrent que les deux protéines ne sont jamais retrouvées ensemble sur les pré-40S. Ces données permettent de suggérer que RIO1 viendrait remplacer RIO2 sur les particules pré-40S durant les étapes de maturation (Widmann et al., 2012; Zemp et al., 2009).

Concernant RIO1, elle intervient dans les étapes finales de la maturation de la petite sous-unité ribosomique et de la maturation de l'ARNr 18S. Elle s'associe aux particules pré-40S de manière très tardive, et est localisée au même endroit que RIO2 qui intervient dans les étapes précédentes de la maturation de la particule pré-40S (Ameismeier et al., 2020, 2018). Cette association se fait de manière transitoire puisque l'utilisation de RIO1 comme appât protéique ne permet de co-

purifier que très peu de particules pré-40S en condition sauvage. Cependant, l'inactivation de son activité ATPase par une mutation dans le site catalytique (D324A) entraîne la stabilisation de RIO1 sur les particules pré-40S (Widmann et al., 2012). De plus, la présence de cette mutation ou l'absence de la protéine entraîne un défaut du clivage de l'ARNr 18S au site D/3 et empêche le relargage de NOB1 et DIM2 chez la levure et l'humain (Ferreira-Cerca et al., 2014; Turowski et al., 2014; Widmann et al., 2012). Ces données permettent de montrer l'importance de la présence de RIO1 ainsi que son activité catalytique dans les étapes finales de la maturation de la petite sous-unité ribosomique. Même si l'activité enzymatique de RIO1 est connue, il reste encore à déterminer quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent l'activation régulée de son activité catalytique. Ceci permettrait de comprendre comment se déclenche le clivage du pré-ARNr par NOB1, mais aussi comment RIO1 se dissocie des particules pré-40S.

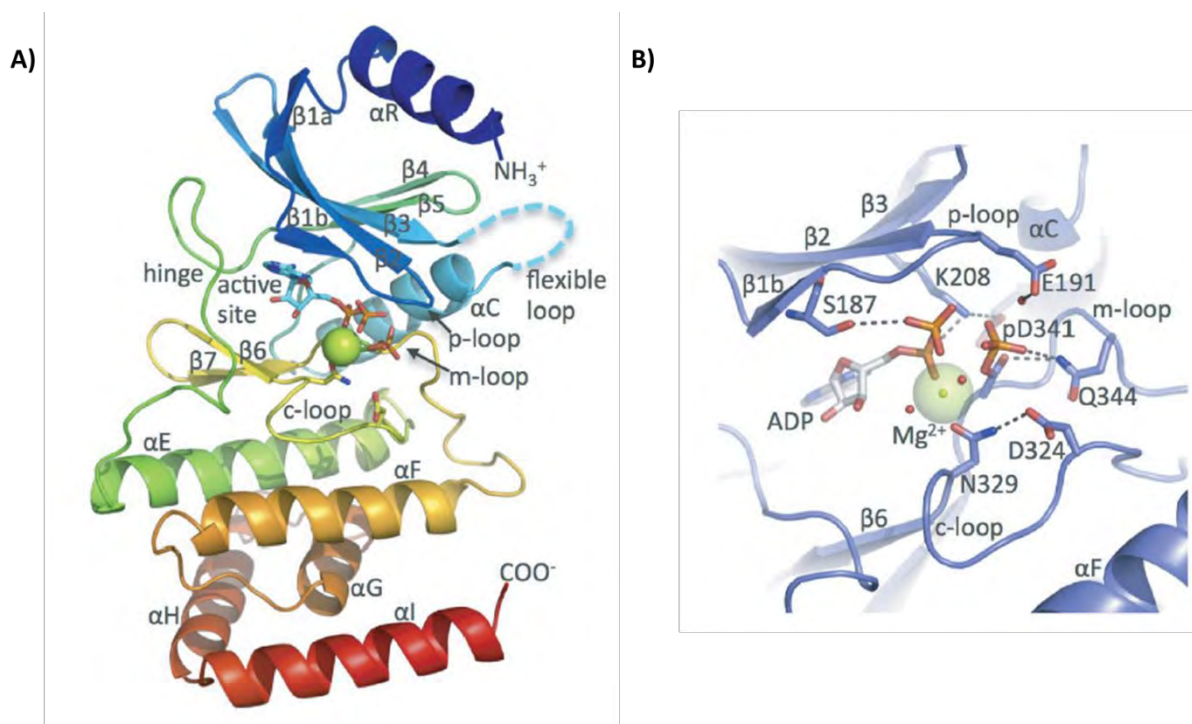


Figure 12 : Structure de RIO1 humaine (*hsRIO1*) déterminée par cristallographie aux rayons X. A) Structure globale de *hsRIO1* (résidus 140-430) avec le domaine RIO conservé (αR-αG) ainsi que deux hélices αH et αI en C-terminal du domaine RIO colorés de bleu (N-Ter) à rouge (C-Ter). **B)** Vue détaillée du site actif de *hsRIO1* avec les interactions avec l'ADP, le Mg²⁺ et le pAsp (pD341). (Adapté de Ferreira-Cerca et al., 2014)

Enfin, comme décrit précédemment, la maturation de l'ARNr 18S chez l'homme engage l'action de plusieurs **endo-** et **exo-ribonucléases**, essentielles aux différents clivages permettant d'obtenir un ARNr 18S mature (pour revue, Aubert et al., 2018). Lorsque la particule pré-40S est exportée dans le cytoplasme elle contient le pré-ARNr 18S-E pour lequel une dernière étape de

clivage est nécessaire à le rendre mature. Cette étape de maturation est assurée par l'endoribonucléase NOB1 qui clive le pré-ARNr 18S-E au site 3 permettant la formation de l'extrémité 3' mature (Preti et al., 2013; Sloan et al., 2013). NOB1 appartient à la famille des protéines à domaines PIN qui contient différents types de nucléases. C'est ce domaine PIN qui porte l'activité catalytique de l'enzyme (pour revue : (Senissar et al., 2017)). De plus, l'activité de Nob1 est dépendante de la présence d'ions divalents (Mn^{2+}), comme les autres endonucléases possédant un domaine PIN (Pertschy et al., 2009). NOB1 s'associe aux particules pré-40S dans le nucléoplasme. Sur les particules pré-40S cytoplasmiques, elle se situe au niveau de la plateforme de la particule pré-40S, à proximité du site 3 de l'ARNr 18S, son site de clivage. Néanmoins, celui-ci est masqué par le facteur de maturation DIM2, aussi appelé PNO1 (pour Partner of NOB1), ce qui empêche la maturation prématurée de l'ARNr 18S-E.

3. Les étapes de la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique

La mise en œuvre de différentes techniques biochimiques et structurales, telles que la purification par affinité couplées à des analyses de spectrométrie de masse et/ou des analyses structurales par cryo-EM, ainsi que l'étude des effets d'extinction de gènes par ARNi suivi par des criblages à haut débit ont permis d'apporter des informations sur la composition et la chronologie d'association des différents composants des intermédiaires des particules pré-40S chez l'Homme. Le couplage d'études structurales et fonctionnelles est aussi essentiel à la compréhension des rôles à la fois des facteurs de maturation mais aussi des RP dans les étapes de synthèse de la petite sous-unité ribosomique. Enfin, ces données ont permis d'identifier les mécanismes conservés entre les eucaryotes par comparaison avec ce qui est connu chez la levure (pour revue : (Cerezo et al., 2019)).

Les particules pré-40S cytoplasmiques ressemblent à des sous-unités 40S matures, le corps est quasi-identique. Cependant, la tête et la plateforme présentent plus de différences structurales avec la sous-unité 40S ; elles sont maturées séquentiellement (d'abord la tête, ensuite la plateforme) grâce à l'action des facteurs de maturation qui leur sont associés. Une fois les particules pré-40S exportées dans le cytoplasme, les données actuelles montrent qu'elles contiennent les facteurs de maturations ENP1, DIM2, TSR1, NOB1, LTV1, RIO2, RRP12 et CK1 δ/ϵ (protéine orthologue de Hrr25 chez la levure) ainsi que la plupart des RPS exceptées RPS10 et RPS26 (Ameismeier et al., 2018). Les facteurs de maturation ENP1 et DIM2 font partie des premiers à s'associer aux pré-40S, directement dans le nucléole. En effet, ENP1 est présent tout au long de la maturation nucléaire de la pré-40S et les accompagne jusque dans le cytoplasme où il

se dissocie (Carron et al., 2011; Miyoshi et al., 2007; Zemp et al., 2009). ENP1 est nécessaire au clivage du pré-ARNr 21S dans l'ITS1 au site E (Carron et al., 2011). Quant à DIM2, il a aussi été localisé dans le nucléole (Carron et al., 2012; Singh et al., 2021; Zemp et al., 2009). De plus, son absence cause l'accumulation du pré-ARNr 26S dans le nucléole indiquant qu'il s'incorpore aux pré-40S très précocement, dès le nucléole (Tafforeau et al., 2013).

De la même manière, TSR1 s'associe aux particules pré-40S dans le noyau. Sa déplétion entraîne une accumulation des particules pré-ribosomiques dans le nucléoplasme. TSR1 ne possédant pas de séquence d'export nucléaire NES (Nuclear Export Sequence), il est suggéré que cette protéine aurait plutôt un rôle structural permettant un assemblage et un repliement correct de la pré-40S afin qu'elle puisse être transportée de manière optimale vers le cytoplasme (Carron et al., 2011). Les facteurs de maturation NOB1 ainsi que LTV1, quant à eux, sont localisés principalement dans le cytoplasme mais se lient aux pré-40S dans le nucléoplasme (Carron et al., 2012; Montellese et al., 2017; Zemp et al., 2009). La protéine RIO2 fait partie de la famille de protéine RIO, décrite précédemment. Elle a été caractérisée comme une ATPase et possède un rôle essentiel au début de la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique. Elle s'associe aux particules pré-40S dans le nucléoplasme, et participerait à l'export des particules pré-ribosomiques dans le cytoplasme : elle possède des séquences NES qui interagiraient avec l'exportine CRM1. RIO2 ne serait cependant pas strictement requise pour l'export des particules pré-40S vers le cytoplasme. En effet, sa déplétion n'entraîne pas d'accumulation systématique des particules pré-40S dans le noyau (Zemp et al., 2009). Dans le cytoplasme, RIO2 est essentielle à la dissociation d'une grande partie des facteurs de maturation associés aux particules pré-40S (Wyler et al., 2011; Zemp et al., 2009).

Les particules pré-40S une fois dans le cytoplasme vont subir différents changements permettant à la plupart des facteurs de maturation de se dissocier afin de procéder ensuite à l'étape finale de maturation de l'ARNr 18S, qui est le clivage au site 3 du pré-ARNr 18S-E par NOB1.

Pour cela, la protéine CK1 δ/ϵ associée dès le noyau aux particules pré-40S, va, une fois dans le cytoplasme, phosphoryler ENP1 et LTV1, ce qui est nécessaire pour déclencher la dissociation de LTV1 des pré-40S (Ghalei et al., 2015; Zemp et al., 2014). RIO2 est aussi impliquée dans le relargage des facteurs de maturation, tout d'abord de ENP1, mais aussi de LTV1, NOB1 et DIM2 ; seul le relargage de ces trois derniers facteurs requiert son activité ATPase (Zemp et al., 2009). Elle est aussi requise pour la dissociation de RRP12 (Wyler et al., 2011). Grâce aux structures de précurseurs de la sous-unité 40S obtenues, il a été possible d'observer que RRP12 maintenait plusieurs hélices d'ARNr (h35, h37, h38 et h39) localisée au niveau de la tête de la petite sous-unité ribosomique dans une position non mature. Sa dissociation des particules pré-

40S permet un réarrangement des hélices h39 et h40 pour atteindre une position proche de leur position mature. Ces réarrangements sont aussi accompagnés de l'association de la protéine ribosomique RACK1 (Ameismeier et al., 2018). RACK1 est impliquée dans la maturation du pré-ARNr 18S-E (Larburu et al., 2016), en plus de son rôle déjà connu dans la régulation de la traduction (Gandin et al., 2013).

La libération de LTV1 et ENP1 entraîne un réarrangement permettant la maturation du bec de la particule pré-40S. En effet, leur dissociation permet non seulement la stabilisation des protéines ribosomiques RPS20, RPS3 ainsi que RPS29 dans leur position mature, mais aussi l'association de RPS10 et finalement le mouvement de l'hélice h34 afin d'obtenir un bec mature (Ameismeier et al., 2018).

Une fois ENP1, LTV1, TSR1 et RIO2 dissociées et le bec mûr, il reste encore à procéder au clivage du pré-ARNr 18S-E par NOB1 ainsi que l'association tardive de la dernière protéine ribosomique RPS26. Ces dernières étapes, vont être médiées par l'arrivée de RIO1 sur les particules pré-40S tardives. Des analyses de la composition des particules pré-40S purifiées avec RIO1 comme appât ont permis d'affirmer que les protéines RIO1 et RIO2 n'étaient pas présentes en même temps sur les particules pré-40S (Widmann et al., 2012). Ceci a pu aussi être confirmé par les structures qui montrent que les deux protéines sont localisées au même endroit sur la particule pré-40S (Ameismeier et al., 2018). RIO1 est requise pour ces dernières étapes de maturation, la déplétion de RIO1 entraînant une accumulation du pré-ARNr 18S-E dans les particules pré-40S. De plus, son activité ATPase apparaît nécessaire au relargage des facteurs de maturation NOB1 et DIM2, une fois le processus de maturation de l'ARNr 18S finalisé (Widmann et al., 2012).

L'étape finale de la maturation de l'ARNr 18S est le clivage au site 3 par l'endoribonucléase NOB1, ce processus est régulé par la présence de DIM2 qui empêche tout au long de la maturation un clivage prématuré par NOB1, déjà incorporé dans la particule dans le noyau. Les analyses structurales ont permis d'obtenir des informations moléculaires sur les interactions qu'il existe entre NOB1, DIM2 et le pré-ARNr 18S-E. Ces données ont été essentielles dans la compréhension du mécanisme permettant à DIM2 de maintenir NOB1 dans une conformation inactive (Ameismeier et al., 2018) : la distance entre NOB1 et son substrat, imposée par cette conformation empêche la réaction de clivage. Plus précisément, deux acides aminés de NOB1 se lient avec les derniers nucléotides de l'ARNr 18S, alors que DIM2, interagit avec des résidus localisés juste après, c'est-à-dire les nucléotides en 5' de l'ITS1 ainsi que quelques nucléotides en 3' de l'ARNr 18S. Cette conformation verrouille la poche catalytique de NOB1 à 30 Å du dernier nucléotide de l'ARNr 18S soit du site 3 (**Figure 13**). Ceci correspond à ce qui a déjà été montré chez la levure (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018). C'est ensuite grâce à la dissociation de DIM2 et un changement de conformation de NOB1, que ce dernier pourra atteindre son site de clivage permettant ainsi la

maturation finale de l'ARNr 18S, comme postulé pour la levure (Turowski et al., 2014). Mais le mécanisme permettant à DIM2 d'être relargué de la pré-40S, déclenchant ainsi la dernière étape de maturation de l'ARNr 18S, n'avait pas été élucidé au début de ma thèse. Je me suis donc attachée à caractériser précisément ce processus (cf. Résultats partie I.).

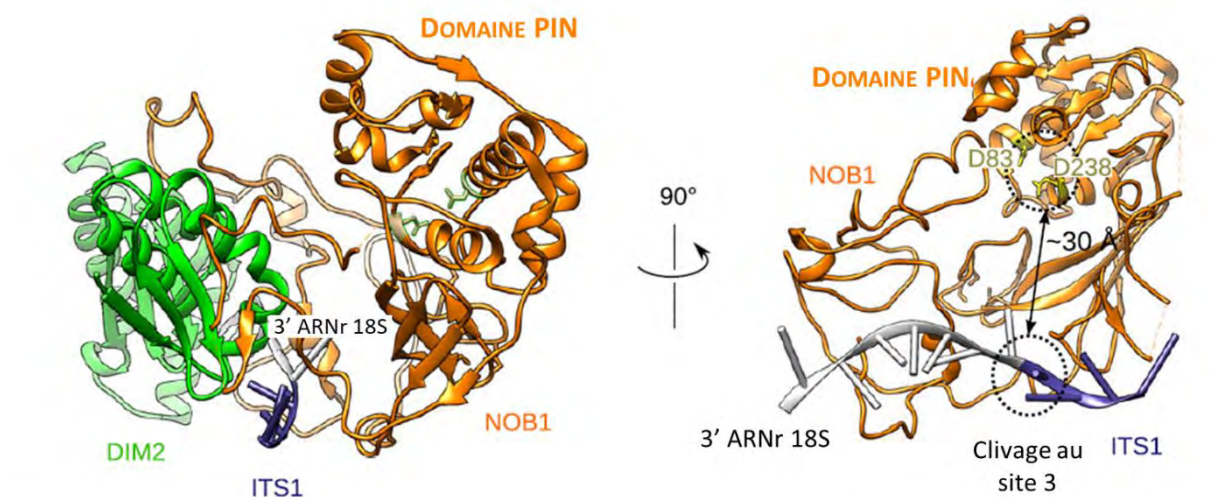


Figure 13 : Détails moléculaires de l'interaction entre DIM2, NOB1 ainsi que le pré-ARNr 18S-E. La vue de droite permet de montrer le site actif de NOB1 positionné à une distance de 30Å de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S empêchant son clivage. (Adapté de Cerezo et al., 2018 à partir de la structure PDB : 6G18)

En parallèle de ce processus, la dernière protéine ribosomique RPS26 vient s'associer à son tour aux particules pré-40S. Le moment précis de l'association de RPS26 dans les particules pré-40S est sujet à débat. En effet, comme décrit précédemment, des études réalisées chez la levure ont montré que Rps26 était prise en charge dans le noyau par Tsr2 permettant son association aux pré-40S dans les particules 90S localisées dans le noyau (Peña et al., 2016; Schütz et al., 2018). Cependant, les structures des particules pré-ribosomiques nucléaires obtenues par cryo-EM jusqu'à présent, chez la levure comme chez l'Homme, ne permettent pas d'identifier Rps26. RPS26 n'a pu être détecté que dans des particules pré-40S cytoplasmique tardives (Ameismeier et al., 2020, 2018). Ces données sont corrélées avec des analyses par western blot et protéomique n'indiquant pas la présence de la protéine RPS26 dans des pré-40S nucléaires ou cytoplasmiques précoces humaines (Larburu et al., 2016; Wyler et al., 2011). Même si à ce jour, des preuves de la présence de RPS26 dans des précurseurs précoces sont manquantes, on ne peut pas exclure que l'association de RPS26 aux précurseurs nucléaires soit labile et ne devienne plus stable que pendant les étapes de maturation ultérieures.

L'ensemble des étapes de la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique 40S chez l'Homme est présenté dans la **Figure 14**.

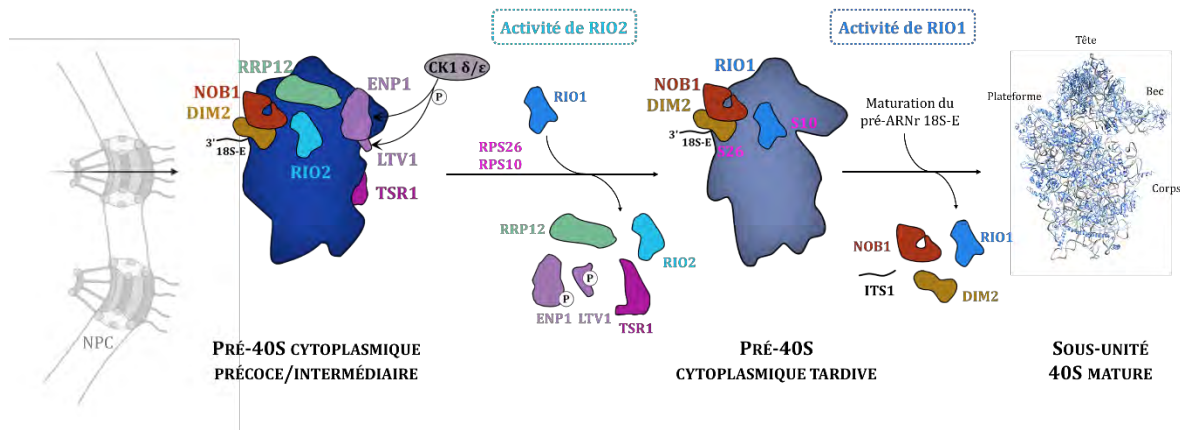


Figure 14 : Etapes de maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique 40S humaine. Les pré-40S sont exportées dans le cytoplasme via le complexe de pore nucléaire (NPC). Les pré-40S cytoplasmiques précoces/intermédiaires (bleu foncé) sont composés d'un grand nombre de facteurs de maturation, indiqués par différentes couleurs. Une grande partie de ces facteurs de maturation se dissocient grâce à l'activité de RIO2 et de la phosphorylation de ENP1 et LTV1 par CK1 δ/ϵ et RPS26 et RPS10 s'associent pour obtenir la pré-40S tardive (gris). La maturation du pré-ARNr 18S-E par NOB1 a lieu ainsi que la dissociation des derniers facteurs de maturation grâce à l'activité de RIO1 pour donner une sous-unité 40S mature (PDB : 4UG0).

4. Processus de contrôle qualité

Il existe différents mécanismes permettant aux ribosomes d'être contrôlés afin qu'ils puissent être complets et fonctionnels, mais aussi qu'ils n'entrent pas en traduction de manière prématurée.

Tout d'abord, comme cela a été expliqué précédemment, la maturation est un processus coopératif, c'est-à-dire que l'action d'une protéine (RP et/ou facteur de maturation) va permettre à une autre de s'associer ou se dissocier du ribosome ou encore de déclencher son activité. L'une des raisons possibles de cette coopérativité est de permettre de vérifier chacune des étapes et donc contrôler la présence et le positionnement correct de chacun des éléments du ribosome. Dans le cas où une erreur se produirait, les étapes suivantes de maturation seront bloquées afin d'empêcher la production d'un ribosome défectueux. Ces mécanismes servent de « points de contrôle », où la maturation ne peut pas se poursuivre tant que l'étape en cours n'est pas correctement terminée. C'est le cas par exemple de RIO2, qui permet la dissociation d'un grand nombre de facteurs de maturation, en même temps que sa propre dissociation du ribosome (Zemp et al., 2009). RIO2 une fois dissociée laisse sa place à RIO1, mais dans le cas où cette étape n'est pas réalisée, RIO1 ne pourra pas s'associer, bloquant ainsi les dernières étapes de maturation (Widmann et al., 2012). Il a aussi été montré que certains facteurs de maturation étaient impliqués dans l'export nucléaire des particules pré-40S, tout comme certaines protéines ribosomiques

(Léger-Silvestre et al., 2004; O'Donohue et al., 2010; Rouquette et al., 2005; Zemp et al., 2009). Dans le cas où un de ces composants serait absent des particules pré-ribosomique, l'export nucléaire serait inhibé bloquant alors les étapes suivantes de la maturation.

De plus, il existe des interactions importantes entre les facteurs qui permettent de contrôler le processus de maturation, c'est le cas par exemple de NOB1 et DIM2 présentés précédemment et qui interagissent afin d'empêcher une maturation prématurée du pré-ARNr 18S-E par NOB1 (**Figure 13**) (Ameismeier et al., 2018).

Chez la levure, les dernières étapes de maturation de la particule pré-40S se dérouleraient dans une particule pseudo-80S (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012). Cette particule pseudo-80S aurait un rôle de contrôle qualité permettant de vérifier l'assemblage de la pré-40S. En effet, ce complexe est formé de la particule pré-40S qui s'associe transitoirement à une sous-unité 60S : cette étape permettrait donc de déterminer si la pré-40S est « fonctionnelle », c'est à dire effectivement capable de s'associer avec la sous-unité 60S. Cette association est possible grâce à la GTPase eIF5B (Fun12p), impliquée dans la jonction de la sous-unité 60S avec la sous-unité 40S mature lors de l'initiation de la traduction (Hinnebusch, 2014). Mais ce complexe pseudo-80S ne permet pas de traduction productive car il s'assemble indépendamment des ARNm et ne contient pas d'ARN de transfert (ARNt) (Strunk et al., 2012). Ce complexe pseudo-80S n'a, quant à lui, jamais été observé chez les cellules humaines, à ce jour (Ameismeier et al., 2020, 2018 ; cette thèse). Mais chez la levure, la question qui demeure est de savoir si la formation de cette particule pseudo-80S est une étape obligatoire pour permettre les dernières étapes de maturation de toutes les particules pré-40S, ou si seule une petite population du pool de particules cytoplasmiques pré-40S est échantillonnée afin de passer par ce point de contrôle qualité. Les données montrent que l'absence d'eIF5B, qui empêche la formation de particules de type 80S, n'est pas mortelle pour les cellules de levure et ne conduit pas à une inhibition totale de maturation du pré-ARNr 20S en ARNr 18S (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012). Ceci indique que cette étape ne serait donc pas essentielle. De plus, dans des conditions sauvages, seule une minorité des particules pré-40S se trouve dans des particules de type 80S, comme le montrent les analyses de Northern blot réalisés après des gradients de saccharose ou des purifications par affinité (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012, 2011; Turowski et al., 2014). Ces complexes pseudo-80S ont été principalement étudiés en conditions mutantes, en inactivant par exemple Nob1 ou Rio1, dont on a vu précédemment les rôles importants dans le processus de maturation de la petite sous-unité ribosomique (Scaiola et al., 2018; Turowski et al., 2014). Dans de telles conditions, la vitesse de biogenèse des ribosomes est ralentie et la quantité de particules pré-40S engagées dans des particules de type 80S est augmentée.

D'autre part, il existe aussi des mécanismes qui permettent aux particules pré-ribosomiques de ne pas s'engager dans un processus de traduction de manière prématurée. Tout d'abord, le fait que la biogenèse des ribosomes soit un processus compartimentalisé permet d'empêcher aux acteurs de la traduction, présents dans le cytoplasme, de s'associer de manière prématurée aux pré-ARNr qui ne seraient pas encore matures. Ceci est surtout vrai pour la grande sous-unité ribosomique 60S pour laquelle la majeure partie des étapes de maturation a lieu dans le noyau.

Concernant la particule pré-40S, elle va très rapidement être exportée vers le cytoplasme pour subir les dernières étapes de maturation. Dans ce cas, d'autres mécanismes entrent en jeu afin d'éviter l'interaction prématurée de facteurs de traduction avec les particules en cours de maturation. En effet, certains facteurs de maturation sont connus pour bloquer des sites de liaison de composants impliqués dans la traduction. C'est le cas par exemple, des facteurs de maturation DIM1, RIO2 et TSR1 qui se positionnent à l'interface entre les deux sous-unités et évitent ainsi à la fois l'interaction prématurée avec la sous-unité 60S, mais aussi avec les éléments de la traduction, comme le facteur d'initiation à la traduction eIF1A. De plus, sur la base des structures des particules pré-40S, il a été possible de montrer que ces trois facteurs de maturation empêchaient aussi la formation des sites A et P de liaisons aux ARNt en stabilisant l'hélice h44 dans une orientation décalée vers l'extérieur comparée à sa position mature (Ameismeier et al., 2018). NOB1 et DIM2 se positionnent sur la plateforme de la petite sous-unité ribosomique et inhibent la liaison de certains facteurs d'initiation à la traduction tel que eIF3, ce qui bloque le processus d'initiation à la traduction. Enfin, LTV1 et ENP1 interagissent directement avec RPS3 au niveau du bec de la sous-unité pré-40S, ce qui va bloquer l'ouverture du sillon de l'ARNm, et ainsi empêcher le recrutement précoce d'un ARNm (Ameismeier et al., 2018).

III. La traduction par le ribosome eucaryote

1. Vue d'ensemble du processus de synthèse protéique

Le ribosome est responsable de la synthèse des protéines, son rôle est conservé à travers les trois domaines du vivant. Il réalise le décodage de l'information génétique contenue dans les ARNm ; il assure également la synthèse des protéines correspondant au code génétique décrypté. L'ensemble de ces processus est nommé traduction.

Les acteurs principaux de la traduction sont le ribosome, l'ARNm portant une coiffe (m^7GpppN) en 5' et une queue poly-adénylée située en 3' ainsi que les ARN de transfert (ARNt). Il existe trois sites de liaisons de ces ARNt à l'interface entre les deux sous-unités ribosomiques (**Figure 2**) qui sont :

- Le site A (pour Aminoacyl-ARNt) dans lequel vient se loger l'ARNt amino-acylé qui entre dans le ribosome.
- Le site P (pour Peptidyl-ARNt) où se positionne ensuite l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours de synthèse.
- Le site E (pour Exit-ARNt) où se trouve l'ARNt une fois déacylé qui pourra ensuite se dissocier du ribosome.

La traduction requiert également différents facteurs protéiques, qui interviennent au cours des trois grandes étapes du processus : (i) **l'initiation**, durant laquelle la petite sous-unité ribosomique va se lier à l'ARNm ainsi qu'à un Met-ARNt (ARNt d'initiation), puis la grande sous-unité vient s'assembler pour ensuite passer à (ii) **l'élongation**, c'est l'étape pendant laquelle les acides aminés sont additionnés à la chaîne polypeptidique et enfin (iii) **la terminaison** est caractérisée par le relargage de la chaîne polypeptidique. On peut également ajouter une dernière étape, le recyclage, étape durant laquelle les sous-unités ribosomiques et l'ARNt se dissocient de l'ARNm (Dever et al., 2018; Hellen, 2018; Kapp and Lorsch, 2004; Merrick and Pavitt, 2018; Wilson and Cate, 2012) (**Figure 15**).

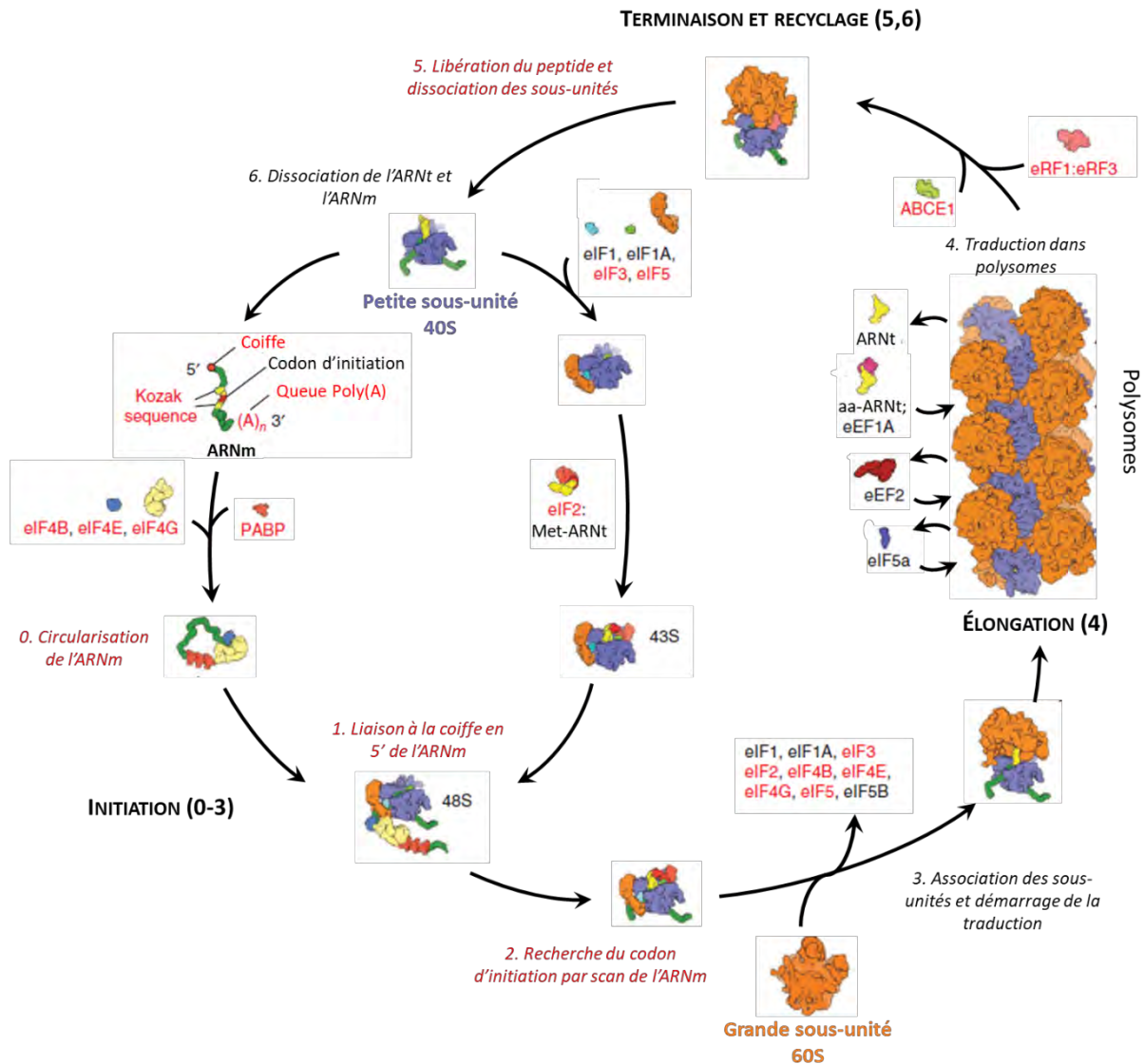


Figure 15 : Les étapes de la traduction chez les eucaryotes. Chacune des étapes du cycle de la traduction est décrite et numérotée. Les spécificités des cellules eucaryotes sont identifiées en rouge. (Adapté de Melnikov et al., 2012)

a. L'initiation de la traduction

L'initiation est l'étape la plus complexe de la traduction, elle fait intervenir les sous-unités ribosomiques 40S et 60S, le Met-ARNt ainsi que 11 facteurs d'initiation (eukaryotic Initiation Factors, eIF).

L'initiation de la traduction démarre avec la formation du complexe de pré-initiation 43S. Cette particule 43S se compose du complexe ternaire formé d'eIF2 lié à du GTP et à un Met-ARNt qui va venir s'associer à la petite sous-unité ribosomique 40S grâce aux facteurs d'initiation eIF1, eIF1A,

eIF3 et eIF5. En parallèle, la famille des facteurs eIF4 (comprenant eIF4E, eIF4G et eIF4B) prépare l'ARNm en « l'activant » pour qu'il puisse ensuite s'associer avec le complexe 43S. La forme activée de l'ARNm correspond donc à l'ARNm circularisé, grâce à eIF4E qui reconnaît la coiffe de l'ARNm en 5', mais aussi à PABP (« PolyA Binding Protein ») associée à la fois à la queue poly-(A) en 3' et à eIF4G permettant de relier les deux extrémités de l'ARNm (Amrani et al., 2008). Le complexe de pré-initiation 43S s'associe alors à l'extrémité 5' de l'ARNm « activé » grâce à l'interaction entre eIF4G et eIF3 ou eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 48S. Le complexe ainsi formé peut alors scanner le 5'UTR de l'ARNm jusqu'à reconnaître un codon d'initiation AUG. Ce codon AUG marque le début de la séquence codante de l'ARNm et se positionne au niveau du site P de la sous-unité 40S où il sera reconnu par le Met-ARNt. La reconnaissance de ce codon d'initiation doit se faire dans un contexte favorable, c'est-à-dire qu'il doit être entouré d'une séquence Kozak : GCCACCAUGG (Kozak, 1987). Les nucléotides positionnés en -3 (A) et +4 (G) par rapport au A de l'AUG sont importants pour la reconnaissance et leur présence caractérise un site d'initiation « fort ». Il a été montré chez la levure que la reconnaissance de cette séquence de Kozak est favorisée par la protéine Rps26, dont j'ai étudié le rôle dans le processus de biogenèse de la 40S humaine (cf. Résultats partie I.). Rps26 interagirait préférentiellement avec des adénosines positionnées en -2 et -4 de la séquence Kozak, et favoriserait ainsi la traduction d'ARNm contenant ces deux A. (Ferretti et al., 2017).

La reconnaissance de l'AUG par le codon Met-ARNt est accompagné de l'hydrolyse du GTP par eIF2 et de la dissociation d'une grande partie des facteurs d'initiation. La grande sous-unité 60S en complexe avec la GTPase eIF5B vient ensuite s'associer à la petite sous-unité 40S. Finalement, la dernière étape de l'initiation consiste à l'hydrolyse du GTP par eIF5B entraînant son relargage du ribosome 80S. Celui-ci entre alors en phase d'élongation de la traduction.

b. L'élongation de la traduction

Contrairement à l'initiation, l'élongation de la traduction est un processus plutôt conservé entre les domaines du vivant. L'élongation est un processus cyclique durant lequel le polypeptide est synthétisé par ajout successif des différents acides aminés à chacun des cycles. Cette étape d'élongation se divise en trois grandes étapes, qui se répètent à chaque cycle (à chaque acide aminé ajouté), jusqu'à rencontrer un codon stop.

L'élongation débute avec l'arrivée d'un ARNt-aminoacylé (ARNt-aa) dans le site A du ribosome. Pour cela, le facteur d'élongation de la traduction (eukaryotic Elongation Factors, eEF) eEF1A (EF-Tu chez la bactérie) va former un complexe ternaire avec une molécule de GTP ainsi que l'ARNt-aminoacylé. Ce complexe vient se loger dans le site A du ribosome ; lorsqu'il y a appariement entre les bases de l'anticodon de l'ARNt-aminoacylé et le codon de l'ARNm présent

dans le site A, alors l'hydrolyse du GTP par eEF1A est déclenchée. Le complexe eEF1A-GDP est ensuite libéré permettant l'accommodation de l'ARNt-aminoacylé dans le site A.

Vient ensuite la deuxième étape, durant laquelle la liaison peptidique entre la chaîne polypeptidique naissante portée par l'ARNt du site P et l'acide aminé porté par l'ARNt du site A se forme. Pour cela, le centre peptidyl-transférase (**Figure 2**) du ribosome (domaine très conservé entre procaryotes et eucaryotes), formé exclusivement d'ARN, va permettre de rapprocher les groupements actifs des ARNt des sites A et P pour la catalyse. De plus, le facteur eIF5A (orthologue de EF-P chez la bactérie) lié au site E, interagit avec le bras accepteur de l'ARNt en P et permet la formation de la liaison peptidique en induisant un positionnement favorable des substrats.

La dernière étape de l'élongation est la translocation des ARNt dans les sites P et E. Cette troisième étape fait intervenir le facteur d'élongation eEF2 (EF-G chez la bactérie) positionné dans le site A. Ce décalage d'un codon exactement (3 nucléotides) libère le site A, et positionne l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours de synthèse dans le site P et l'ARNt déacylé dans le site E. Une fois le site E libéré, un nouveau cycle d'élongation peut débuter avec l'appariement d'un nouvel ARNt-aminoacylé en A.

c. La terminaison de la traduction

La terminaison de la traduction se déclenche en réponse à un codon stop (UAA, UAG ou UGA) sur l'ARNm au niveau du site A du ribosome. Étant donné qu'aucun ARNt ne peut reconnaître de codon stop, cette dernière étape nécessite le recrutement de deux facteurs qui sont eRF1 et eRF3 (eRF pour « Release Factor »). Un complexe se forme entre eRF1, eRF3 et du GTP et vient se positionner dans le site A ; à cette étape, eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop. Après l'hydrolyse du GTP par eRF3, eRF1 déclenche l'hydrolyse du polypeptidyl-ARNt, libérant ainsi le polypeptide néo-synthétisé.

À la fin de ce processus, une dernière étape de recyclage des composants est nécessaire. En effet, une fois l'étape de terminaison accomplie, le ribosome est toujours lié à l'ARNm avec un ARNt déacylé dans son site P et eRF1 dans son site A, il doit donc être désassemblé pour libérer l'ARNm et permettre d'autres cycles de traduction. La première étape du recyclage est la dissociation de la grande sous-unité 60S médiée par ABCE1 laissant un complexe 40S/ARNt-déacylé lié à l'ARNm. Finalement la petite sous-unité ribosomique 40S est dissociée de l'ARNt et de l'ARNm pour qu'elle puisse repartir dans un nouveau cycle de traduction.

2. Focus sur l'étape d'élongation de la traduction

Les étapes de l'élongation regroupent l'ensemble des mécanismes qui permettent la formation du peptide par l'ajout successif des acides aminés reliés les uns aux autres par une liaison peptidique. Ce processus est très conservé entre les organismes et la plupart des données ont, tout d'abord, été obtenues chez les procaryotes. Mais grâce, notamment, aux avancées de la cryo-EM, il a été possible d'accéder aux mécanismes d'élongation de la traduction des cellules eucaryotes et plus particulièrement de mammifères. En effet, des études structurales ont permis de visualiser différents états du ribosome dans plusieurs phases de l'élongation et ainsi d'accéder à des détails moléculaires permettant de comprendre comment se déroule l'élongation de la traduction (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020; Budkevich et al., 2011, 2014; Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018; Shao et al., 2016). De plus, l'utilisation du smFRET (single molecule Förster Resonance Energy Transfert) a aussi aidé à obtenir des informations quant aux mouvements des ARNt dans le ribosome durant les différentes phases de l'élongation (Budkevich et al., 2011; Ferguson et al., 2015; Flis et al., 2018). Ces études ont permis d'apporter des informations afin de comprendre les mécanismes de l'élongation de la traduction mais aussi de mettre en lumière les similitudes ainsi que les divergences qu'il existe entre les bactéries et les eucaryotes.

L'ensemble des données structurales et fonctionnelles a permis de mettre en évidence **différents états structuraux**, dans lesquels sont observés plusieurs réarrangements du ribosome (**Figure 16**). L'élongation débute avec le décodage du codon de l'ARNm au site A par le complexe eEF1A/ARNt-aa (état de **décodage**) (Behrmann et al., 2015; Budkevich et al., 2014; Shao et al., 2016). Une fois l'ARNt-aa sélectionné et l'étape de décodage réussie, le facteur d'élongation se dissocie et l'ARNt vient s'accommoder dans le site A de la grande sous-unité. Ceci déclenche alors la formation de l'état de pré-translocation classique (**classique-PRE**) dans lequel les ARNt sont en conformation dite « classique », c'est-à-dire logés dans les sites A et P de la petite et de la grande sous-unité ribosomique respectivement (A/A et P/P). Dans cette conformation, la chaîne naissante est transférée vers l'ARNt du site A (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020; Budkevich et al., 2011, 2014). Par la suite, le ribosome atteint une conformation dans laquelle la petite sous-unité 40S subit une rotation par rapport à la 60S (**hybride-PRE**), ce qui génère un positionnement hybride des ARNt, qui sont en A et P de la petite sous-unité, mais en P et E de la grande sous-unité, respectivement. Ce positionnement hybride est également noté (A/P et P/E) (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020; Budkevich et al., 2011). Ceci est suivi par la liaison d'eEF2, qui stabilise le complexe, empêche l'ARNt du site P de changer de cadre et aide à stabiliser et terminer la rotation de la sous-unité 40S, permettant ainsi la translocation de la petite sous-unité (état **TI**). La translocation est également permise par un mouvement de pivot de la tête de la

petite sous-unité ribosomique par rapport à son corps (« swivelling ») (Anger et al., 2013; Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018; Pellegrino et al., 2018; Spahn et al., 2004; Taylor et al., 2007). Après la translocation, eEF2 se dissocie du ribosome, conduisant à la formation de l'état post-translocation (état **POST**) avec un site A vide et les ARNt des sites P et E dans une conformation classique, prêt pour le prochain cycle de décodage (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020). La sous-unité 40S retourne quant à elle dans une conformation « classique » (par un pivot de la tête et une rotation du corps inverses, voir **Figure 16**).

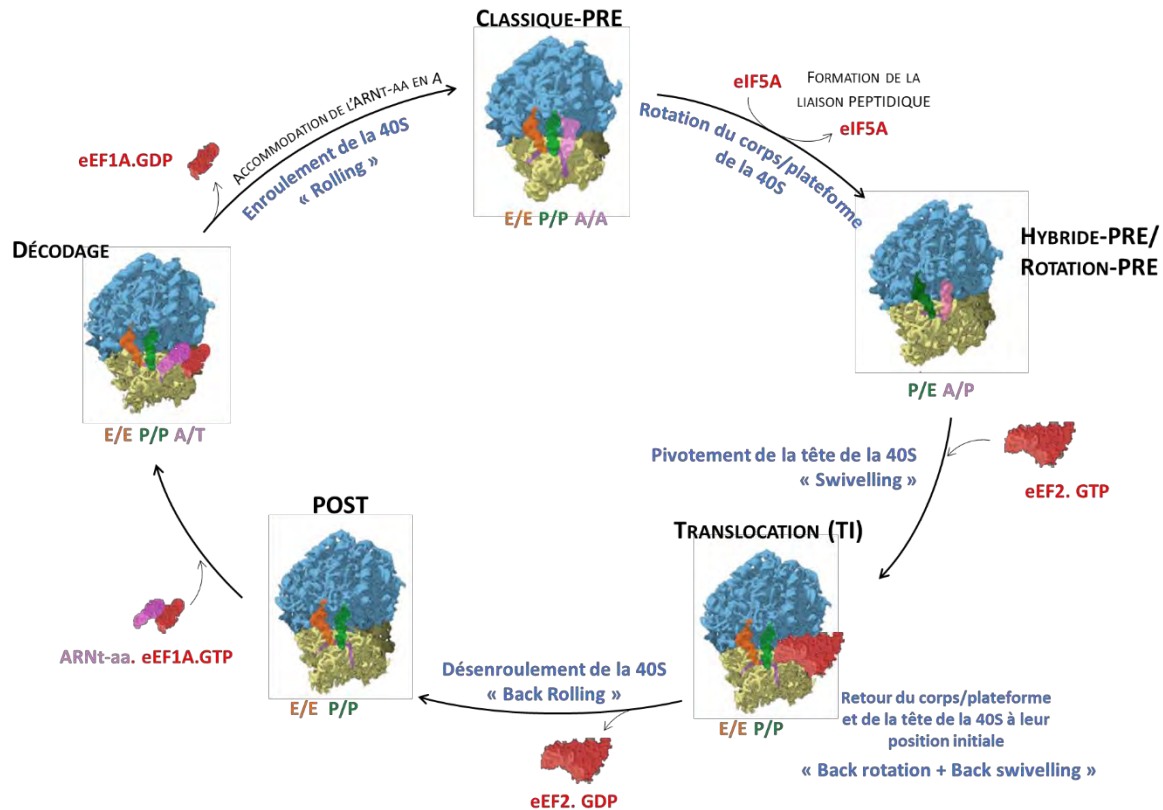


Figure 16 : Cycle de l'élongation de la traduction chez les eucaryotes. Les étapes de l'élongation sont décrites, avec les réarrangements structuraux annotés en bleu. L'ARNt-déacylé est représenté en orange, l'ARNt-peptidyl en vert et l'ARNt-aa en rose, le positionnement des ARNt est aussi indiqué selon le même code couleur. Les facteurs d'élongation sont représentés en rouge (Adapté de Behrmann et al., 2015).

a. Reconnaissance du codon

La première étape de l'élongation correspond à l'entrée d'un ARNt-aa au niveau du site A du ribosome, permettant le décodage de l'ARNm, grâce à l'appariement du codon de l'ARNm avec l'anticodon porté par l'ARNt-aa au niveau de sa tige boucle anticodon (Anticodon Stem Loop, ASL) (**Figure 17A**). Pour cela l'ARNm entre dans le ribosome dans le sillon de l'ARNm et va être guidé

jusqu'au centre de décodage par l'intermédiaire d'interactions avec différentes protéines ribosomiques. Ainsi les protéines ribosomiques RPS14, RPS26, RPS28 et RPS30, de par leur proximité physique avec les sites A, P et E auraient un rôle fonctionnel dans l'accompagnement de l'ARNm à travers la sous-unité 40S (Behrmann et al., 2015) (**Figure 17B**).

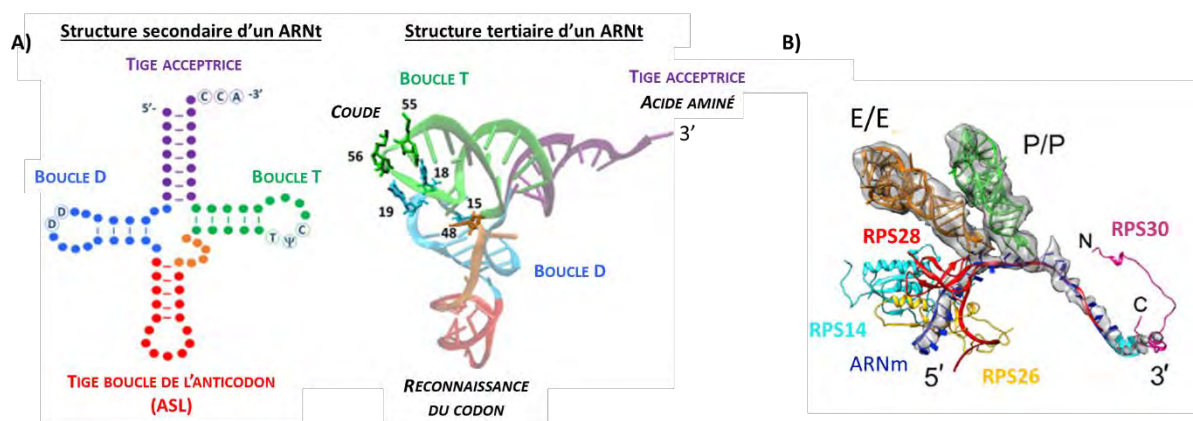


Figure 17 : Représentation des ARNt et de l'ARNm impliqués dans l'élongation de la traduction. A) Structure secondaire et tertiaire d'un ARNt, les domaines caractéristiques sont indiqués, avec un code couleur identique entre les structures secondaires et tertiaires (Adapté de McKenney et al., 2017). B) Contacts de l'ARNm avec les différentes protéines ribosomiques au niveau du centre de décodage, avec les ARNt en E/E (orange) et en P/P (vert) (Adapté de Budkevich et al., 2014).

Cette première étape est médiée par le facteur d'élongation eEF1A, une GTPase orthologue à EF-Tu chez la bactérie. Cette GTPase est formée de trois domaines, le domaine G (ou 1) portant l'activité catalytique de l'enzyme, ainsi que les domaines 2 et 3. Le domaine G de la protéine contient des motifs importants pour son activité catalytique : les motifs Switch 1, Switch 2 ainsi que la boucle P (Crepin et al., 2014). Des analyses cryo-EM ont permis d'accéder à la structure du ribosome pendant le décodage de l'ARNm, c'est-à-dire lié au complexe ternaire ARNt-aa.eEF1A.GTP. Afin de pouvoir stabiliser ce complexe, les auteurs de ces articles ont utilisé soit un analogue non hydrolysable de GTP (GMP-PNP) ou bien un antibiotique, la Didemnin B (Budkevich et al., 2014; Shao et al., 2016). Cet inhibiteur de la traduction se lie entre le domaine G et le domaine 3 d'eEF1A ce qui empêcherait le changement conformationnel essentiel à sa dissociation du ribosome. De manière intéressante, une structure cryo-EM du ribosome pendant le décodage, lié au complexe ternaire a aussi pu être résolue sans l'utilisation de drogues permettant de bloquer le complexe ternaire sur les ribosomes (Behrmann et al., 2015). L'ensemble de ces structures permet donc d'avoir une vision globale des différents états du ribosome en « décodage ». En effet, les structures obtenues avec l'analogue de GTP correspondent aux premières étapes de

l'appariement de l'ARNt-aa avant l'hydrolyse du GTP, alors que les structures avec Didemnin B ou non liées correspondent, elles, aux états du ribosome après l'hydrolyse du GTP juste avant ou pendant la dissociation du facteur eEF1A, respectivement (Behrmann et al., 2015; Budkevich et al., 2014; Shao et al., 2016). Ces études, menées dans des cellules de mammifères, ont donc permis de comprendre les mécanismes de décodage de l'ARNm des eucaryotes, et de les comparer avec ceux déjà bien caractérisés chez la bactérie.

La phase d'élongation de la traduction est globalement bien conservée entre eucaryotes et procaryotes, mais il existe quelques différences. Par exemple, il est intéressant de noter que chez la bactérie, le complexe ternaire formé de l'ARNt-aa, d'EF-Tu et de GTP se lie au ribosome par l'intermédiaire de la protéine multimérique L7/L12, spécifique aux bactéries. Cette protéine forme des sortes de bras qui viennent rapprocher le complexe ternaire vers le ribosome (Diaconu et al., 2005; Rodnina et al., 1996). Chez les eucaryotes, un autre mécanisme est donc mis en jeu pour permettre l'association du complexe ARNt-aa.eEF1A.GTP avec le ribosome (**Figure 18**). La GTPase eEF1A possède une courte insertion d'environ 14 résidus supplémentaires comparé à EF-Tu de bactérie. Cette insertion est localisée juste avant le domaine switch 1 formant une hélice α annotée $\alpha 2$. L'association d'eEF1A avec le ribosome semblerait se faire en partie par l'intermédiaire de cette hélice $\alpha 2$ spécifique aux eucaryotes. En effet, l'hélice $\alpha 2$ entre en contact à la fois avec la protéine RPL23 mais aussi avec la boucle conservée de la grande sous-unité ribosomique SRL (pour Sarcin-Ricin Loop) et l'hélice 14 de l'ARNr 18S (Budkevich et al., 2014; Shao et al., 2016) (**Figure 18B**). Une fois le complexe ternaire associé au ribosome, il permet l'intégration de l'ARNt-aa dans le PTC afin de sonder l'ARNm. Pour cela, l'ARNt-aa se trouve dans une position de pré-accommodation : la tige boucle de l'anticodon (ASL) est localisée dans le site A, alors que les boucles P et acceptrices se trouvent elles en dehors, au niveau du domaine G d'eEF1A, on parle alors de position en A/T de l'ARNt-aa (Shao et al., 2016). Il est aussi possible d'observer une interaction entre l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt et l'épaule de la sous-unité 40S par l'intermédiaire du domaine 2 d'eEF1A (**Figure 18C**). Cette interaction est conservée entre procaryotes et eucaryotes (Budkevich et al., 2014). L'ensemble de ces interactions va entraîner une distorsion de l'ARNt-aa correspondant à une conformation de haute énergie. Il a été décrit chez la bactérie que cette distorsion permettrait d'aider au choix de l'ARNt-aa en plus de l'appariement codon-anticodon. En effet, des expériences ont montré que la séquence du corps des ARNt serait propre à chaque ARNt portant un acide aminé précis (Olejniczak and Uhlenbeck, 2006). Chaque ARNt, au sein d'une espèce donnée, utilise donc probablement une stratégie unique pour lier le ribosome, qui doit équilibrer l'énergie gagnée grâce aux interactions avec le centre de décodage avec celle perdue en stabilisant la conformation A/T déformée permettant ainsi un décodage précis (Voorhees and Ramakrishnan, 2013).

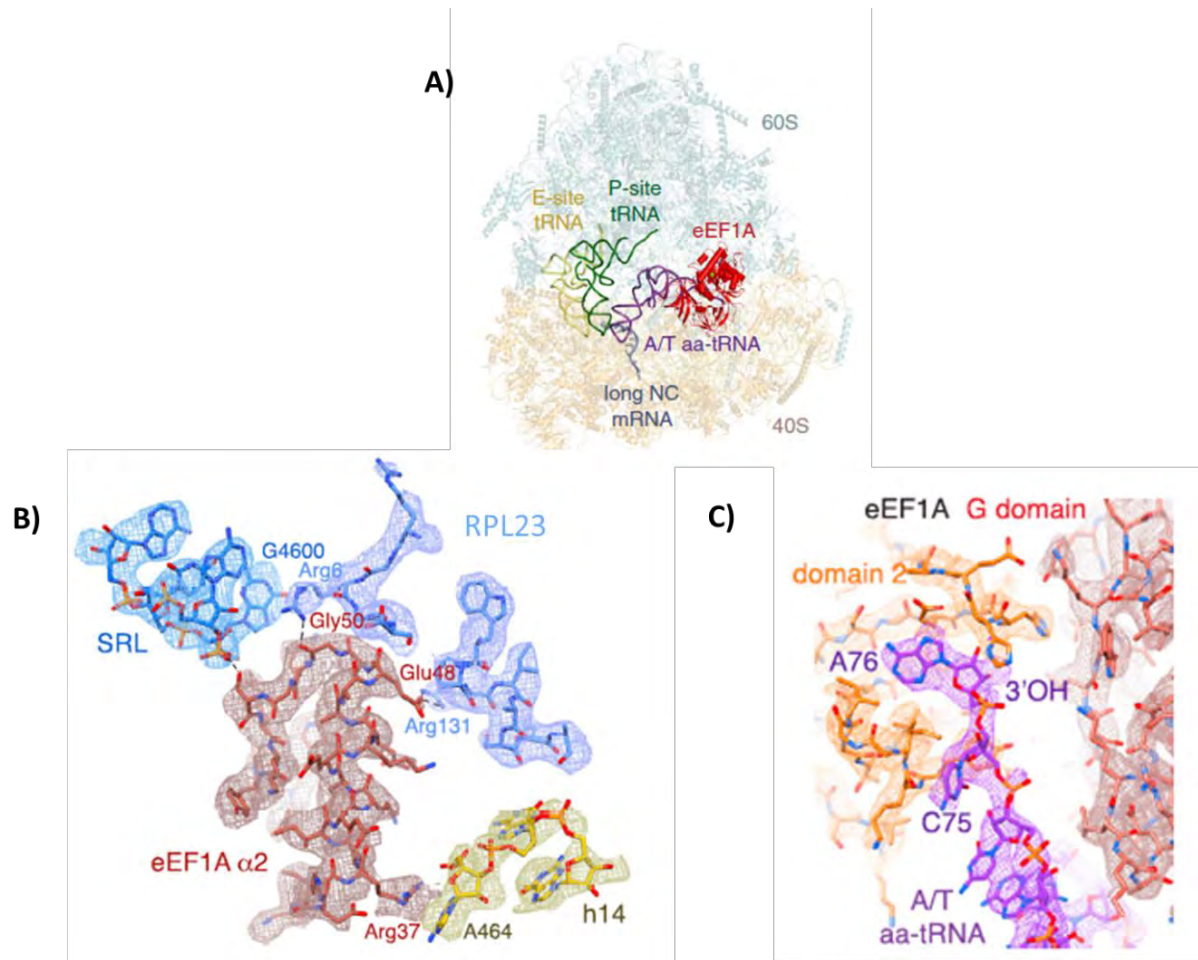


Figure 18 : Interaction du facteur eEF1A avec le ribosome et l'ARNt-aa lors de l'étape de décodage de l'ARNm. A) Vue d'ensemble du complexe d'élongation comprenant la grande (60S) et la petite (40S) sous-unité ribosomique, les ARNt du site P (en vert) et du site E (en or), l'ARNm est coloré en gris, l'ARNt-aa à l'état A/T est représenté en violet, et eEF1A en rouge. **B)** Interactions entre la boucle switch 1 avec l'hélice $\alpha 2$ d'eEF1A (rouge) avec l'ARNr et les protéines de la grande (bleu) et de la petite (jaune) sous-unité. **C)** Interactions entre l'extrémité 3' de l'ARNt-aa (violet) et le domaine 2 (orange) et le domaine G (rouge) de eEF1A. (Adapté de Shao et al., 2016, à partir du PDB : 5LZS)

Le décodage de l'ARNm médié par l'appariement des bases entre l'anticodon de l'ARNt-aa dit « cognate » (terme anglais signifiant que c'est l'ARNt-aa qui possède un anticodon correspondant au codon de l'ARNm) et le codon de l'ARNm est un mécanisme globalement conservé entre bactéries et eucaryotes. Il fait intervenir les nucléotides A1824 et A1825 chez les mammifères (A1492 et A1493 chez la bactérie) qui ressortent de l'hélice 44 (h44) de l'ARNr 18S ainsi que G626 (G530 chez la bactérie). Ces nucléotides interagissent avec le petit sillon de l'hélice codon-anticodon et stabilisent la liaison de l'ARNt du site A par liaison hydrogène (Loveland et al., 2017; Ogle et al., 2001; Shao et al., 2016). Les résidus A1824 et A1825 interagissent avec les deux premiers nucléotides du codon dans le duplex codon-anticodon (+1 et +2), permettant une

certaine tolérance pour la position en +3 qui peut prendre une position dite « bancale » (wobble) (**Figure 19A**).

En plus de ces nucléotides, d'autres facteurs entrent en jeu afin de procéder à la reconnaissance du codon. En effet, il a été montré que la protéine RPS23, comme son homologue bactérien, possède une boucle qui vient se loger dans le centre de décodage. L'acide aminé Glutamine 61 (Gln61) situé au sommet de la boucle va venir former des liaisons hydrogènes avec A1824 ainsi que le nucléotide en +2 sur le codon. De plus la Proline 62 (Pro62), permet quant à elle la formation d'une liaison hydrogène avec le nucléotide placé en +3 du codon par l'intermédiaire d'une molécule d'eau ou d'un ion (**Figure 19B**) (Ogle et al., 2001; Shao et al., 2016). De la même manière, l'extrémité C-terminale de la protéine RPS15, spécifique des eucaryotes, interagit avec le squelette phosphate de l'ARNt du site P et peut aussi former une interaction électrostatique avec l'ARNt du site A. Cela a aussi été observé chez la bactérie avec la protéine Rps13 (RPS18 chez les eucaryotes) (**Figure 19C**) (Jenner et al., 2010; Shao et al., 2016).

De manière différente, il existe aussi des interactions spécifiques aux eucaryotes, c'est le cas avec la protéine RPS30, retrouvée exclusivement chez les eucaryotes, et qui serait impliquée dans la stabilisation d'une interaction codon-anticodon correcte. En effet, l'extrémité N-terminale de RPS30, en présence d'un ARNt-aa « cognate » deviendrait ordonnée. Ce phénomène permet à l'histidine 76 d'atteindre le sillon formé entre le nucléotide en position +1 de l'anticodon et les bases A1824 et A1825 sorties de leur hélice 44, ce qui stabiliserait cette conformation. Il est intéressant de préciser que ce contact ne peut se faire que lorsque qu'il y a appariement des bases avec un ARN-aa « cognate », car il dépend de la formation du sillon qui ne se crée que si les bases A1824 et A1825 ressortent de h44. Cette interaction permettrait donc de stabiliser préférentiellement les ARNt « cognate » afin d'améliorer la discrimination (**Figure 19A**) (Shao et al., 2016). Ainsi, les contacts formés par RPS30, qui dépendent de la présence d'un ARNt-aa « cognate », et également par RPS15, pourraient augmenter la stabilité des ARNt-aa lors de la sélection initiale et de l'accommodation, permettant ainsi d'améliorer la précision du choix des ARNt-aa et d'augmenter la fidélité de la traduction par rapport aux bactéries (Kramer et al., 2010).

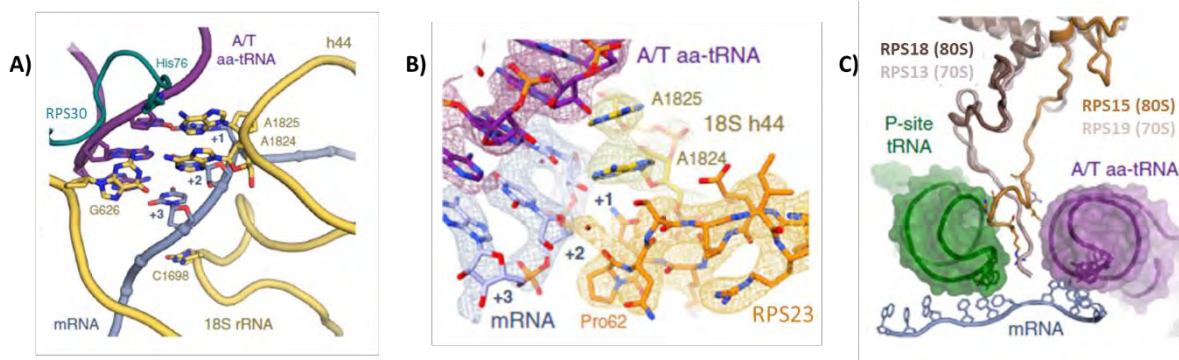


Figure 19 : Interactions mises en jeu dans le centre de décodage lors de la reconnaissance du codon par l'ARNt-aa, représenté en violet. A) Les nucléotides de l'ARNr 18S impliqués dans le décodage sont représentés en jaune ainsi qu'une partie de RPS30 en vert, l'ARNm et les nucléotides du codon en A sont colorés en gris et numérotés. **B)** Interactions dans le centre de décodage entre la protéine RPS23 (orange), l'ARNr 18S (jaune), et les nucléotides du codon au site A dans l'ARNm (gris et numérotés). **C)** Les extrémités C-Ter de RPS15 (mammifère) et RPS19 (*T. Thermophilus*) ainsi que RPS18 (mammifère) et RPS13 (*T. Thermophilus*) sont représentés en nuances de marron dans le centre de décodage du ribosome 80S comparées aux protéines orthologues dans un complexe d'élongation bactérien 70S (gris, PDB: 4V51), montrant les interactions potentielles du domaine C-Ter de RPS15 chez les mammifères ou RPS13 chez les bactéries avec les tiges-boucles anticodon de l'ARNt-aa en A/T (violet) et de l'ARNt du site P (vert). (Adapté de Shao et al., 2016, à partir du PDB : 5LZS)

Une fois la sélection de l'ARNt-aa « cognate » réalisée, grâce aux bases A1824 et A1825 qui ont permis de vérifier la géométrie de l'hélice codon-anticodon, l'étape suivante est l'hydrolyse du GTP par eEF1A afin qu'il puisse se dissocier du ribosome et ainsi laisser l'ARNt-aa s'accommoder complètement dans le site A. Chez la bactérie, lors de la reconnaissance d'un ARNt-aa « cognate » dans le centre de décodage, la petite sous-unité 30S va changer de conformation pour passer dans une configuration dite « fermée ». Ceci va permettre à EF-Tu de s'approcher de la boucle SRL de la sous-unité 50S, activant alors le centre catalytique d'EF-Tu responsable de l'hydrolyse du GTP pour qu'il puisse finalement se dissocier du ribosome (Ogle et al., 2002, 2001). Chez les mammifères, un changement de conformation du même type a pu être observé. En effet, l'épaule de la 40S vient tourner vers l'interface entre les sous-unités permettant à l'ARNr 18S d'entrer en contact avec eEF1A. De plus, ce changement de conformation permet aussi à eEF1A d'interagir avec la SRL par l'intermédiaire des domaines catalytiques (switch 1, 2 et la boucle P). Plus précisément, ces interactions entre les domaines catalytiques et la boucle SRL permettraient le positionnement de l'histidine catalytique His95 pour favoriser l'hydrolyse du GTP par eEF1A afin qu'il puisse ensuite se dissocier du ribosome (**Figure 20**) (Budkevich et al., 2014; Shao et al., 2016).

Finalement, la possibilité d'observer des structures de ribosome lié au complexe ternaire sans bloquer l'hydrolyse du GTP montre que la dissociation d'eEF1A ne se fait pas immédiatement après l'hydrolyse. Ceci est en adéquation avec des études de cinétiques qui ont montré, chez la

bactérie, que contrairement à l'hydrolyse du GTP, la dissociation d'EF-Tu était un processus lent (Behrmann et al., 2015; Pape et al., 1998).

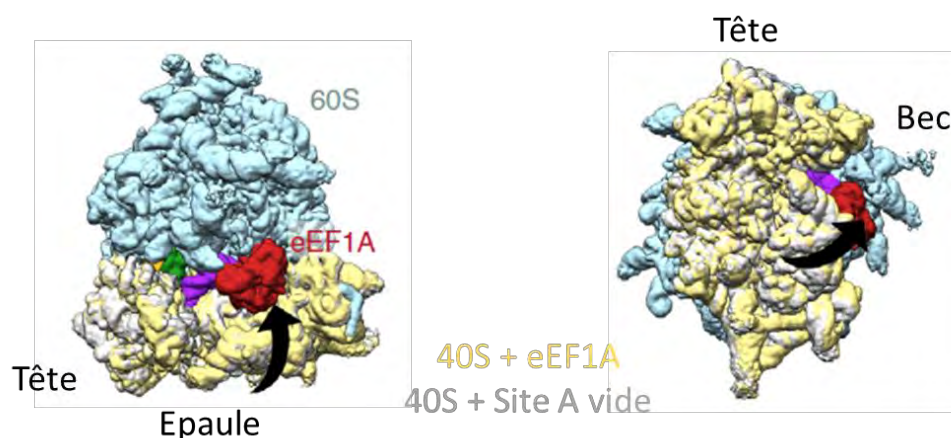


Figure 20 : Complexe d'élongation (coloré) (PDB : 5LZS) superposé à un ribosome avec un site A vide (petite sous-unité grise). Mise en évidence du mouvement correspondant à la fermeture de domaine (illustré par la flèche) avec l'épaule de la petite sous-unité se déplaçant vers la grande sous-unité, permettant les contacts entre le ribosome et le centre GTPase d'eEF1A. (Adapté de Shao et al., 2016)

b. Accommodation de l'ARNt-aa dans le site A et formation de la liaison peptidique

Une fois eEF1A décroché du ribosome, l'ARNt-aa va venir s'accommoder entièrement dans le site A du ribosome, permettant une transition de la conformation A/T vers un état classique A/A. Pour cela, l'extrémité 3' de l'ARNt va devoir se loger dans le PTC de la grande sous-unité. Chez les eucaryotes, ce mécanisme met en jeu un réarrangement de la petite sous-unité qui diffère des bactéries (Voorhees and Ramakrishnan, 2013). En effet, il a été observé chez les eucaryotes un état du ribosome appelé classique-PRE dans lequel la petite sous-unité ribosome est dans un état dit « enroulé » (« subunit rolling » en anglais). Ce réarrangement peut être décrit comme une rotation de la petite sous-unité d'environ 6° vers la tige L1 de la sous-unité 60S. Cette rotation se fait le long de l'axe de la petite sous-unité correspondant à l'hélice 44. Dans cet état classique-PRE l'ARNt-aa est déjà positionné dans le site A, mais un état intermédiaire a aussi pu être observé dans lequel la petite sous-unité 40S n'était « enroulée » que de 1 à 2° (Behrmann et al., 2015; Budkevich et al., 2014). Le mouvement d'enroulement de la petite sous-unité 40S pourrait être impliqué dans l'accommodation de l'ARNt en A. En effet, dans cet état, la petite sous-unité modifie l'ouverture de l'espace inter sous-unité, comparé à l'état POST, ce qui va entraîner à la fois la fermeture du site A et l'ouverture du site E. Ainsi, le réarrangement de la petite sous-unité pourrait être à l'origine du

repositionnement de l'extrémité 3' de ARNt-aa dans le site A (**Figure 21A**) (Budkevich et al., 2014).

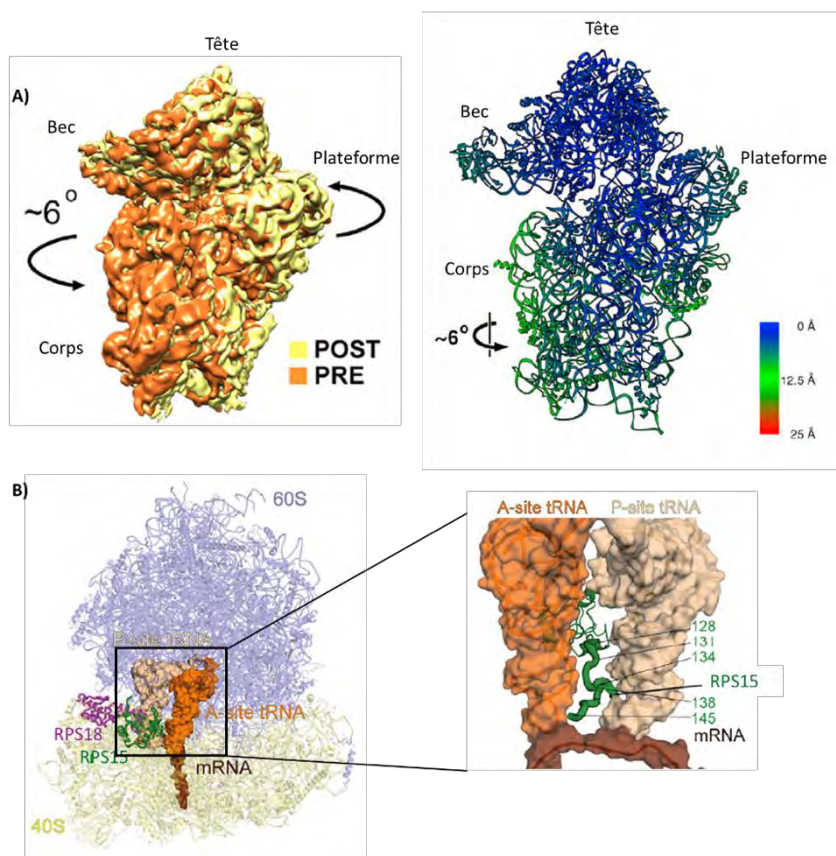


Figure 21 : Accommodation de l'ARNt-aa dans le site A après reconnaissance de l'anticodon par l'ARNm. A) Superposition de la petite sous-unité ribosomique 40S dans l'état classique-PRE (PDB : 4CXC) avec l'état POST, basé sur l'alignement de la sous-unité 60S, ce qui permet d'observer un enroulement de 6° de la sous-unité 40S vers la sous-unité 60S, indiqué par les flèches. La figure de gauche représente la sous-unité 40S de l'état classique PRE en jaune et de l'état POST en orange (Adapté de Budkevich et al., 2014). À droite, la superposition est colorée en fonction des changements de distance entre les deux modèles (Adapté de Behrmann et al., 2015). **B)** Structure du ribosome humain actif dans la conformation classique-PRE (PDB : 6Y0G), avec la grande (60S, mauve) et la petite sous-unité (40S, jaune) ; sont aussi indiqués les protéines ribosomiques RPS18 en violet et RPS15 en vert ainsi que l'ARNm en marron, l'ARNt du site A en orange et celui du site P en beige. Un zoom est réalisé sur le zone de décodage où est représentée l'extrémité C-Terminale de RPS15 entre les ARNt des sites A et P (Adapté de Bhaskar et al., 2020).

Récemment, une étude a aussi pu mettre en évidence l'implication de la protéine RPS15 dans l'accommodation de l'ARNt-aa dans le site A. En effet, ses auteurs ont montré que l'extrémité C-terminale de la protéine, spécifique des eucaryotes, pourrait être impliquée dans plusieurs réarrangements du ribosome durant l'élongation en se plaçant entre les ARNt positionnés en A et en P. Dans l'état classique-PRE du ribosome la partie C-terminale de la protéine RPS15 interagit à la fois avec l'ARNt en A et l'ARNm au niveau du centre de décodage, et est bien ordonnée. Ces données mettent en évidence l'importance des résidus de l'extrémité C-terminale de RPS15 qui

fonctionnent comme une sorte de point d'ancrage pour l'ARNt-aa positionné en A, l'aidant à verrouiller son ASL, pendant l'enroulement de la sous-unité 40S permettant à son extrémité 3' de venir s'accommoder dans le PTC. Ce mécanisme moléculaire permettrait donc d'éviter un décalage de cadre de lecture aidant ainsi à maintenir la fidélité de la traduction (**Figure 21B**) (Bhaskar et al., 2020).

Une fois l'accommodation de l'ARNt-aa dans le site A terminée, la formation de la liaison peptidique avec l'ARNt-peptidyl dans le site P se produit très rapidement. Ce processus se déroule dans le PTC localisé dans la grande sous-unité ribosomique 60S. Comme cela a été précédemment indiqué, ce domaine est composé d'ARNr qui catalysent la réaction, et ces ARNr sont très conservés dans les trois domaines du vivant. Ce mécanisme serait donc conservé à travers les différents organismes. Lors de la formation de la liaison peptidique, le PTC permet le positionnement des ARNt-peptidyl et -aa pour la catalyse. Chez la bactérie, ce processus fait intervenir le facteur d'élongation EF-P, et chez les eucaryotes c'est son orthologue, le facteur eIF5A qui entre en jeu. Ce facteur eIF5A se lie au site E et interagit avec le bras accepteur de l'ARNt-peptidyl, ce qui maintiendrait, comme pour EF-P bactérien, dans une position favorable à la formation de la liaison peptidique. Lors de ce processus, le peptide naissant est transféré de l'ARNt-peptidyl du site P vers l'ARNt-aa au site A afin de permettre le rallongement de l'ARNt-peptidyl (Doerfel et al., 2015; Gutierrez et al., 2013; Melnikov et al., 2016; Schmidt et al., 2016; Shin et al., 2017).

Ce mécanisme de formation de la liaison peptidique est accompagné d'un repositionnement des ARNt dans des états hybrides ainsi que du réarrangement de la petite sous-unité ribosomique (Moazed and Noller, 1989; Voorhees and Ramakrishnan, 2013). Cette conformation nommée hybride-PRE correspondrait à un état transitoire avant l'étape de translocation médiée par le facteur d'élongation eEF2. Dans la littérature, trois états du ribosome dans cette configuration hybride-PRE, aussi nommée rotation-PRE ont pu être décrits (Behrmann et al., 2015; Budkevich et al., 2011). Chacun de ces états, comme leur nom l'indique possède une sous-unité 40S tournée. Lors de cette rotation, le corps et la plateforme de la sous-unité 40S vont tourner par rapport à la sous-unité 60S. Premièrement, pour l'état rotation-PRE*, la sous-unité 40S est tournée d'environ 8° et possède des ARNt en A, P et E dans des configurations classiques (**Figure 22**) (Behrmann et al., 2015). Les auteurs décrivent cet état comme un état très transitoire mais pour lequel l'interprétation est difficile dû à la basse résolution des ARNt et du centre de décodage (Behrmann et al., 2015). La question se pose alors de savoir si cet état ne correspondrait pas à l'état pendant lequel la liaison peptidique se forme grâce à l'action du facteur eIF5A. En effet, ce facteur, qui ressemble à un ARNt, se place dans le site E et a déjà été observé dans un ribosome ayant une configuration tournée (Melnikov et al., 2016). De plus, les états suivants du ribosome en rotation ne contiennent plus d'ARNt en E et sa dissociation est nécessaire et pourrait être médiée

par ce facteur et/ou par la rotation du corps de la sous-unité 40S. Les conformations suivantes, hybrid-PRE-1 et hybrid-PRE-2 possèdent une sous-unité 40S tournée de 10° et 11° respectivement. Dans le complexe hybrid-PRE-1, l'ARNt-peptidyl se trouve dans le site A alors que l'ARNt-déacylé adopte une position hybride dans laquelle l'anticodon est apparié à l'ARNm dans le site P et le bras accepteur de l'ARNt est lui dans le site E (**Figure 22**). Cette conformation évolue ensuite vers l'état hybride-PRE-2, dans lequel l'ARNt-déacylé se trouve toujours en position hybride P/E et l'ARNt-peptidyl est cette fois ci repositionné dans une configuration hybride A/P avec l'anticodon apparié à l'ARNm dans le site A et le peptide attaché au bras accepteur dans le site P (**Figure 22**) (Behrmann et al., 2015; Budkevich et al., 2011).

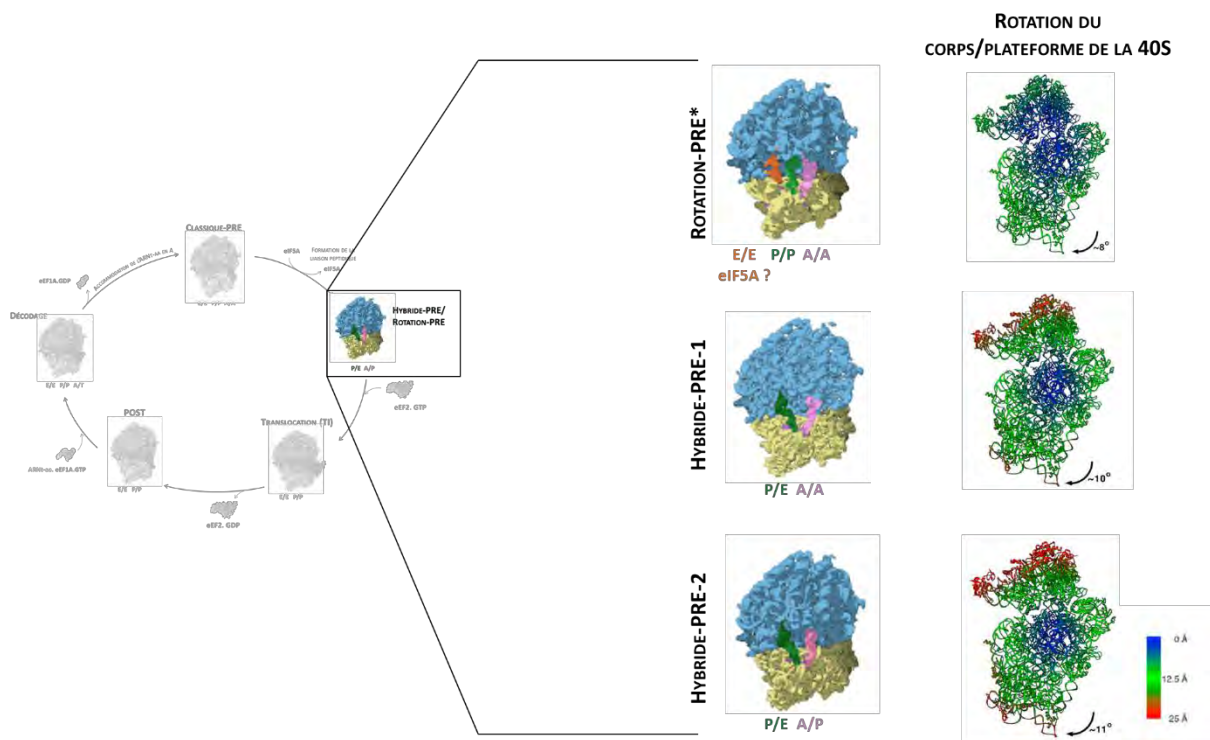


Figure 22 : Etats hybride-PRE/Rotation-PRE du ribosome lors du repositionnement des ARNt. Les états Rotation-PRE*, Hybride-PRE-1 et Hybride-PRE-2 sont représentés avec la petite (jaune) et la grande (bleue) sous-unité ribosomique ainsi que l'ARNt-peptidyl en rose et l'ARNt-déacylé en vert. Le facteur en orange peut être l'ARNt-déacylé avant formation de la liaison peptidique ou bien eIF5A. La rotation du corps/platforme de la sous-unité 40S est aussi montré grâce à sa structure colorée en fonction des changements de distance entre le modèle indiqué et le modèle POST (PDB : 5AJ0). (Adapté de Behrmann et al., 2015)

c. Translocation de l'ARNt et de l'ARNm

L'étape de translocation est primordiale, elle permet le décalage d'un codon de l'ARNm afin de pouvoir passer au cycle suivant d'élongation. Lors de cette étape, les ARNt-peptidyl et -déacylé vont se repositionner afin de passer d'une position hydride A/P et P/E, retrouvés dans les états hybride-PRE décrits précédemment, vers des configurations classiques P/P et E/E respectivement. Ce processus fait intervenir le facteur d'élongation eEF2, orthologue d'EF-G chez les bactéries et est possible grâce à deux réarrangements structuraux principaux de la petite sous-unité ribosomique permettant le repositionnement des ARNt et de l'ARNm. Tout d'abord, comme cela a été montré précédemment, le corps/plateforme de la sous-unité 40S va tourner relativement à la sous-unité 60S, c'est ce qui est observé sur les états hybrides-PRE (**Figure 22**). Puis un deuxième réarrangement va avoir lieu, qui correspond au pivotement de la tête de la sous-unité 40S (« swivelling »). C'est le pivotement de la tête accompagné du retour à l'état d'origine du corps/plateforme de la sous-unité 40S, c'est-à-dire avant rotation (vers l'état POST), qui permettrait le positionnement des ARNt dans des configurations classiques P/P et E/E.

À ce jour, plusieurs états du ribosome en translocation ont pu être décrits. Ces structures ont permis d'obtenir des informations détaillées sur les mouvements et les interactions mis en jeu lors du mécanisme de la translocation. La première étape de la translocation correspond à l'arrivée d'eEF2 au niveau du site A du ribosome (**Figure 23A**). Le facteur eEF2 va venir s'ancrer à la grande sous-unité via ses domaines I et V. Les domaines II et III vont eux interagir avec l'ARNr 18S de la sous-unité 40S. Ces dernières interactions ne sont visibles qu'au début de la translocation, car la rotation de la sous-unité 40S par rapport à la sous-unité 60S est maximale à cet état-là. De plus, l'enzyme va venir se loger dans le centre de décodage du ribosome. Le domaine III d'eEF2 vient s'attacher à la protéine RPS23 située au niveau de l'épaule de la sous-unité 40S permettant au domaine IV de l'enzyme d'atteindre l'interface corps/plateforme et tête de la sous-unité 40S via son association à RPS30, qui est proche de RPS23, afin d'intégrer finalement le centre de décodage (**Figure 23B**). Dans le centre de décodage, eEF2 va interagir spécifiquement avec le duplex codon-anticodon, afin de le stabiliser. Cette interaction est médiée notamment par la diphthamide, une modification post-traductionnelle portée par l'Histidine conservée His715 (chez l'Homme) qui viendrait entrer en contact avec l'hélice h44 de la sous-unité 40S au niveau du site P. L'interaction d'eEF2 avec le duplex codon-anticodon permettrait la stabilisation de ce dernier, d'une manière similaire à la stabilisation médiée par les nucléotides A1824, A1825 et G626 de l'ARNr 18S lors de l'étape de décodage (**Figure 23C**) (Abeyrathne et al., 2016; Anger et al., 2013; Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018; Murray et al., 2016.; Spahn et al., 2004; Taylor et al., 2007).

L'association d'eEF2 au ribosome va avoir une double conséquence, en effet, elle permettrait à la fois de déclencher le pivotement de la tête de la sous-unité 40S, mais viendrait aussi pousser, via son domaine IV, l'ARNt situé dans le site A/P. Les ARNt vont alors se positionner dans des états transitoires. Concernant le positionnement de l'ARNt-peptidyl du site A, sa tige-boucle de l'anticodon (ASL) est retrouvée à moitié transloquée entre les sites A et P de la petite sous-unité, et son extrémité acceptrice se trouve en contact avec le centre PTC, dans le site P de la grande sous-unité, formant un état chimérique appelé ap/P. De la même manière, l'ARNt-déacétylé va lui prendre une position pe/E (**Figure 24A**) (Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018).

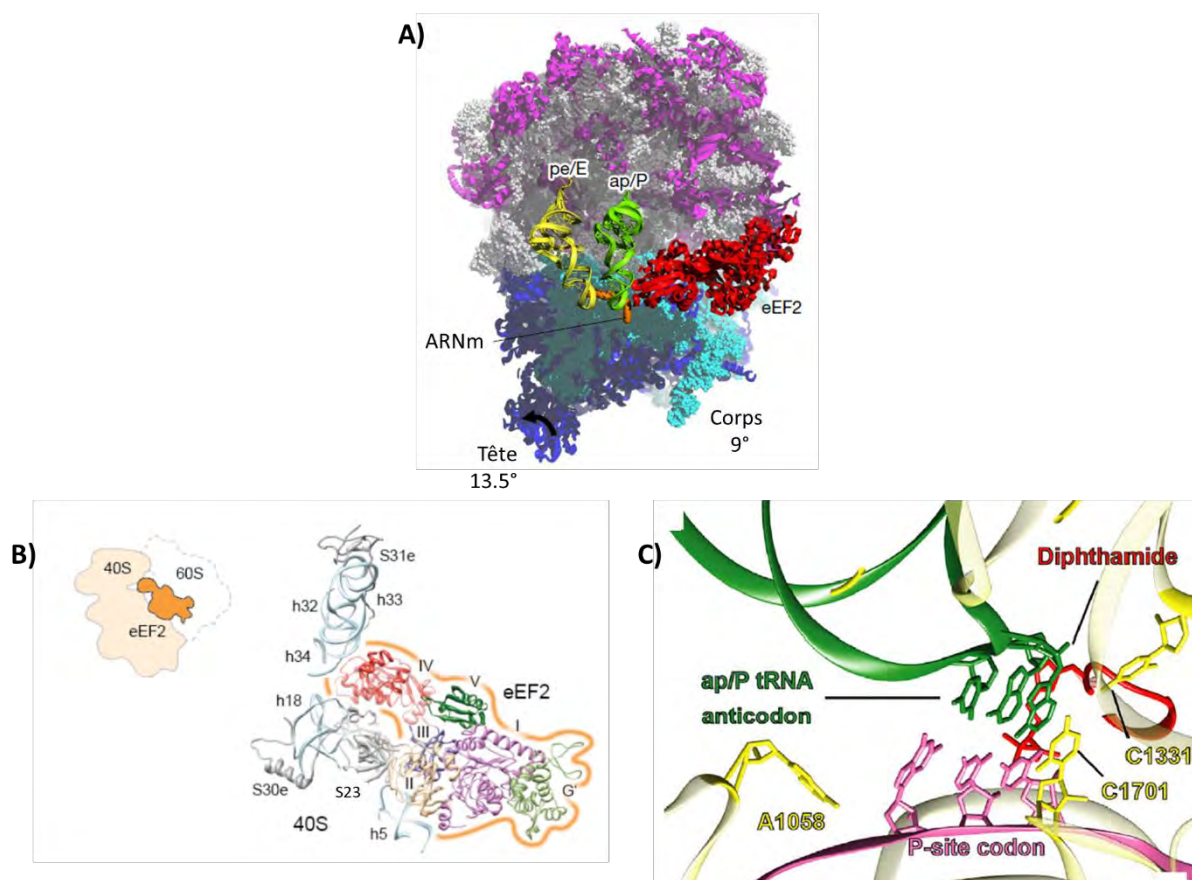


Figure 23 : Association d'eEF2 au niveau du site A du ribosome. **A)** Structure du ribosome dans l'état TI (PDB : 7OSM) avec la petite sous-unité en bleu, la grande sous-unité en violet et gris. Les ARNt-déacétylé (jaune) et -peptidyl (vert) sont dans une conformation pe/E et ap/P respectivement. Le facteur eEF2 est représenté en rouge, et l'ARNm en orange. Les degrés de rotation de la tête et du corps sont indiqués (relativement à un état non tourné) (Adapté de Djumagulov et al., 2021). **B)** Interaction d'eEF2 avec la sous-unité 40S, chaque domaine est annoté et coloré différemment. Les hélices de l'ARNr 18S ainsi que les protéines ribosomiques interagissant avec eEF2 sont indiquées (Adapté de Anger et al., 2013 ; à partir du PDB : 4V6X). **C)** Zoom sur le site P du ribosome associé à eEF2, dans lequel la diphthamide (rouge) stabilise le duplex codon-anticodon (rose-vert) lors de la translocation (Adapté de Flis et al., 2018 ; à partir du PDB : 6GZ3).

À ce stade, les ARNt-peptidyl et -déacylé doivent encore être repositionnés afin que leur ASL puisse s'intégrer aux site P et E de la petite sous-unité, respectivement, les tiges acceptrices étant déjà positionnées dans leur état presque final du côté de la grande sous-unité (**Figure 24A**). Ceci va être possible à la fois grâce à eEF2, comme indiqué précédemment, mais aussi grâce aux réarrangements structuraux (Voorhees and Ramakrishnan, 2013). Les structures de quatre états principaux de translocation ont pu être résolus, appelés TI, TI-POST-1, TI-POST-2 et TI-POST-3, le premier étant obtenu par cristallographie aux rayons X et les trois autres par cryo-EM (**Figure 24B**) (Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018). Ces structures ont permis la visualisation des réarrangements structuraux, aidant ainsi à la détermination de la chronologie des événements, à l'origine de la translocation du duplex ARNt-ARNm. Les différents réarrangements structuraux permettant la translocation vont être décrits par la suite, mais la vidéo (movie 1) de l'article (Djumagulov et al., 2021) permet de visualiser comment se déroulent ces changements conformationnels à l'origine du mouvement des ARNt dans le ribosome.

Tout d'abord, dans l'état TI, le corps/plateforme de la 40S est tournée d'environ 9°, correspondant à une rotation maximale de la petite sous-unité par rapport à la sous-unité 60S. De plus, dans ce premier état, la tête a pivoté de presque 14°, sous l'effet de l'association d'eEF2 (**Figure 23A**) (Djumagulov et al., 2021). Ces domaines vont ensuite revenir à leurs positions de prétranslocation (avant rotation). Ce processus va se faire en deux temps, d'abord, c'est le corps/plateforme qui va se retourner afin de reprendre sa position initiale. Puis, dans un second temps, la tête re-pivotera dans le sens inverse afin d'atteindre l'état POST. Ceci a pu être montré grâce aux structures des différents états intermédiaires de la translocation. En effet, dans les états TI-POST-1 et TI-POST-2, le corps de la sous-unité 40S n'est plus que partiellement tourné avec des angles de rotation de 4° et 0,7° respectivement, alors que la tête de la sous-unité 40S est elle encore pivotée (**Figure 24B**) (Flis et al., 2018). Le fait que la tête de la sous-unité 40S ne revienne pas à sa position initiale en même temps que le corps peut être expliqué par son interaction avec les ARNt qui l'en empêche. Finalement lorsque le corps de la 40S aura repris sa position initiale, cela créera probablement une tension dans la région du cou de la sous-unité 40S ce qui forcera la tête à se délier des ARNt et à revenir en arrière. Ainsi, les dernières étapes de la translocation sont réalisées par un ré-ajustement de la tête vers un état non tourné permettant aux ARNt d'être repositionnés dans une configuration classique P/P, E/E, ce qui crée alors une nouvelle liaison de l'ARNt-ARNm (un codon plus bas) au niveau du centre de décodage de la petite sous-unité (**Figure 24**) (Anger et al., 2013; Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018; Taylor et al., 2007).

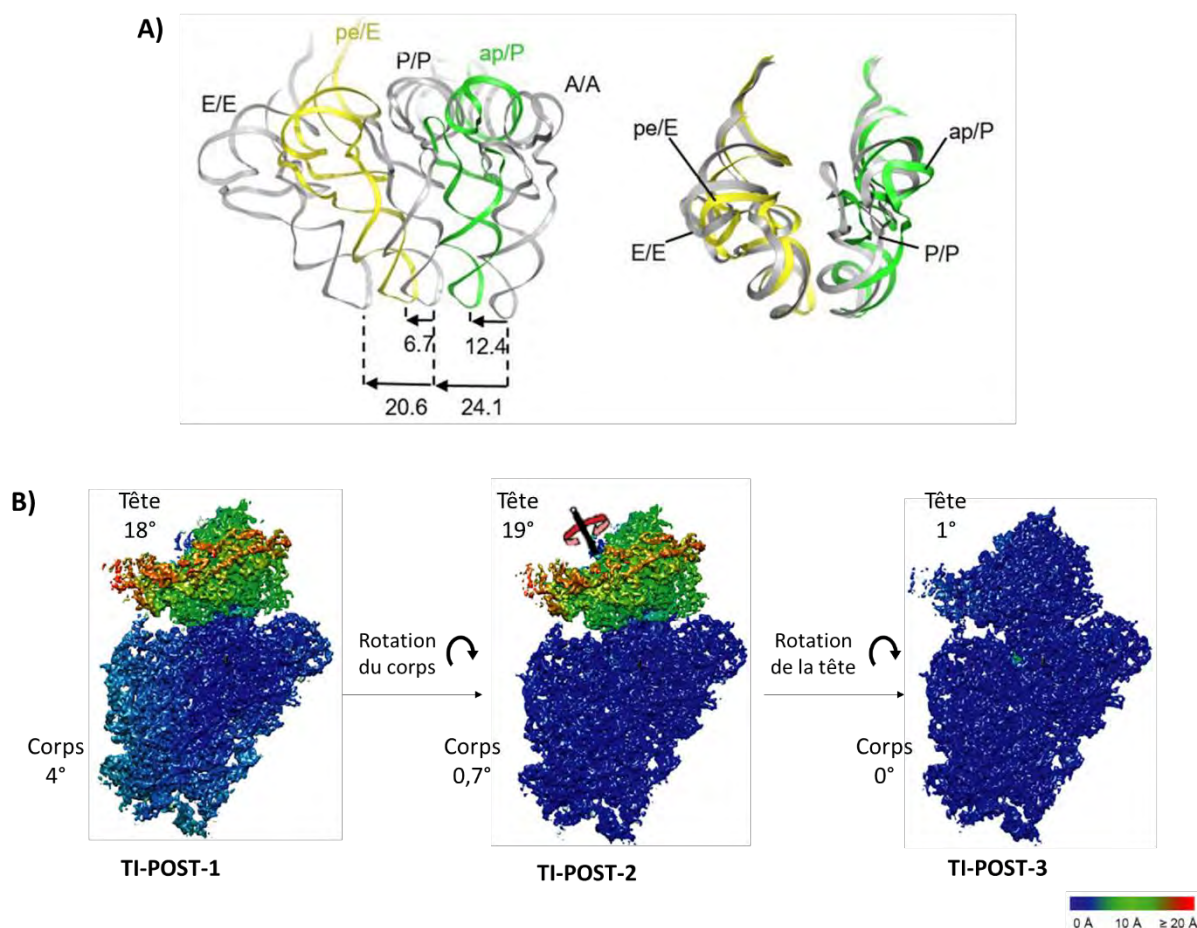


Figure 24 : Réarrangements structuraux de la 40S à l'origine de la translocation du duplex ARNt-ARNm. A) Positions des ARNt du ribosome dans l'état TI (PDB : 70SM) par rapport aux ARNt dans les états classiques A, P et E (gris, PDB : 4V6F). Le panel de gauche représente les ARNt alignés sur le corps de la sous-unité 40S. Le panel de droite montre les ARNt alignés sur la sous-unité 60S, les distances indiquées sont en Å (Adapté de Djumagulov et al., 2021). B) Structures de la petite sous-unité ribosomique lors des étapes de translocation, avec le TI-POST-1 (PDB : 6GZ3), TI-POST-2 (PDB : 6GZ4) et le TI-POST-3 (PDB : 6GZ5). Les structures des sous-unité 40S sont colorées en fonction des changements de distance entre le modèle indiqué et le modèle POST (non tourné) (PDB : 5AJ0). Les degrés de rotation des domaines sont indiqués et correspondent à des rotation antihoraires (Adapté de Flis et al., 2018).

Ces réarrangements structuraux vont donc permettre au duplex ARNt-ARNm de se déplacer suffisamment pour qu'un nouveau codon de l'ARNm se retrouve dans le site A prêt à accueillir un nouvel ARNt-aa. Pendant le mouvement de la sous-unité 40S il est primordial de stabiliser et maintenir ce duplex ARNt-ARNm afin qu'il ne bouge pas en même temps que la sous-unité 40S et pour éviter un décalage du cadre de lecture. C'est le facteur eEF2 qui va permettre le maintien du duplex codon-anticodon via son domaine IV, comme précisé précédemment. De plus, dans les états TI-POST-1 et TI-POST-2, au vu de la rotation arrière du corps de la sous-unité 40S, les domaines II et III d'eEF2 interagissent moins avec la sous-unité 40S, et le facteur se retrouve

plus ancré à la sous-unité 60S. Dans cette conformation, eEF2 permet le maintien des ARNt dans les sites P et E de la sous-unité 60S, tout en interrompant l'interaction entre le centre de décodage de la sous-unité 40S et le duplex ARNt-ARNm. Ainsi, les domaines de la sous-unité 40S vont pouvoir revenir à leur position de pré-translocation (avant rotation), sans ramener l'ARNt et l'ARNm avec eux, évitant par la même occasion un décalage du cadre de lecture. De plus, le réarrangement du corps de la sous-unité 40S va entraîner un mouvement de RPS23, qui interagit avec le domaine III d'eEF2, ainsi la propagation de ce mouvement vers le domaine switch II d'eEF2 déclencherait l'hydrolyse de GTP par l'enzyme lors des dernières étapes de la translocation (**Figure 25**). L'hydrolyse de GTP va conduire à un changement de conformation d'eEF2, à l'origine de sa dissociation du duplex ARNm-ARNt. Cela va empêcher le retour du duplex codon-anticodon vers le site A. Finalement, eEF2 va pouvoir se dissocier du ribosome (Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018).

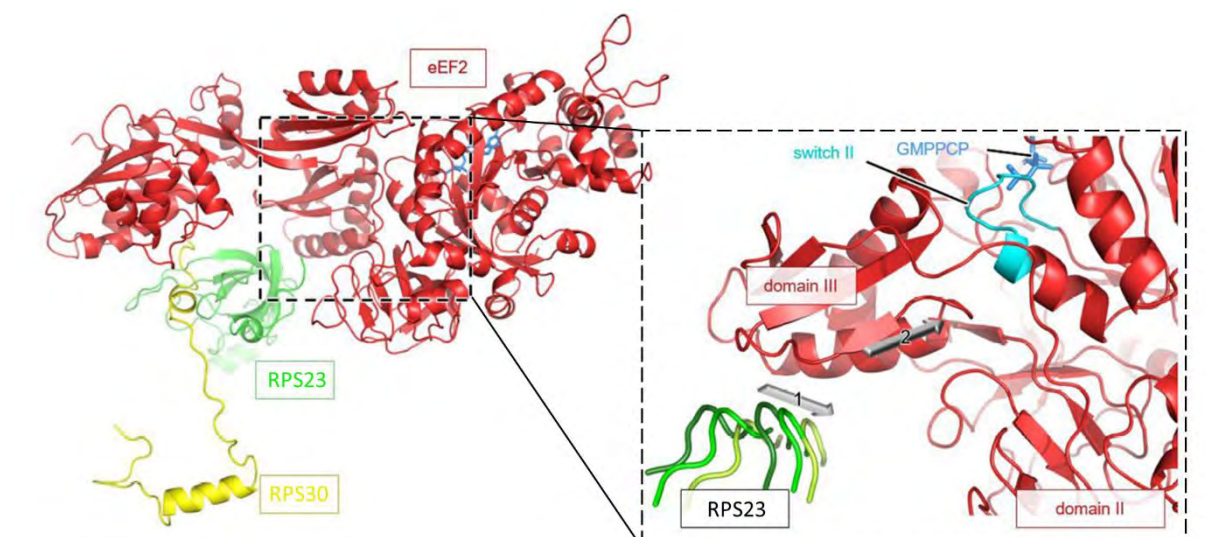


Figure 25 : Déclenchement de l'hydrolyse du GTP par l'interaction entre eEF2 et la protéine RPS23 de l'épaule de la sous-unité 40S lors de la rotation inverse du corps de la sous-unité 40S. Le panel de gauche représente une vue de l'interaction d'eEF2 (rouge) avec les protéines ribosomiques RPS30 (jaune) et RPS23 (vert) au niveau de l'épaule de la sous-unité 40S (PDB : 70SM). Le panel de droite est un zoom de l'interaction entre RPS23 et eEF2 durant la rotation du corps de la sous-unité 40S. Le mouvement de RPS23 lors de la rotation arrière du corps de la sous-unité 40S est représenté par la flèche 1, ce mouvement se propage jusqu'au domaine switch II via le domaine III (flèche 2) ce qui va déclencher l'hydrolyse du GTP. Les régions de RPS23 adjacentes à eEF2 sont affichées et colorées de vert foncé à vert clair en fonction de l'état de rotation où le vert foncé est l'état le plus tourné (TI ; 70SM) et les verts moyens (TI-POST-1 ; 6GZ3) et clairs (TI-POST-3 ; 6GZ5) représentent les états les moins tournés. L'alignement a été fait en utilisant eEF2 (Adapté de Djumagulov et al., 2021).

Enfin, la rotation inverse de la tête de la sous-unité 40S dans son état initial permettra alors le positionnement des ARNt dans une configuration classique en P/P et E/E, comme observé dans l'état TI-POST-3 pour lequel le corps est complètement revenu à sa position initiale et la tête n'est plus qu'à 1° de la position retrouvée dans l'état POST (**Figure 26**) (Flis et al., 2018).

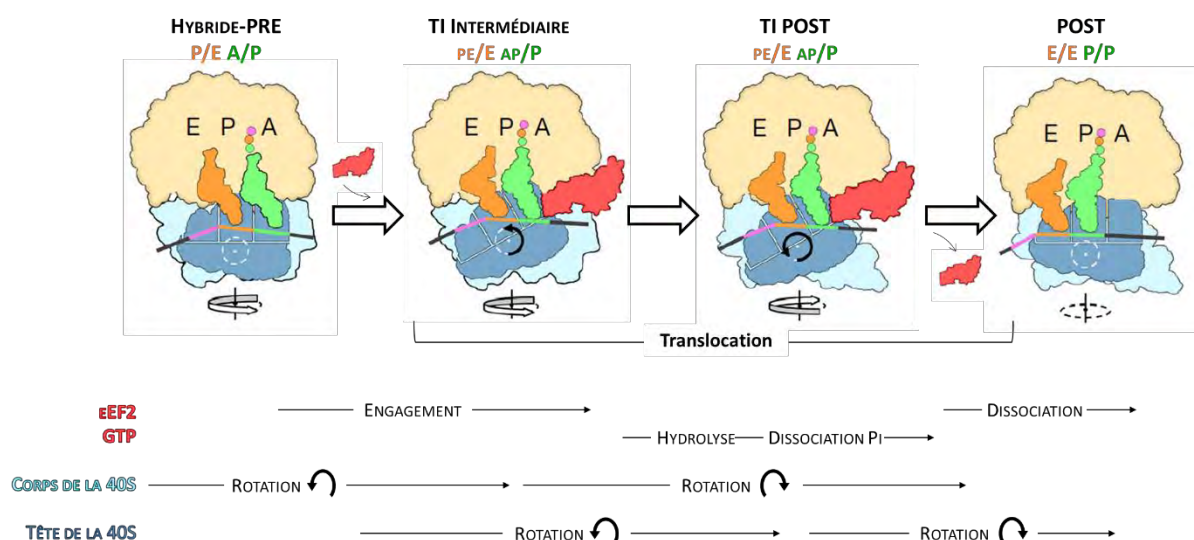


Figure 26 : Vue d'ensemble des réarrangements impliqués dans l'étape de translocation. Les états hybride-PRE, TI, TI-POST et POST sont schématisés avec la sous-unité 60S en jaune, et la sous-unité 40S en nuance de bleu dont le corps représenté en cyan et la tête en bleu foncé. L'ARNt-déacylé est coloré en orange et l'ARNt-peptidyl en vert, le facteur d'élongation eEF2 en rouge. Les étapes permettant la translocation sont indiquées avec les flèches représentant le sens de rotation (horaire ou antihoraire). (Adapté de Djumagulov et al., 2021)

Une fois que la tête de la sous-unité 40S a complètement repris sa position initiale, le ribosome se retrouve dans un état appelé POST. Mais, afin d'obtenir cet état POST, un dernier réarrangement doit avoir lieu, c'est le désenroulement de la sous-unité 40S (rotation inverse d'environ -6°). Pour rappel, l'enroulement de la petite sous-unité a eu lieu lors de l'accommodation de l'ARNt dans le site A du ribosome. Lorsque ce dernier réarrangement structural est terminé, le ribosome se trouve dans la configuration POST qui lui permet d'accueillir un nouvel ARNt-aa dans son site A, et est donc prêt à repartir dans un nouveau cycle d'élongation (Behrmann et al., 2015).

De manière intéressante, chez les eucaryotes, contrairement aux bactéries, dans l'état POST, le site E du ribosome est occupé par un ARNt-déacylé. Chez les bactéries, la libération de l'ARNt du site E se ferait soit juste après la translocation, avant la venue d'un nouvel ARNt en A, soit lors de l'arrivée de l'ARNt-aa dans le site A : le moment de la dissociation est encore débattu

(Wilson and Nierhaus, 2006). Chez les eucaryotes, seul l'état hybride-PRE ne contient pas d'ARNt en E. Il est proposé que la dissociation de cet ARNt du site E pourrait se faire lors de la rotation du corps de la sous-unité 40S qui déstabiliserait l'interaction entre l'ARNt vide et le ribosome et permettrait ainsi sa dissociation du ribosome (Anger et al., 2013; Behrmann et al., 2015; Ferguson et al., 2015).

Finalement, ces étapes d'élongation peuvent être bloquées par l'utilisation d'antibiotique (Pellegrino et al., 2021) pour revue). Lors de l'étude des ribosomes, de leur biogenèse ou encore de leur fonctionnement dans la cellule il est très fréquent d'utiliser le cycloheximide (CHX), car il est connu pour bloquer la synthèse protéique. Des études structurales ont permis de décrire son mode d'action. En effet, le CHX va venir se loger au niveau du site E du ribosome dans la 60S, là où vient normalement se placer l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt. En se plaçant ainsi, l'étape de translocation durant laquelle les ARNt se repositionnent dans les sites P/P et E/E va être bloquée. De plus, cet antibiotique est aussi responsable du délogement des ARNt placés dans les sites E du ribosome durant le cycle d'élongation (Garreau de Loubresse et al., 2014; Myasnikov et al., 2016).

L'ensemble des processus présentés précédemment impliquant le ribosome, de leur biogenèse jusqu'à leur fonctionnement dans la synthèse protéique, sont des mécanismes qui doivent être finement contrôlés et régulés afin d'obtenir des ribosomes fonctionnels traduisant correctement les ARNm. Par exemple, lors des précédentes parties, les protéines ribosomiques RPS14, RPS15, RPS26 ou encore RPS28 ont été mentionnées pour leurs rôles importants, que ce soit dans la biogenèse des ribosomes mais aussi dans le mécanisme de synthèse protéique par le ribosome. Ainsi, la mutation de l'une de ces protéines ribosomiques peut avoir de graves impacts sur les fonctions de la cellule et entraîner des pathologies qui sont nommées ribosomopathies. En effet, ces protéines ribosomiques ainsi que d'autres composants du ribosome ont été identifiés portant des mutations dans différents cas de ribosomopathies. Ces mutations peuvent aussi être à l'origine de l'apparition de cancers.

IV. Les maladies associées à des défauts du ribosome

Les ribosomopathies correspondent à des maladies causées par des défauts d'éléments impliqués dans l'assemblage ou le fonctionnement des ribosomes. Ces défauts sont causés par des mutations qui peuvent toucher les protéines ribosomiques, ainsi que les facteurs de maturation de l'ARNr ou de l'assemblage des sous-unités ribosomiques. Ces mutations peuvent être congénitales, c'est-à-dire héritées et présentes dès la naissance ou somatiques, acquises et qui apparaissent plus tardivement. Les ribosomopathies sont d'abord caractérisées par un phénotype d'hypo-prolifération cellulaire (anémie, insuffisance de la moelle osseuse...) qui peut évoluer vers un état d'hyper-prolifération cellulaire entraînant l'apparition de cancers.

Elles sont à l'origine de défauts impactant l'assemblage des ribosomes, mais aussi la traduction ou encore les fonctions extra-ribosomiques des RP. Par la suite je m'attacherai à présenter les conséquences des défauts de ces trois mécanismes et les maladies qui en résultent.

1. Manifestations des défauts de la biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est étroitement liée à la croissance et à la prolifération cellulaires et est considérée comme l'un des processus les plus énergivores dans la prolifération des cellules. En effet, chez la levure, il a été estimé que 2000 ribosomes sont assemblés et contrôlés chaque minute (Warner, 1999). Des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'assemblage des ribosomes ont pour conséquence une diminution de la production de ribosomes matures, entraînant par la même occasion une baisse globale du niveau de synthèse des protéines traduites. Dans ce contexte, les maladies associées à ce genre de défaut se caractérisent en général par un phénotype d'hypo-prolifération cellulaire. Ce phénotype est à l'origine de différents symptômes tels que l'anémie, une insuffisance de la moelle osseuse (avec des difficultés à produire suffisamment de globules rouges), ou encore une dysostose (malformation de certains os). Paradoxalement, les patients atteints de ces ribosomopathies ont un risque élevé de développer ensuite un cancer, en progressant vers un état d'hyper-prolifération cellulaire.

a. Cas des ribosomopathies dues à une haplo-insuffisance

Chacune des anomalies génétiques impacte une étape spécifique de la biogenèse des ribosomes et cause différentes maladies, ici les ribosomopathies les plus étudiées seront abordées (Figure 27).

Tout d'abord, il existe des formes de ribosomopathies liées à des défauts de transcription et/ou de maturation de l'ARNr.

C'est le cas du **Syndrome de Treacher Collins** (TCS), il se traduit par diverses malformations cranio-faciales. Ce syndrome est provoqué par des mutations ou délétion congénitales qui apparaissent sur les gènes *TCOF1*, *POLR1C* et *POLR1D*. Ces anomalies vont impacter la transcription et la méthylation des pré-ARNr à cause notamment d'une perte de l'activité des ARN polymérases I et III. Ceci va avoir pour conséquence une diminution du niveau de ribosome mature et un déclenchement de l'apoptose des cellules impliquées dans le développement des tissus et des os du visage expliquant ainsi les symptômes associés à ce syndrome (Dauwerse et al., 2011).

Une autre forme de ribosomopathie est, quant à elle, liée plus spécifiquement à des défauts des modifications de l'ARNr. Il s'agit de la **dyskeratose congénitale** (DC) qui est caractérisée par une insuffisance de la moelle osseuse généralement associée à une hyperpigmentation de la peau, une dystrophie des ongles, une leucoplasie des muqueuses et une fibrose pulmonaire. Elle est causée par une délétion partielle ou des mutations faux-sens du gène *DKC1* qui code pour la dyskérine (Heiss et al., 1998; Knight et al., 1999). Cette enzyme est responsable de la pseudo-uridylation de l'ARNr par l'intermédiaire de snoARN à boîte H/ACA ainsi que de trois autres protéines : NOP10, NHP2 et GAR1. NOP10 et NHP2 ont par ailleurs aussi été identifiés mutés dans des cas de DC (Vulliamy and Dokal, 2008; Walne et al., 2007). Il est intéressant de souligner que la dyskérine, GAR1, NOP10 et NHP2 font aussi parties du complexe de la télomérase responsable de la maintenance des séquences protectives à la fin des chaque chromosome : les télomères (Wang and Meier, 2004). De plus, il a été montré que les télomères des patients atteints de DC sont très courts (Vulliamy et al., 2001). Au vu de ces informations il serait suggéré que la DC soit dû à des défauts de maintenance des télomères.

Enfin « **l'hypoplasie cartilage-cheveux** » (CHH pour Cartilage Hair Hypoplasia) se manifeste par les symptômes suivants : petite taille, insuffisance de la moelle osseuse, hypoplasie des cheveux et du cartilage et immunodéficience. Cette maladie est provoquée par des mutations du gène *RMRP* (RNA Component of Mitochondrial RNA Processing Endoribonuclease), transcrit en un long ARN non codant faisant partie du complexe RNase MRP. Ce complexe est impliqué dans la maturation du pré-ARNr donnant naissance aux ARNr 18S et 5,8S matures. Ces mutations de *RMRP* affectent donc la maturation du pré-ARNr en inhibant le clivage de l'ITS1 induisant une diminution des ARNr 18S et 5,8S matures (Ridanpää et al., 2001; Welting et al., 2004).

D'autres ribosomopathies sont causées par des défauts impactant les étapes d'assemblage des sous-unités ribosomiques.

Une des ribosomopathies les plus étudiées est l'**anémie de Blackfan-Diamond** (DBA pour Diamond Blackfan Anemia). Les patients atteints de DBA souffrent d'aplasie érythroïde (anémie) associée à plusieurs anomalies congénitales, parmi lesquelles, des malformations craniofaciales, des malformations des mains, des défauts de développement génito-urinaires et cardiaques, ainsi qu'une susceptibilité accrue à développer notamment des leucémies ou des tumeurs solides (Goudarzi and Lindström, 2016). En 1999, les mutations du gène de la protéine ribosomique RPS19 ont été les premières anomalies génétiques décrites causant la DBA (Draptchinskaia et al., 1999). À ce jour, un total de 20 gènes mutés a été identifié, parmi lesquels *RPS19*, *RPL5*, *RPS26* et *RPL11* sont retrouvés mutés dans 25 %, 7 %, 6,6 % et 5 % respectivement (Da Costa et al., 2018; Ulirsch et al., 2018). Il a été montré que les mutations de RPS19 et RPS26 altèrent la maturation de l'ARNr 18S, entraînant une accumulation de certains précurseurs de l'ARNr 18S, tels que les pré-ARNr 21S ou 18S-E et une diminution de la production de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ceci va avoir pour conséquence finale de diminuer la quantité de ribosome 80S mature (Doherty et al., 2010; Idol et al., 2007).

D'autres gènes ne codant pas pour des protéines ribosomiques ont aussi été identifiés causant des cas de DBA. C'est le cas de deux protéines chaperons, des mutations sur les gènes codant pour TSR2 et HEATR3 ont, en effet, été décrites. TSR2 est la protéine chaperon de RPS26 et est impliquée dans la biogenèse des ribosomes (Gripp et al., 2014). Quant à HEATR3 c'est la protéine chaperon de RPL5 et RPL11, homologue de Syo1 chez la levure (travaux en cours de publication). Par ailleurs, il a été montré que des mutations sur le facteur de transcription GATA-1 était aussi lié à l'apparition de formes de DBA. GATA-1 est un facteur de transcription essentiel impliqué dans la différenciation érythroïde (Sankaran et al., 2012).

Il existe aussi le **syndrome 5q-** qui induit des défauts de différenciation érythroïde, et est une forme particulière de myélodysplasie (production insuffisante de cellules sanguines matures saines par la moelle osseuse). Elle se caractérise par la déplétion d'une région entière du chromosome 5q. Cette délétion implique la région 5q32 et entraîne une haplo-insuffisance de RPS14 impactant la maturation de l'ARNr 18S, et diminuant donc la proportion de sous-unité 40S dans la cellule (Ebert et al., 2008; Schneider et al., 2016).

Enfin le **Syndrome de Shwachman-Diamond** (SDS) se traduit par une insuffisance de la moelle osseuse et également par de multiples anomalies du développement, telles qu'une dysfonction pancréatique et une altération du développement osseux. 90 % des patients atteints de SDS portent des mutations sur le gène *Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (SBDS)*, codant pour le facteur de maturation des ribosomes SBDS. Cette protéine est impliquée dans les dernières étapes cytoplasmiques de la maturation de la grande sous-unité ribosomique 60S. Elle permet la dissociation du facteur d'initiation eIF6 des pré-60S. eIF6, a pour rôle de maintenir la pré-60S dans un état fonctionnel inactif durant les dernières étapes de la maturation de la grande sous-

unité avant l'association avec la petite sous-unité 40S. eIF6 doit ensuite être dissociée afin de permettre les dernières étapes de maturation de la pré-60S et son association avec la petite sous-unité ribosomique 40S pour former un ribosome 80S mature (Weis et al., 2015). Ces mutations sur le gène *SBDS* provoquent la perte de l'expression de la protéine SBDS, eIF6 ne pourra donc pas être dissociée de la pré-60S bloquant ainsi les dernières étapes de la maturation de la 60S (Finch et al., 2011).

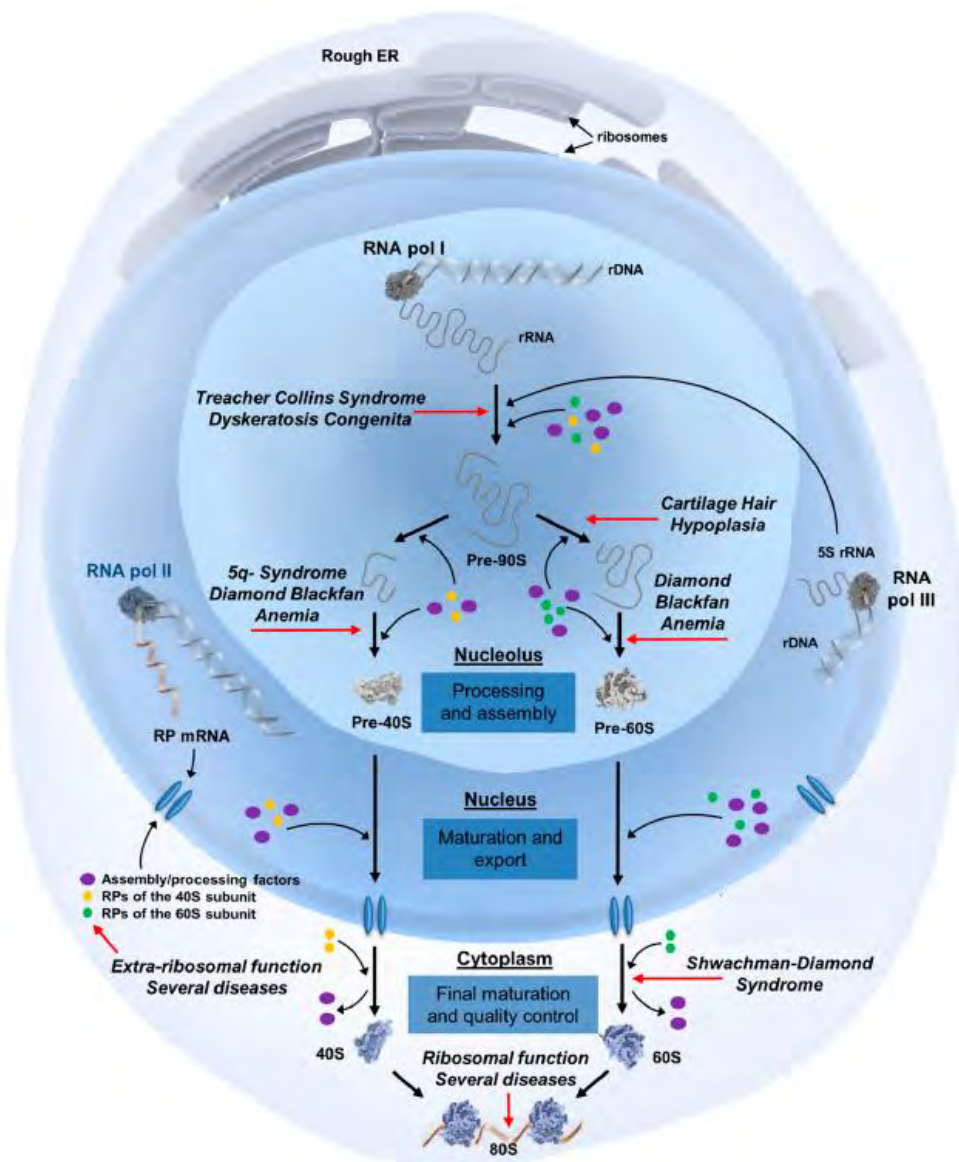


Figure 27 : Aperçu des ribosomopathies associées aux différentes étapes de la maturation des ribosomes. Dans le nucléole, les maladies associées à des défauts de la transcription et/ou de la maturation des ARNr : TCS (Treacher Collins Syndrome), DC (Dyskeratosis Congenita) et CHH (Cartilage Hair Hypoplasia). Dans le nucléoplasme et le cytoplasme, les maladies associées à des défauts de l'assemblage des sous-unités ribosomiques : DBA (Diamond Blackfan Anemia), 5q-Syndrome (5q deletion syndrome) et SDS (Shwachman Diamond Syndrome). (Adapté de Sulima et al., 2019)

b. Haplo-insuffisance de RPS20, un cas particulier de ribosomopathie

Finalement, il est aussi possible que des mutations impliquant le processus de biogenèse des ribosomes n'entraîne pas systématiquement des ribosomopathies, mais puissent aussi induire des formes de cancers. En effet, en 2014 il a été montré qu'une mutation congénitale dans le gène codant pour la protéine *RPS20* était liée à une forme familiale (héréditaire) de cancer du côlon (Nieminen et al., 2014). Cette mutation provoque un décalage de cadre de lecture entraînant la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Les cellules de patients montrent des signes de défauts de biogenèse des ribosomes tels que l'accumulation de précurseurs de l'ARNr 18S et des modifications de la proportion des sous-unités ribosomiques produites. Étonnamment, ces défauts sont des signes distinctifs des mutations retrouvées typiquement chez les patients atteints de ribosomopathies, mais sans les symptômes d'haplo-insuffisance associés. Par ailleurs, un variant de *RPS20* a récemment été lié à l'anémie de Diamond-Blackfan (Bhar et al., 2020).

Au vu des données présentées ici, la question demeure de savoir comment les mutations d'une protéine donnée peuvent-elles déclencher des manifestations cliniques si différentes, à savoir des symptômes associés aux ribosomopathies ou aux cancers ?

Une étude très récente réalisée sur des variants du gène *RPL9* a permis de mettre en lumière la manière dont des mutations congénitales de gènes codants pour des RP pourraient conduire directement au cancer (Lezzerini et al., 2020). Dans cette étude, il a été démontré qu'un premier individu diagnostiqué avec le DBA était porteur d'une mutation dans la région 5'UTR du gène *RPL9*, tandis que deux autres individus issus d'une famille présentant de multiples incidences de cancer étaient porteurs d'une mutation faux-sens du gène *RPL9*.

L'analyse des cellules de ces patients a révélé que même si tous les variants présentaient des défauts de maturation du pré-ARNr et une réduction des ribosomes 80S, les effets en aval étaient remarquablement différents. Il a été démontré que les cellules portant la mutation dans la région 5'UTR stabilisent P53 et altèrent la croissance et la différenciation des cellules érythroïdes. En revanche, les ribosomes incorporant la mutation faux-sens lisent de manière erronée les codons stop UAG et UGA des ARNm. Ces résultats indiquent que des mutations héréditaires dans le même gène RP peuvent déclencher des défauts similaires de la biogénèse des ribosomes, mais avoir des conséquences et des manifestations cliniques très différentes, qui pourraient dépendre de l'incorporation de la RP mutante dans des ribosomes fonctionnels pour la traduction.

2. Mutations ribosomiques impliquant des défauts de traduction

La traduction est un processus rapide et très précis. Le ribosome est capable de synthétiser une protéine à une vitesse de 15 à 20 acides aminés par seconde avec un taux d'erreur de 10^{-3} - 10^{-4} /codon (Zaher and Green, 2009). La vitesse et la fidélité de la traduction sont des caractéristiques importantes qui doivent être contrôlées afin de maintenir un état normal de prolifération des cellules. Certaines protéines ribosomiques portant des mutations (le plus souvent ponctuelles) ne vont pas être systématiquement dégradées mais vont pouvoir s'associer au ribosome en cours de maturation donnant lieu à des ribosomes défectueux. Certaines mutations vont donc influencer directement sur la qualité du processus de traduction en impactant la vitesse et/ou fidélité de la synthèse protéique (Kampen et al., 2020).

D'autre part, ces défauts peuvent aussi conduire à la formation de ribosomes dits « spécialisés ». En effet, il a été montré que la composition des ribosomes pouvait modifier leur fonction et les mener à traduire préférentiellement certains ARNm. Dans ce contexte, il a été montré que certaines mutations sont à l'origine de la formation de ribosomes hétérogènes ayant des préférences pour certains ARNm particuliers.

Le translatome qui résulte de ces ribosomes portant des RP mutées peut se déplacer vers des signatures d'expression de protéines oncogènes, favorisant ainsi la croissance cellulaire, à l'origine de l'apparition de cancers.

Différents exemples illustrant ces défauts de traduction vont être abordés.

a. Mutations impactant la fidélité de la traduction

Tout d'abord, dans le cas de mutations (le plus souvent ponctuelles) sur des protéines ribosomiques, il est possible qu'elles ne soient pas systématiquement dégradées mais puissent s'intégrer au ribosome en cours de maturation. La formation de ces ribosomes défectueux va avoir des conséquences sur la qualité du processus de synthèse protéique. Dans ce contexte, une étude a montré que la mutation du gène *RPS23* codant pour la protéine RPS23 était liée à une forme de ribosomopathie provoquant microcéphalies, pertes de l'audition ainsi que dysmorphie. Cette mutation altère la fidélité de la traduction dû à un mauvais décodage de l'ARNm par le ribosome contenant la protéine mutée. Cette étude a aussi montré un défaut de biogenèse des ribosomes, avec une accumulation du pré-ARNr 18S-E, altérant ainsi la maturation de la petite sous-unité 40S, mais sans modifier ni la prolifération cellulaire ni le taux de synthèse protéique (Paolini et al., 2017).

De manière similaire, certains cas de leucémie lymphoblastique aigüe (T-ALL) sont liés à la mutation somatique R98S portée par la protéine RPL10. Ce résidu se situe à la base d'une boucle flexible essentielle dans RPL10, qui est localisée proche du PTC au niveau du centre catalytique

du ribosome. Cette protéine est connue pour avoir un rôle à la fois dans la fonction du ribosome en permettant la rotation de la grande sous-unité ribosomique 60S durant les étapes d'élongation, mais aussi dans les étapes tardives de la maturation de la sous-unité 60S en permettant aux derniers facteurs de maturation de se dissocier pour pouvoir finalement déclencher l'assemblage avec la sous-unité 40S (Bussiere et al., 2012; Sulima et al., 2014). Il a été montré que les cellules exprimant la protéine mutée présentent des défauts de biogenèse des ribosomes (Keersmaecker et al., 2013). De plus, chez la levure une étude a mis en évidence les effets de la mutation sur la synthèse protéique en induisant des défauts de fidélité de la traduction ainsi qu'en altérant la reconnaissance des codons stop (Sulima et al., 2014).

De plus, il a été montré que le gène *RPS15* était muté dans environ 20% des cas de rechute de leucémies lymphocytaires chroniques (CLL) (Ljungström et al., 2016). Ce gène code pour la protéine RPS15 et les mutations décrites sont majoritairement présentes sur la partie C-terminale de la protéine, dont certains résidus spécifiques, tels que Pro131, His137 et Ser138 sont soumis à des taux de mutation très élevés. Le domaine C-terminal de RPS15 est positionné proche du sillon de l'ARNm et du site de décodage par les ARNt. Ce domaine est spécifique aux eucaryotes et participerait au processus de décodage (Bhaskar et al., 2020; Khairulina et al., 2010) (cf. Introduction partie III.). De manière intéressante, les mutations présentes sur RPS15 peuvent avoir un double effet. Premièrement, elles peuvent induire la dégradation de la protéine mutée et donc entraîner une baisse de la production de ribosomes menant vers une haplo-insuffisance. Mais RPS15 mutée peut aussi réussir à s'associer aux ribosomes, altérant ainsi leur fonction dans la synthèse protéique. Il a d'ailleurs été montré dans des cellules sur-exprimant une forme mutée de RPS15 que des défauts de traduction apparaissaient. En effet, une étude a pu décrire que les mutations portées par RPS15 impactaient à la fois l'initiation de la traduction en augmentant la traduction d'ARNm sans coiffe, mais aussi l'élongation en induisant la mauvaise incorporation d'acides aminés et enfin la terminaison, en passant outre les codons stop (Bretones et al., 2018). En revanche, les conséquences des mutations de RPS15 sur la biogenèse des ribosomes n'ont pas encore été étudiés, même s'il a déjà été montré que la déplétion de RPS15 bloquait l'export nucléaire de la petite sous-unité ribosomique 40S ainsi que la maturation de l'ARNr 18S, ce qui perturbe la synthèse de la petite sous-unité ribosomique (O'Donohue et al., 2010; Rouquette et al., 2005). Il sera donc aussi intéressant d'analyser l'impact de ces mutations ponctuelles de RPS15 sur la biogenèse des ribosomes.

b. Mutations entraînant la traduction spécialisée de certains ARNm

Il peut aussi arriver que certaines mutations soient à l'origine de la formation de ribosomes dits « spécialisés » ayant plus d'affinité pour certains ARNm ou pour des éléments

régulateurs de la traduction. Par exemple, certains ribosomes mutants peuvent spécifiquement traduire des ARNm contenant des séquences IRES (pour « Internal Ribosomal Entry Site »). Les séquences IRES permettent de recruter des ribosomes indépendamment de l'initiation de la traduction médiée par la coiffe, décrite précédemment. Cet élément est particulièrement retrouvé dans les ARNm codant pour des facteurs de réponses au stress : cette initiation alternative permet une activation plus rapide de la traduction en condition de stress cellulaire.

Par exemple, la mutation R98S de RPL10 présentée précédemment, impliquée dans les T-ALL, peut aussi favoriser la traduction IRES-dépendante d'un ARNm codant pour le facteur anti-apoptotique BCL2 induisant ainsi sa surexpression. Ceci va permettre aux cellules leucémiques de survivre à la chimiothérapie et à un fort stress oxydatif (Kampen et al., 2020).

Dans certains cas de DBA, les mutations présentes sur les gènes *RPS19* et *RPL11* sont à l'origine de la réduction de la traduction IRES-dépendante des facteurs de différenciation érythroïdes *BAG1* et *CSDE1* pouvant expliquer certains des symptômes associés tels que l'anémie (Horos et al., 2012). De la même manière, comme vu précédemment, des formes mutées de RPS26 sont retrouvées dans plus de 6% des cas de DBA. Une étude réalisée sur des levures déplétées de RPS26 a montré qu'elles traduisaient préférentiellement certains ARNm codants pour des facteurs de réponse au stress en favorisant la traduction IRES-dépendante. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en conditions normales, chez la levure, Rps26 favorise l'initiation de la traduction classique en interagissant avec les résidus de la séquence Kozak en amont du codon d'initiation de l'ARNm (Ferretti et al., 2017).

De plus, il a été montré dans des cellules DBA que l'expression réduite des protéines ribosomiques RPS19, RPL5, RPL11 ou RPS24 pouvait conduire à une diminution de la traduction du facteur de transcription GATA-1. GATA-1 est un facteur de transcription essentiel au développement érythroïde et son ARNm possède une séquence 5'UTR courte et très peu structurée. La nature de l'ARNm de GATA-1 pourrait alors, le rendre plus sensible à un défaut d'assemblage des ribosomes. Les ribosomes produits en quantité insuffisante limiteraient donc la traduction de ces ARNm (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014). Pour rappel, des mutations de GATA-1 ont aussi été décrites dans des formes de DBA (Sankaran et al., 2012).

Au sein du ribosome, les défauts portés par des RP ne sont pas les seuls à pouvoir causer des pathologies, des problèmes au niveau des ARNr peuvent aussi provoquer des dysfonctionnements dans la cellule. Les ARNr subissent des modifications au cours de leur maturation. Les modifications majeures apportées sont la 2'-O méthylation et la pseudo-uridylation catalysées par des snoRNP ainsi que des enzymes. Des défauts sur ces modifications de l'ARNr peuvent influencer la traduction IRES-dépendante des ARNm. En effet, une étude a montré que p53 était capable de réguler les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr en

contrôlant le niveau d'expression du gène *FBL* qui code pour la fibrillarine : la méthyl-transférase impliquée dans l'ajout de la modification 2'-O méthylation. En cas d'expression élevé de *FBL*, le schéma de méthylation de l'ARNr va être modifié, ceci va avoir pour conséquence l'altération de la fidélité de la traduction ainsi que l'augmentation de la traduction d'ARNm par initiation IRES-dépendante de gènes clés du cancer. p53 étant inactivé dans certaines cellules cancéreuses, il ne pourra plus réguler le gène *FBL* induisant ainsi sa surexpression, ce qui contribue à l'expression de gènes oncogènes (Marcel et al., 2013).

De plus, comme discuté précédemment, la dyskeratose congénitale (DC) est provoquée par des mutations du gène *DKC1* codant pour la dyskérine, une enzyme responsable de la pseudo-uridylation des ARNr. Des défauts sur cette enzyme peuvent modifier la préférence du ribosome produit pour certains ARNm contenant des séquences IRES. En effet, il a été montré que ces mutations inhibent la traduction des gènes codants pour les facteurs suppresseurs de tumeurs *TP53* et *CDKN1B*, ainsi que ceux codants pour les facteurs anti-apoptotiques *BCL2L1* et *XIAP* (Yoon et al., 2006). Elles peuvent aussi stimuler la traduction d'autres ARNm par initiation IRES-dépendante, tel que l'ARNm codant pour le facteur angiogénique VEGF (Rocchi et al., 2013). Cet exemple met en lumière une des causes permettant d'expliquer la progression des ribosomopathies en cancer, grâce à la production de ribosomes dysfonctionnels qui traduisent spécifiquement certains ARNm contenant des séquences IRES, favorisant ainsi l'expression de protéines pro-oncogénique ou inhibant la production de facteurs suppresseurs de tumeurs.

3. Altération des fonctions extra-ribosomiques de protéines ribosomiques défectueuses

Certaines RP peuvent porter d'autres fonctions que celles directement liées à l'assemblage des ribosomes ou à la traduction. Elles peuvent, par exemple, réguler des protéines pro-oncogéniques ou suppresseurs de tumeur indépendamment de la traduction. La dérégulation des fonctions extra-ribosomique de ces RP, sous l'effet de mutations par exemple, peut être à l'origine de la transformation des cellules en cellules cancéreuses (Molavi et al., 2019).

Tout d'abord, les protéines RPL5 et RPL11 sont connues pour réguler la protéine suppresseur de tumeur p53 en condition de stress. p53 est un facteur de transcription, qui, en réponse à des conditions de stress cellulaire, a pour rôle de réguler l'expression de centaines de gènes, afin d'empêcher une croissance incomplète des cellules ou une division non préparée. Dans des conditions normales, p53 est exprimé à un taux relativement faible. Dès sa synthèse, elle est directement prise en charge par MDM2 qui est une E3 ubiquitine ligase. MDM2 ubiquitine donc

p53, entraînant ainsi son export vers le cytoplasme où il sera finalement dégradé par le protéasome (Hock and Vousden, 2014) (**Figure 28**).

Les deux protéines ribosomiques RPL5 et RPL11 s'associent à l'ARNr 5S pour former la particule 5S, qui en condition normale, viendra s'associer aux particules pré-60S lors de la formation de la grande sous-unité. Mais en condition de stress cellulaire, la biogenèse des ribosomes est directement perturbée induisant une diminution de la production de ribosomes fonctionnels et donc une augmentation des protéines ribosomiques libres dans la cellule. Ainsi, la particule 5S se retrouvera libre et son association avec MDM2 sera favorisée empêchant la formation du complexe MDM2-p53 et donc la dégradation de p53 (Bhat et al., 2004; Dai and Lu, 2004; Horn and Vousden, 2008). En effet, des études ont été réalisées en induisant un stress cellulaire par traitement des cellules à l'actinomycine D pour inhiber l'ARN polymérase I et perturber ainsi la biogenèse des ribosomes, ce qui va donc entraîner une stabilisation de p53. Ces études ont effectivement montré qu'en absence de RPL5 et/ou RPL11, cette stabilisation de p53 causée par l'actinomycine D était inhibée. Par ailleurs, d'autres protéines ribosomiques sont aussi connues pour stabiliser p53, telles que par exemple RPL23, RPS7 et RPL26 (Chen et al., 2007; Dai and Lu, 2004; Zhang et al., 2010). Lorsque ces autres protéines ribosomiques sont déplétées, ce phénomène observé, en présence d'actinomycine D, pour RPL5 et RPL11 n'est cependant pas observé (Bursac et al., 2012; Fumagalli et al., 2012). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en cas de stress cellulaire, les RP qui continuent à être synthétisées mais qui ne peuvent plus s'associer aux ribosomes se retrouvent libres, elles sont donc plus vulnérables à la dégradation par le protéasome (Bursac et al., 2012; Lam et al., 2007; Warner, 1977). Contrairement aux protéines ribosomiques RPL5 et RPL11 qui lorsqu'elles ne sont pas associées au ribosome, font partie du complexe 5S RNP ce qui va les protéger de la dégradation par le protéasome et favoriser leur interaction avec MDM2 (Donati et al., 2013).

Des études ont permis de montrer que RPS15 pouvait aussi être impliquée dans la régulation de p53 en interagissant avec MDM2 ce qui inhiberait son activité d'ubiquitylation stabilisant ainsi p53 (Daftuar et al., 2013). Certaines des mutations de RPS15, présentées précédemment, pourraient empêcher l'interaction avec MDM2 et donc être à l'origine de la déstabilisation de p53 en induisant sa dégradation (Ljungström et al., 2016).

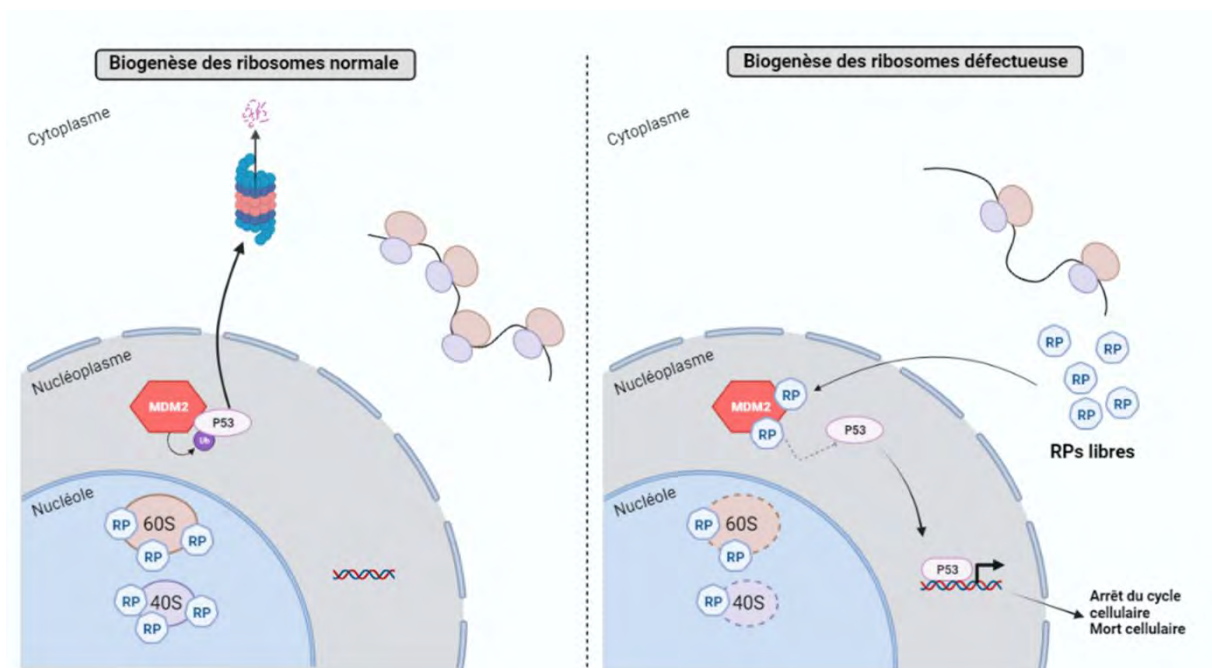


Figure 28 : Régulation du complexe MDM2-p53 par l'intermédiaire de protéines ribosomiques (RP). Dans les cellules dont la biogenèse des ribosomes n'est pas perturbée (à gauche), les sous-unités ribosomiques 40S et 60S sont assemblées dans le nucléole et se rejoignent dans le cytoplasme où elles s'assemblent sur des ARNm. Dans les cellules normales, p53 est maintenu à des niveaux très bas grâce à l'ubiquitinylation médiée par MDM2 et sa dégradation par le protéasome. Des défauts dans la biogenèse des ribosomes dus à une altération de la synthèse ou de la maturation de l'ARNr ou à une déficience en protéines ribosomique (à droite), provoquent une diminution des ribosomes 80S matures. La biogenèse perturbée des ribosomes entraîne une augmentation du pool de certaines RP libres et non liées aux ribosomes, qui peuvent se lier à MDM2 et inhiber sa régulation négative de p53, entraînant à son tour la stabilisation de la protéine p53 et ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes de la voie d'arrêt du cycle cellulaire et de la mort cellulaire.

Une autre des fonctions extra-ribosomique connues de certaines protéines ribosomiques est le rétro-contrôle négatif du facteur de transcription c-MYC. Ce facteur favorise la synthèse des ribosomes en induisant la transcription des ARNr et des protéines ribosomiques menant à une prolifération cellulaire. Certaines RP régulent ensuite ce facteur par rétrocontrôle négatif et inhibent ainsi le niveau et la fonction de c-MYC. Parmi ces RP, RPL5 et RPL11 se lient ensemble à l'ARNm codant pour c-MYC et le mène vers le complexe RISC (« RNA-induced silencing complex ») pour permettre sa dégradation (Liao et al., 2014). La protéine ribosomique RPS14 réprime également l'expression et la fonction de c-MYC (Zhou et al., 2013).

Mais dans le cas où l'une de ces RP se retrouve mutée ou en quantité insuffisante, c-MYC ne sera plus régulée induisant son activation et donc une hyper-prolifération cellulaire pouvant mener à

la transformation des cellules en cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que les délétions de RPL11 et RPL22 induisaient la stimulation de c-MYC dans des modèles de lymphomes de souris (Morgado-Palacin et al., 2015; Rao et al., 2012).

4. L'énigme de Dameshek ou comment la cellule est capable de passer d'un état d'hypo-prolifération à un état d'hyper-prolifération ?

Il a été montré que les patients souffrant de ribosomopathies ont de 2,5 à 8,5 fois plus de risque de développer un cancer au cours de leur vie (Alter et al., 2018; Sulima et al., 2019; Vlachos et al., 2018). Les ribosomopathies entraînent, comme présenté précédemment, un phénotype d'hypo-prolifération, qui était autrefois mortel pour les patients atteints de ces maladies et ne permettait donc pas un suivi de l'évolution de la maladie. Mais la mise en place de traitements permet désormais aux patients de survivre à cette phase initiale de la maladie. L'amélioration de la durée de vie de ces patients, a mis en lumière une deuxième phase paradoxale de la maladie. En effet, les personnes atteintes de ribosomopathies ont un risque élevé de progresser vers un état cellulaire hyper-prolifératif provoquant finalement un cancer plus tard dans leur vie. Une hypothèse a été émise permettant d'expliquer ce paradoxe (Dameshek, 1967; De Keersmaecker et al., 2015).

Ceci peut être expliqué par le fait que des défauts de biogenèse du ribosome et de sa fonction induisent, comme expliqués précédemment, à la fois une activation de p53 en réponse au stress nucléolaire, mais entraînent également une traduction sélective de certains ARNm particuliers impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire. La dérégulation du métabolisme va causer un stress oxydatif pour la cellule qui va alors produire de manière excessive des ROS (Reactive Oxygen Species). Ces stress nucléolaires et métaboliques sont à l'origine des réponses hypo-prolifératives, qui se traduisent par l'arrêt du cycle cellulaire, une sénescence ou une apoptose menant aux signes cliniques associés à un état d'hypo-prolifération cellulaire (anémie, etc.). La dérégulation chronique de la biogenèse des ribosomes et du métabolisme cellulaire favorise l'instabilité génomique et l'apparition de mutations secondaires notamment à cause de la quantité élevée de ROS dans la cellule qui provoquent des dommages de l'ADN. Au fil du temps, l'acquisition de nouvelles mutations coopératives va permettre de corriger le phénotype en inhibant la production de ROS dans la cellule. Tout ceci va finalement aboutir à une transition de la cellule qui va passer vers un état d'hyper-prolifération en augmentant son métabolisme tout en permettant aussi la surexpression de facteurs oncogènes et/ou la diminution de l'expression de facteurs anti-tumoraux. Cette transition d'un état d'hypo-prolifération à hyper-prolifération cellulaire permet d'expliquer l'origine des cancers chez des patients atteints de ribosomopathies (**Figure 29**).

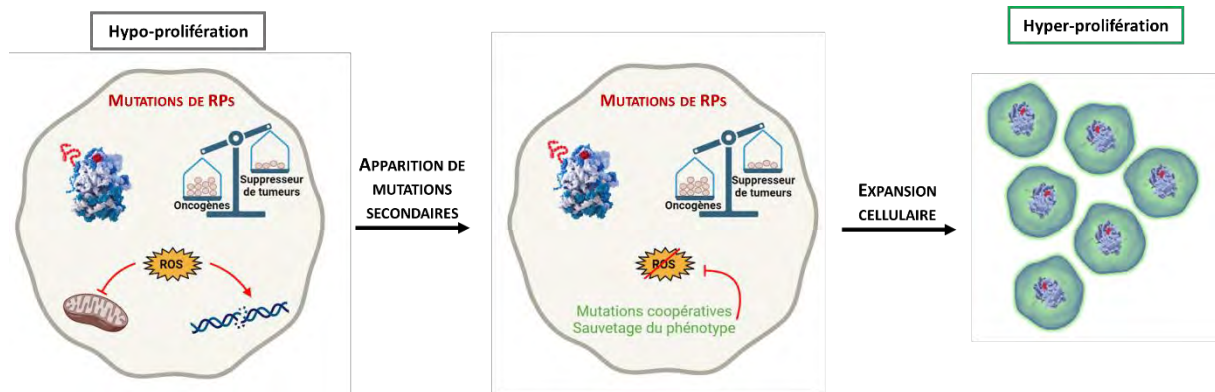


Figure 29 : Modèle de la transition cellulaire d'un état hypo-prolifératif vers un état hyper-prolifératif. Les défauts ribosomiques altèrent la traduction ce qui va favoriser l'expression d'oncogènes et défavoriser l'expression de facteurs suppresseurs de tumeurs. Des défauts dans l'assemblage et/ou la fonction des ribosomes entraînent également une augmentation du stress cellulaire et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), qui inhibent la prolifération cellulaire et favorisent les dommages à l'ADN et une mutagenèse plus élevée. Après un certain temps, ces dommages élevés à l'ADN entraînent l'acquisition de mutations coopératives qui inhibent la production de ROS, supprimant ainsi le blocage de la prolifération cellulaire. À ce stade, la phase d'expansion commence, marquant la transition de l'état d'hypo-prolifération vers un état d'hyper-prolifération cellulaire. (Adapté de Sulima et al., 2019)

V. Problématiques et objectifs de thèse

Comme on l'a vu dans cette introduction, le ribosome joue un rôle clé pour le fonctionnement optimal de la cellule. Tout d'abord, le processus d'assemblage des ribosomes, qui est extrêmement complexe, va permettre, s'il est correctement réalisé, de former des ribosomes fonctionnels. Ceux-ci entreront ensuite dans le processus de traduction, et permettront la synthèse correcte de protéines (et assureront ainsi l'homéostasie cellulaire). La compréhension de ces mécanismes d'assemblage ribosomique et de traduction en conditions normales et pathologiques est donc primordiale. En effet des défauts ribosomiques peuvent entraîner l'apparition de ribosomopathies et de cancers. Il est donc crucial de caractériser avec précision les mécanismes structuraux et fonctionnels entourant le ribosome humain, de sa synthèse jusqu'à son rôle dans la traduction.

Les connaissances sur l'assemblage des ribosomes et le processus de traduction chez les mammifères ont fortement progressé ces dernières années, notamment grâce aux avancées de la cryo-EM couplée à l'analyse d'images. Les analyses structurales en cryo-EM ont en effet permis d'obtenir des « snapshots » du ribosome en cours de maturation ainsi qu'en traduction. En combinant ces études structurales à des analyses fonctionnelles, il a été possible d'accéder à des informations essentielles à la compréhension de ces processus fondamentaux entourant le ribosome. En effet, concernant la biogenèse des ribosomes, ces études ont été nécessaires à la détermination du rôle et de la position des différents facteurs maturation et protéines ribosomiques dans la biogenèse des sous-unité ribosomiques. Ceci a contribué, notamment, à comprendre la chronologie des étapes d'assemblage du ribosome. Du point de vue de la traduction ces analyses structure/fonction ont été essentielles dans la compréhension du rôle des facteurs de traduction et des protéines ribosomiques dans le processus de synthèse des protéines ainsi que dans la fidélité de la traduction. De plus, elles ont permis la visualisation et la compréhension des mouvements des sous-unités ribosomiques essentielles à ce processus. C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse.

Lors de mon premier projet, j'ai mené une étude structure/fonction visant à caractériser les dernières étapes de la maturation de la petite sous-unité ribosomique (40S) humaine. La purification d'affinité de particules pré-40S, via le facteur de maturation étiqueté et catalytiquement inactif RIO1(kd), permet d'accumuler des particules pré-40S bloquées à un stade tardif de leur maturation. Plusieurs structures par cryo-EM de ces particules ont été obtenues dans l'équipe par Ramtin Shayan lors de son doctorat. Je me suis basée sur ces structures et ai mis au point et réalisé des expériences fonctionnelles et biochimiques en vue de caractériser la transition entre les différents états structuraux observés. Finalement, la combinaison des structures par

cryo-EM et de mes données fonctionnelles a permis de comprendre comment RIO1, avec l'aide de la protéine RPS26, permet tout d'abord de déclencher le clivage du pré-ARNr 18S-E par l'endonucléase NOB1, puis de dissocier les derniers facteurs de maturation de la particule pré-40S afin d'obtenir une sous-unité 40S mature.

Le deuxième projet est quant à lui plus exploratoire et a pour but de caractériser les effets de la mutation de RPS15 sur le ribosome en cours de traduction. En effet, des mutations ponctuelles du domaine C-terminal de RPS15 sont fréquemment retrouvées dans différents types de cancers (cf. Introduction partie IV). Comme pour le projet précédent, je me suis servie d'une approche structure/fonction. Des ribosomes en cours d'élongation de la traduction ont d'abord été étudiés afin de déterminer l'impact de la mutation sur cette fonction du ribosome. Pour cela, j'ai purifié des polysomes à partir de lignées lymphoïdes murines (cellules Ba/F3) sauvages ou portant la mutation ponctuelle P131S sur RPS15. Grâce à la cryo-EM et à l'analyse de particules isolées, j'ai résolu des structures 3D de ces ribosomes en cours de traduction. L'analyse de ces structures révèle une forte désorganisation du domaine C-terminal de RPS15 en condition mutante. Elle suggère également une dynamique de traduction différente entre les deux types de ribosomes. Finalement, j'ai initié des études fonctionnelles afin d'évaluer l'impact de cette mutation de RPS15 sur les processus de biogenèse du ribosome.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET *MÉTHODES*

I. Purification et analyses des particules pré-40S humaines

1. Culture cellulaire et traitement avec siARN

Des cellules HEK293 ont été utilisées pour l'ensemble des expériences décrites par la suite. Elles sont mises en culture dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et 1mM de pyruvate de sodium. Afin de purifier des particules pré-40S, nous avons utilisé des lignées cellulaires stables (HEK293 FlpIn TRex), exprimant de manière inductible par tétracycline différents facteurs de maturation portant un tag St-HA pour la purification. Ces lignées ont été générées précédemment et décrites dans (Wyler et al., 2011). Dans notre cas, nous nous sommes servis des lignées exprimant les facteurs : HAST-DIM2, HAST-LTV1, RIO1(wt)-StHA et RIO1(kd)-StHA (un mutant catalytique de RIO1 (D324A)).

En parallèle, nous avons aussi fait des expériences dans lesquelles RPS26 ou EIF1AD ont été déplétées, afin de voir l'effet de ces déplétions sur la maturation des particules pré-40S. Pour cela, les cellules ont été transfectées avec un siARN dirigé contre l'ARNm de RPS26 (5' - GGACAAGGCCAUUAAGAAA dTdT-3') ou EIF1AD (5' -ACCGCAGACAGUAUCAUGAGA-3') à une concentration finale de 500nM dans 100µL de cellules (50x10⁶ cellules/mL diluées dans du tampon Na phosphate pH 7.25, contenant 250 mM saccharose et 1 mM MgCl₂). Une fois les cellules transfectées à 240V, elles sont ensemencées puis collectées 48h après. Les cellules contrôles sont transfectées avec un siARN scramble. L'efficacité de la déplétion est vérifiée par RT-qPCR en utilisant HPRT1 comme contrôle interne, ainsi que par Western Blot.

2. Purification par affinité des particules pré-40S humaines

Les particules pré-40S ont été purifiées en se basant sur le protocole établi par Ulrike Kutay (Wyler et al., 2011) qui a été adapté comme suit. L'expression des protéines appâts taguées StHA en N- ou C-Terminal dans des lignées stables HEK 293 a été induite par tétracycline (0,5mg/mL) 24h avant de récolter les cellules. Les cellules sont ensuite récoltées en utilisant du PBS contenant 0,5mM EDTA et lysées dans du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, supplémenté en inhibiteur de protéase et phosphatase) à l'aide d'un dounce. Une fois lysées, les cellules sont centrifugées (4500 g, 12 min) et le lysat est incubé sur des billes EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma-Aldrich) pendant 2h à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon de lavage (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT).

a. Analyse des protéines

Pour l'analyse des protéines par Western Blot ou spectrométrie de masse, l'élution se fait directement sur les billes par ajout de tampon de charge 2X, puis chauffage 10 min à 70°C.

Dans le cas du Western Blot, environ 6 à 10 µL d'élution sont déposés sur un gel SDS-PAGE 4-12 %. Puis le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un TransBlot (Biorad). La membrane est ensuite saturée dans du Lait 5 % préparé dans du PBST 1X. La composition des pré-40S est ensuite analysée par incubation de différents anticorps (**Tableau 2**).

Anticorps	Source	Dilution
α-DIM2	Zemp et al., 2009	1:2000
α-ENP1	Zemp et al., 2009	1:5000
α-HA-HRP	Sigma-Aldrich Applied Science	1:1000
α-NOB1	Zemp et al., 2009	1:5000
α-RIO2	Zemp et al., 2009	1:5000
α-RPS26	Genetex	1:1000
α-RPS19	Equipe U. Kutay	1:5000
α-EIF1AD	ProteinTech	1:2000

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour les Western Blot.

La membrane est incubée avec chacun des anticorps primaires 2h à température ambiante dans du lait 5 % PBST1X, puis 1h avec l'anticorps secondaire α-HRP (dilution : 1/5000). Après trois lavages successifs de la membrane au PBST 1X, la membrane est révélée par chemiluminescence après utilisation d'un kit ECL (Clarity Max Western ECL Substrate, Biorad).

Dans le cas de la spectrométrie de masse, pour l'analyse de la composition des particules pré-40S RIO1(kd), 100 µL de particules pre-40S purifiées avec RIO1, correspondant à 3,5 mg de protéine, ont été réduites par incubation pendant 5 min à 95°C avec 5 µL de tampon Laemmli contenant 30mM de DTT, puis alkylées avec 90 mM d'iodoacétamide pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité.

L'échantillon réduit/alkylé a ensuite été chargé sur un gel SDS-PAGE (4-12% d'acrylamide). Pour une analyse unique de l'ensemble de l'échantillon, aucun fractionnement n'a été effectué, et la migration a été arrêtée dès que l'échantillon est entré dans le gel, formant ainsi qu'une seule bande. Les protéines sont ensuite révélées avec l'« Instant Blue » (Expedeon) pendant 20 min, et la bande contenant l'ensemble de l'échantillon a été coupée et lavée. La bande de gel est ensuite

emmenée jusqu'à la plateforme de spectrométrie de masse de l'IPBS à Julien Marcoux pour la digestion et l'analyse des protéines.

Pour l'analyse par spectrométrie de masse des particules pré-40S RIO1(kd) déplétées de RPS26, la préparation des échantillons a été modifiée. Chaque échantillon de protéine correspondant aux particules pré-40S RIO1(kd)-StHA purifiées à partir de cellules déplétées de RPS26 et de cellules témoins (64 et 94 µg de protéines dans 300 µL de Tris-HCl 40 mM, 4% SDS, respectivement) a été réduit avec 6 µL de DTT 1 M (20 mM final) pendant 10 min à 95°C sous agitation, puis refroidie à température ambiante, et alkylée avec 19 µL d'iodoacétamide 1 M (60 mM final) pendant 30 min dans l'obscurité. Les échantillons une fois prêts sont envoyés sur la plateforme de protéomique de l'IPBS afin d'y être digérés puis analysés.

b. Analyse des ARN

Pour l'analyse des ARN, une fois les lavages successifs des billes réalisés lors de la purification, l'extraction des ARN s'effectue ensuite directement sur les billes. Pour cela, après avoir éliminé le maximum de surnageant, les ARN sont purifiés par extraction au Tri Reagent et précipitation à l'éthanol.

Pour les essais de digestion par la RNase H, 250 ng d'ARN purifiés pré-40S ont été dénaturés à 95°C pendant 6 min avec une sonde inverse ARN/ADN/ARN s'hybridant sur l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (sonde RNaseH_3_Hyb1 : 5'- UGUUACGACUUUUACTTCCUCUAGA UAGUCAAGUUC-3' ; 0,5 µL à 100 mM). L'hybridation de la sonde se fait ensuite en plaçant l'échantillon à température ambiante pendant 20 min. Puis, la RNase H est ajoutée à l'échantillon pour atteindre 30 µL final, avec un mélange réactionnel contenant un tampon de réaction RNase H 1X, 25 mM de DTT, 0,5 U/l de RNasin (Promega) et 50 U de RNase H (New England Biolabs). Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 min. La réaction a ensuite été bloquée par l'ajout d'acétate de sodium 0,3 M, pH 5,2 et d'EDTA 0,2 mM, et les ARN ont été récupérés après extraction au phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et précipitation à l'éthanol.

Les ARN ont ensuite été séparés sur un gel de polyacrylamide à 12 % (19:1) dans un tampon TBE 1X contenant 7 M d'urée. Puis les ARN sont transférés sur une membrane en nylon Hybond N + (GE-Healthcare, Orsay, France) et fixés sous lumière UV. La pré-hybridation de la membrane a été réalisée à 45°C dans du SSC (citrate de sodium salin) 6X, de la solution de Denhardt 5X, du SDS 0,5 % et de l'ARNt 0,9 mg/mL. La sonde oligonucléotidique 3' 18S (5'-GATCCTTCCGCAG GTTCACCTACG-3') radiomarquée a été ajoutée après 1 h de pré-hybridation et incubée pendant la nuit à 45°C. Les membranes ont été lavées deux fois pendant 10 min dans du SSC 2X et SDS 0,1 %

et une fois dans du SSC 1X et SDS 0,1 %, puis exposées. Les signaux ont été acquis avec un PhosphorImager Typhoon Trio et quantifiés à l'aide du logiciel ImageLab.

L'échelle d'ARN correspond à une séquence de 131 nucléotides comprenant la sonde 3'18S et la séquence du promoteur T7. La matrice d'ADN, pour l'échelle d'ARN, a été produite par PCR en utilisant les oligonucléotides Lad_S et Lad_AS (Respectivement : 5'-TAATACGACTCACTATAGGC GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGGAGCCCGGAGGGCGAGGGATGAAGATGATGAGCTCGGCA GGTCTGAGGAGTGATGA-3' et 5' - AAGGTGAATCAGCACTCAAGATCCTCATCACTCCTCAGGACC-3'). Ensuite, l'ARN a été synthétisé par transcription *in vitro* des produits de la PCR en utilisant l'ARN polymérase T7 (kit Promega). Puis, une hydrolyse alcaline a été réalisée sur 500 ng de l'ARN synthétisé en les incubant dans 50mM de carbonate de sodium, pH 10,3, 1 mM d'EDTA pendant 5 min à 95°C.

3. Surexpression et purification de la protéine hRPS26-His

La construction hRPS26-HisTag a été clonée dans le vecteur pET29b en utilisant les sites de restrictions NdeI/KpnI (GenScript). Après addition de 0,5 mM d'IPTG, la souche *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) portant le vecteur pET29b-hRPS26-HisTag est incubée toute la nuit à 20°C pour permettre l'induction de l'expression de la protéine recombinante hRPS26. Puis, les cellules ont été culottées et lysées par sonication dans 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% de glycérol, 20 mM Imidazole, et un inhibiteur de protéase (cOmplete™, Roche). Afin d'éliminer les ARN d'*E. coli* liés à la protéine RPS26, l'extrait a été traité avec 750 U de Benzonase pendant 30 min à température ambiante sous agitation, puis clarifié par centrifugation et filtration (0,22 µm). La protéine recombinante a ensuite été purifiée à partir des fractions solubles en utilisant la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Äkta-Basic, GE-Healthcare), sur une colonne de nickel HiTrap (HisTrap 1 mL, GE-Healthcare) avec un gradient linéaire de 20-500 mM d'imidazole. Les fractions éluées contenant les protéines marquées par le tag Histidine ont été regroupées, dialysées et concentrées sur des Amicon 10 kDa MWCO (Sartorius) avec un tampon de dialyse (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1% Triton, 1 mM DTT, 10% glycérol, 5 mM MgCl₂). La pureté de la protéine a finalement été vérifiée sur gel SDS-PAGE 4-12 % suivie d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'un Western Blot.

4. Expérience de clivage *in vitro*

La méthode de purification des particules pré-40S décrite ci-dessus a été suivie, mais à la place d'éluer les protéines, les billes ont été lavées trois fois avec 1 mL de tampon TAP. La plus grande partie du surnageant a été jetée et 50 µL de tampon X (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton et 10% glycérol) ont été ajoutés aux billes (en suspension

dans environ 20 μ L de tampon TAP restant) pour atteindre un volume final de 70 μ L. Des nucléotides (ATP ou AMP-PNP) à une concentration finale de 1 mM et/ou 2 μ g de hRPS26 ont été ajoutés si nécessaire. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 1 heure, et les ARN ont ensuite été immédiatement extraits avec le Tri Reagent.

5. Immunoprécipitation avec l'anticorps α -EIF1AD

La lignée cellulaire HEK 293 exprimant RIO1(kd)-StHA a été utilisée pour ces expériences. L'expression de la protéine taguée a été ou non induite par ajout de 0,5mg/ml de tétracycline. Une fois les cellules décollées à l'aide de PBS supplémenté de 0,5mM EDTA, le culot cellulaire obtenu est alors lysé dans du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, supplémenté en inhibiteur de protéase et phosphatase) à l'aide d'un dounce. L'extrait cellulaire est finalement obtenu par centrifugation (4500 g, 12 min). 5 μ g d'anticorps EIF1AD (ProteinTech :20528-1-AP) sont ensuite incubés avec l'extrait cellulaire à une concentration en protéines totale d'environ 8mg/mL (dosé au test de Bradford) sous agitation à 4°C sur la nuit. Après équilibration des billes (Sera-Mag SpeedBeads Protein A/G Magnetic Particles) avec du tampon de lavage (20mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,5 % NP40, 1mM DTT), celles-ci sont incubées avec le mélange anticorps et extrait cellulaire pendant 3h à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées trois fois dans du tampon de lavage et les protéines sont finalement éluées directement sur les billes avec du tampon de charge 1X.

L'analyse des protéines se fait ensuite par Western Blot. Afin d'éviter de voir les chaînes lourdes et légères de l'anticorps α -EIF1AD utilisé lors de l'immunoprécipitation, de la protéine A-HRP (1/250) est utilisé pour la révélation du Western Blot.

II. Purification et analyse de polysomes à partir de cellules Ba/F3 WT ou mutantes

1. Culture cellulaire des cellules Ba/F3

Des cellules lymphoïdes de souris Ba/F3 WT ou portant une mutation sur la protéine ribosomique RP S15 (P131S) ont été utilisées pour la purification des polysomes. Elles sont mises en culture dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et de 1,25ng/mL d'interleukine-3 recombinante de souris. En routine, elles sont cultivées dans des flasques de 75cm² avec 30mL de milieu sans jamais dépasser une concentration d'environ 1,7x10⁶ cellules par mL de milieu. Pour la purification des polysomes, les cellules sont récoltées lorsque l'on a atteint environ 60x10⁶ cellules, pour former un culot cellulaire. Le milieu est changé 1h avant la récolte des cellules.

2. Purification des polysomes sur gradient de saccharose 10-50 %

Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 2mL de Tampon cyto (10mM HEPES pH 7,6 ; 1,5mM MgCl₂ ; 10mM KCl), puis les cellules sont lysées à l'aide d'un dounce. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation pendant 20min à 1200g à 4°C suivie de deux autres centrifugations de 10min à 10 000g à 4°C, où le surnageant est à chaque fois gardé.

Pour le gradient de saccharose, des solutions de saccharose 10 % et 50 % (M/M) sont préparées dans 20mM HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂ et 1mM DTT (Tampon A gradient). 5,5mL de chaque solution sont déposées dans un tube de gradient, en commençant par la solution de saccharose 50 % puis 10 %, un gradient linéaire est ensuite formé grâce à un formeur de gradient (Teledyne ISCO).

À partir de l'extrait cytoplasmique précédemment obtenu, les protéines sont dosées, à l'aide d'un test de Bradford et de 0,8 à 1,5mg/mL de protéines sont déposées sur le gradient de saccharose 10-50 %, puis centrifugé pendant 3h20 à 38 000rpm à 4°C dans un rotor SW41 (Beckman Coulter). Les fractions sont ensuite collectées (Foxy R1 UA-6 TELEDYNE ISCO), et le profil de sédimentation est tracé. À partir du profil de sédimentation obtenu, les fractions correspondant aux polysomes sont sélectionnées. Ces fractions sont rassemblées, puis désucriées par 3 bains successifs de dialyse dans du tampon A gradient (Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device, 3.5K MWCO, 2 mL). Après dialyse, les fractions sont concentrées sur Vivacon2 100 kDa MWCO (Sartorius), pour finalement obtenir un volume d'environ 50-100μL à une concentration en ARN d'environ 300 à 500ng/μL (dosage nanodrop).

3. Purification des polysomes avec traitement au cycloheximide

Les étapes de purification décrites précédemment sont identiques, mais du cycloheximide est ajouté à chacune des étapes de purification. Le traitement au cycloheximide débute par un traitement des cellules Ba/F3 durant 20min à une concentration finale de 1µg/mL. Par la suite, les étapes de préparation de l'extrait cytoplasmique sont suivies comme indiquées précédemment mais dans chacun des tampons utilisés, 1µg/mL de cycloheximide sont ajoutés, jusqu'au dépôt des échantillons sur le gradient de saccharose. Ce dernier étant préparé dans les mêmes conditions que précisées précédemment.

III. Le microscope électronique à transmission (MET)

1. Principes généraux

Contrairement au microscope optique qui utilise les photons comme source de rayonnement, dans les années 1920, Ernst Ruska fut le premier à utiliser les électrons comme source de rayonnement primaire. Et c'est en 1931 que le premier prototype de microscope électronique en transmission (MET ou TEM en anglais) a été mis au point par Max Knoll et Ernst Ruska. Cette invention a d'ailleurs permis à ce dernier de recevoir le prix Nobel de physique en 1986. La résolution maximale atteignable dépendant presque exclusivement de la longueur d'onde de la source lumineuse utilisée, dans le cas de la MET, l'utilisation des électrons comme source de rayonnement primaire a permis une nette amélioration de la résolution. En effet, pour exemple, la longueur d'onde d'un faisceau d'électrons accélérés, dans une colonne sous vide, à 200 kV, va être de $0,025 \text{ \AA}$, permettant ainsi d'atteindre une résolution théorique maximale de quelques centièmes d'Angström. En MET, il est possible d'atteindre une résolution réelle plutôt de l'ordre de l'Angström, la limite de résolution n'est donc pas causée par la longueur d'onde de la source de rayonnement mais plutôt par les aberrations des lentilles du microscope.

Le microscope électronique à transmission est composé de différents éléments (**Figure 30**).

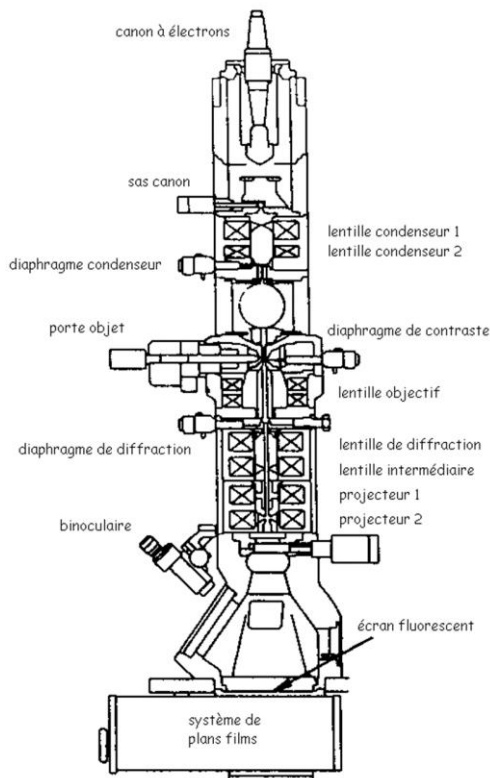


Figure 30 : Schéma du microscope électronique en transmission (Adapté de <https://www.stem.lps.u-psud.fr/>).

Brièvement, il est équipé d'un **canon à électron** qui émet un faisceau d'électron à haute tension. Puis à l'aide d'un système de **lentilles électromagnétiques** ce faisceau est focalisé sur l'échantillon. Une fois que le faisceau a traversé l'échantillon et les atomes qui le constitue, différents évènements vont se produire ce qui va influencer sur le rayonnement incident. Le **détecteur** placé sous l'échantillon va finalement pouvoir recueillir le signal et former une image agrandie de l'échantillon biologique.

2. Quels sont les différents éléments composant le microscope électronique ?

Le premier élément, en haut de la colonne du microscope, est un **canon à électron** qui a pour but de former un faisceau d'électron par extraction et accélération de ceux-ci à partir d'un matériau. Il en existe deux types, les canons à émission thermoïoniques et les canons à émissions de champs, plus récents (**Figure 31**).

Concernant les canons à émission thermoïoniques, le plus souvent des matériaux tels que le Tungstène et l'hexaborure de lanthane (LaB_6) sont utilisés, car il nécessite une énergie faible pour extraire les électrons de la cathode (**Figure 31A**). C'est en apportant de l'énergie thermique que l'extraction des électrons de la cathode peut avoir lieu. Brièvement, une tension de chauffage au niveau de la cathode va permettre de former un flux de courant, ce courant va chauffer le filament suffisamment pour permettre la sortie des électrons du métal (par émission thermoïonique). Un nuage d'électrons se forme donc ensuite autour de la cathode. Puis, ils sont accélérés par une tension dite accélératrice, formée entre la cathode et l'anode. Une fois l'anode passée, ils se retrouvent dans une colonne sous vide, et vont se déplacer avec la même direction et la même énergie (cohérence spatiale et temporelle) pour atteindre l'échantillon, formant ainsi le faisceau d'électrons. Dans la pratique, les filaments de Tungstène sont généralement chauffés à une température supérieure à 2 200°C alors que le monocristal de LaB_6 est chauffé à une température moins élevée d'environ 1 500°C. Cette cathode nécessite un vide plus poussé, mais et permet d'obtenir un faisceau d'électrons plus cohérent (longueur d'onde des électrons émis plus homogène que dans le cas du Tungstène) (**Figure 31B**).

Dans le cas d'un canon à émission de champ (FEG), la cathode est formée d'une pointe de Tungstène cristallin très fine (**Figure 31A**). Le principe est ensuite d'appliquer un fort champ magnétique entre la cathode et l'anode pour qu'un flux d'électron puisse se former par effet de champ. En pratique une tension de l'ordre de 2 à 7 kV est appliqué sur la pointe de Tungstène, ainsi les électrons sont extraits de la pointe par effet tunnel. Ces électrons traversent ensuite une

zone d'accélération leur permettant d'être accélérés à une tension dépendante du microscope utilisé (**Figure 31C**).

L'arrivée de ces canons à émission de champs a permis d'améliorer la cohérence spatiale et la brillance du faisceau d'électrons. Dans ce cas, la dispersion en énergie des électrons est moindre, ce qui augmente le transfert d'informations aux hautes fréquences spatiale comparés aux canons à émissions thermoïonique.

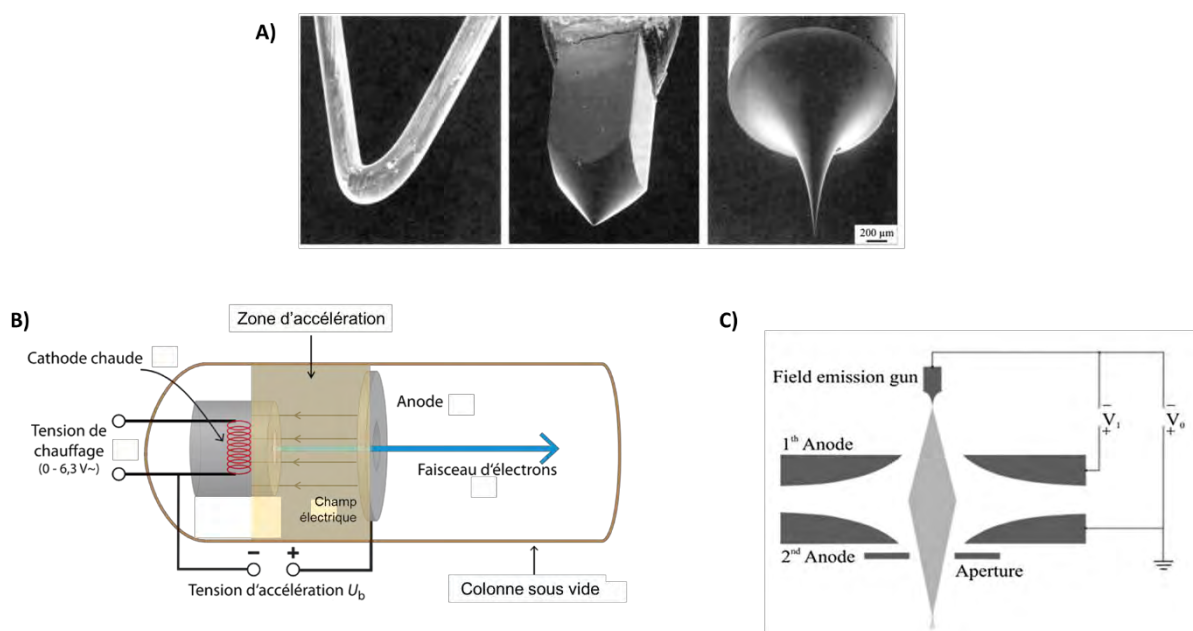


Figure 31 : Sources et canons à électrons. A) Sources d'émission thermoïonique et à effet de champ utilisées en Cryo-EM avec de gauche à droite le filament de tungstène, le cristal LaB₆ (émission thermoïonique) et la pointe de tungstène (effet de champ FEG). **B)** Canon à émission thermoïonique : les électrons sont extraits grâce à la tension de chauffage puis entre dans la colonne sous vide pour ensuite être accélérés grâce à leur mise sous tension d'accélération U_b . **C)** Canon à émission de champs (FEG) : V_1 correspond à la tension nécessaire à l'extraction des électrons (2 à 7kV) et V_0 correspond à la tension d'accélération (différente selon le microscope) (Adapté de (Henning and Adhikari, 2017)).

Une fois les électrons extraits, ils vont entrer dans la **colonne** du microscope qui est maintenu sous vide afin que les électrons puissent se propager sans interagir avec des molécules résiduelles. En effet, ceci perturberait le trajet et l'énergie des électrons. Le faisceau d'électron va alors rencontrer plusieurs séries de lentilles électromagnétiques.

Les **lentilles électromagnétiques** sont des bobines de cuivre dans lesquelles circule un courant électrique engendrant un champ magnétique. En modifiant le courant qui circule dans les bobines et donc par variation de la valeur du champ magnétique la trajectoire des électrons va être modifiée.

En premier le faisceau va rencontrer un système de lentilles dit « **condenseur** ». Les lentilles condenseurs ont pour rôle de régler la taille et l'angle d'incidence du faisceau (spot).

Le faisceau d'électron va ensuite rencontrer une série de lentilles électromagnétiques dites « **objectives** » qui ont pour but de focaliser le faisceau sur l'échantillon. Selon l'intensité du courant circulant dans les lentilles, la focale de chaque lentille peut être modifiée. Le fait de faire varier le focus de la lentille (plus particulièrement de défocaliser) permet d'augmenter le contraste de l'image, la lentille objective est donc primordiale pour obtenir des images contrastées.

Finalement, les **lentilles de projections** vont permettre d'agrandir l'image formée et la projeter sur le détecteur.

Le dernier élément du microscope électronique (en bas de la colonne) est le **détecteur d'électrons**, il sert à former une image de l'échantillon. À l'origine, les images étaient obtenues sur des films photographiques, ils avaient pour avantage un large champ visuel et un coût raisonnable. Mais la nécessité de devoir les développer et les numériser rendait la collecte de données longue et peu efficace. Afin de rendre l'acquisition plus rapide et plus efficace, une première solution a été d'obtenir des données numériques directes via la mise en place de caméra à dispositif de couplage de charge (CCD). Les caméras CCD sont des systèmes à transfert de charges. Ces caméras sont couplées à des écrans scintillateurs dans lesquels la charge des électrons incidents est convertie en photons. L'image photonique obtenue est ensuite amplifiée puis transférée vers le capteur CCD via un système de fibre optique, qui va finalement encoder l'image numérique. Même si ces caméras ont permis une grande avancée dans la collecte des données de microscopie électronique elles souffrent tout de même de certaines limites. En effet, le fait de devoir convertir le signal électronique en signal photonique entraîne une perte d'informations, ainsi qu'une augmentation du bruit sur l'image (**Figure 32A**).

C'est dans ce contexte, qu'un nouveau type de détecteur a été développé, les détecteurs directs d'électron (DDE). Leur développement a permis d'améliorer le rapport signal sur bruit mais aussi d'accélérer la vitesse d'acquisition des images. En effet, ces DDE, contrairement aux capteurs CCD, sont capables de convertir les électrons directement en signal électrique sans passer par la conversion en photon. Dans les DDE, le scintillateur couplé au système de fibre a fait place à une fine couche semi conductrice CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) qui a pour rôle de convertir directement la charge des électrons en tension (**Figure 32B**).

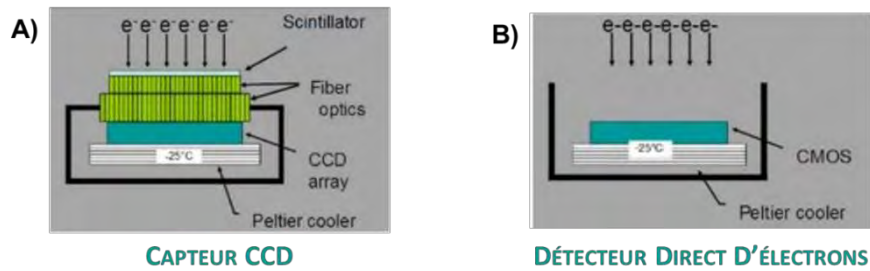


Figure 32 : Les deux types de capteurs : **A)** Le capteur CCD nécessite la conversion des électrons en signal (photons) grâce au scintillateur avant d'être transféré vers le capteur CCD par l'intermédiaire de la fibre optique. **B)** Dans le détecteur direct d'électrons le scintillateur et la fibre optique ne sont plus nécessaire grâce au capteur CMOS qui détecte les électrons directement sans les convertir.

3. Comment se forme une image ?

○ Interactions des électrons avec l'échantillon

Au moment où le faisceau d'électrons atteint l'échantillon, les électrons vont pouvoir interagir avec les atomes de l'échantillon, permettant ainsi la formation de l'image (**Figure 33**). La nature de l'interaction des électrons avec l'échantillon dépend de l'énergie des électrons mais aussi de l'épaisseur et de la composition de l'échantillon.

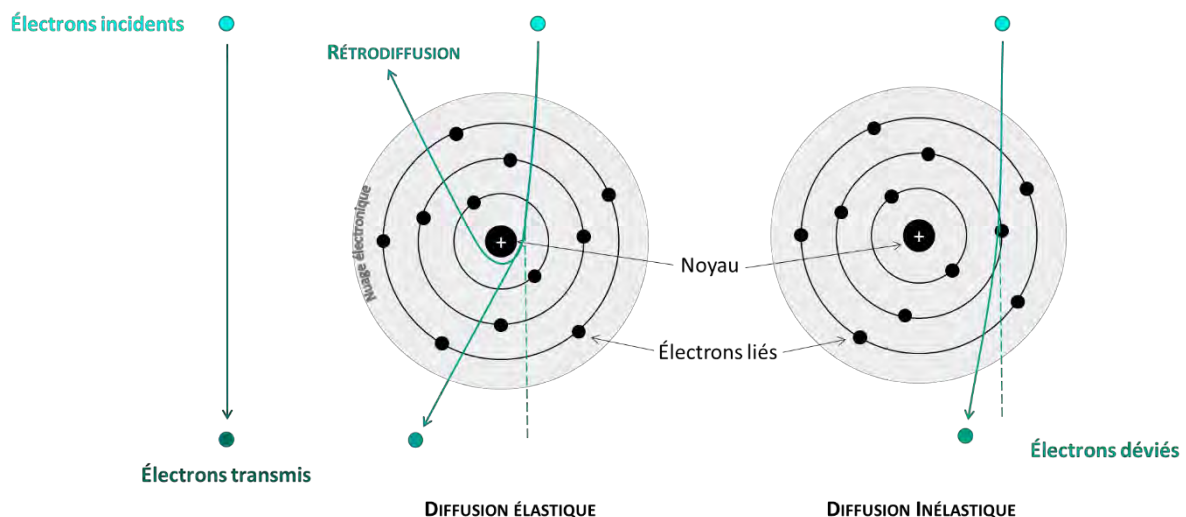


Figure 33 : Interactions des électrons avec l'échantillon. La déviation des électrons du faisceau par le nuage d'électrons ne modifie pas l'énergie de l'électron (diffusion élastique) tandis que l'interaction des électrons du faisceau avec des électrons ou des noyaux atomiques entraîne une perte d'énergie (diffusion inélastique).

Certains électrons traversent l'échantillon sans aucune interaction, la trajectoire de ces électrons n'est donc pas déviée et leur énergie n'est pas modifiée, on parle alors dans ce cas-là d'électrons transmis (**Figure 33 panel de gauche**).

D'autres, au contraire interagissent avec l'échantillon, on dit qu'ils sont diffusés par l'échantillon. Il existe deux types de diffusion, la diffusion élastique et la diffusion inélastique. Dans la diffusion élastique, les électrons sont attirés par le noyau de l'atome qu'ils rencontrent. Dans ce cas, les électrons ne perdent pas d'énergie mais leur trajectoire est déviée. La déviation est fonction de la taille du noyau de l'atome rencontré, dans le cas d'atomes à numéro atomique élevé, l'angle de déviation des électrons sera grand, allant parfois jusqu'à la rétrodiffusion des électrons (**Figure 33 panel du milieu**).

Quant aux électrons diffusés inélastiquement, ils interagissent directement avec les électrons des atomes de l'échantillon. Dans ce cas, les électrons incidents perdent de l'énergie et la transfèrent (en partie) à l'échantillon, ce phénomène est à l'origine des dommages de radiation causés à l'échantillon (réarrangement des liaisons chimiques, formation de radicaux libres ou la diffusion d'électrons secondaires) qui modifient la structure de l'échantillon et impactent donc la qualité des images obtenues. Dans la colonne du microscope un filtre d'énergie peut être installé afin d'éliminer ces électrons diffusés inélastiquement permettant ainsi d'augmenter le contraste (**Figure 33 panel de droite**).

Pour un échantillon de faible épaisseur, les électrons diffusés élastiquement sont majoritaires par rapport aux électrons inélastiques et formeront le contraste de l'image.

○ *Les deux types de contraste*

Il existe deux types de contraste qui permettent de former une image : le contraste d'amplitude et le contraste de phase (**Figure 34**).

Dans un premier temps, le **contraste d'amplitude** est causé par une perte d'électrons. En effet, une partie des électrons du faisceau incident est absorbée par l'échantillon (diffusion inélastique). Dans le cas des échantillons biologiques de faible épaisseur, et composés essentiellement d'atomes légers (C, H, O et N), seule une petite partie des électrons est absorbée, rendant ce contraste faible. Le contraste d'amplitude est aussi induit par l'utilisation d'un diaphragme placé après les lentilles objectives, son rôle est d'arrêter les électrons diffusés et transmis avec un grand angle. Enfin le filtre d'énergie permet d'éliminer les électrons diffusés inélastiquement. Seule une petite fraction d'électrons déviés atteint donc le plan image, contrairement aux électrons transmis, c'est ce qui crée le contraste d'amplitude. Afin d'améliorer le contraste d'amplitude il est possible d'utiliser des solutions contrastantes (tel que l'acétate

d'uranyle en coloration négative) pour apporter des atomes lourds qui peuvent absorber une plus grande partie des électrons (**Figure 34A**).

Comme expliqué précédemment, certains électrons sont déviés lorsqu'ils interagissent avec l'échantillon (diffusion élastique). Ces électrons diffusés élastiquement peuvent interférer avec les électrons transmis, dans le cas où cette interférence est constructive, on parle de **contraste de phase**. Les interférences formées lors du décalage de phase se produisent seulement au-dessus ou en-dessous du plan focal, c'est ce qui induit des variations de contraste. Il est donc primordial de défocaliser afin de créer du contraste de phase (**Figure 34B**).

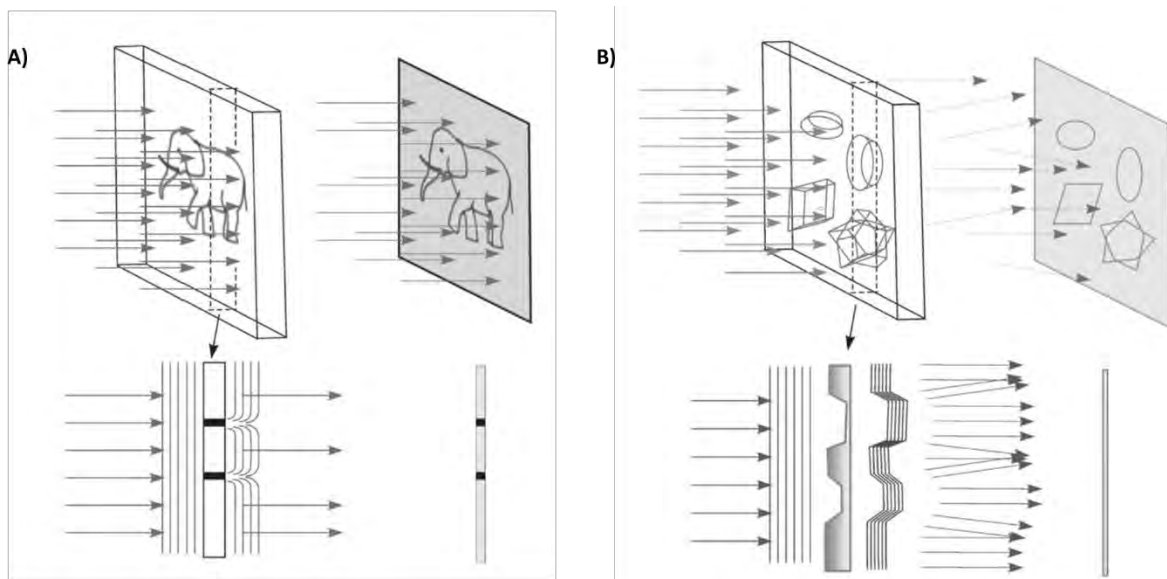


Figure 34 : Types de contraste permettant la formation d'une image en microscopie électronique. A) Le contraste d'amplitude. Le panel du haut correspond à un objet illuminé par un faisceau d'électrons parallèle avec formation d'une image résultant de l'interaction du faisceau avec l'échantillon. Le panel du bas correspond à une coupe transversale de l'objet délimité par les lignes pointillées. Les flèches montrent les changements dans le front d'onde après interaction avec l'échantillon avec certains rayons qui sont absorbés dans l'échantillon. L'Intensité des rayons créant l'image dans la région de la section transversale. Les points noirs sur l'image correspondent aux zones d'absorption du faisceau. **B) Le contraste de phase.** Le panel du haut correspond à un objet illuminé par un faisceau d'électrons parallèle et pour lequel l'image formée ne montre que des caractéristiques faibles. Le panel du bas correspond à une coupe transversale de l'objet délimité par des lignes pointillées avec les flèches montrant les changements dans le front d'onde (lignes parallèles) après interaction avec l'échantillon. L'intensité n'est pas modifiée, mais le front d'onde se courbe (Adapté de (Orlova and Saibil, 2011)).

○ Formation de l'image

La formation d'une image en microscopie suit la théorie d'Abbe (1873). Elle est décrite brièvement ci-après. Si l'on considère le faisceau d'électron incident comme une onde, l'échantillon peut modifier localement la phase et l'amplitude de cette onde.

Les électrons transmis vont dans un premier temps rencontrer la lentille objective, ils convergeront ensuite au niveau du plan focal de la lentille. Au niveau de ce plan focal se forme alors un spectre de diffraction caractéristique de la géométrie de l'échantillon, sur lequel ne sont représentés que les intensités, perdant toute information de phase. Ce spectre de diffraction est obtenu mathématiquement par la transformée de Fourier (TF).

Ensuite, afin de repasser dans l'espace réel et donc de convertir la figure de diffraction en image agrandie de l'échantillon, la transformée de Fourier inverse (TF⁻¹) est utilisée (**Figure 35**).

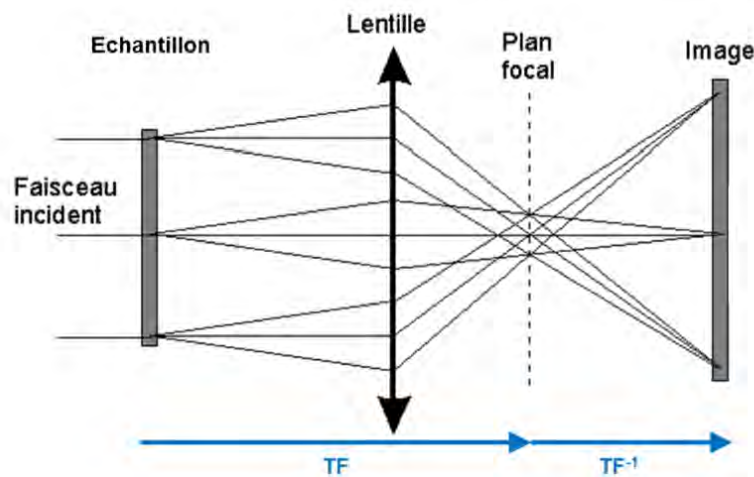


Figure 35 : Schéma de formation d'une image en microscopie électronique à transmission. Avec TF correspondant à la Transformée de Fourier et TF⁻¹ correspondant à la transformée de Fourier inverse.

4. Quelles sont les limites de la résolution ?

○ La diffraction

La résolution est tout d'abord limitée par le phénomène de diffraction. Lorsque la lumière passe à travers une ouverture circulaire, elle est diffractée, c'est à dire que l'image d'un point ne sera pas un point mais une tâche de diffusion ou tâche d'Airy. Cette tâche correspond à un disque brillant au centre autour duquel est représenté une série d'anneaux concentriques d'intensités décroissantes. Le diamètre de ce motif est lié à la longueur d'onde (λ) du rayonnement : $D = \frac{1,22 \times \lambda}{n \times \sin \alpha}$

Avec λ la longueur d'onde du faisceau, n l'indice de réfraction du milieu traversé (dans le vide n est environ égale à 1) et α l'angle d'incidence du faisceau.

Les images formées par deux points voisins produisent donc deux tâches d'Airy, si ces deux tâches se recouvrent il sera impossible de distinguer ces deux points. Plus le diamètre de la tâche d'Airy

est petit et plus il sera facile de séparer deux objets proches, le pouvoir de résolution sera donc meilleur (**Figure 36**). Le choix des électrons comme source de rayonnement est donc intéressant. Afin d'observer deux tâches d'Airy séparées, il faut que la distance entre les deux soit égale à la moitié du diamètre du disque, d'où la formule de la résolution théorique qui veut que :

$$R_{th} = \frac{0,61 \times \lambda}{n \times \sin \alpha}.$$

Cependant, dans un microscope électronique, cette résolution est limitée par les imperfections des lentilles électromagnétiques.

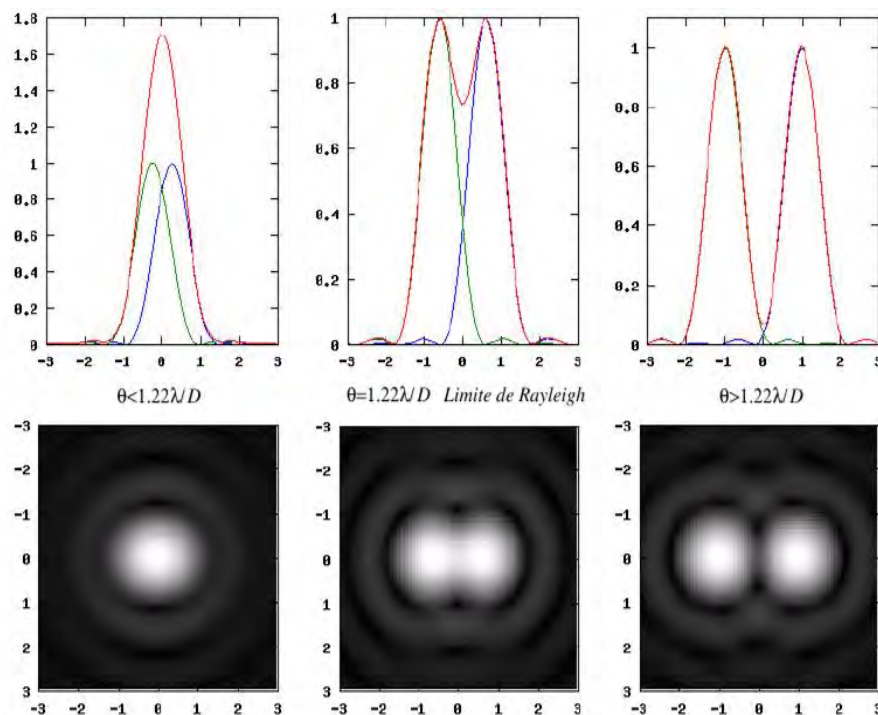


Figure 36 : Limite de résolution et tâche d'Airy. Image de deux points par une fente circulaire de diamètre D . La limite de résolution est atteinte lorsque l'angle de séparation des deux points est égal à $1.22 \frac{\lambda}{D}$ correspondant au critère de Rayleigh (panel du milieu). (Adapté de <http://sites.unice.fr/site/aristidi/optique/coh/cspat/node12.html>)

○ Les aberrations des lentilles électromagnétiques

Les lentilles électromagnétiques présentent les mêmes types de défauts que des lentilles optiques. Ces défauts altèrent les images acquises, rendant la résolution atteignable loin de la résolution théorique relative à la longueur d'onde des électrons. Les lentilles électromagnétiques présentent trois types d'imperfections : l'aberration sphérique, l'aberration chromatique et l'astigmatisme (**Figure 37**).

Dans le cas de **l'aberration sphérique**, les rayons passant par la périphérie de la lentille sont réfractés plus fortement que les rayons passant par le centre. Les électrons vont donc converger à des distances focales différentes. Ce phénomène entraîne la distorsion de l'image et se traduit par une perte de netteté. Le fait de réduire l'ouverture du diaphragme peut aider à réduire ce défaut en limitant la quantité de rayonnement parasite (**Figure 37B**).

L'aberration chromatique, quant à elle est causée par le fait que les électrons n'ont pas tous la même longueur d'onde quand ils atteignent la lentille. Lorsqu'ils traversent la lentille, les électrons les moins rapides seront les plus déviés, de sorte qu'une partie de l'image sera formée dans un plan plus proche de l'objet. Les électrons ayant des énergies différentes ne vont donc pas tous converger vers le même point. Ce phénomène entraîne des halos "colorés" autour des bords des images. En MET, ces différences de longueur d'onde sont causées par trois événements : (i) la variation de la tension de la source d'électrons, (ii) la dispersion d'énergie des électrons dans le faisceau primaire (qui sera différente selon la source, par exemple : les source FEG ont une dispersion moindre) et (iii) la perte d'énergie des électrons diffusant de manière inélastique dans l'échantillon. Cela a pour conséquence de rendre les détails fins de l'images flous (**Figure 37C**).

Enfin **l'astigmatisme** est produit par une déviation de la symétrie axiale de la lentille, de sorte que la lentille est légèrement plus forte dans une direction que dans sa direction perpendiculaire. Dans le microscope électronique l'astigmatisme est provoqué par un champ magnétique asymétrique dans les lentilles. Ce phénomène entraîne une déformation de l'image, ainsi l'image d'un point ne sera pas circulaire mais elliptique (**Figure 37D**).

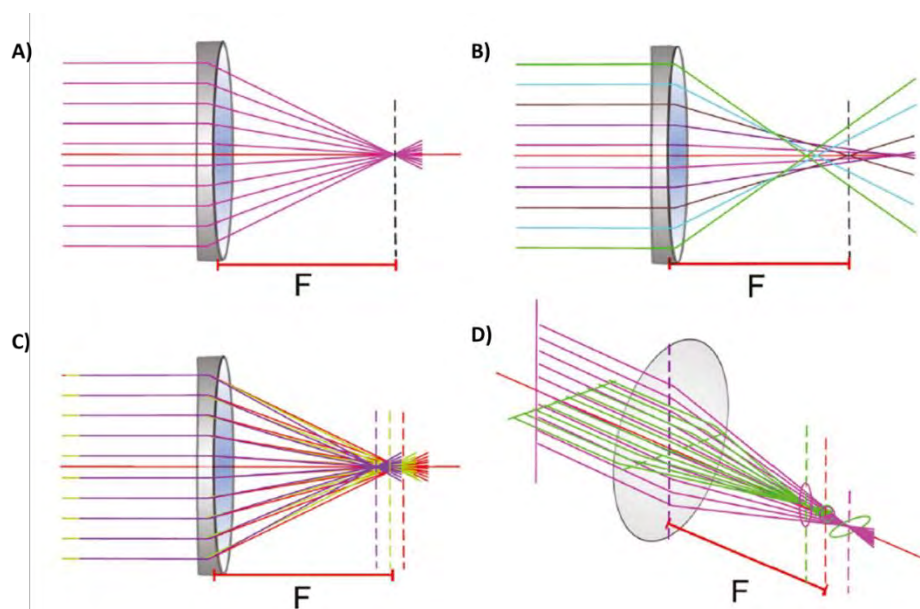


Figure 37 : Représentation schématique des aberrations des lentilles électromagnétiques. A) lentille parfaite, B) L'aberration sphérique, C) L'aberration chromatique, D) L'aberration astigmatique. F représente le plan focal de la lentille. (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011)

Ici, ont été présenté les trois principaux défauts des lentilles électromagnétiques, mais il en existe d'autres. De plus d'autres éléments peuvent aussi altérer la résolution d'une image comme les dommages causés par les radiations du faisceau d'électrons.

5. La fonction de transfert de contraste (CTF)

L'image représente une projection de la structure de l'objet modulée par un terme dépendant des caractéristiques optiques du microscope. Ce terme appelé la fonction de transfert de contraste (CTF) décrit les effets de la qualité du contraste provenant à la fois d'effets d'amplitudes et d'effets de phases mais varie aussi en fonction de la défocalisation, l'aberration sphérique et l'accélération des électrons. La CTF représente une fonction oscillatoire sinusoïdale qui est défini telle que :

$$CTF(\Delta z, s) = \sin\left(2\pi\left[\frac{-(s^2\lambda\Delta z)}{2} + \frac{(\lambda^3s^4C_s)}{4}\right]\right)$$

Avec Δz : la défocalisation ; s : la fréquence spatiale ; λ : la longueur d'onde du faisceau d'électrons ; C_s : les aberrations sphériques

La transformée de Fourier (TF) ou spectre de puissance de la CTF est caractérisée par de multiples cercles concentriques appelés anneaux de Thon. L'analyse de la forme des anneaux donne des informations sur la qualité de l'image et permet d'identifier d'éventuels défauts comme l'astigmatisme (anneaux pas circulaires mais plutôt elliptiques) ou encore le mouvement de l'échantillon durant l'acquisition de l'image (**Figure 38A**).

Sur la CTF, l'amplitude varie positivement et négativement entre chaque passage à zéro où le signal est nul et donc où aucune information n'est transmise. De plus, à chaque « zéro » la phase est inversée (180°). La position de ces « zéros » sur la CTF dépend du défocus de l'image. Comme l'information transmise aux points « zéro » est perdue, il est primordial d'acquérir de multiples images en utilisant une gamme de valeurs de défocalisation afin de couvrir la majorité des plages de fréquences. Dans le cas d'une image acquise proche du focus (donc peu défocalisée), elle possède peu de contraste et a donc un rapport signal sur bruit faible. Cependant, son premier « zéro » est placé vers les hautes fréquences. Cette image permettra donc d'obtenir des détails à haute fréquence, elle sera plus résolue mais avec un contraste plus faible que pour une image plus défocalisée. En effet, pour une image très défocalisée, le contraste est élevé mais son premier « zéro » sera positionné vers les basses fréquences ne permettant pas d'obtenir des données à haute résolution, mais seulement des informations pour les basses fréquences (**Figure 38B**).

De plus, la CTF est également affectée par les aberrations des lentilles électromagnétiques ainsi que l'instabilité de la tension d'accélération et du faisceau d'électrons. Ces facteurs, regroupés sous

le terme fonction d'enveloppe vont moduler la CTF et induire une diminution progressive de l'amplitude aux hautes fréquences. Cette diminution de l'intensité du signal aux hautes fréquences devra être corrigée. Il sera également nécessaire de corriger la CTF afin d'inverser les amplitudes, le contraste sera alors positif ou nul pour l'ensemble des fréquences spatiales.

Durant l'analyse d'images, le fait d'estimer précisément la CTF de chacune des images obtenues puis de la corriger permet de diminuer la perte d'informations. En effet, l'information une fois corrigée permettra d'augmenter le signal aux hautes fréquences, ceci ayant aussi pour conséquence d'augmenter le bruit par la même occasion.

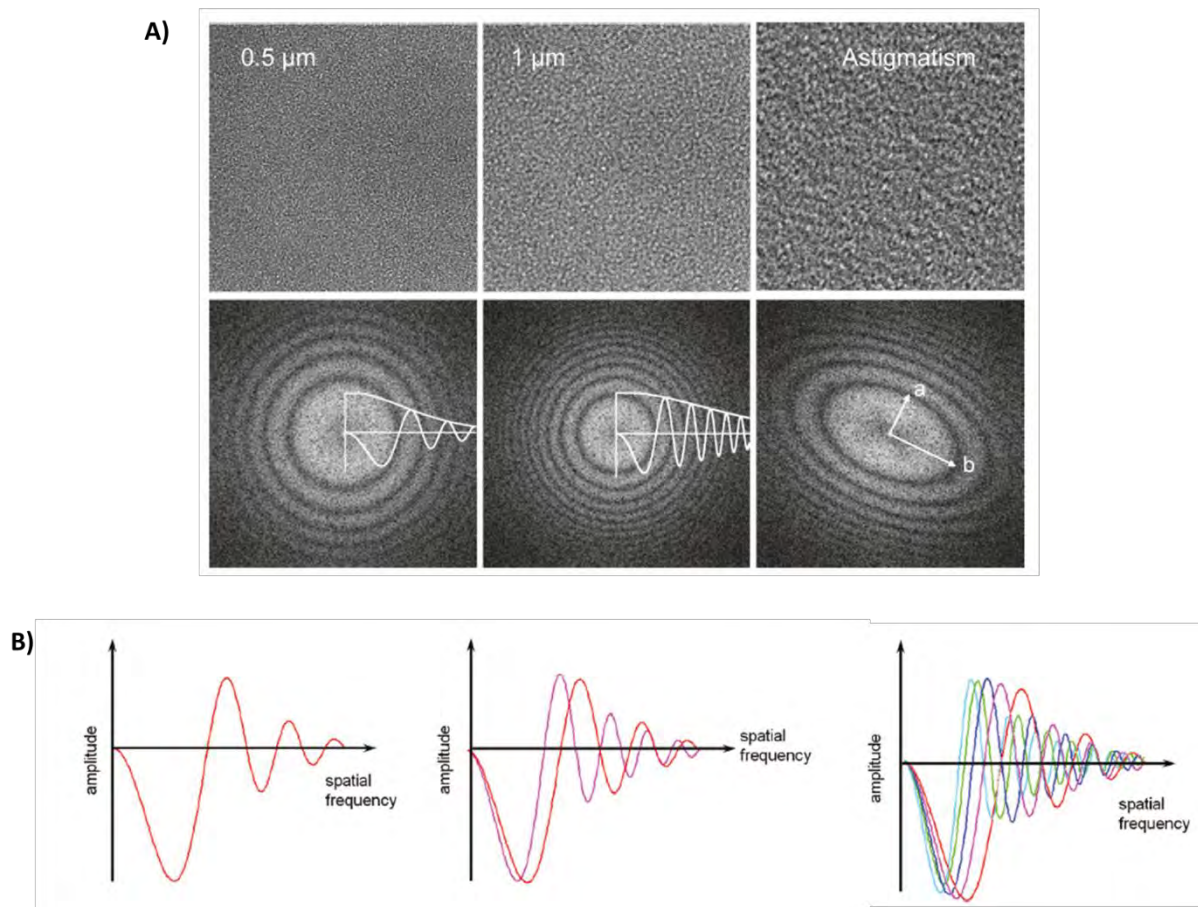


Figure 38 : La fonction de transfert de contraste (CTF). **A)** Images obtenues à différents défocus leurs spectres de puissance associés, montrant les anneaux de Thon et les courbes CTF correspondantes. L'image de gauche a été obtenue à 0,5 μm de défocalisation, et l'image du milieu à 1 μm de défocalisation. Le panel de droite montre un exemple d'image avec de l'astigmatisme et son spectre de puissance. **B)** Représentation des courbes CTF selon différentes valeurs de défocus : pour une seule valeur de défocalisation (panel de gauche). Puis superposées pour deux valeurs de défocalisation différentes avec la courbe rouge correspondant à une image plus proche du focus et oscille plus lentement (panel du milieu). Le panel de droite montre les courbes CTF de plusieurs valeurs de défocalisation avec les courbes cyan/vert qui correspondent aux images avec la défocalisation la plus élevée, et la courbe rouge avec la valeur de défocus la plus proche de la mise au point. (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011)

IV. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique

L'étude structurale des ribosomes en cours de traduction se fait par microscopie électronique. La première étape consiste à vérifier la qualité des échantillons (concentration, présence de saccharose, dispersité des particules...) par coloration négative. Une fois les échantillons validés, l'étape suivante est l'analyse par cryo-EM.

1. Coloration négative

○ Préparation des grilles

La coloration négative est une technique simple qui permet de visualiser rapidement les particules isolées d'un échantillon au microscope électronique. Elle est donc utilisée en routine sur les échantillons purifiés et concentrés, afin de vérifier leur homogénéité ainsi que leur concentration. Les échantillons biologiques étant composés exclusivement d'atomes légers, il est très difficile de pouvoir les observer au microscope électronique car la trajectoire des électrons ne va être que faiblement déviée ce qui va entraîner un contraste trop faible pour pouvoir distinguer les particules. Les échantillons sont également hydratés, et sans protection, l'eau qu'ils contiennent serait immédiatement vaporisée à l'intérieur de la colonne du microscope, endommageant le vide poussé de celle-ci ainsi que la structure des molécules d'intérêt. Pour pallier ce problème, le principe de la coloration négative est d'enrober l'échantillon d'une solution de métaux lourds, le plus souvent de l'acétate d'uranyle, qui sont opaques aux électrons. Ces sels de métaux lourds vont donc former une couche dense enrobant l'échantillon, permettant ainsi de délimiter les contours des particules et donc de les distinguer facilement en créant du contraste, entre le fond sombre et les particules non colorées.

Tout d'abord, la grille doit être ionisée. Cette étape est nécessaire afin de rendre le support de la grille hydrophile, et donc permettre aux particules isolées de l'échantillon de se répartir de manière homogène sur la surface de la grille. En effet, le support étant un film de carbone il est hydrophobe et ne permet pas à la solution aqueuse d'interagir correctement avec la grille. La grille est donc placée entre une anode et une cathode dans une cloche sous vide, une tension est alors appliquée entre l'anode et la cathode, formant un plasma d'ozone par ionisation de gaz à faible pression (l'oxygène). Les charges négatives ainsi produites se déposent sur le film carbone et le rendent hydrophile. Ici, une grille carbonée (QUANTIFOIL® Cu 300 mesh) est utilisée et ionisée à l'aide d'un ionisateur Pelco EasiGlow, pour cela la grille est placée sous une atmosphère de 0,45mBar, avec un courant d'intensité de 25mA, appliqué durant 30sec.

Une fois la grille ionisée, 3,5 μ L d'échantillon sont déposés dessus, puis l'excédent de solution est absorbé à l'aide d'un papier filtre (Whatman 4). Ensuite 3,5 μ L d'acétate d'uranyle 1 % sont déposés sur la grille contenant l'échantillon, l'excédent est à nouveau éliminé grâce au papier filtre, puis cette étape est ré-itérée une nouvelle fois, cette fois-ci l'excès d'acétate d'uranyle est absorbé après 20sec. La grille est finalement séchée à l'air libre avant d'être stockée, avant l'observation au microscope (**Figure 39**).

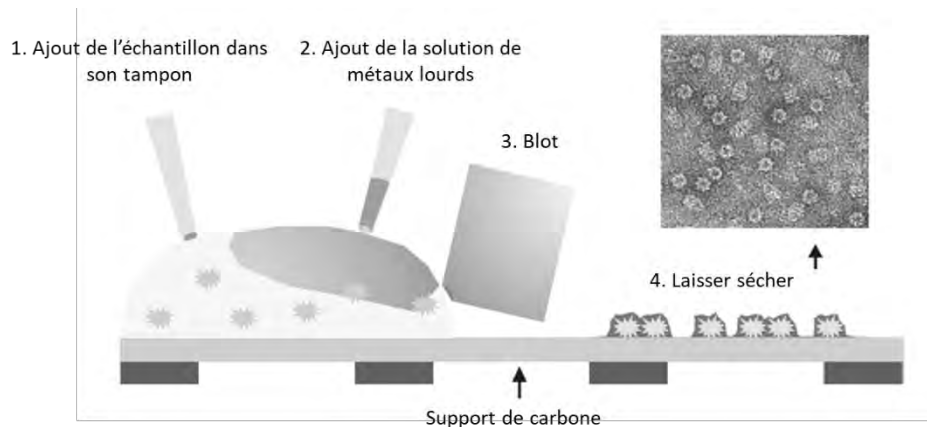


Figure 39 : Représentation schématique de la préparation des échantillons en coloration négative. (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011)

○ *Microscope utilisé pour l'observation :*

Le microscope utilisé pour la vérification des échantillons en coloration négative est un MET Jeol JEM 1400 se trouvant sur la plateforme de microscopie électronique de Toulouse (METI). Il dispose d'un filament en tungstène comme source d'électron, opérant à une tension d'accélération entre 80 et 120kV (le plus souvent à 80kV dans notre cas). Il est également équipé d'une caméra CCD Gatan Orius SC1000B 11 Megapixels. L'acquisition des images s'effectuent par le biais du logiciel d'acquisition d'images Digital Micrograph (Gatan).

Une fois l'échantillon validé par coloration négative, il est ensuite préparé pour la cryo-EM, dont les images permettront d'obtenir des structures 3D haute résolution (après analyse par Single Particle Analysis ou SPA).

2. Cryo-congélation

○ *Préparation des grilles :*

La technique de coloration négative utilise des métaux lourds pour augmenter le contraste, mais ceux-ci peuvent entraîner des modifications structurales de l'échantillon. Afin d'éviter cela,

la technique de cryo-EM est utilisée. En effet, afin de maintenir l'intégrité structurale des particules, il est important de les garder dans un milieu aqueux proche de leur état natif. C'est pour cela que le principe de la cryo-EM est de congeler l'échantillon dans de la glace vitreuse (non cristalline), transparente aux électrons. Pour ce faire, une congélation ultra-rapide et à très basse température (-185°C) de l'échantillon est nécessaire

La méthode de congélation, appelée *plunge-freezing*, est réalisée grâce à l'automate de congélation EM GP (Leica). Cet appareil est composé d'une chambre dans laquelle la température et le taux d'humidité sont régulés. Dans notre cas, la température est réglée à 20°C pour un taux d'humidité de 95 % ce qui permet à l'échantillon de rester hydraté tout au long de la manipulation. Les grilles utilisées sont des grilles à trous, recouverte d'une fine couche continue de carbone (Quantifoil R2/1 +2nmC) (**Figure 40A**). Celles-ci sont ionisées extemporanément grâce à l'EasiGlow Pelco (Paramètres du Glow Discharge programme 2). Ensuite, $3,5\mu\text{L}$ de suspension des particules d'intérêt sont déposés sur les grilles ionisées, puis la grille est placée dans la chambre. Ensuite l'excédent d'échantillon est éliminé grâce à un papier filtre. Pour cela la grille est mise en contact durant 0,9sec avec un papier filtre (Whatman 1). Puis la grille est plongée dans de l'éthane liquide (-185°C) refroidi par de l'azote liquide, entraînant la vitrification instantanée de l'eau de l'échantillon (**Figure 40B**).

Une fois cette étape clé réalisée, la difficulté, ensuite, est de ne pas rompre la chaîne du froid, en effet il est primordial pour les grilles une fois congelées d'être maintenues à basse température (en ne remontant jamais au-dessus de -165°C) durant les transferts et l'observation au microscope. Pour cela, les grilles, une fois stockées dans des portes-objets de cryo-EM, sont toujours manipulées et conservées dans de l'azote liquide (-196°C) afin d'éviter la transformation irréversible de la glace vitreuse en glace cristalline.

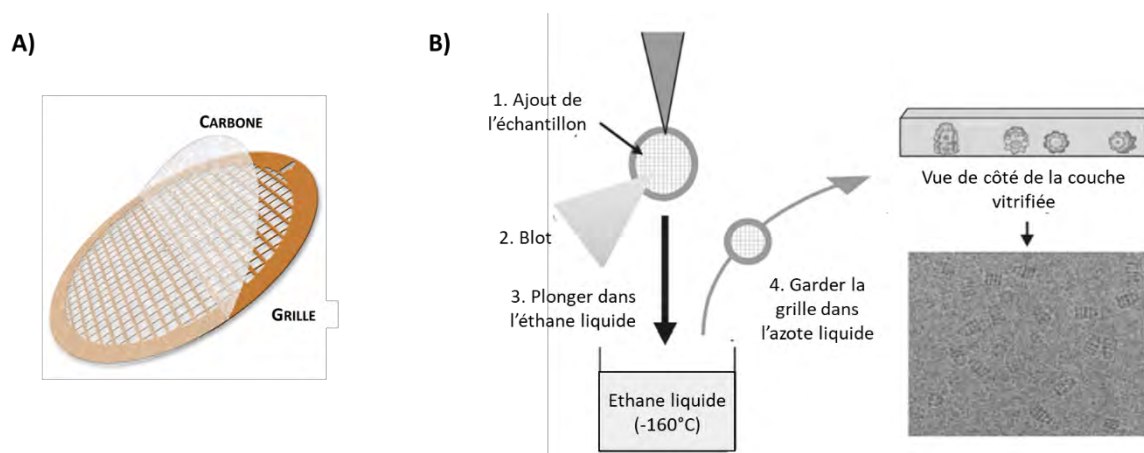


Figure 40 : Préparation des échantillons en cryo-EM. A) Schéma d'une grille carbonée utilisée en microscopie électronique à transmission. **B)** Etapes de préparation des échantillons en cryo-EM (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011).

○ *Microscope utilisé pour l'observation*

Les grilles de cryo-EM ont principalement été observées sur le Talos Arctica de la plateforme METI. Il dispose d'un filament FEG comme source d'électron, opérant à une tension d'accélération de 200 kV. Il est également équipé d'un détecteur direct d'électron (Gatan K2) couplé à un filtre d'énergie (BioQuantum). L'acquisition automatisée des images est réalisée grâce au logiciel EPU. Les images sont acquises à un grossissement nominal de 130 000x, qui correspond à une taille de pixel calibrée à 1.01 Å. Le mode movie a été utilisé, il consiste à acquérir plusieurs images (comme un film), du même champ de particules, durant un temps d'exposition donné. Dans cette étude, il était habituel d'acquérir une pile de 35 ou 40 images (aussi appelé stack de frames) ayant une dose d'électrons d'environ 1 e/Å²/image, soit une dose totale allant d'environ 35 à 45 e/Å².

Les images ont été obtenues en utilisant une gamme de défocalisation variant de -800 nm jusqu'à -2900 nm.

V. Analyse d'images

1. Principes généraux

Lors de la préparation des grilles de microscopie électronique, que ce soit par coloration négative ou cryo-congélation, de multiples copies de l'objet d'intérêt se retrouvent sur la grille, dans des orientations différentes, dans le meilleur des cas, aléatoire. En microscopie électronique à transmission (MET), les images acquises, à partir de ces grilles, correspondent à différentes projections bidimensionnelles de l'objet d'intérêt tridimensionnel. En combinant assez de projections 2D différentes d'un même objet, et ce de manière correcte, il est possible de reconstruire la structure 3D de cet objet d'intérêt. Pour ce faire, il est d'abord nécessaire de déterminer l'orientation relative de chacune des projections 2D du jeu de données. Ensuite, les projections 2D correctement orientées pourront être sommées, afin d'obtenir une reconstruction 3D de l'objet d'intérêt. D'un point de vue mathématique, le théorème des sections centrales permet d'expliquer comment à partir de ces projections 2D il est possible d'obtenir une reconstruction 3D de l'objet. La transformée de Fourier de chaque projection 2D d'un objet 3D correspond à une section centrale dans la transformée de Fourier 3D de cet objet. L'orientation de départ de l'objet sous le faisceau d'électron définit l'orientation de la section dans la transformée de Fourier 3D de ce même objet. De plus, toutes les transformées de Fourier 2D étant des sections centrales de la transformée de Fourier 3D de l'objet, toutes les projections 2D d'un même objet ont au moins une ligne en commun, passant par le centre de l'espace de Fourier. La recherche des lignes communes est l'une des méthodes permettant de déterminer l'orientation relative des projections 2D d'un jeu de données. Les transformées de Fourier des projections 2D d'un objet correspondent donc à des « tranches » centrales de la transformée de Fourier 3D d'un objet. Il est donc primordial que les particules adoptent suffisamment d'orientations différentes (avoir suffisamment de vues d'un même objet, et donc suffisamment de tranches centrales de sa transformée de Fourier 3D) afin d'obtenir les informations nécessaires à une reconstruction 3D la plus complète possible. Finalement la structure 3D de l'objet pourra être calculée par transformée de Fourier inverse.

La qualité de la reconstruction 3D obtenue dépend donc à la fois de l'orientation des particules dans la glace mais aussi de la qualité des images.

La reconstruction 3D des structures de ribosomes a été possible grâce au traitement des images de cryo-EM dit analyse des particules isolées (Single Particle Analysis ou SPA). Cette méthode passe par différentes étapes qui vont être abordées par la suite et dans notre cas qui ont été réalisées sur le logiciel d'analyse d'images RELION 3.1 (Scheres, 2016; Zivanov et al., 2018).

RELION 3.1

RELION, pour REGularized Likelihood OptimizatiON, est une suite de programmes informatiques développée par le groupe de Sjors Scheres au MRC Laboratory of Molecular Biology à Cambridge. Comme expliqué ci-dessus, le principe de la technique d'analyse des particules isolées est de réussir à assigner l'orientation des particules imagées, afin de pouvoir reconstruire un modèle 3D de l'objet. Pour cela, RELION utilise une approche de statistique bayésienne basée sur le maximum de vraisemblance, et calcul la probabilité maximale d'orientation de chaque particule expérimentale. Ces calculs de probabilités tiennent compte de la flexibilité structurale de la particule, mais aussi que la variabilité du rapport signal sur bruit dans le jeu de données d'images acquises. La force de ce modèle statistique est que de nombreux paramètres sont collectés directement dans les données, ce qui permet d'obtenir des résultats objectifs et de haute qualité sans avoir besoin de l'expertise de l'utilisateur. De plus ce programme est capable de trier l'hétérogénéité structurale de l'échantillon. RELION utilise aussi la méthode « Gold-standard FSC » qui permet d'éviter la surinterprétation des données et les biais de référence.

2. Étapes de traitement des images

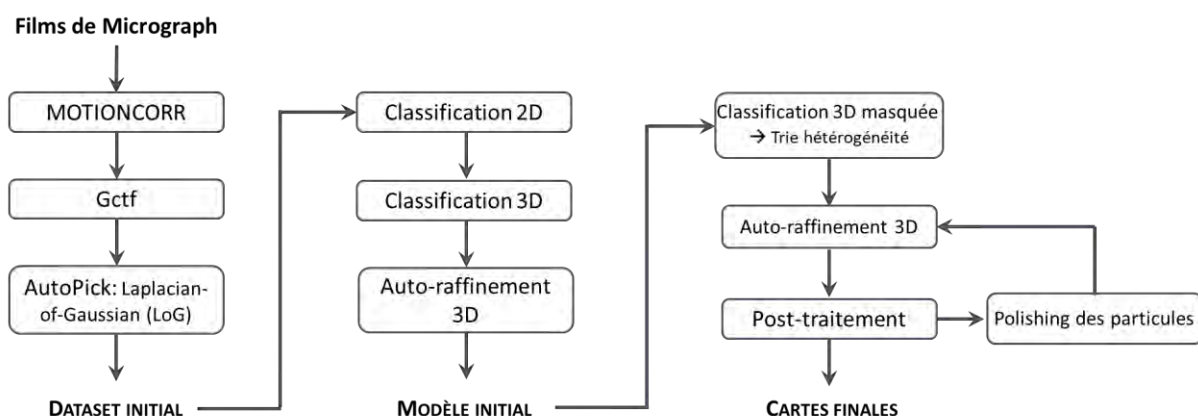


Figure 41 : Workflow utilisé lors de la détermination des structures 3D en cryo-EM.

Chacune des étapes de la (Figure 41) sera décrite une à une par la suite.

a. Pré-traitement

Motion Correction

Avec l'arrivée des détecteurs à électrons directs en 2012/2013, il est devenu possible d'acquérir des films, ou pile (stack) de plusieurs images, durant l'exposition de l'échantillon au faisceau d'électrons. Ceci a permis deux améliorations qui étaient auparavant inaccessibles : la correction du mouvement de l'échantillon induit par le faisceau d'électrons, et la pondération de la dose reçue par l'échantillon (qui augmente avec le nombre d'images dans une pile).

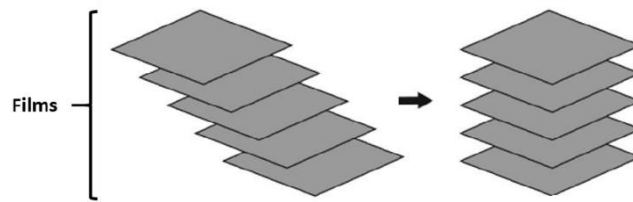


Figure 42 : Représentation schématique de films de micrographes avant et après alignement par Motion Correction.

À partir du jeu de données collecté, la première étape du traitement des images est donc de ré-aligner les images de la pile et les sommer ainsi que de pondérer la dose d'électrons reçue. Ici, le logiciel MotionCor2 implémenté dans RELION 3.1 est utilisé pour le pré-traitement des images (Zheng et al., 2017). Le mouvement de l'échantillon induit par le faisceau peut être décomposé en deux composantes, le mouvement uniforme de l'ensemble de l'image et les mouvements locaux non uniformes qui varient dans l'image. MotionCor2 combine la correction du mouvement uniforme de l'image entière et du mouvement local, et normalise toutes les étapes de prétraitement nécessaires, notamment la détection et la correction des mauvais pixels avant de poursuivre avec les étapes suivantes d'analyse d'images (**Figure 42**).

Estimation de la CTF

Une fois les films réalignés et sommés pour donner un micrographe, l'étape suivante est d'estimer la CTF de chacune de ces images. Comme présenté précédemment, sur la CTF, l'amplitude du signal peut être positive, négative ou nulle suivant les fréquences spatiales, ce qui permet d'observer les anneaux de Thon sur le spectre de puissance des images.

Comme vu précédemment, la CTF dépend de l'accélération du faisceau d'électron, des aberrations des lentilles et de la défocalisation. L'accélération du faisceau est connue ainsi que le coefficient des aberrations sphériques (fournit par le constructeur). Seule la valeur de défocalisation reste à déterminer. Pour cela, le spectre de puissance de chaque image est calculé et est comparé à une CTF théorique 1D calculée selon les paramètres connus, décrits précédemment (coefficient

d'aberration, voltage et contraste d'amplitude). La défocalisation du modèle est modifiée afin de trouver la meilleure correspondance entre les deux profils. Ces valeurs de défocalisation obtenues sont ensuite affinées en fonction du spectre de puissance 2D de chacune des images.

Ici, le logiciel Gctf est utilisé pour l'estimation de la CTF (Zhang, 2016). Ce logiciel applique la méthode « 1S2R » pour « 1-dimensional search and 2-dimensional refinement » qui correspond à ce qui a été expliqué précédemment, et cette méthode combinée à l'utilisation des GPU accélère le processus d'estimation de la CTF. Une fois l'estimation CTF réalisée, le logiciel fournit un fichier texte au format STAR qui sera utilisé par RELION pour les étapes suivantes d'analyse d'images afin de corriger les CTF de chaque image. Dans ce fichier sont retrouvés, les paramètres du microscope électronique (le voltage, le grandissement) ainsi que les valeurs d'astigmatisme et les valeurs de défocus calculées pour chacune des images.

La correction de la CTF se fera ensuite sur les étapes suivantes de l'analyse d'image. Une des étapes de la correction de la CTF est d'inverser l'amplitude pour que le contraste soit positif ou nul. Il est aussi nécessaire de corriger la phase par 180° (**Figure 43**).

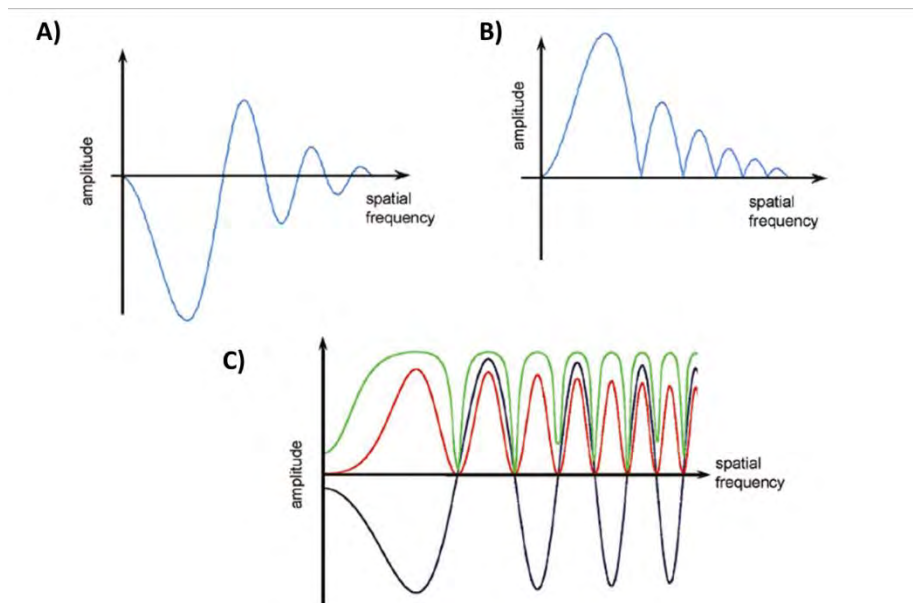


Figure 43 : Correction de la CTF. A) Courbe CTF d'un jeu de données non corrigé. **B)** Courbe CTF après correction de la phase. **C)** Superposition de la courbe CTF non corrigée en noire avec la courbe CTF après correction de la phase (rouge) et après correction de la phase et de l'amplitude en vert. (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011).

Sélection des particules

Cette étape consiste à déterminer les coordonnées du centre de chacune des particules présentes sur une image, ayant un diamètre particulier (d) puis à les extraire dans une plus petite image carrée et qui ne contiendra qu'une seule particule. Celle-ci est aussi appelée boîte, ou box

en anglais. Afin de réaliser cette étape, le programme basé sur le filtre Laplacien après convolution gaussienne (Laplacian-of-Gaussian, LoG) de RELION 3.1 a principalement été utilisé. Ce programme est plus automatisé que dans la version précédente de RELION (RELION 2), où il fallait sélectionner plusieurs milliers de particules manuellement sur quelques micrographes, puis utiliser ces particules comme référence (après une étape de classification 2D) pour sélectionner automatiquement les particules sur l'ensemble du jeu de données.

Le principe du filtre LoG est décrit dans (Zivanov et al., 2018). En résumé, le filtre LoG n'a pas besoin de référence, il a seulement besoin de connaître le diamètre minimal (d_{\min}) et maximal (d_{\max}) de la particule. Le programme appliquera ensuite quatre filtres LoG pour détecter les zones dans le micrographe qui contiennent des particules plus petites que d_{\min} puis quatre filtres LoG cette fois-ci qui détecteront les particules plus grandes que d_{\max} , et enfin trois filtres LoG permettant de détecter les particules ayant la taille spécifiée par l'utilisateur (d_{\min} , la moyenne de d_{\min} et d_{\max} , et d_{\max}).

Pour qu'une particule soit sélectionnée, il faut qu'après avoir réalisé les onze filtres LoG, la valeur obtenue (LoGbest) soit supérieure au seuil spécifié par l'utilisateur et que la particule en question ait un diamètre compris dans la gamme de taille indiquée par l'utilisateur.

En pratique, le programme LoG est tout d'abord testé sur quelques micrographes afin de vérifier qu'il sélectionne correctement les particules souhaitées, il est alors possible d'ajuster la valeur de seuil spécifiée afin de sélectionner plus ou moins de particules. Une fois la sélection convenable pour l'utilisateur, le filtre LoG est ensuite lancé sur l'ensemble du jeu de données.

L'avantage de ce programme réside dans le fait qu'aucune référence n'est nécessaire, il n'y a donc pas de biais de référence. De plus, le fait de ne pas avoir à sélectionner manuellement plusieurs milliers de particules pour créer une référence rend cette étape beaucoup plus rapide.

Une fois les particules sélectionnées, un fichier texte (au format STAR) est généré dans lequel se trouvent les coordonnées de chacune des particules sélectionnées. Ces particules sont ensuite extraites des images dans des boîtes individuelles qui doivent avoir une taille suffisante pour loger la particule en entier mais pas trop grande pour optimiser les calculs suivants de l'analyse d'image. Dans le cas des ribosomes, ils sont extraits dans des boîtes individuelles de 312 x 312 pixels.

b. Classification 2D

Une fois les particules extraites, la première étape du traitement est la classification 2D. Le plus souvent, cette classification 2D est utilisée comme contrôle de la qualité des données mais aussi comme étape de prétraitement avant la reconstruction 3D. Elle a pour but d'aligner et classer les particules selon leur orientation ; pour simplifier, on peut dire que toutes les particules

correspondant à des vues similaires de l'objet seront regroupées dans une même classe. Les particules une fois alignées et classées seront moyennées, ceci permet d'augmenter le rapport signal sur bruit des « vues » de l'objet.

Dans RELION, la classification 2D (Scheres, 2016) est un programme pour lequel aucune référence extérieure au jeu de données n'est nécessaire. Le programme utilise un algorithme de maximum de vraisemblance pour lequel seul le nombre de classe (K) est nécessaire de spécifier par l'opérateur. Ce nombre de classe K indique le nombre de classe 2D de « références » qu'utilisera le programme. En effet, le principe est de répartir aléatoirement le jeu de données dans le nombre de classe K, les images sont moyennées et forment les « références » qui seront ensuite utilisées pour l'itération suivante. Chaque image est alors comparée à chacune des références (K) dans toutes les orientations possibles. Le programme ne va pas affecter les images à une classe ou une orientation particulière mais va calculer un score de probabilité pour chaque possibilité. Les moyennes des classes sont ensuite calculées comme des moyennes pondérées de toutes les affectations possibles et utilisées pour l'itération suivante. Lorsque la probabilité est maximale entre une particule et une référence (classe 2D), alors la particule est attribuée à cette classe 2D. Finalement, chacune des particules correspondant à une même vue se retrouvera assignée à une classe 2D de référence correspondant à une orientation précise. Enfin, les particules d'une même classe seront sommées pour augmenter le rapport signal sur bruit. Quant aux particules aberrantes, elles ne pourront pas s'aligner et seront donc affectées à des classes 2D différentes ; après avoir moyenné le signal de celles-ci, les classes sommées correspondront à des « blobs » de basse résolution. À cette étape il est possible d'éliminer les classes 2D dans lesquels les images d'artefacts sont rassemblées afin de nettoyer le jeu de données de ces particules aberrantes pour la suite du traitement des images (des exemples de classes 2D sont présentés dans les Résultats partie II. **Figure 49&50**).

c. Classification 3D

La sélection des particules se poursuit avec la classification 3D. Lors de cette étape, l'orientation des particules va être déterminée, pour permettre la reconstruction de structures 3D de l'objet d'intérêt. Cette classification 3D permet donc à la fois d'éliminer les dernières particules aberrantes qui pourraient persister dans le jeu de données, mais aussi de trier les structures 3D selon leur hétérogénéité structurale et conformationnelle.

Tout comme pour la classification 2D, la classification 3D est basée sur le principe de maximum de vraisemblance. Mais contrairement à la classification 2D, pour cette étape l'utilisateur doit fournir une référence. Pour la reconstruction des ribosomes, une carte de densité d'un ribosome hybride (créé dans Chimera) formé d'une grande sous-unité ribosomique 60S de souris (6SWA –

EMD-10321) (Kraushar et al., 2021) et d'une petite sous-unité 40S de lapin (6YAN – EMD-10762) (Simonetti et al., 2020) a été utilisée.

La première étape du programme est de filtrer à basse résolution la référence, ceci permet de réduire le biais de référence, et donc de ne pas sur-interpréter les données. Puis, lors de la première itération, des projections 2D de la référence 3D sont générées, selon des orientations connues et couvrant tout la géométrie de la molécule d'intérêt. Chaque particule expérimentale est ensuite comparée en translation et rotation aux projections 2D du modèle de référence (c'est le principe de « projection matching » (**Figure 44**) (Estrozi and Navaza, 2008). Lorsque la probabilité de vraisemblance atteint un maximum, l'orientation de la projection 2D est attribuée à la particule. Une fois les orientations de chaque particule définie, elles sont réparties, de manière aléatoire, dans un nombre de classe K (comme pour la classification 2D, ce nombre est défini au préalable par l'utilisateur). À partir des particules de chacune des classes, une structure 3D est construite (donc pour K classes, K reconstructions 3D seront générées). Une nouvelle fois, les n projections 2D de chacune des K reconstructions 3D vont être générées. Ce sont ces $n \times K$ projections qui seront utilisées comme références pour déterminer l'orientation et l'appartenance à une classe des particules expérimentales, à la prochaine itération. Au fil des itérations, l'orientation de chaque particule va s'affiner pour finalement obtenir une structure 3D reconstruite reflétant les particularités des particules expérimentales de chacune des classes.

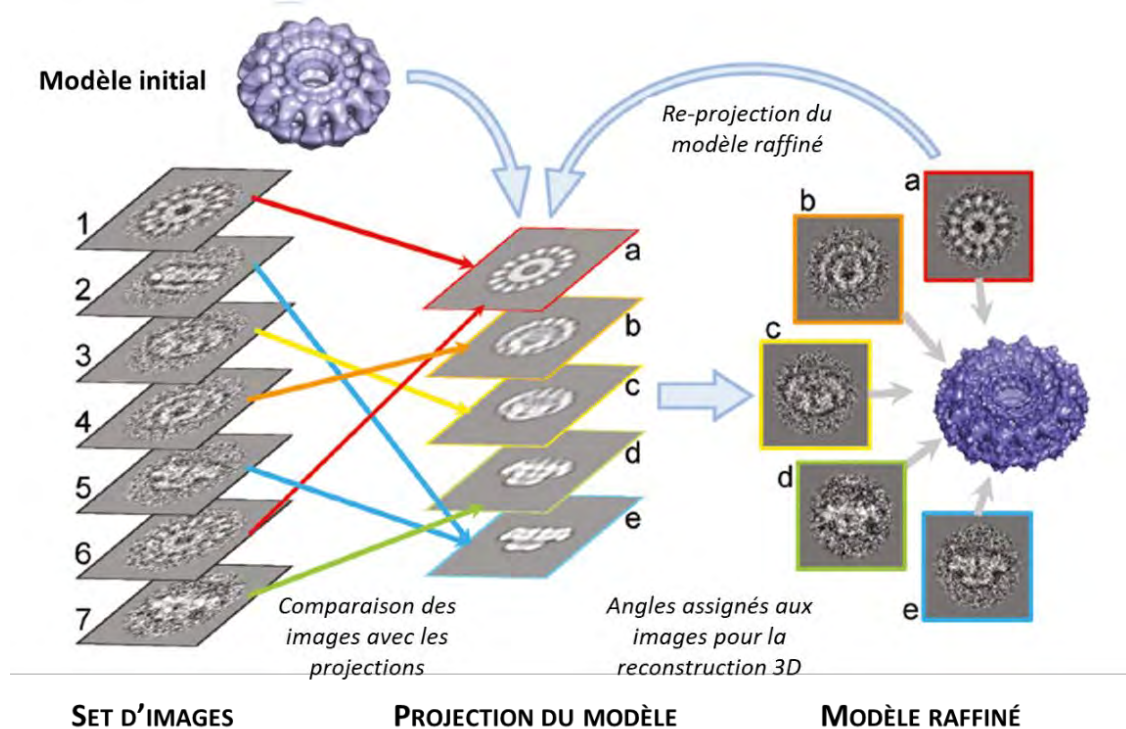


Figure 44 : Principe du « projection matching ». Les étapes de la classification 3D à partir du principe du « projection matching » sont indiquées (Adapté d'Orlova et Saibil, 2011).

Pour cette classification 3D, l'utilisateur doit fournir une structure de référence. Dans le cas où la référence initiale est fautive et ne correspond pas à l'objet présent dans l'échantillon, les classes 3D sortantes seront mal résolues et formeront des « blobs », il n'y a pas de risque de surinterprétation des données dans le cas où la référence serait mal choisie (**Figure 45**). L'utilisateur aura aussi besoin de spécifier le nombre de classe K qui dépend à la fois du nombre de particules totales du jeu de données mais qui doit aussi se rapprocher au mieux du nombre de structures différentes de l'objet. Cette information n'étant en général pas connue, cette valeur peut être modulée. Il doit aussi indiquer le nombre d'itérations (généralement aux alentours de 25 à 35), pour cette valeur il est important de suivre la convergence du calcul pour l'adapter aux mieux (c'est-à-dire, arriver à obtenir un calcul qui converge vers un résultat sans perdre trop de temps de calcul).

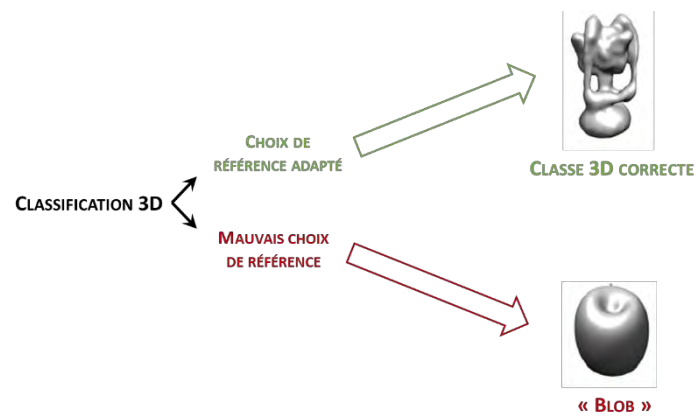


Figure 45 : Biais de référence. Le choix de la référence utilisé pour la classification 3D est important, mais dans le cas d'un choix erroné de la référence, la classe 3D obtenue ne ressemblera pas à la référence mais formera un « blob ». (Adapté de (Punjani et al., 2017))

d. Auto-raffinement 3D

Une fois la première reconstruction 3D obtenue, cette étape d'auto-raffinement 3D permet d'améliorer (raffiner) la structure 3D obtenue. Elle est utilisée pour affiner les orientations et translations des particules déterminées précédemment pour chaque classe 3D. Ce programme est basé comme pour les classifications sur le principe de maximum de vraisemblance, et utilise aussi la comparaison des particules avec les projections 2D d'une structure 3D de référence. Pour ce programme, il est donc nécessaire de lui fournir une référence (qui correspond le plus souvent à la reconstruction 3D obtenue lors de la classification 3D). Il n'est par contre pas utile ici de lui spécifier un nombre d'itérations, le programme va de lui-même s'arrêter lorsque que le calcul arrivera à convergence et que la résolution n'évoluera plus.

Lors de la première itération, le programme filtre à basse résolution la référence 3D, afin de réduire le biais causé par la référence. Le programme divise également aléatoirement le jeu de

données en deux, et les deux demi-jeux de données seront analysés de manière indépendante jusqu'à la fin du processus itératif, qui va donc générer deux structures 3D de manière indépendante. Ceci permet d'éviter la surinterprétation des données.

Pour chaque itération, deux reconstructions 3D sont calculées indépendamment, elles sont appelées demi-cartes. Afin de déterminer les orientations et les translations de chacune des particules, les transformées de Fourier des projections de la structure de référence sont comparées aux transformées de Fourier des images expérimentales. Comme indiqué précédemment, ici, le principe de maximum de vraisemblance est aussi utilisé. Lors de la comparaison des transformées de Fourier, les particules ne sont pas assignées à une orientation précise, mais un score de probabilité est plutôt calculé pour chacune des projections de référence. Cette probabilité est plus ou moins importante et est prise en compte pour la reconstruction 3D. En effet, à la fin de chacune de itérations, la reconstruction d'une transformée de Fourier 3D de l'objet, basée sur les probabilités d'assignation des particules pour chaque projection, est obtenue. Puis, par transformée de Fourier inverse une nouvelle structure de chaque demi-jeux de données est reconstruit. À chaque itération la résolution des reconstructions 3D est calculée par la méthode du « Gold-standard FSC » (voir ci-après pour le principe). Cette résolution est alors utilisée comme valeur de filtre passe-bas de la structure de référence pour l'itération suivante. Chaque probabilité déterminée pour chacune des orientations est ensuite recalculée et mise à jour. Au fil des itérations de plus en plus d'informations aux moyennes et hautes fréquence s'ajoutent permettant ainsi d'améliorer la qualité de la reconstruction 3D jusqu'à ce que finalement le calcul arrive à convergence et que la résolution n'évolue plus.

Lors de la dernière itération, les deux demi-cartes sont fusionnées et la reconstruction obtenue est alors filtrée à la résolution précédemment obtenue. Cette étape permet donc l'augmentation du rapport signal sur bruit et l'augmentation de la résolution de la reconstruction finale.

e. Post-traitement

Afin d'aider à améliorer la résolution de la reconstruction 3D, un programme de post-traitement est lancé. Pour rappel, chaque particule est extraite dans une boîte, pour l'étape d'auto-raffinement 3D l'ensemble du contenu de la boîte est pris en compte, soit la particule ainsi que le bruit autour. Le bruit autour de la particule peut causer une sous-estimation de la résolution.

Pour pallier ce problème et donc permettre d'améliorer la résolution, une étape de post-traitement est réalisée. Pour cela le programme a besoin d'un masque qui entoure la particule afin d'éliminer le bruit autour. La première étape est donc de créer un masque binaire entourant la particule, il doit être suffisamment large pour ne pas perdre de signal tout en étant assez serré

autour de la particule pour éliminer un maximum de bruit. Une fois le masque créé et fourni au programme, il est appliqué aux deux reconstructions 3D obtenues lors de la dernière itération de l'auto-raffinement 3D. À partir de ces structures masquées, la méthode de gold-standard FSC est une nouvelle fois utilisée pour limiter la surestimation de la résolution et une surinterprétation causée par l'utilisation du masque binaire (Scheres and Chen, 2012). Pour ce faire, du bruit est ajouté aléatoirement aux deux transformées de Fourier au niveau des moyennes et hautes fréquences. Puis, la résolution des deux reconstructions est calculée avec la méthode de FSC (Scheres and Chen, 2012). La dernière étape du programme consiste à appliquer un filtre passe-bande sur la reconstruction 3D afin d'atténuer les basses fréquences mais aussi d'amplifier les hautes fréquences (c'est-à-dire amplifier l'information de haute résolution) et ce, jusqu'à la résolution calculée par le programme. Au-delà de cette résolution le signal est supprimé pour éviter de sur-interpréter du bruit.

f. Classification 3D masquée

La classification 3D masquée est une étape indiquée lorsque l'on souhaite identifier différents états structuraux d'une reconstruction 3D. En effet, la classification 3D masquée permet de focaliser la classification sur une zone particulière de la particule, une zone que l'on sait variable. Pour cela, un masque est créé autour de la zone d'intérêt à l'aide du logiciel Chimera (Pettersen et al., 2004). Une fois ce masque réalisé et fourni à RELION, une classification 3D, sans imposer l'alignement des images, est lancée. Cette étape permet de subdiviser les particules en K classes, et donc de faire apparaître des détails sur la zone d'intérêt qui peuvent être masqués dans la structure consensus, surtout dans le cas où un état structural particulier est majoritaire et/ou plus stable.

Une fois la classification faite, chacune des classes est ensuite reconstruite grâce à la commande de RELION : `relion_reconstruct`. Puis, les classes une fois reconstruites repassent par les étapes d'auto-raffinement 3D et de post-traitement.

g. Polishing des particules

Dans RELION-3, deux programmes ont été ajoutés et permettent une fois qu'une structure 3D a pu être reconstruite d'aider à améliorer sa résolution.

Raffinement de la CTF

Comme présenté précédemment, une des premières étapes du pré-traitement des images est d'estimer la CTF. Le programme `Gctf` utilisé, adapte les CTF aux anneaux de Thon visibles des spectres de puissance des micrographes.

Dans RELION-3, un nouveau programme a été ajouté, il permet d'affiner les paramètres de la CTF. Plus particulièrement, il a pour but de ré-estimer la défocalisation et l'astigmatisme en utilisant une structure 3D de référence (Zivanov et al., 2020, 2019). Une référence étant nécessaire, cette étape est réalisée une fois qu'une reconstruction 3D a pu être obtenue, c'est-à-dire à la fin du processus d'analyse d'images.

Le fait d'utiliser une référence permet d'exploiter à la fois les phases et les amplitudes des images expérimentales, au lieu de devoir se fier exclusivement à leurs spectres de puissance. Dans cette approche l'estimation des CTF est beaucoup plus fiable en raison de rapports signal sur bruit plus élevés mais aussi car comme les anneaux de Thon ne sont pas utilisés il n'est plus nécessaire de séparer les anneaux de l'intensité du fond du spectre de puissance. Cette technique permet d'estimer pour chaque particule individuellement, leur valeur de défocalisation.

Bayesian polishing

Cette étape suivante est réalisée afin d'estimer la trajectoire du mouvement des particules ainsi que la quantité de dommages cumulés due au faisceau. Une nouvelle méthode a été implémentée à RELION-3 nommée « Bayesian Polishing » elle est décrite dans (Zivanov et al., 2019). Brièvement, ce programme permet de lisser les mouvements spatiaux et temporels de chacune des particules d'intérêt sans imposer de contrainte. Pour cela la première étape est de modéliser le mouvement au sein de l'échantillon à l'aide d'un processus de régression gaussien. En pratique, le programme est lancé une première fois en mode « entraînement ». Lors de cette étape, le programme sélectionne aléatoirement plusieurs ensembles de particules sur quelques micrographes. Il estime ensuite, sur chaque ensemble de particule, une probabilité préalable de lissage de la trajectoire des particules. Ce terme nécessite trois paramètres qui décrivent les statistiques du mouvement observé. Une fois ces estimations obtenues, le programme est à nouveau exécuté afin d'ajuster les trajectoires des mouvements de toutes les particules dans l'ensemble du jeu de données. L'algorithme permet aussi d'estimer la quantité moyenne de dommages causés par les rayonnements cumulés en fonction de la dose de rayonnement et de la fréquence spatiale.

h. Interprétation des cartes de densité électronique : construction des modèles atomiques

Une fois les reconstructions 3D raffinées et post-traitées, obtenues à des résolutions finales aux alentours de 3 Å, les modèles atomiques peuvent ensuite être générés. Pour cela, des structures PDB déjà existantes ont été utilisées. Les reconstructions 3D appelées aussi cartes de densité électronique sont visualisées dans le logiciel Chimera (Pettersen et al., 2004). La

première étape consiste à ajuster par Rigid Body Docking la structure de référence dans la carte, grâce à la fonction « fit in map » de Chimera. Le modèle PDB ainsi ajusté dans la carte est ensuite réarrangé pour s'intégrer au mieux dans la carte de densité électronique. Pour cela chaque acide aminé de chaque protéine, et chaque nucléotide de chaque ARN est vérifié dans le logiciel Coot (Emsley et al., 2010).

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

I. Analyses fonctionnelles des particules pré-40S cytoplasmiques tardives humaines

1. Contexte et objectifs de l'article

Ce premier projet avait pour but de caractériser les dernières étapes cytoplasmiques de la maturation des particules pré-40S humaines. Pour cela nous avons utilisé une approche structure/fonction. En effet, après purification de particules pré-40S tardives, celles-ci ont pu être caractérisées d'un point de vue structural puis fonctionnel afin de comprendre les étapes de maturation finales de la pré-40S.

Les particules pré-40S ont été purifiées à partir de cellules humaines grâce à une méthode mise au point par l'équipe d'Ulrike Kutay, ETH Zürich (Wyler et al., 2011) avec laquelle nous collaborons. La méthode de purification d'affinité consiste à utiliser une lignée cellulaire exprimant un facteur de maturation étiqueté. Puis, après surexpression, ce facteur est utilisé comme appât afin de purifier les pré-40S qui lui sont associées. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes servis du mutant catalytiquement inactif de l'ATPase RIO1 comme appât de purification. Les particules ainsi purifiées sont nommées pré-40S RIO1(kd)-StHA. Ce facteur de maturation est connu pour être impliqué pour les dernières étapes de la maturation des pré-40S. En effet, les équipes d'Ulrike Kutay et de Sébastien Ferreira-Cerca ont pu montrer, dans des cellules humaines et de levure respectivement, que l'activité catalytique de RIO1 est nécessaire à la maturation du pré-ARNr 18S-E /20S ainsi qu'au relargage des derniers facteurs de maturation présent sur la sous-unité, à savoir NOB1, DIM2 et lui-même (Ferreira-Cerca et al., 2014; Widmann et al., 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires précis qui sous-tendent ces dernières étapes de maturation restaient à définir.

Au début de ma thèse, des analyses fonctionnelles ont permis de décrire la chronologie d'association/dissociation des facteurs de maturation dans le cytoplasme. La maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique peut être divisée en trois grandes étapes : précoce, intermédiaire et tardive (Voir **Figure 14** Introduction partie II.3.). Ces étapes de maturation correspondent à la maturation du corps par l'incorporation des dernières protéines ribosomiques, puis la formation du bec et de la plateforme de la sous-unité grâce à la dissociation d'un grand nombre de facteurs de maturation. Ensuite, les étapes tardives correspondent à l'association du facteur RIO1 et de la dernière protéine ribosomique RPS26 sur les pré-40S ainsi qu'à la maturation du pré-ARNr 18S-E par NOB1. Enfin la dissociation des derniers facteurs de maturation DIM2, NOB1 et RIO1 doit avoir lieu pour obtenir des sous-unités 40S matures.

D'un point de vue structural, seules les structures des particules pré-40S cytoplasmiques précoces et intermédiaires chez l'humain étaient disponibles (Ameismeier et al., 2018) (**Figure 46**). En effet, dans cette étude les auteurs ont utilisé le facteur de maturation DIM2 comme appât de purification, qui leur a permis de cibler les pré-40S cytoplasmiques avant la maturation du pré-ARNr 18S-E par NOB1. Cependant, l'utilisation de ce facteur comme appât n'a pas permis aux auteurs d'observer de particules pré-40S tardives. Afin d'obtenir ces particules pré-40S tardives, ils ont décidé de les reconstituer *in vitro*. Pour cela ils ont incubé, ensemble, des sous-unité 40S matures avec les facteurs de maturation DIM2, RIO1 et NOB1 surexprimés. La reconstitution de ces particules pré-40S tardives leur a servi à positionner le facteur de maturation NOB1 et à distinguer une partie de RIO1 sur les particules mais sans réussir à le positionner entièrement. Ces données structurales ont confirmé le positionnement des facteurs de maturation cytoplasmiques déjà connu chez la levure, mis à part RIO1 pour lequel le positionnement reste flou. Cette étude structurale menée en 2018 n'a cependant pas permis de comprendre l'implication ainsi que la chronologie d'action des différents constituants s'associant tardivement à la pré-40S dans ces dernières étapes de maturation (Ameismeier et al., 2018).

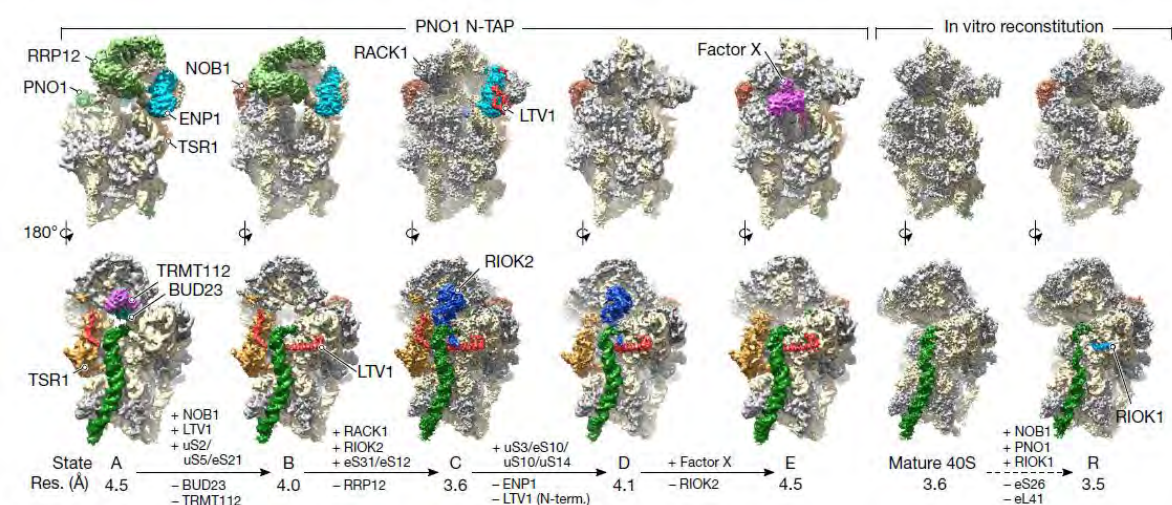


Figure 46 : Structure des particules pré-40S humaines à différentes étapes de maturation. Les états A à E correspondent à des particules pré-40S natives purifiées avec l'appât DIM2 (PNO1). L'état R est une reconstitution de pré-40S tardives à partir de la 40S mature et des facteurs de maturation indiqués surexprimés. Les protéines ribosomiques sont représentées en gris, l'ARNr en beige, avec l'hélice 44 en vert sur les vues de l'interface (panel du bas). Les différents facteurs de maturations sont indiqués par plusieurs couleurs. (Adapté d'Ameismeier et al., 2018)

Il était donc nécessaire de déterminer, la structure de particules pré-40S tardives grâce à l'utilisation du facteur de maturation RIO1(kd). Cette étude structurale par cryo-EM a été menée par Ramtin Shayan durant sa thèse et a permis la résolution de deux états structuraux de ces pré-40S tardives.

Par la suite, je me suis basée sur ces structures pour pouvoir ensuite caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes finales de la maturation de la petite sous-unité 40S par des analyses fonctionnelles. Ces analyses fonctionnelles regroupent notamment, l'étude du rôle de RPS26 par des études de perte de fonction (siRPS26) associés à des analyses du précurseur 18S-E de l'ARNr 18S par des digestions à la RNase H, ainsi que des analyses de clivages *in vitro*, qui m'ont permis, en les combinant aux structures des pré-40S tardives, de mettre en évidence le rôle conjoint de RPS26 et RIO1 dans les dernières étapes de la maturation de la pré-40S.

L'ensemble de ces données a donné lieu à la publication d'un article dans le journal eLife (Plassart, Shayan, et al. eLife 2021 ; 10 : e61254. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.61254>).

2. Article: The final step of 40S ribosomal subunit maturation is controlled by a dual key lock

The final step of 40S ribosomal subunit maturation is controlled by a dual key lock

Laura Plassart^{1†}, Ramtin Shayan^{1†§}, Christian Montellese^{2#}, Dana Rinaldi¹, Natacha Larburu^{1†}, Carole Pichereaux³, Carine Froment³, Simon Lebaron¹, Marie-Françoise O'Donohue¹, Ulrike Kutay², Julien Marcoux³, Pierre-Emmanuel Gleizes^{1†*}, Celia Plisson-Chastang^{1†*}

¹Molecular, Cellular and Developmental Biology department (MCD), Centre de Biologie Integrative (CBI), University of Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France;

²Institut für Biochemie, ETH Zürich, Zurich, Switzerland; ³Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

*For correspondence:

pierre-emmanuel.gleizes@univ-tlse3.fr (P-EG);

celia.plisson-chastang@univ-tlse3.fr (CP-C)

[†]These authors contributed equally to this work

[‡]These authors also contributed equally to this work

Present address: [§]Institute of Structural and Molecular Biology, Birkbeck, University of London, London, United Kingdom; [#]CSL Behring, CSL Biologics Research Center, Bern, Switzerland;

[¶]Department of Life Sciences, Imperial College London, London, United Kingdom

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

Funding: See page 20

Received: 20 July 2020

Accepted: 19 April 2021

Published: 28 April 2021

Reviewing editor: Alan G Hinnebusch, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, United States

© Copyright Plassart et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Preventing premature interaction of pre-ribosomes with the translation apparatus is essential for translational accuracy. Hence, the final maturation step releasing functional 40S ribosomal subunits, namely processing of the 18S ribosomal RNA 3' end, is safeguarded by the protein DIM2, which both interacts with the endoribonuclease NOB1 and masks the rRNA cleavage site. To elucidate the control mechanism that unlocks NOB1 activity, we performed cryo-electron microscopy analysis of late human pre-40S particles purified using a catalytically inactive form of the ATPase RIO1. These structures, together with in vivo and in vitro functional analyses, support a model in which ATP-loaded RIO1 cooperates with ribosomal protein RPS26/eS26 to displace DIM2 from the 18S rRNA 3' end, thereby triggering final cleavage by NOB1; release of ADP then leads to RIO1 dissociation from the 40S subunit. This dual key lock mechanism requiring RIO1 and RPS26 guarantees the precise timing of pre-40S particle conversion into translation-competent ribosomal subunits.

Introduction

Synthesis of eukaryotic ribosomes relies on a large array of ribosome biogenesis factors (RBFs) that coordinate the multiple steps of pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) modification, cleavage, and folding, together with ribosomal protein (RP) assembly (*Bohnsack and Bohnsack, 2019*). Progression through this process, defined by the timely association or dissociation of RBFs and RPs to pre-ribosomal particles and the gradual maturation of pre-rRNAs, is tightly monitored from one stage to the next. These monitoring mechanisms not only ensure quality control along this intricate biosynthetic pathway, but also prevent binding of immature ribosomal subunit precursors (pre-ribosomes) to mRNAs or to components of the translation apparatus. Such interactions would not only interfere with ribosome biogenesis, but also affect translation accuracy. The recent discovery of congenital diseases or cancers linked to ribosome biogenesis defects and translation dysregulation underscores the importance of the control mechanisms that license newly formed ribosomal subunits to enter the translation-competent pool of ribosomes (*Aubert et al., 2018; Bohnsack and Bohnsack, 2019; Sulima et al., 2017*).

After initial assembly in the nucleolus, pre-40S particles are rapidly transported to the cytoplasm (*Rouquette et al., 2005*), where translation takes place. Cytoplasmic precursors to the 40S ribosomal subunits (pre-40S particles) closely resemble their mature counterparts (*Ameismeier et al., 2018; Larburu et al., 2016*), which possess binding sites for numerous components of the

translation machinery including factors of the translation initiation complex, tRNAs and mRNAs. Thus, pre-40S particles would be especially prone to premature interactions with the translation apparatus without the presence of several RBFs (Bystin/ENP1, LTV1, RIO2, TSR1, DIM2/PNO1, NOB1), which occupy the binding sites of translation partners near their 'head' and 'platform' domains (Larburu *et al.*, 2016; Strunk *et al.*, 2012). These two structural domains undergo several remodeling steps in the cytoplasm leading to the gradual release of these RBFs (Ameismeier *et al.*, 2018; Zemp *et al.*, 2014; Zemp *et al.*, 2009). This maturation process ends with the cleavage of the 18S rRNA 3' end and the dissociation of the last RBFs, DIM2, and NOB1, which converts pre-40S particles into functional subunits. Interfering with this late stage can result in the incorporation of immature 40S subunits in the translation pool (Belhabich-Baumas *et al.*, 2017; Parker *et al.*, 2019).

Up to this final stage, the 3' end of the 18S rRNA is extended with remnants of the internal transcribed spacer 1 (ITS1). In human cells, this last precursor to the 18S rRNA (called 18S-E pre-rRNA) is generated in the nucleolus by endonucleolytic cleavage of earlier pre-rRNAs 78 or 81 nucleotides downstream of the mature 3' end (Preti *et al.*, 2013; Sloan *et al.*, 2013; Tafforeau *et al.*, 2013). This 3' tail is then gradually trimmed by exonucleases before and after nuclear export, including PARN in the nucleus (Montellese *et al.*, 2017). However, processing of the 18S rRNA 3' end is finalized by endonuclease NOB1, which cleaves at the so-called site 3. NOB1 is already incorporated into the pre-40S particle in the nucleolus on the platform domain near site 3, but it is restricted from cleaving the rRNA by DIM2, another RBF, which contacts NOB1 in the particle and masks the cleavage site on the RNA (Ameismeier *et al.*, 2018; Larburu *et al.*, 2016). This conformation also maintains a large gap between the catalytic site of NOB1 and its substrate. Dissociation of NOB1 and DIM2 from the pre-40S particles only occurs at the final processing stage, which produces mature 18S rRNA. In addition, NOB1 occupies the mRNA binding cleft and prevents the association of pre-40S particles with mRNAs until this ultimate maturation step (Parker *et al.*, 2019). Thus, NOB1 and DIM2 constitute a critical checkpoint controlling the release of nascent 40S subunits into the translating pool.

The RIO1 ATPase was shown to play a critical function in the last maturation step of the 18S rRNA (Widmann *et al.*, 2012), but the molecular mechanism driving the accurate activation of rRNA cleavage by NOB1 remains poorly known. RIO1 associates with pre-40S particles briefly before the final cleavage step. Like RIO2, another ATPase of the same family that intervenes earlier in pre-40S particle maturation, RIO1 adopts different conformations depending on its nucleotide binding state (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). The absence of RIO1 or suppression of its catalytic activity impairs both rRNA cleavage and release of NOB1 and DIM2 in yeast and human cells (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014; Turowski *et al.*, 2014; Widmann *et al.*, 2012), suggesting that RIO1 association to pre-40S particles as well as its ATPase activity are both required to yield functional small ribosomal subunits.

Ribosomal protein RPS26/eS26, which is in close contact with the 18S rRNA 3' end on the mature small ribosomal subunit, was also shown to be necessary for efficient cleavage by NOB1 in yeast and in human cells (O'Donohue *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2016; Schütz *et al.*, 2018), but its interplay with RIO1, DIM2, and NOB1 remains unclear. Indeed, the precise timing of association of this ribosomal protein to pre-ribosomal particles is a matter of debate. Studies performed in yeast cells suggested that Rps26 is imported into the nucleus and is dissociated from its importin by the RBF Tsr2 in a non-canonical way (Schütz *et al.*, 2014). Tsr2 was proposed to then chaperone the incorporation of Rps26 into nucleolar pre-ribosomal particles (Peña *et al.*, 2016; Schütz *et al.*, 2018). However, RPS26 has not been found so far in cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of nucleolar small ribosomal subunit precursors in yeast or human, and was only detected in late cytoplasmic ones (Ameismeier *et al.*, 2020; Ameismeier *et al.*, 2018). Consistently, western blot and proteomics analysis failed to clearly identify RPS26 in nuclear or in early cytoplasmic human pre-40S particles (Larburu *et al.*, 2016; Wyler *et al.*, 2011). One cannot exclude that association of RPS26 to nuclear precursors might be highly labile and becomes more stable only during later maturation steps, but evidence is still lacking to date for the presence of human RPS26 in early precursors.

Here, we have used cryo-EM to solve the structures of human pre-40S particles trapped with a catalytically inactive form of RIO1 in this final maturation stage. Image analysis revealed two distinct structural states, prior and after 18S rRNA cleavage. In the pre-cleavage state, DIM2 and NOB1 are still in place, while the position of RIO1 is not clearly defined and RPS26 is absent. In contrast, the post-cleavage state displays RIO1 and RPS26 stably associated with 40S particles, which contain mature 18S rRNA. In vivo assays confirmed the central role of RPS26 for triggering both processing

of the 18S-E pre-rRNA and the release of DIM2, NOB1, and RIO1. In vitro, cleavage of the 18S-E pre-rRNA was partially stimulated by ATP binding to RIO1 in RPS26-depleted pre-40S particles and was enhanced by adding back purified RPS26. These data suggest a model in which ATP-bound RIO1 and RPS26 cooperatively displace DIM2 to activate the final cleavage of the 18S rRNA 3' end by NOB1.

Results

Pre-40S particles purified with a catalytically deficient form of RIO1 display pre- and post-18S rRNA processing structural states

In order to characterize the final cytoplasmic maturation steps undergone by human pre-40S particles, we purified pre-40S particles from a human cell line overexpressing a tagged version of a catalytically inactive form of RIO1 mutated on aspartic acid 324 (D324A) (Widmann et al., 2012). Autophosphorylation of this mutant in the presence of ATP was previously shown to be strongly impaired (Widmann et al., 2012), and free Pi release activity reduced by at least 50% in its *Chaetomium thermophilum* D281A ortholog (Ferreira-Cerca et al., 2014). Protein and RNA composition of the affinity-purified complexes, hereafter called RIO1(kd)-StHA pre-40S particles, were analyzed using SDS-PAGE, northern blot, and bottom-up proteomics (Figure 1). SDS-PAGE revealed a complex protein pattern with a typical trail of low-molecular-weight bands corresponding to RPs. Northern blot showed that the 18S-E pre-rRNA was the only 18S rRNA precursor precipitated by this bait, while no rRNA of the large ribosomal subunit could be detected (Figure 1—figure supplement 1). Bottom-up proteomics confirmed that the catalytically dead version of RIO1 associates with the methylosome, a complex composed of proteins PRMT5 and MEP50 that methylates proteins involved in gene expression regulation (Guderian et al., 2011), in addition to late pre-40S particles (Montellese et al., 2017; Widmann et al., 2012). Of note, these purified pre-40S particles contain all RPs of the small subunit (RPSs), including the late binding RPS10 and RPS26, but only a handful of ribosome biogenesis factors, namely RIO1 (the bait), DIM2, NOB1, and TSR1 (Figure 1, Figure 1—figure supplement 2). Other proteins also co-purified with RIO1(kd)-StHA: while some can unambiguously be identified as components of the translation apparatus (eIF4A, RPLs, etc.), it is not known whether others belong to the methylosome or to (pre-)ribosomal particles.

We then performed cryo-EM and single-particle analysis on the particles purified using RIO1(kd)-StHA as bait. 2D classification assays performed with RELION (Scheres, 2012) yielded class sums corresponding to pre-40S particles as well as various views of the methylosome (Timm et al., 2018; Figure 2, Figure 2—figure supplement 1). Pre-40S views were selected for further processing; an extensive 3D classification scheme resulted in two distinct 3D structures, hereafter called state A and state B, that likely reflect two successive pre-40S maturation steps (Figure 2, Figure 2—figure supplement 1). Both structures, which represented ~21% (state A) and ~57% (state B) of the pre-40S particles comprised within the analysis, were refined to overall resolutions of 3.2 and 3.0 Å, respectively, according to RELION's gold-standard FSC (Figure 2—figure supplements 1 and 2).

State A harbored an rRNA scaffold closely resembling that of the mature 18S rRNA. On the head region, the three-way junction formed by rRNA helices h34, h35, and h38 is fully formed (Mohan et al., 2014), while RPS3, RPS10, and RPS12 occupy their final position. Like in many other pre-40S structures (Ameismeier et al., 2018; Heuer et al., 2017; Mitterer et al., 2019; Scaiola et al., 2018), the upper part of rRNA h44, located on the intersubunit side, appears detached from the body (Figure 3a). Low-pass filtering of the cryo-EM map of state A also revealed the presence of TSR1 in this region (Figure 3—figure supplement 1). Combined with the bottom-up proteomic analysis that revealed the presence of this RBF among the co-purified proteins, this suggests that TSR1 might still be loosely and/or flexibly bound to pre-40S particles at this maturation state. Of note, the presence of TSR1 in late pre-40S particles and mature 40S subunits was recently observed by others (Thoms et al., 2020), reinforcing the idea that TSR1 could stay associated with small ribosomal subunits until their entry into translation initiation. On the platform region, the cryo-EM density map allowed to unambiguously position nucleotide A1870, belonging to the ITS1 after the 3' end of the mature 18S rRNA. In this state, DIM2 protects this region of the 18S-E pre-rRNA and impedes endonucleolytic cleavage by NOB1, located right next to DIM2 (Figures 2 and 3b). These results suggest that RIO1(kd)-StHA pre-40S particles in structural state A are in an

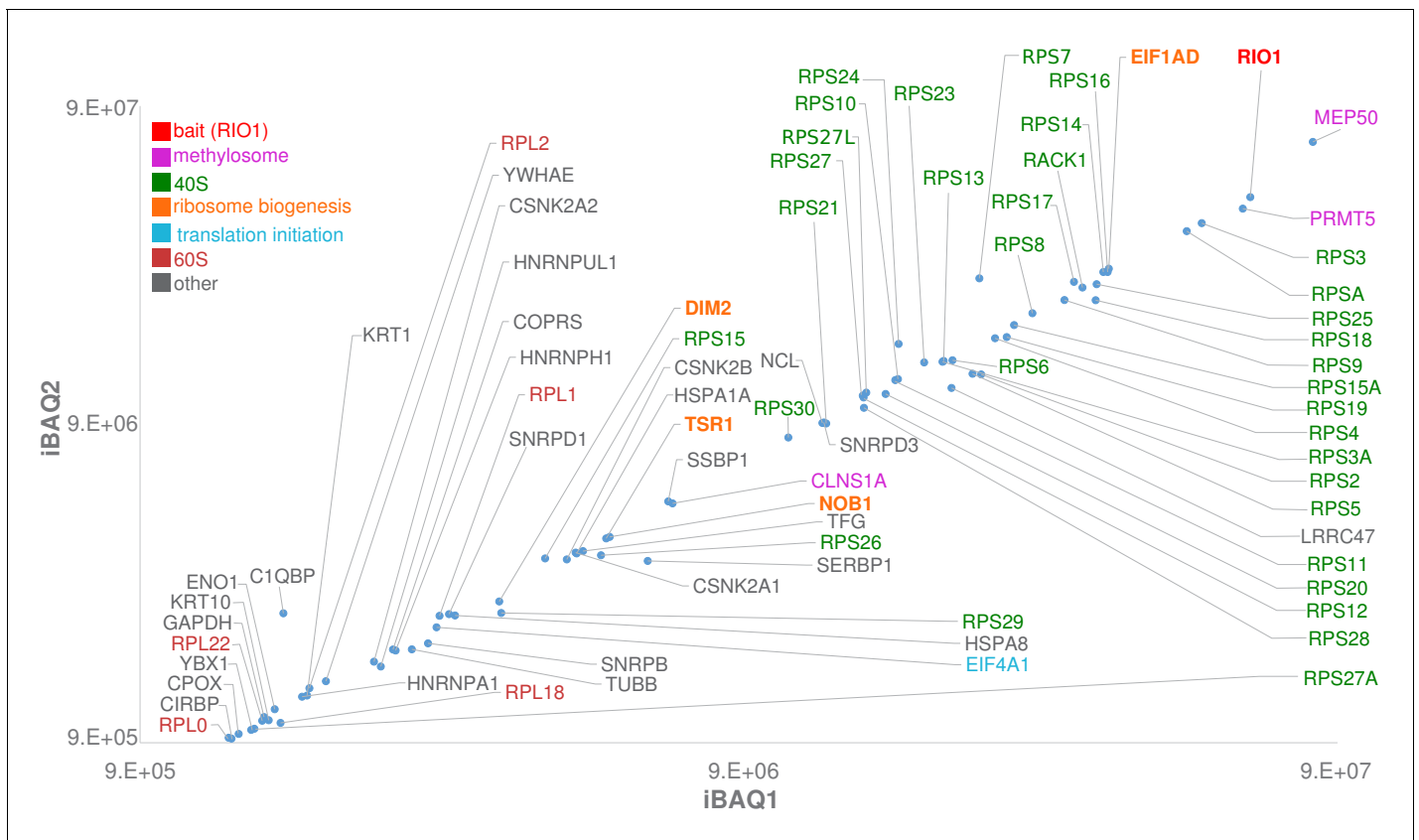


Figure 1. Label-free bottom-up proteomic analysis of RIO1(kd)-StHA co-purified proteins. The most intense proteins (first two logs) with an observed/observable peptide ratio > 30% are displayed and color coded as indicated on the graph. Three independent experimental replicates were performed. This plot represents iBAQs (intensity-based absolute quantification) of experimental replicate 1 (iBAQ1) against experimental replicate 2 (iBAQ2). The iBAQ value is obtained by dividing protein intensities by the number of theoretically observable tryptic peptides (Schwanhäusser et al., 2011). Other plots are displayed in **Figure 1—figure supplement 2**. Of note, USP16, which was recently identified as a key player in both ribosome biogenesis and translation (Montellese et al., 2020), was also identified among RIO1(kd)-StHA proteic partners. It ranked at the 62th position when quantifying proteins based on their normalized abundances and at the 98th position when quantifying proteins based on their iBAQs (see the PRIDE repository [Perez-Riverol et al., 2019]; dataset identifier: PXD019270).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 1:

Figure supplement 1. Purification of RIO1(kd)-StHA-containing particles.

Figure supplement 2. Label-free bottom-up proteomic analyses of RIO1(kd)-StHA co-purified proteins.

immature state in which the rRNA scaffold harbors a quasi-mature conformation, but the remaining nucleotides of the ITS1 have not yet been cleaved off by NOB1. Furthermore, NOB1 and DIM2 are the only two RBFs that can clearly be distinguished, while RIO1(kd)-StHA, the protein used as purification bait, cannot be clearly positioned on this cryo-EM map. This suggests that RIO1(kd)-StHA is not structurally stabilized onto state A pre-40S particles. Indeed, while this manuscript was under revision, a cryo-EM study focusing on similarly late human pre-40S particles revealed that RIO1 can adopt several positions in maturing pre-40S particles (Ameisemeier et al., 2020).

On the contrary, the cryo-EM map corresponding to state B harbored a density located on the intersubunit side, at the back of the head region, into which the X-ray structure of RIO1 could unambiguously be fitted (Ferreira-Cerca et al., 2014). Of note, RIO1 occupies a position strongly overlapping with that of RIO2 in earlier pre-40S maturation states (Ameisemeier et al., 2018; **Figure 3—figure supplement 1**). This observation explains why both ATPases are not found together in pre-40S particles and confirms that RIO1 replaces RIO2 at the back of the head (Ameisemeier et al., 2018; Knüppel et al., 2018; Widmann et al., 2012). The C-terminal domain of RIO2 was shown to be deeply inserted within the body of human pre-40S particles (Ameisemeier et al., 2018). In contrast, the C-terminal domain of RIO1 is not resolved here; furthermore, the upper part of rRNA helix

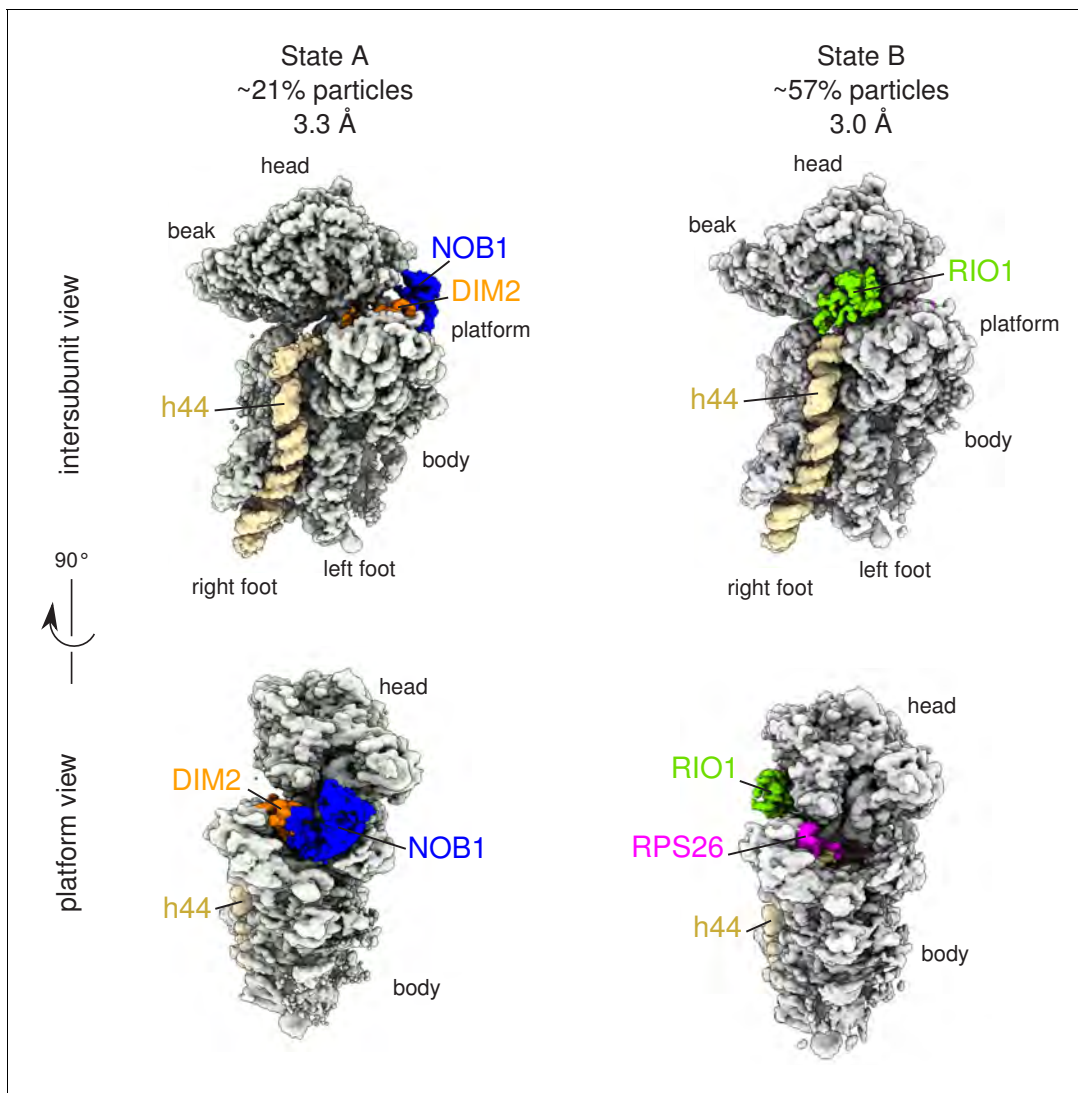


Figure 2. Cryo-EM and single-particle analysis reveal two distinct structural states, pre- (state A) and post- (state B) 18S-E rRNA cleavage. Surface views of cryo-EM maps of RIO1(kd)-StHA pre-40S particles in structural state A (left) and state B (right). Ribosomal proteins, rRNA segments, and RBFs of interest have been segmented and colored as indicated on the figure. Image processing details are shown in **Figure 2—figure supplements 1 and 2**. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. Cryo-EM image processing scheme.

Figure supplement 2. Details of the cryo-EM structures/model validation.

h44 occupies its mature position, which would preclude insertion of the C-terminal domain of RIO1 at the same position as the C-terminal domain of RIO2. Indeed, the strong sequence divergence of the C-termini of RIO proteins suggests that these domains play a major role in the functional specificity of these proteins, which is supported by the structural difference observed here.

As previously observed in the structure of wild-type RIO1 solved by X-ray crystallography (Ferreira-Cerca et al., 2014), our cryo-EM map revealed that the catalytic pocket of mutant RIO1 encloses an ADP together with phospho-aspartate pD341 (Figure 3c, Figure 3—figure supplement 2). Thus, the D324A RIO1 mutation does not fully prevent ATP hydrolysis, but rather blocks the release of its reaction products. ATP hydrolysis is thought to be accompanied by a significant conformational change of RIO1 (Knüppel et al., 2018; Kühlbrandt, 2004), which might be essential for stable association of RIO1 to pre-40S particles. Blocking of RIO1 in this conformation is likely to explain why this point mutation traps the protein on the particles. Furthermore, the RIO1(kd) catalytic pocket appears to be closed through a pi-stacking interaction between phenylalanine F328 and 18S rRNA

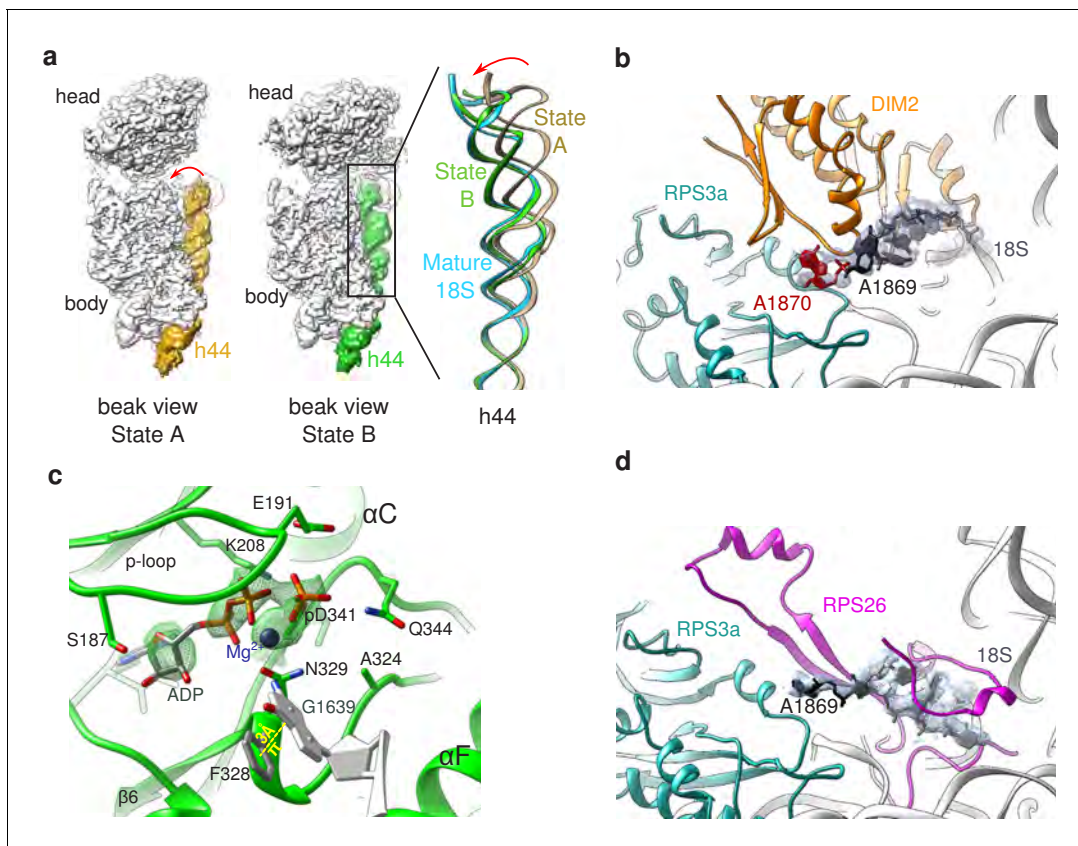


Figure 3. Structural details of RIO(kd)-StHA pre-40S particles. (a) The upper part of 18S rRNA helix h44 is in an immature position in structural state A. The cryo-EM density map corresponding to this helix has been segmented (beige density); the atomic model of rRNA h44 in structural state A is represented in golden; superimposed 18S rRNA h44 as found in structural state B and in the mature 40S subunit (PDB 6EK0 **Natchiar et al., 2018**) are in green and blue, respectively. (b) Close-up on the platform domain of structural state A. Segmented cryo-EM density corresponding to 18S-E pre-rRNA is shown as a grey mesh. The 3'-end of the mature 18S rRNA (nucleotides 1865–1869) is shown in black, while A1870 in the ITS1 is in red. The 18S rRNA is otherwise shown as a gray ribbon. DIM2 is in orange; RPS3a is in turquoise. NOB1 was removed from this representation for the sake of clarity. (c) The catalytic pocket of RIO1 is in an 'active' state within structural state B pre-40S particles, and carries an ADP and a phospho-aspartate (pD341). The cryo-EM density corresponding to ADP, p-Asp, and magnesium is shown as a green mesh. RIO1 is shown in green; ADP in dark gray, Mg²⁺ in dark violet, and 18S rRNA G1639 closing RIO1 catalytic domain by a pi-stacking interaction (yellow dashed line) with RIO1 Phe 328 in light gray. (d) Close-up on the platform domain of structural state B. Segmented cryo-EM density corresponding to 18S rRNA 3'-end is shown as a light gray mesh. 18S rRNA 3'-end (nucleotides 1865–1869) is shown in black, while otherwise as gray ribbon. RPS26 is in magenta and RPS3a in turquoise. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. Details of the structural analysis of hRIO1(kd)-StHA pre-40S particles.

Figure supplement 2. RIO1(kd) carries an hydrolyzed ATP in its catalytic site.

G1639 (**Figure 3c**). This highly conserved nucleotide plays a crucial role in tRNA translocation, which puts RIO1 in a good position to probe this mechanism (see Discussion).

In state B, the rRNA scaffold harbors a fully mature conformation. Contrary to what was observed on the platform in state A, no density corresponding to nucleotides belonging to the ITS1 could be detected, suggesting that the 18S rRNA 3' end is mature. Furthermore, neither NOB1 nor DIM2 could be found in this area; instead, a cryo-EM density sheathing the 18S rRNA 3' end revealed the presence of RPS26 (**Figure 3d**). These observations indicate that state B corresponds to particles after rRNA cleavage by NOB1. This conclusion was further supported by the analysis of the 3'-end of the 18S rRNA by RNase H digestion assays (**Figure 4a**). As expected, early and intermediate cytoplasmic pre-40S particles purified using tagged forms of LTV1 or DIM2 as baits (**Ameismeier et al., 2018; Wyler et al., 2011**) contained a large majority of 18S-E pre-rRNAs. Most of the 18S-E precursors in these particles included 4 to 9 nucleotides of the ITS1 (**Figure 4, Figure 4—figure**

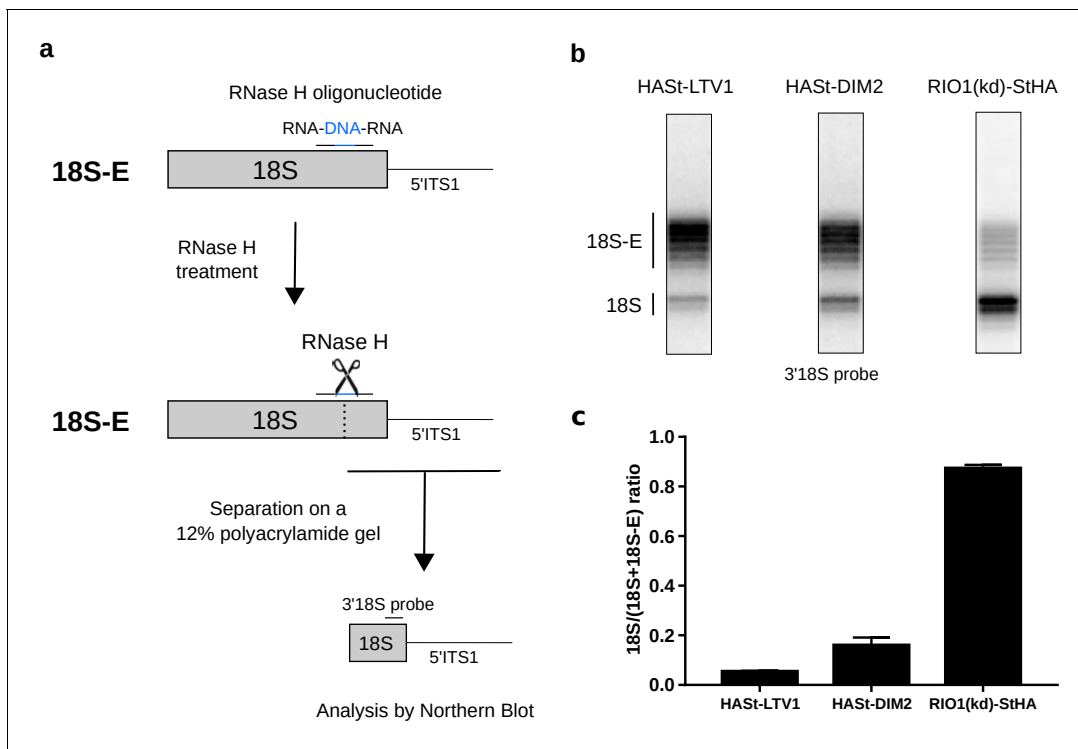


Figure 4. Late RIO1(kd)StHA pre-40S particles contain a high proportion of mature 18S rRNA. (a) Diagram representing steps of the pre-40S rRNA digestion by RNase H. (b) RNase H assays were performed on RNAs extracted from pre-40S particles purified with the mentioned StHA-tagged bait and separated on a 12% polyacrylamide gel. The 18S rRNA and its precursors were revealed by the 3'18S radiolabeled probe. Bands are separated with single nucleotide resolution, as shown in **Figure 4—figure supplement 1**. (c) Signals corresponding to the 18S-E and 18S rRNAs were quantified by phosphorimaging and represented by the 18S/(18S + 18S-E) ratio for the different purified pre-40S particles. The average of three independent experiments is shown, with the standard deviation indicated on top of the histogram.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. Assessment of the size of the ITS1 in purified pre-40S particles.

supplement 1). In stark contrast, this experiment showed that RIO1(kd)-StHA pre-40S particles mostly contained mature 18S rRNA (**Figure 4b,c**).

We conclude that states A and B of the pre-40S particles here isolated with RIO1(kd)-StHA correspond to two very late maturation stages, just before and right after cleavage of the 18S rRNA 3' end. These data indicate that rRNA cleavage and release of NOB1 and DIM2 coincide with the association of RIO1 in a stable conformation within the pre-40S particle and the incorporation of RPS26 in its final location. RIO1 enzymatic activity, and more specifically the release of the ATP hydrolysis products, seems required for its own dissociation from the particle rather than for the 18S-E pre-rRNA processing by NOB1.

RPS26 is required for efficient rRNA cleavage and release of NOB1 and DIM2

States A and B of the RIO1(kd)-StHA pre-40S particles harbor two distinct conformations of the platform domain: in state A, the 18S-E pre-rRNA 3'-end is protected by DIM2, which prevents endonucleolytic cleavage by NOB1; in state B, the platform displays a mature conformation, with RPS26 replacing DIM2. Both RPS26 and RIO1 were shown to be necessary for processing of the 18S-E pre-rRNA to occur in human cells (O'Donohue *et al.*, 2010; Widmann *et al.*, 2012), which argues for the two proteins being involved in transition from state A to state B. Accommodation of RPS26 in its mature position requires prior release of DIM2, which occupies the binding site of RPS26.

In order to assess the role of RPS26 binding to pre-40S particles in 18S rRNA maturation as well as DIM2 and NOB1 release, we analyzed the RNA and protein composition of intermediate and late

pre-40S particles purified from cells depleted of RPS26 using a specific siRNA (siRPS26). The level of 18S-E pre-rRNA cleavage in pre-40S particles was measured by RNase H analysis in pre-40S particles isolated using different baits (RIO1(kd)-StHA or RIO1(wt)-StHA, HAST-LTV1) (**Figure 5a,b**). The amount of 18S-E pre-rRNA within early cytoplasmic pre-40S particles purified with HAST-LTV1 remained unchanged upon RPS26 depletion (**Figure 5a**), consistent with the absence of RPS26 in these particles (**Ameismeier et al., 2018; Larburu et al., 2016; Wyler et al., 2011**). In contrast, we observed a strong defect of 18S-E pre-rRNA processing in RIO1(kd)-StHA particles upon knockdown of RPS26, as evidenced by a ~60% decrease of the 18S/(18S + 18S-E) ratio when compared to the same particles isolated from cells treated with scramble siRNA. Similar observations were obtained when purifying pre-40S particles with a wild-type version of RIO1 as bait (RIO1(wt)-StHA pre-40S particles). These experiments indicate that the absence of RPS26 impedes 18S-E pre-rRNA maturation and that the action of RPS26 in 18S-E pre-rRNA cleavage takes place within RIO1-containing late cytoplasmic pre-40S particles.

We then used western blot analyses to monitor how RPS26 depletion influences the release of NOB1 and DIM2 (**Figure 5c**). As expected from previous studies (**Larburu et al., 2016; Wyler et al., 2011**), we did not detect RPS26 in early cytoplasmic HAST-LTV1 pre-40S particles. Consistently, knockdown of RPS26 did not influence the presence of NOB1 and DIM2 in these early cytoplasmic pre-40S particles, as attested by measuring the NOB1/RPS19 or DIM2/RPS19 ratios (**Figure 5d**), nor did it affect the dissociation of ENP1 and RIO2. In contrast, we observed a strong increase of NOB1 and DIM2 levels relative to RPS19 in RIO1(kd)-StHA pre-40S particles purified from RPS26-depleted cells when compared to control cells (**Figure 5c,d**), which suggests that the absence of RPS26 prevents the release of NOB1 and DIM2 and traps the particles in state A. This hypothesis was further supported when we analyzed pre-40S particles purified using wild-type RIO1 as bait (RIO1(wt)-StHA). We have previously shown that RIO1(wt)-StHA does not co-purify efficiently with pre-40S particles when compared to the catalytically inactive version of RIO1 (**Montellese et al., 2020; Widmann et al., 2012**), which was confirmed here by the very low amount of both pre-40S RBFs and RPS19 detected by western blot (**Figure 5c**). However, upon RPS26 depletion, RIO1(wt)-StHA co-purified with late cytoplasmic pre-40S particles, as attested by the presence of NOB1 and DIM2 (**Figure 5c**), as well as that of 18S-E pre-rRNA (**Figure 5a**). These data indicate that RIO1 association with late cytoplasmic pre-40S particles is stabilized in the absence of RPS26, while the release of NOB1 and DIM2 is inhibited.

Comparative proteomics analyses of RIO1(kd)-StHA-associated pre-40S particles in the absence or presence of RPS26 confirmed that no other RPS was lost upon RPS26 depletion (**Figure 5—figure supplement 1**). This experiment also revealed a significant decrease of EIF1AD co-purification with RIO1(kd)-StHA upon RPS26 depletion (\log_2 (fold change) = -2.1, corresponding to a 4.2-fold decrease; p -value=8.9E-3). EIF1AD was recently shown to be a new RBF present in late pre-40S particles in direct contact with RIO1 (**Ameismeier et al., 2020**). But whether RPS26 depletion affects EIF1AD association to RIO1 within or out of pre-40S particles cannot be distinguished by this experiment. To assess incorporation of EIF1AD in RIO1(kd)-StHA pre-40S particles, we evaluated the ratio of EIF1AD relative to RPS19 within pre-40S particles by western blot and observed a mild 1.3-fold reduction upon RPS26 depletion (**Figure 5—figure supplement 2**). As a comparison, the levels of NOB1 or DIM2 relative to RPS19 increased by a factor of 1.6 and 2, respectively (**Figure 5c,d, Figure 5—figure supplement 2**). These results indicate that loss of RPS26 does not strongly impact the presence of EIF1AD onto RIO1(kd)-StHA pre-40S particles. The stronger decrease observed by mass spectrometry may be also related to EIF1AD association with RIO1(kd)-StHA out of the pre-40S particles and be an indirect effect of RPS26 depletion. Altogether, these data lead us to conclude that RPS26 intervenes directly in the mechanism triggering rRNA cleavage by NOB1 at site 3 and dissociation of NOB1, DIM2, and RIO1 from pre-40S particles.

ATP binding by RIO1 and addition of RPS26 stimulate in vitro rRNA cleavage by NOB1 in RPS26-depleted pre-40S particles

RIO protein kinases have been proposed to act as conformation-sensing ATPases rather than kinases (**Ferreira-Cerca et al., 2014**). Previous studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have shown that rRNA cleavage by Nob1 in cytoplasmic pre-40S particles purified with tagged Rio1 was stimulated in vitro by ATP binding to Rio1 (**Turowski et al., 2014**). The D324A point mutation introduced in RIO1(kd)-StHA does not hamper fixation of ATP (**Widmann et al., 2012**), but the structure of

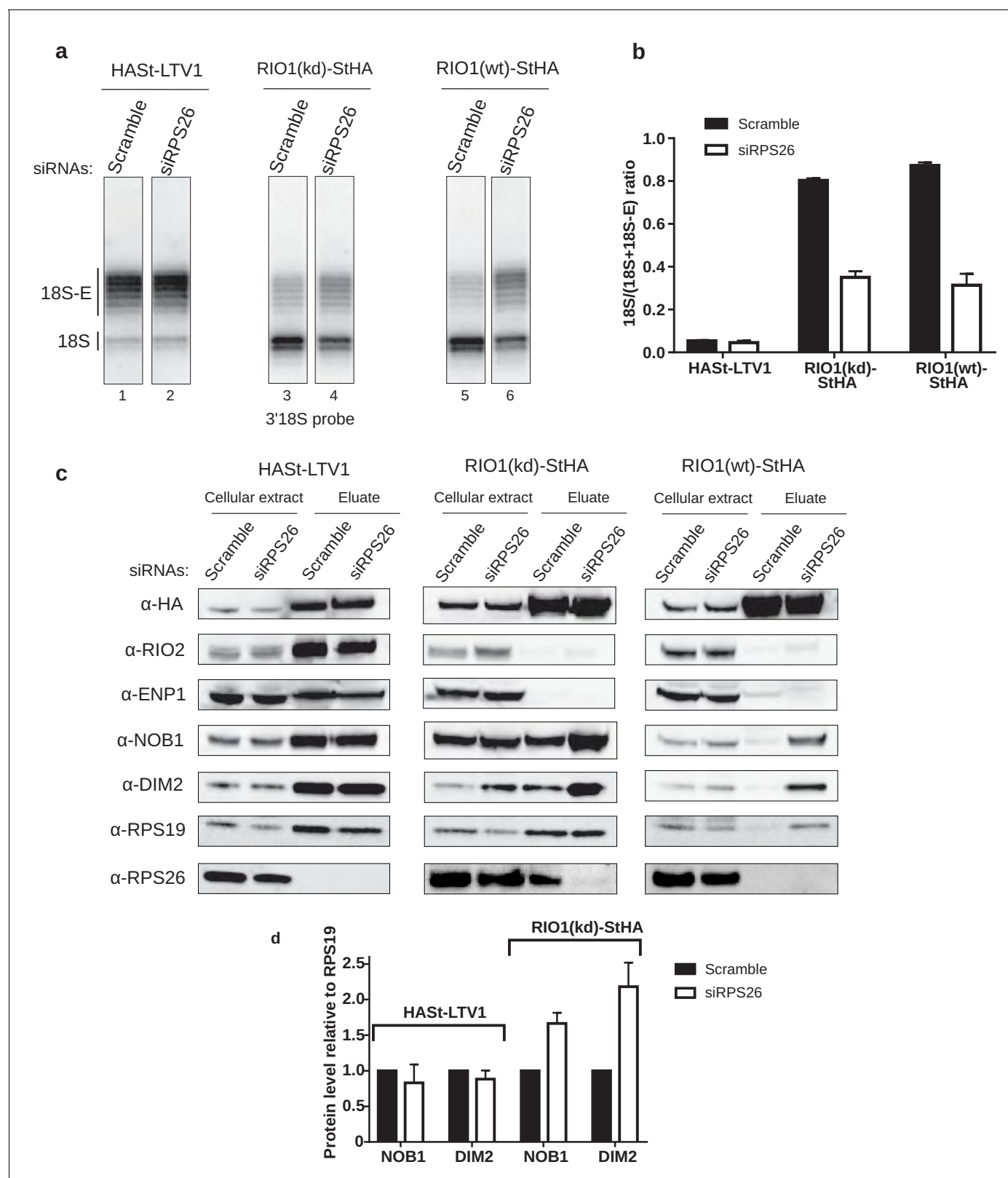


Figure 5. RPS26 is required for rRNA cleavage at site 3 as well as NOB1 and DIM2 release. HEK cell lines expressing tagged version of LTV1, the catalytically inactive RIO1-D324A (RIO1 (kd)) or wild-type RIO1 (RIO1(wt)) were treated with scramble or RPS26 siRNAs for 48 hr. (a) RNase H assays were conducted as in **Figure 4** on rRNAs of pre-40S particles purified with the mentioned StHA-tagged bait, either from RPS26-depleted or from control cells (scramble siRNA). (b) Signals corresponding to the 18S-E and 18S rRNA detected in (a) were quantified and represented as the 18S/(18S + 18S-E) ratio. (c) Western blots showing protein levels of various proteins in cellular extract and eluate. (d) Quantification of protein levels relative to RPS19. Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

ratio for the different pre-40S particles. Error bars, s.d. (n = 3) (c) Cell extracts and purified particles were analyzed by western blot using the indicated antibodies. (d) Bands corresponding to DIM2 and NOB1 (in the eluates) were quantified, corrected for pre-40S particle loading (using RPS19) and normalized to the control condition (set to 1). Error bars, s.d. (n = 3).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 5:

Figure supplement 1. Comparative proteomics of RIO1(kd)-StHA particles composition upon RPS26 depletion.

Figure supplement 2. Western blot analysis of EIF1AD association to pre-40S particles upon depletion of RPS26.

RIO1(kd) in state B shows that the hydrolysis products are trapped in the catalytic site (**Figure 3c**). However, this defective catalytic activity does not block maturation of the 3'-end of 18S rRNA within RIO1(kd)-StHA pre-40S particles. This suggests that ATP binding to the human RIO1 catalytic site is sufficient for 18S-E pre-rRNA cleavage, similar to what was shown in yeast. In order to check whether ATP binding to RIO1 favors rRNA cleavage by NOB1, we purified RIO1(wt)-StHA and RIO1(kd)-StHA human pre-40S particles from RPS26 depleted cells to enrich pre-cleavage state A and performed in vitro cleavage assays.

Based on the conditions established in yeast (**Lebaron et al., 2012**), we added either ATP or AMP-PNP (a non-hydrolysable analog of ATP) to purified pre-40S particles and monitored 18S rRNA 3'-end maturation using RNase H digestion. As shown in **Figure 6**, 18S-E pre-rRNA cleavage was stimulated both by ATP and AMP-PNP in particles purified with RIO1(wt)-StHA or with RIO1(kd)-StHA, albeit a bit more efficiently by ATP as previously observed in yeast (**Figure 6a,b**). This result reinforces the idea that, like in yeast, ATP binding to RIO1 stimulates 18S-E cleavage at site 3 (**Ferreira-Cerca et al., 2014; Turowski et al., 2014**). Given the position of RIO1 in the vicinity of DIM2 and NOB1 revealed by the cryo-EM analysis, RIO1 might favor DIM2 displacement and subsequent activity of NOB1 through an ATP-driven local conformational change. Indeed, superimposition of state A and state B atomic models showed steric hindrance between the C-terminal regions of DIM2 and RIO1 (**Figure 6—figure supplement 1**); similarly, putative clashes between RIO1 and DIM2 were also seen by others (**Ameismeier et al., 2020**). These structural observations support a mechanism of competition between RIO1 and DIM2.

We next sought to assess the role of RPS26 and produced recombinant human RPS26 (**Figure 6—figure supplement 2**). Addition of RPS26 to the pre-40S particles depleted of RPS26 stimulated cleavage by NOB1 to the same extent as addition of ATP (**Figure 6a,c**). Importantly, the addition of RPS26 together with ATP significantly increased the fraction of cleaved 18S rRNA when compared to single addition of one or the other (**Figure 6a,c**). These data show that in vitro cleavage by NOB1 in pre-40S particles is stimulated by both RIO1 and RPS26 and support the hypothesis of a cooperative action of RPS26 and RIO1 in triggering the final step of 18S rRNA maturation.

Discussion

A previous cryo-EM analysis of human pre-40S particles purified using DIM2 as bait revealed several successive structural states, in which the latest one carried NOB1, DIM2, TSR1, as well as a long alpha-helix attributed to LTV1 (**Ameismeier et al., 2018**). Here, by purification of a pre-40S particle via a catalytically inactive form of RIO1, we have uncovered two later structural states in which only the last RBFs found in pre-40S particles, namely NOB1, DIM2, and RIO1, were clearly detected. In addition, one of these states is posterior to 18S-E pre-rRNA cleavage at site 3, as indicated by detection of the mature 3' end of the 18S rRNA, presence of RPS26, and absence of NOB1 and DIM2. These structures arguably correspond to the ultimate maturation stages of the pre-40S particles. Our results point towards a coordinated action of RIO1 and RPS26 in triggering the last 18S rRNA processing step by NOB1, following a sequence represented in **Figure 7** and discussed below.

The cooperative action of RIO1 and RPS26 unlocks 18S-E rRNA cleavage

Our results show that RIO1 binds to pre-40S particles in the same region as RIO2, which suggests that recruitment of RIO1 may simply follow the release of RIO2. The absence of a clear density for

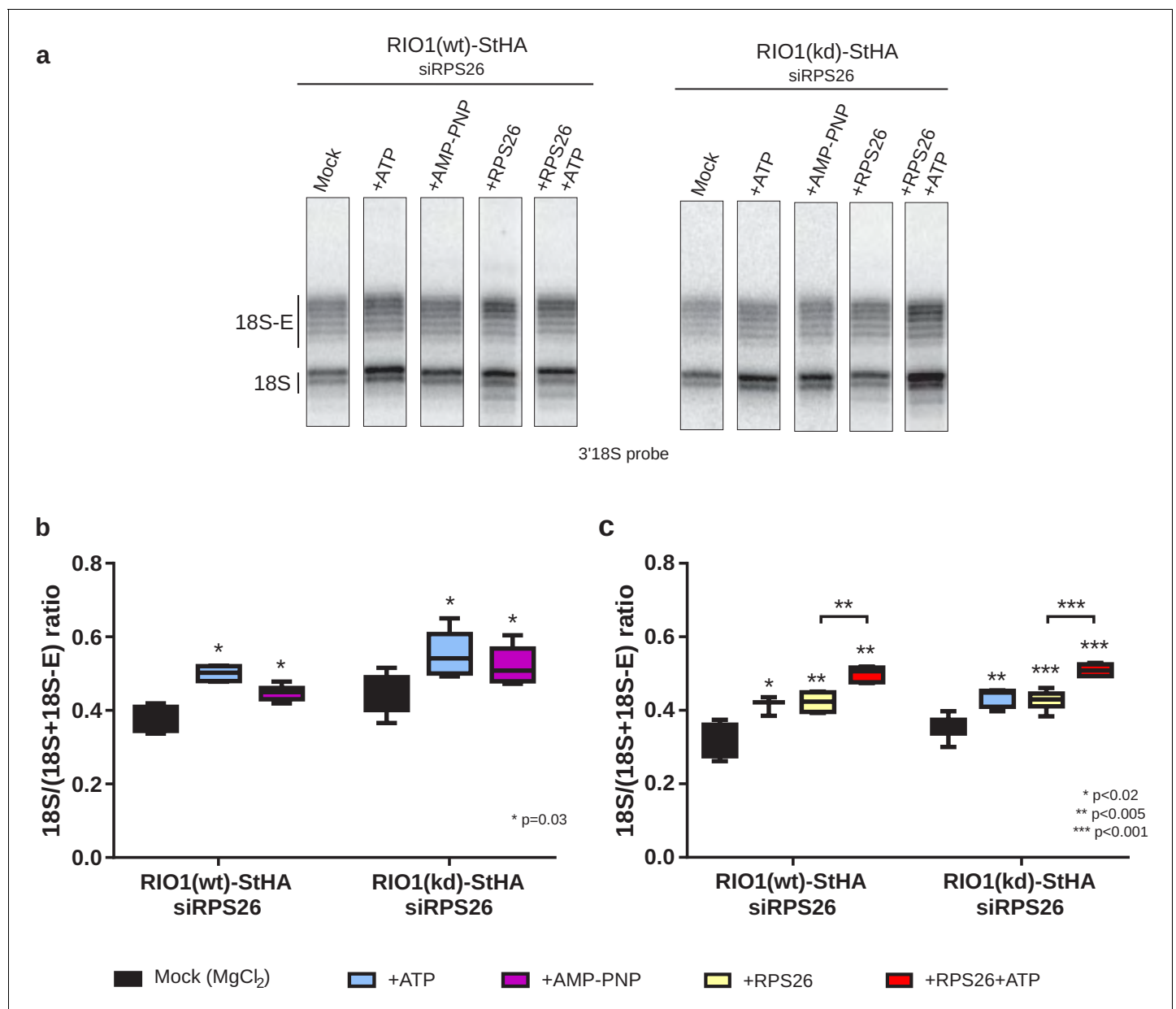


Figure 6. In vitro cleavage of the 18S-E pre-rRNA within pre-40S particles is stimulated by ATP addition. HEK cell lines expressing tagged versions of wild-type RIO1 'RIO1(wt)' or of the catalytically inactive 'RIO1(kd)' were treated with RPS26 siRNAs for 48 hr to enrich particles in state A. Pre-40S particles were purified and incubated for 1 hr in buffer alone (mock condition) or in the presence of either 1 mM ATP, 1 mM AMP-PNP, 2 μ g of RPS26, or 2 μ g of RPS26 plus 1 mM ATP. (a) RNAse H assays were performed on the RNAs extracted from the particles. (b) The variation of cleavage efficiency upon addition of ATP or AMP-PNP is indicated by the 18S/(18S + 18S-E) ratio. The data correspond to five independent experiments. Statistical analysis was performed with a unilateral paired Wilcoxon test ('sample greater than mock') indicating p-values of 0.031 for all samples. (c) The variation of cleavage efficiency upon addition of ATP and/or RPS26 is indicated by the 18S/(18S + 18S-E) ratio. The data correspond to three to six independent measurements for each point. Statistical analysis was performed with a unilateral unpaired Wilcoxon test ('sample greater than mock' or '+RPS26+ATP greater than +RPS26').

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 6:

Figure supplement 1. Superimposition of atomic models of states A and B reveals overlapping distances (gray lines) between atoms of Proline 351 from RIO1 (green) and of Arginine 247 from DIM2 (orange).

Figure supplement 2. Purification of recombinant hRPS26-His.

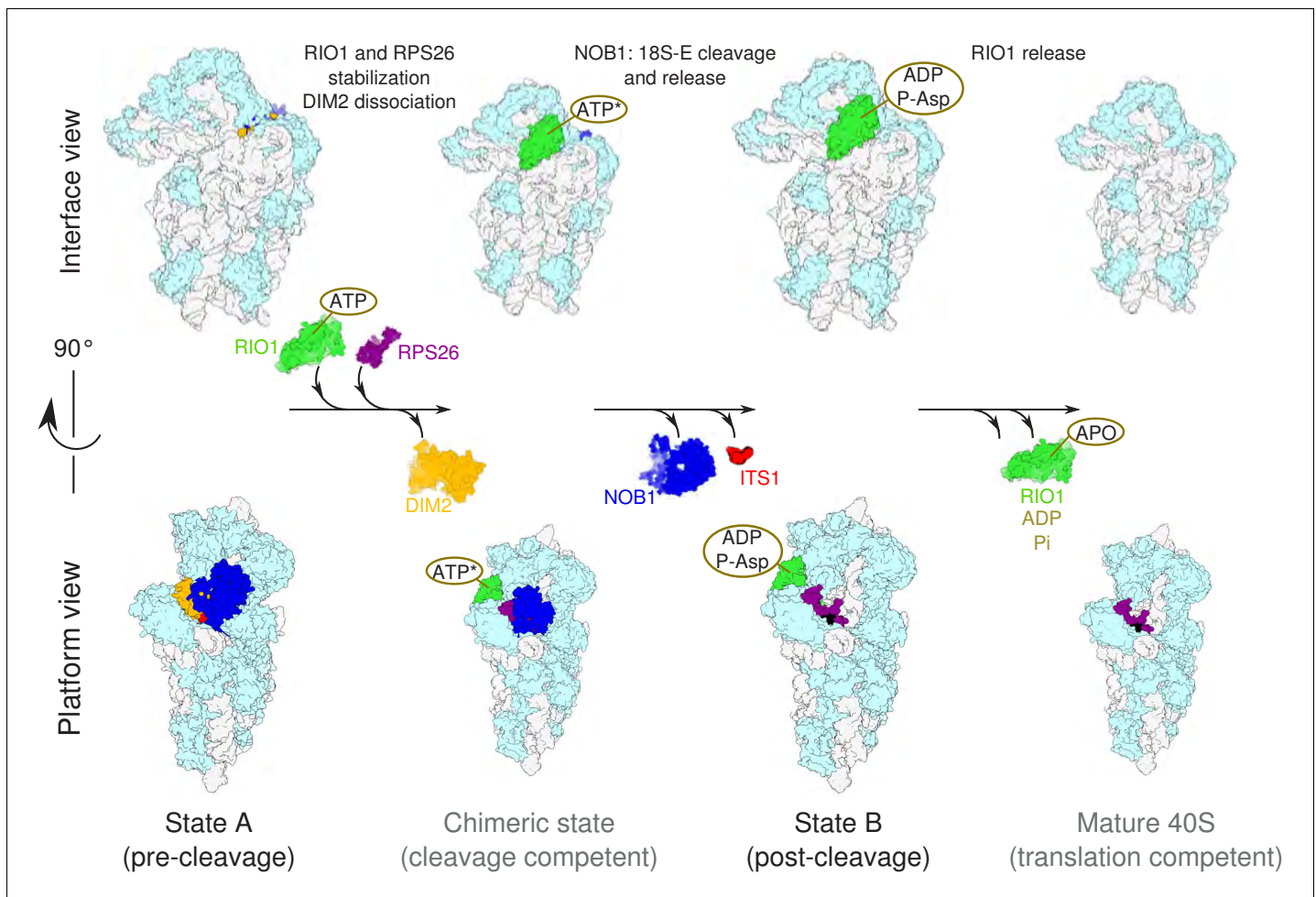


Figure 7. Model of the pre-40S last maturation steps triggered by RIO1 and RPS26. Upper and lower panels represent interface and platform views of the small ribosomal subunit, respectively. A putative ITS1 cleavage-competent state is shown to illustrate the transition between the pre-cleavage (state A) and post-cleavage (state B) structures that were resolved in this study. Status of ATP hydrolysis within RIO1 for this maturation state is not known, and thus marked as 'ATP*'.
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.61254>

RIO1 in pre-cleavage state A suggests that RIO1 is initially flexibly associated, while DIM2 and NOB1 are stably bound. A recent cryo-EM study performed on human pre-40S particles revealed significant changes in RIO1 position before 18S-E pre-rRNA cleavage (Ameismeier et al., 2020). We hypothesize that we could not precisely position RIO1 in the pre-cleavage state A herein described because our cryo-EM analysis was performed on a significantly smaller scale.

In contrast, state B shows RIO1 in a stable conformation, while DIM2 and NOB1 are absent in this post-cleavage particle. Despite its overall impaired ATPase activity, the catalytic pocket of the RIO1-D324A mutant is occupied by ADP+pAsp341 (Figure 3c, Figure 3—figure supplement 2). This suggests that transition of pre-40S particles to state B involves ATP binding as well as the ATP hydrolysis activity of RIO-D324A, while trapping of ADP in the catalytic site prevents release from the matured particle. The structure of RIO1 was shown to switch to a so-called 'active' form when complexed either with ATP or with its hydrolysis products ADP/pAsp (Ferreira-Cerca et al., 2014). ATP fixation in the catalytic pocket of RIO1 might trigger its stabilization on the head of the pre-40S particle and bring RIO1 to contact DIM2. Furthermore, our data reveal a possible steric clash between the C-terminal domains of RIO1 and DIM2 (Figure 6—figure supplement 1). This suggests that RIO1 stabilization on pre-40S particles initiates DIM2 dislodging to uncover site 3 and allows rRNA cleavage by NOB1. Accordingly, our in vitro assays show that binding of ATP or AMP-PNP to RIO1 stimulates cleavage by NOB1 in human pre-40S particles (Figure 6), as concluded before in yeast (Ferreira-Cerca et al., 2014). Also supporting this scenario, recent in vitro studies in yeast have

shown that Rio1 forms a trimeric complex with Dim2 and Nob1 in the presence of AMP-PNP and not ADP (Parker et al., 2019). In addition, overexpression of Rio1 in yeast is sufficient to displace a catalytically inactive form of Nob1 from pre-40S particles (Parker et al., 2019). The recent study by Ameismeier et al., 2020 reached similar conclusions regarding the role of RIO1. It also uncovered the role of EIF1AD as a new ribosome biogenesis factor. The structures published in this study suggest that both factors may functionally interact upstream of RPS26 incorporation.

Nevertheless, the action of RIO1 is not sufficient to efficiently trigger 18S-E pre-rRNA cleavage together with DIM2 and NOB1 dissociation from pre-40S particles, as shown by the blocking of RIO1-StHA pre-40S particles in the pre-cleavage state upon RPS26 knockdown. RPS26 is the only component of the mature small ribosomal subunit missing in state A. Its binding site overlaps with that of DIM2, and its final positioning on the 40S subunits is thus directly dependent on the release of DIM2. Importantly, addition of RPS26 was sufficient to stimulate in vitro cleavage of the 18S-E pre-rRNA in RPS26 depleted pre-40S particles, and it increased cleavage efficiency in the presence of ATP. While establishment of the full interaction of RIO1 with the head domain may provide a driving force to displace DIM2, RPS26 may potentiate its activity by competing with DIM2 binding. We propose a model in which displacement of DIM2 upon RIO1 binding in its final position (corresponding to state B) triggers the recruitment of RPS26 to the pre-40S particle, which in turn further displaces DIM2 from cleavage site 3. This cooperative action of RIO1 and RPS26 would then lead to a putative, probably short-lived cleavage-competent state (Figure 7), in which NOB1 can reach its substrate and process the 3'-end of the 18S rRNA. The status of ATP hydrolysis within RIO1 in this state is not known, and thus marked as 'ATP*' in Figure 7. The release of ADP and dephosphorylation of phospho-aspartate pAsp341 would then trigger a conformational change within RIO1 allowing its dissociation from pre-40S particles, as proposed for yeast Rio1 as well as other RIO kinases family members (Ferreira-Cerca et al., 2014; Ferreira-Cerca et al., 2012; Knüppel et al., 2018; Turowski et al., 2014). Along this view, RIO1 and RPS26 function as the two keys of a dual key lock that ensures a strict control of the ultimate steps of 40S subunit maturation before entry in translation.

Human 40S subunit precursors do not form 80S-like particles

In yeast, expression of the Rio1-D244A mutant (equivalent to human RIO1-D324A) was shown to promote the accumulation of 80S-like particles, with which it co-purifies. In these 80S-like particles, pre-40S particles containing unprocessed 20S pre-rRNA, the last precursor to the 18S rRNA in yeast, are associated with large ribosomal subunits (Ferreira-Cerca et al., 2014; Turowski et al., 2014). Such particles were also observed with a number of other mutations targeting late-acting small ribosomal subunit biogenesis factors (Lebaron et al., 2012; Parker et al., 2019; Scaiola et al., 2018; Strunk et al., 2012) and were proposed to host the cleavage of the 20S pre-rRNA. Association of late pre-40S particles with large ribosomal subunits might serve as a checkpoint to verify that they are translation-competent after their final maturation (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012; Turowski et al., 2014). In addition, yeast 80S-like particles containing 20S pre-rRNA have been shown to be able to associate with polysomes and thus enter into the translating pool of ribosomes (Belhabich-Baumas et al., 2017; Parker et al., 2019; Soudet et al., 2010), suggesting some permissiveness between final pre-40S maturation and translation initiation events. In stark contrast, we found little evidence that human RIO1(kd)-StHA pre-ribosomal particles strongly associate with 60S subunits, neither by proteomics and northern blot, nor by cryo-EM single-particle analysis. Our results rather suggest that final rRNA maturation can occur within free pre-40S particles. Though ribosome biogenesis appears globally conserved within eukaryotic species, substantial differences in the pre-rRNA processing pathways, as well as in the dynamics of RBF association with pre-ribosomes in mammals and yeast, have been demonstrated (for review, Cerezo et al., 2019; Henras et al., 2015). The absence of 80S-like particles in late human pre-40S particles might constitute a significant difference in the maturation pathway of human pre-ribosomal particles compared to yeast.

RIO1 probes tRNA translocation capacities of pre-40S particles

The function of RIO1 in the release of DIM2 and NOB1 echoes the roles that other NTPases play in pre-ribosomal particle remodeling along the maturation pathway. Their nucleotide-hydrolyzing activity was shown to power the release of other RBFs, as well as their own release, contributing to the

unidirectionality of the maturation (Hedges et al., 2005; Kargas et al., 2019; Knüppel et al., 2018; Micic et al., 2020; Mitterer et al., 2019; Weis et al., 2015; Zemp et al., 2009). NTPases might also have additional roles than conformational switches and probe the correct conformation of functional sites. For example, proper formation of the peptidyl-transferase center (PTC) in the large subunit may be checked by Nog2 and adjacent GTPases Nog1 and Nug1, which binds at or adjacent to the PTC (discussed by Klinge and Woolford, 2019). RIO1 binds to the same place as RIO2, which prevents premature engagement of pre-40S particles in translation by physically obstructing the mRNA groove and tRNA interaction sites (Ameismeier et al., 2018; Heuer et al., 2017; Larburu et al., 2016; Scaiola et al., 2018; Strunk et al., 2012). Furthermore, in the post-cleavage state B herein described, 18S rRNA G1639 appears to lock the RIO1(kd) catalytic pocket in its ‘active’ conformation (Ferreira-Cerca et al., 2014) through a pi-stacking interaction with phenylalanine F328 (Figure 3c). Such an interaction does not seem to be established with RIO2, whose catalytic pocket is more distant from this guanosine (Ameismeier et al., 2018). The N7-methylated G1639 is universally conserved and is involved in the correct positioning of tRNA in the P-site as well as its transfer to the E-site thanks to a switch mechanism (Malygin et al., 2013; Selmer et al., 2006). Through its cycle of association, ATPase hydrolysis, and subsequent dissociation from pre-40S particles, RIO1 might thus act as a conformational and functional probe that assesses the tRNA translocation capacities of the small subunit and couples triggering of the last maturation step to functional proofreading of the ribosome.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Cell line (Homo sapiens)	HEK293 FlpIn T-REx HAST-DIM2	(Wyler et al., 2011) DOI: 10.1261/rna.2325911		
Cell line (Homo sapiens)	HEK293 FlpIn T-REx HAST-LTV1	(Wyler et al., 2011) DOI: 10.1261/rna.2325911		
Cell line (Homo sapiens)	HEK293 FlpIn T-REx RIOK1-StHA	(Widmann et al., 2012) DOI: 10.1091/mbc.E11-07-0639		
Cell line (Homo sapiens)	HEK293 FlpIn T-REx RIOK1 (D324A)-StHA	(Widmann et al., 2012) DOI: 10.1091/mbc.E11-07-0639		
Transfected construct (human)	si-RPS26	Eurogentec		5'-GGACAAGGCCA UUAAGAAA dTdT-3'
Transfected construct (human)	si-EIF1AD	Eurogentec		5'-ACCGCAGAC AGUAUCAUGAGA-3'
Transfected construct (human)	si-control	Eurogentec	SR-CL000-005	
Antibody	Anti-DIM2 (rabbit polyclonal)	(Zemp et al., 2009) DOI: 10.1083/jcb.200904048		WB(1:2000)
Antibody	Anti-ENP1 (rabbit polyclonal)	(Zemp et al., 2009) DOI: 10.1083/jcb.200904048		WB(1:5000)
Antibody	Anti-HA-HRP (rabbit polyclonal)	Sigma-Roche Applied Science	Cat# MMS-101P RRID:AB_2314672	WB(1:1000)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-NOB1 (rabbit polyclonal)	(Zemp et al., 2009) DOI: 10.1083/jcb.200904048		WB(1:5000)
Antibody	Anti-RIOK2 (rabbit polyclonal)	(Zemp et al., 2009) DOI: 10.1083/jcb.200904048		WB(1:5000)
Antibody	Anti-RPS26 (rabbit polyclonal)	Genetex	GTX131193-S	WB(1:1000)
Antibody	Anti-RPS19 (rabbit polyclonal)	(This article)		WB(1:5000)
Antibody	Anti-EIF1AD (rabbit polyclonal)	Proteintech	20528-1-AP	WB(1:2000)
Sequence-based reagent	3'18S probe	(Larburu et al., 2016) DOI: 10.1093/nar/gkw714		Northern blot probe, 5'-GATCCTTCCG CAGGTTACCTACG-3'
Sequence-based reagent	RNase H_3_Hyb1 (RNA/ DNA/RNA)	Eurogentec		5'-UGUUACGAC UUUUACTTCCUCU AGAUAGUCAAGUUC-3'
Sequence-based reagent	Lad_S oligo	Eurogentec		5'-TAATACGACTCA CTATAGGCGTAGG TGAACCTGCGGAA GGATCATTAAACGG AGCCCGGAGGGCG AGGGATGAAGATG ATGAGCTCGGCAG GTCCTGAGGAGTGATGA-3'
Sequence-based reagent	Lad_AS oligo	Eurogentec		5'- AAGGTGAATCA GCACTCAAGATCCT CATCACTCCTCAGGACC-3'
Sequence-based reagent	Ladder sequence	This article		5'-UAAUACGACUCAC UAUAGGCGUAGG UGAACCU GCGGA AGGAUCAUUAACG GAGCCCGGAGGGC GAGGGAUGAAGAUG AUGAGCUCGGCAGG UCCUGAGGAGUGAU GAGGAUCUUGAGUG CUGAUUCACCUU-3'

Cell culture and treatment with siRNA duplexes

HEK293 cells were cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 mM sodium pyruvate. HEK293 FlpIn TRex cell lines (Invitrogen, RRID:CVCL_U427) and expressing HAST-DIM2, HAST-LTV1, RIO1(wt)-StHA, and RIO1(D324A)-StHA have been described previously (Wyler et al., 2011). Cell lines used in this study were not further authenticated after obtaining them from the indicated source. All cell lines were tested negative for mycoplasma using MycoAlert test (Lonza). None of the cell lines used in this study were included in the list of commonly misidentified cell lines maintained by International Cell Line Authentication Committee.

To knockdown expression of the corresponding human protein genes, siRNA duplex of RPS26 (5'-GGACAAGGCCAUUAAGAAAdTdT-3') or EIF1AD (5'-ACCGCAGACAGUAUCAUGAGA-3') (Eurogentec) was added at a final concentration of 500 nM to 100 μL of cell suspension (50 × 10⁶ cells/mL diluted in Na phosphate buffer, pH 7.25, containing 250 mM sucrose and 1 mM MgCl₂). After electrotransformation at 240 V, cells were plated and collected 48 hr later. Control cells were electro-transformed with a scramble siRNA. Knockdown efficiency of siRNAs was assessed by quantitative PCR, using HPRT1 as an internal control.

TAP purification of human pre-40S particles

To purify pre-ribosomal particles, the protocol described in *Wyller et al., 2011* was adapted as follows: expression of N-terminally HASt-tagged or C-terminally StHA-tagged bait proteins in stable HEK293 cells was induced with tetracycline (0.5 µg/mL) 24 hr prior to harvest. Cells were detached with PBS containing 0.5 mM EDTA and lysed in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, supplemented with protease and phosphatase inhibitors) using a dounce homogenizer. Lysed cells were centrifuged (4500 g, 12 min), and the lysate was incubated with EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma-Aldrich) for 2 hr in an overhead shaker. For electron microscopy studies, beads were washed six times with TAP buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and eluted by incubation in TAP buffer supplemented with 0.2 mg/mL HA peptide (Sigma-Aldrich). Eluates were washed and concentrated by Vivacon 2, 100 kDa MWCO centrifugal devices (Sartorius). For subsequent analyses by silver staining, western blotting, and mass spectrometry, beads were washed three times with TAP buffer and bound material was eluted with SDS sample buffer.

Protein digestion and nano-LC-MS/MS analysis

Analysis of RIO1(kd)-StHA particles composition

Following TAP purification, 100 µL of concentrated RIO1 pre-40S particles, corresponding to 3.5 µg of protein, was reduced by incubation for 5 min at 95°C with 5 µL of Laemmli buffer containing 30 mM DTT and then alkylated with 90 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. The reduced/alkylated sample was then loaded onto SDS-PAGE gel (stacking 4% and separating 12% acrylamide). For one-shot analysis of the entire mixture, no fractionation was performed, and the electrophoretic migration was stopped as soon as the protein sample entered the separating gel as one single band. The proteins, revealed with Instant Blue (Expedeon) for 20 min, were found in one blue band of around 5 mm width. Single slice containing the whole sample was cut and washed before the in-gel digestion of the proteins overnight at 37°C with a solution of modified trypsin (sequence grade, Promega, Charbonnières, France). The resulting peptides were extracted from the gel by one round of incubation (15 min, 37°C) in 1% formic acid-acetonitrile (40%) and two rounds of incubation (15 min each, 37°C) in 1% formic acid-acetonitrile (1:1). The extracted fractions were air-dried. Tryptic peptides were resuspended in 14 µL of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). Nano-LC-MS/MS analysis was performed in duplicate injections using an Ultimate 3000 nanoRS system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled with an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) operating in positive mode. Five microliters of each sample was loaded onto a C18-pre-column (300 µm inner diameter × 5 mm) at 20 µL/min in 2% ACN, 0.05% TFA. After 5 min of desalting, the pre-column was switched online with the analytical C18 nanocolumn (75 µm inner diameter × 15 cm, packed in-house) equilibrated in 95% solvent A (5% ACN, 0.2% FA) and 5% solvent B (80% ACN, 0.2% FA). Peptides were eluted by using a 5–50% gradient of solvent B for 105 min, at a flow rate of 300 nL/min. The LTQ-Orbitrap Velos was operated in data-dependent acquisition mode with the XCalibur software. Survey scans MS were acquired in the Orbitrap, on the 300–2000 m/z (mass to charge ratio) range, with the resolution set to a value of 60,000 at m/z 400. Up to 20 of the most intense multiply charged ions (>2+) per survey scan were selected for CID (collision-induced dissociation) fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear ion trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

Analysis of RIO1(kd)-StHA particles composition upon RPS26 depletion

Each protein sample corresponding to RIO1(kd)-StHA pre-40S particles purified from RPS26 depleted cells and control cells (64 and 94 µg of proteins in 300 µL of 40 mM Tris-HCl, 4% SDS, respectively) was reduced with 6 µL of 1 M DTT (20 mM final) during 10 min at 95°C under agitation, cooled to room temperature, and alkylated with 19 µL of 1 M iodoacetamide (60 mM final) during 30 min in the dark. Then, each sample was digested with trypsin using the S-Trap Micro spin column protocol (Protifi, Huntington, NY) according to the manufacturer's instructions (*HaileMariam et al., 2018*). The pooled digested peptide extracts were dried down and resuspended with 0.05% TFA in 2% ACN at a concentration of 3.8 µg/µL, vortexed, and sonicated for 10 min before injection. Peptides samples were analyzed in triplicate injections using an UltiMate 3000 RSLCnano LC system

(ThermoScientific, Dionex) coupled with an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) operating in positive mode. Five microliters of each sample were loaded onto a 300 μm ID \times 5 mm PepMap C18 pre-column (Thermo Scientific, Dionex) at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ in 2% ACN, 0.05% TFA. After 5 min of desalting, peptides were on-line separated on a 75 μm ID \times 50 cm C18 column (in-house packed with Reprosil C18-AQ Pur 3 μm resin, Dr. Maisch; Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) equilibrated in 95% of buffer A (0.2% formic acid [FA]), with a gradient of 5% to 25% of buffer B (80% ACN, 0.2% FA) for 75 min and then 25–50% for 30 min at a flow rate of 300 nl/min. The instrument was operated in data-dependent acquisition mode using a top-speed approach (cycle time of 3 s). Survey scans MS were acquired in the Orbitrap over 400–2000 m/z with a resolution of 120,000 (at 200 m/z), an automatic gain control (AGC) target value of $4e5$, and a maximum injection time of 50 ms. Most intense multiply charged ions (2+ to 7+) per survey scan were selected at 1.6 m/z with quadrupole and fragmented by higher energy collisional dissociation (HCD). The monoisotopic precursor selection was turned on, the intensity threshold for fragmentation was set to 50,000, and the normalized collision energy was set to 35%. The resulting fragments were analyzed in the Orbitrap with a resolution of 30,000 (at 200 m/z), an AGC target value of $5e4$, and a maximum injection time of 60 ms. Dynamic exclusion was used within 60 s with a 10 ppm tolerance, to prevent repetitive selection of the same peptide. For internal calibration the 445.120025 ion was used as lock mass.

Bioinformatic MS data analysis

Mascot (Mascot server v2.6.1; <http://www.matrixscience.com>) database search engine was used for peptide and protein identification using automatic decoy database search to calculate a false discovery rate (FDR). MS/MS spectra were compared to the SwissProt *H. sapiens* database (supplemented with the sequence of the D324A RIO1 mutant). MS mass tolerance was set at 5 ppm and MS/MS mass tolerance was set at 0.8 Da and 0.02 Da for data acquired on LTQ-Orbitrap Velos and Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometers, respectively. The enzyme selectivity was set to full trypsin with two missed cleavages allowed. Protein modifications were fixed carbamidomethylation of cysteines, variable phosphorylation of serine, threonine and tyrosine, variable oxidation of methionine, variable acetylation of protein N-terminus. Proline software (Bouyssie et al., 2020) was used for the validation and the label-free quantification of identified proteins in each sample. Mascot identification results were imported into Proline. Search results were validated with a peptide rank = 1 and at 1% FDR both at PSM level (on adjusted e-value criterion) and protein set level (on modified Mudpit score criterion). Label-free quantification was performed for all proteins identified: peptides were quantified by extraction of MS signals in the corresponding raw files, and post-processing steps were applied to filter, normalize, and compute protein intensities. For analysis of RIO1(kd)-StHA pre-40S particles composition, protein abundances were summarized in iBAQ values by dividing the protein intensities by the number of observable peptides (Schwanhäusser et al., 2011). Proteins with a ratio of observed peptide sequences over observable peptide sequences inferior to 30% were filtered out. Additionally, only the two most intense iBAQ logs ($1E6$ to $1E8$) were represented in **Figure 1**, **Figure 1—figure supplement 2**. For analysis of RIO1(kd)-StHA pre-40S particle composition upon RPS26 depletion, after log2-transformation of the data, an unpaired two-tailed Student's t-test was performed and proteins were considered significantly enriched when their absolute log2-transformed fold change was higher than two and their p -value lower than 0.01. A volcano plot was drawn to visualize significant protein abundance variations between the two compared conditions and represents $-\log_{10}(p\text{-value})$ according to the log2 ratio (**Figure 5—figure supplement 1**).

Grid preparation and cryo-EM images acquisition

Cryo-EM grids were prepared and systematically checked at METI, Toulouse. Immediately after glow discharge, 3.5 μL of purified hRIO1(kd)-StHA particles (with RNA concentrations of ~ 60 ng/ μL as estimated by Nanodrop measurement) was deposited onto QUANTIFOIL holey carbon grids (R2/1, 300 mesh with a 2 nm continuous layer of carbon on top). Grids were plunge-frozen using a Leica EM-GP automat; temperature and humidity level of the loading chamber were maintained at 20°C and 95%, respectively. Excess solution was blotted with a Whatman filter paper no. 1 for 1.7–1.9 s, and grids were immediately plunged into liquid ethane (-183°C).

Images were recorded on a Titan Krios electron microscope (FEI, ThermoFisher Scientific) located at EMBL, Heidelberg, Germany. The cryo-electron microscope was operating at 300 kV and was equipped with a Gatan K2 summit direct electron detector using counting mode. Automatic image acquisition was performed with SerialEM, at a magnification corresponding to a calibrated pixel size of 1.04 Å and a total electron dose of 29.88 e-/Å² over 28 frames. Nominal defocus values ranged from -0.8 µm to -2.8 µm.

Single-particle analysis

Nine thousand four hundred and ninety-four stacks of frames were collected at EMBL. Frame stacks were aligned to correct for beam-induced motion using MotionCor2 (Zheng *et al.*, 2017). Contrast transfer function (CTF) and defocus estimation were performed on the realigned stacks using CTFIND4 (Rohou and Grigorieff, 2015). After selection upon CTF estimation quality, maximum resolution on their power spectra, and visual checking, 'good' micrographs were retained for further analysis. The 2,126,610 particles were automatically picked and then extracted in boxes of 384 × 384 pixels, using the RELION 3.0 Autopick option. All subsequent image analysis was performed using RELION 3.0 (Zivanov *et al.*, 2018; Figure 2—figure supplement 1). A first 2D classification was performed (on particles images binned by a factor of 8) to sort out ill-picked and methylosome particles. The 1,287,445 remaining particles were binned by a factor of 4 and subjected to a 3D classification in five classes, using the 40S subunit atomic model derived from the human ribosomal 3D structure (PDB-ID 6EK0) (Natchiar *et al.*, 2018) low-pass filtered to 60 Å, as initial reference. One class harbored full 40S morphology and good level of details. The 484,429 particles from this class were re-extracted without imposing any binning factor, and a consensus 3D structure was obtained using RELION's 3D auto-refine option, with an overall resolution of 2.9 Å for FSC = 0.143 according to gold-standard FSC procedure. Particles were then submitted to focused 3D classifications with signal subtraction around the platform domain, to remove information coming from the body and head of the pre-40S particles, according to Scheres, 2016. Two of the five 3D classes yielded reconstructions with clear features. The first one, hereafter named state A, contained 104,844 particles and was further auto-refined to 3.1 Å resolution according to gold-standard FSC procedure; the second one (state B) comprised 276,012 particles and was auto-refined to 2.9 Å resolution. Subsequently, particles corresponding to the states A and B 'platform only' classes were retrieved from the dataset without signal subtraction and submitted to auto-refinement, yielding maps of 'full' states A and B particles solved to 3.22 and 2.96 Å, respectively (Figure 2—figure supplement 1b, c). Because significant motion of the head and platform regions compared to the body was observed, multi-body refinement (Nakane *et al.*, 2018) was performed for both states by dividing pre-40S particles in three main domains: body, head, and platform. Multi-body refinement of state A gave rise to body, head, and platform domains solved to 3.14, 3.17, and 3.30 Å, respectively, after post-processing, while that of state B yielded resolutions of 2.98, 2.96, and 2.98 Å for the body, head, and platform regions, respectively (Figure 2—figure supplement 1c). Local resolution of all cryo-EM maps was estimated using the ResMap software (Kucukelbir *et al.*, 2014; Figure 2—figure supplement 2).

Interpretation of cryo-EM maps

Atomic models of pre-40S particle (PDB-ID 6G51) (Ameismeier *et al.*, 2018) or the mature 40S subunit (PDB-ID 6EK0) (Natchiar *et al.*, 2018) were first fitted in the cryo-EM maps of interest as rigid body using the 'fit' command in UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Body, head, and platforms domains were modeled separately in the post-processed multi-body 'bodies' maps and then adapted to the composite full maps to generate whole atomic models using UCSF Chimera and Coot (Emsley *et al.*, 2010).

Final atomic models of states A (pre-cleavage) and B (post-cleavage) pre-40S particles were refined using REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011) and Phenix_RealSpace_Refine (Adams *et al.*, 2010), with secondary structure restraints for proteins and RNA generated by ProSMART (Nicholls *et al.*, 2014) and LIBG (Brown *et al.*, 2015). Final model evaluation was done with MolProbity (Chen *et al.*, 2010). Overfitting statistics were calculated by a random displacement of atoms in the model, followed by a refinement against one of the half-maps in REFMAC5, and Fourier shell

correlation curves were calculated between the volume from the atomic model and each of the half-maps in REFMAC5 (**Supplementary file 1**).

Maps and models visualization was done with Coot and UCSF Chimera; figures were created using UCSF Chimera and ChimeraX (**Goddard et al., 2018**).

RNase H digestion assay and RNA analysis

For RNase H digestion assays, 250 ng of pre-40S purified RNAs were denatured at 95°C for 6 min with a RNA/DNA/RNA reverse probe hybridizing in the 3'-end of 18S rRNA (probe RNaseH_3_Hyb1: 5'-UGUUACGACUUUUACTTCUCUAGAUAGUCAAGUUC-3'; 0.5 µL at 100 µM). After annealing by cooling down to room temperature for 20 min, the reaction mixture was diluted to 30 µL with a reaction mix containing 1X RNase H reaction buffer, 25 µM DTT, 0.5 U/I RNasin (Promega), and 50 U RNase H (New England Biolabs), and incubated at 37°C for 30 min. The reaction was then blocked by addition of 0.3 M sodium acetate, pH 5.2 and 0.2 mM EDTA, and the RNAs were recovered by ethanol precipitation after phenol–chloroform–isoamylalcohol (25:24:1) extraction.

RNAs were then separated on a 12% polyacrylamide gel (19:1) in 1X TBE buffer containing 7 M urea. RNAs were transferred to Hybond N + nylon membrane (GE-Healthcare, Orsay, France) and crosslinked under UV light. Membrane pre-hybridization was performed at 45°C in 6X SSC (saline-sodium citrate), 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, and 0.9 mg/mL tRNA. The 5'-radiolabeled oligonucleotide probe 3'18S (5'-GATCCTTCCGCAGGTTACCTACG-3') was added after 1 hr and incubated overnight at 45°C. Membranes were washed twice for 10 min in 2X SSC and 0.1% SDS and once in 1X SSC and 0.1% SDS, and then exposed. Signals were acquired with a Typhoon Trio PhosphorImager and quantified using the ImageLab software.

The RNA ladder corresponds to a 131 nucleotides sequence comprising the 3'18S probe and the T7 promoter sequence (**Supplementary file 1**). Using the oligonucleotides Lad_S and Lad_AS (**Supplementary file 1**), the DNA template for the RNA ladder was produced by PCR. Then, RNA was synthesized by in vitro transcription of the PCR products using the T7 RNA polymerase (Promega kit). Then, alkaline hydrolysis was performed on 500 ng of the synthesized RNA incubated in 50 mM sodium carbonate, pH 10.3, 1 mM EDTA for 5 min at 95°C.

Overexpression and purification of hRPS26-His

hRPS26-HisTag construct was cloned into pET29b vector using NdeI/KpnI (GenScript). *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) strain carrying pET29b-hRPS26-HisTag was induced by addition of 0.5 mM IPTG and incubated O.N at 20°C. Cells were pelleted and lysed by sonication in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 20 mM Imidazole, and (EDTA)-free protease inhibitor (cCompleteTM, Roche). The extract was treated with 750 U of Benzonase 30 min at room temperature under agitation and then clarified by centrifugation and filtration (0.22 µm). The recombinant protein was purified from the soluble fractions using FPLC (fast protein liquid chromatography, Äkta-Basic, GE-Healthcare), by a nickel-attached HiTrap chelating column (HisTrap 1 mL, GE-Healthcare) with a linear gradient of 20–500 mM imidazole. The eluted fractions containing His-tagged proteins were pooled, dialyzed, and concentrated on Amicon 10 kDa MWCO centrifugal devices (Sartorius) with dialysis buffer (50 mM Tris–HCl [pH 7.5], 0.1% Triton, 1 mM DTT, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂). The purity of the protein was finally checked by SDS–PAGE 12% followed either by Coomassie blue staining or by western blot (**Figure 6—figure supplement 2**).

In vitro pre-ribosome maturation assay

The method of pre-40S particle purification described above was followed, and instead of elution, beads were then washed three times with 1 mL of TAP buffer. Most of the supernatant was discarded, and 50 µL of buffer X (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton, and 10% glycerol) added to the beads (suspended in approx. 20 µL of remaining TAP buffer) to reach a final volume of 70 µL. Nucleotides at a final concentration of 1 mM and/or 2 µg of hRPS26 were added when required. Reactions were incubated at 37°C for 1 hr, and RNAs were then immediately extracted with Tri Reagent.

Acknowledgements

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR 16-CE11-0029), the CNRS, the University of Toulouse-Paul Sabatier, the Région Occitanie, the European Union (Fonds Européens de Développement Régional, FEDER), and Toulouse Métropole. UK received funding from the Swiss National Science Foundation (grant 31003A_166565 and the NCCR 'RNA and disease'). Cryo-EM image acquisition was performed on the METI facility (CBI, Toulouse) and at the EMBL in Heidelberg with financial support from the iNext European initiative. Cryo-EM image analysis was performed using HPC resources from CALMIP (Grant 2018-[P1406]). We would like to thank the engineers and staff working on these facilities for their great help, as well as Marion Aguirreben-goia for her help on statistical analysis and Odile Burlet-Schiltz for her support.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	16-CE11-0029, ANR RIBOMAN	Laura Plassart Ramtin Shayan Natacha Larburu Simon Lebaron Marie-Françoise O'Donohue Pierre-Emmanuel Gleizes Celia Plisson-Chastang
Swiss National Science Foundation	31003A_166565	Christian Montellese Ulrike Kutay
CALMIP	2018-[P1406])	Celia Plisson-Chastang
iNEXT	PID3684 - VID 5784	Celia Plisson-Chastang

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

Author contributions

Laura Plassart, Conceptualization, Data curation, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Ramtin Shayan, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Christian Montellese, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Dana Rinaldi, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Natacha Larburu, Formal analysis, Investigation, Writing - review and editing; Carole Pichereaux, Formal analysis, Investigation; Carine Froment, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Simon Lebaron, Marie-Françoise O'Donohue, Conceptualization, Methodology, Writing - review and editing; Ulrike Kutay, Conceptualization, Resources, Funding acquisition, Methodology, Writing - review and editing; Julien Marcoux, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Visualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Pierre-Emmanuel Gleizes, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing; Celia Plisson-Chastang, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Visualization, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Ulrike Kutay  <http://orcid.org/0000-0002-8257-7465>

Julien Marcoux  <http://orcid.org/0000-0001-7321-7436>

Pierre-Emmanuel Gleizes  <https://orcid.org/0000-0003-0830-7341>

Celia Plisson-Chastang  <https://orcid.org/0000-0002-8439-8428>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.61254.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.61254.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Cryo-EM data collection, atomic models refinement, and validation statistics.
- Transparent reporting form

Data availability

Mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD019270. Cryo-EM maps have been deposited in the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), under the accession codes : EMD-11440 (State A multi-body composite map); EMD-11441 (State B multi-body composite map); EMD-11446 (State A, head); EMD-11445 (State A, body); EMD-11447 (State A, platform); EMD-11443 (State B, head); EMD-11442 (State B, body); EMD-11444 (State B, platform). Atomic coordinate models of State A and State B RIO1(kd)-StHA pre-40S particles have been deposited in the Protein Data Bank (PDB), with respective PDB accession codes 6ZUO and 6ZV6.

The following datasets were generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Plassart L	2021	State A Multibody composite map	https://www.emdatare-source.org/EMD-11440	EMDB, EMD-11440
Plassart L	2021	State B Multibody composite map	https://www.emdatare-source.org/EMD-11441	EMDB, EMD-11441
Plassart L	2021	State A, head	https://www.emdatare-source.org/EMD-11446	EMDB, EMD-11446
Plassart L	2021	State A, body	https://www.emdatare-source.org/EMD-11445	EMDB, EMD-11445
Plassart L	2021	State A, platform	https://www.emdatare-source.org/EMD-11447	EMDB, EMD-11447
Plassart L	2021	State B, head	https://www.emdatare-source.org/EMD-11443	EMDB, EMD-11443
Plassart L	2021	State B, body	https://www.emdatare-source.org/EMD-11442	EMDB, EMD-11442
Plassart L	2021	State B, platform	https://www.emdatare-source.org/EMD-11444	EMDB, EMD-11444
Plassart L	2021	Human Pre-40S, State A	https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00006zuo	PDB, 6ZUO
Plassart L	2021	Human Pre-40S, State B	https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00006zv6	PDB, 6ZV6
Pichereaux C	2021	human late pre-40S particles (RIO1 (kd)-StHA	https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD019270	PRIDE, PXD019270

References

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

Ameismeier M, Cheng J, Berninghausen O, Beckmann R. 2018. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* **558**:249–253. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0193-0>, PMID: 29875412

Ameismeier M, Zemp I, van den Heuvel J, Thoms M, Berninghausen O, Kutay U, Beckmann R. 2020. Structural basis for the final steps of human 40S ribosome maturation. *Nature* **587**:683–687. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2929-x>, PMID: 33208940

- Aubert M**, O'Donohue M-F, Lebaron S, Gleizes P-E. 2018. Pre-Ribosomal RNA processing in human cells: from mechanisms to congenital diseases. *Biomolecules* **8**:123. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8040123>
- Belhabib-Baumas K**, Joret C, Jády BE, Plisson-Chastang C, Shayan R, Klopp C, Henras AK, Henry Y, Mougin A. 2017. The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles. *Nucleic Acids Research* **45**:10824–10836. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx734>, PMID: 28977579
- Bohnsack KE**, Bohnsack MT. 2019. Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *The EMBO Journal* **38**:e100278. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.2018100278>, PMID: 31268599
- Bouyssié D**, Hesse AM, Mouton-Barbosa E, Rompais M, Macron C, Carapito C, Gonzalez de Peredo A, Couté Y, Dupierriis V, Burel A, Menetrey JP, Kalaitzakis A, Poisat J, Romdhani A, Burlet-Schiltz O, Cianférani S, Garin J, Bruley C. 2020. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**:3148–3155. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118>, PMID: 32096818
- Brown A**, Long F, Nicholls RA, Toots J, Emsley P, Murshudov G. 2015. Tools for macromolecular model building and refinement into electron cryo-microscopy reconstructions. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **71**:136–153. DOI: <https://doi.org/10.1107/S1399004714021683>, PMID: 25615868
- Cerezo E**, Plisson-Chastang C, Henras AK, Lebaron S, Gleizes PE, O'Donohue MF, Romeo Y, Henry Y. 2019. Maturation of pre-40S particles in yeast and humans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **10**:e1516. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1516>, PMID: 30406965
- Chen VB**, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **66**:12–21. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>, PMID: 20057044
- Emsley P**, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **66**:486–501. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>, PMID: 20383002
- Ferreira-Cerca S**, Sagar V, Schäfer T, Diop M, Wesseling AM, Lu H, Chai E, Hurt E, LaRonde-LeBlanc N. 2012. ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**:1316–1323. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2403>, PMID: 23104056
- Ferreira-Cerca S**, Kiburu I, Thomson E, LaRonde N, Hurt E. 2014. Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes. *Nucleic Acids Research* **42**:8635–8647. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku542>, PMID: 24948609
- Goddard TD**, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. 2018. UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science* **27**:14–25. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3235>, PMID: 28710774
- Guderian G**, Peter C, Wiesner J, Sickmann A, Schulze-Osthoff K, Fischer U, Grimm M. 2011. RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **286**:1976–1986. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148486>, PMID: 21081503
- HaileMariam M**, Eguéz RV, Singh H, Bekele S, Ameni G, Pieper R, Yu Y. 2018. S-Trap, an ultrafast Sample-Preparation approach for shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research* **17**:2917–2924. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00505>, PMID: 30114372
- Hedges J**, West M, Johnson AW. 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal* **24**:567–579. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600547>, PMID: 15660131
- Henras AK**, Plisson-Chastang C, O'Donohue M-F, Chakraborty A, Gleizes P-E. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes: pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *WIREs RNA* **6**:225–242. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1269>
- Heuer A**, Thomson E, Schmidt C, Berninghausen O, Becker T, Hurt E, Beckmann R. 2017. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *eLife* **6**:e30189. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.30189>, PMID: 29155690
- Kargas V**, Castro-Hartmann P, Escudero-Urquijo N, Dent K, Hilcenko C, Sailer C, Zisser G, Marques-Carvalho MJ, Pellegrino S, Wawiórka L, Freund SM, Wagstaff JL, Andreeva A, Faille A, Chen E, Stengel F, Bergler H, Warren AJ. 2019. Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife* **8**:e44904. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.44904>, PMID: 31115337
- Klinge S**, Woolford JL. 2019. Ribosome assembly coming into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**:116–131. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0078-y>, PMID: 30467428
- Knüppel R**, Christensen RH, Gray FC, Esser D, Strauß D, Medenbach J, Siebers B, MacNeill SA, LaRonde N, Ferreira-Cerca S. 2018. Insights into the evolutionary conserved regulation of rio ATPase activity. *Nucleic Acids Research* **46**:1441–1456. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1236>, PMID: 29237037
- Kucukelbir A**, Sigworth FJ, Tagare HD. 2014. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nature Methods* **11**:63–65. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2727>, PMID: 24213166
- Kühlbrandt W**. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**:282–295. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1354>, PMID: 15071553
- Larburu N**, Montellese C, O'Donohue MF, Kutay U, Gleizes PE, 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 Research* **44**:8465–8478. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw714>, PMID: 27530427
- Lebaron S**, Schneider C, van Nues RW, Swiatkowska A, Walsh D, Böttcher B, Granneman S, Watkins NJ, Tollervey D. 2012. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S

- subunits. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**:744–753. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2308>, PMID: 22751017
- Malygin AA, Kossinova OA, Shatsky IN, Karpova GG. 2013. HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation. *Nucleic Acids Research* **41**:8706–8714. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt632>, PMID: 23873958
- Micic J, Li Y, Wu S, Wilson D, Tutuncuoglu B, Gao N, Woolford JL. 2020. Coupling of 5S RNP rotation with maturation of functional centers during large ribosomal subunit assembly. *Nature Communications* **11**:3751. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17534-5>, PMID: 32719344
- Mitterer V, Shayan R, Ferreira-Cerca S, Murat G, Enne T, Rinaldi D, Weigl S, Omanic H, Gleizes PE, Kressler D, Plisson-Chastang C, Pertschy B. 2019. Conformational proofreading of distant 40S ribosomal subunit maturation events by a long-range communication mechanism. *Nature Communications* **10**:2754. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10678-z>, PMID: 31227701
- Mohan S, Donohue JP, Noller HF. 2014. Molecular mechanics of 30S subunit head rotation. *PNAS* **111**:13325–13330. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1413731111>, PMID: 25187561
- Montellese C, Montel-Lehry N, Henras AK, Kutay U, Gleizes PE, O'Donohue MF. 2017. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Research* **45**:6822–6836. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx253>, PMID: 28402503
- Montellese C, van den Heuvel J, Ashiono C, Dörner K, Melnik A, Jonas S, Zemp I, Picotti P, Gillet LC, Kutay U. 2020. USP16 counteracts mono-ubiquitination of RPS27a and promotes maturation of the 40S ribosomal subunit. *eLife* **9**:e54435. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.54435>, PMID: 32129764
- Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA. 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **67**:355–367. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>, PMID: 21460454
- Nakane T, Kimanius D, Lindahl E, Scheres SH. 2018. Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION. *eLife* **7**:e36861. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.36861>, PMID: 29856314
- Natchiar SK, Myasnikov AG, Hazemann I, Klaholz BP. 2018. Visualizing the role of 2'-OH rRNA methylations in the human ribosome structure. *Biomolecules* **8**:125. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8040125>, PMID: 30366442
- Nicholls RA, Fischer M, McNicholas S, Murshudov GN. 2014. Conformation-independent structural comparison of macromolecules with ProSMART. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **70**:2487–2499. DOI: <https://doi.org/10.1107/S1399004714016241>, PMID: 25195761
- O'Donohue MF, Choesmel V, Faublader M, Fichant G, Gleizes PE. 2010. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *The Journal of Cell Biology* **190**:853–866. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201005117>, PMID: 20819938
- Parker MD, Collins JC, Korona B, Ghalei H, Karbstein K. 2019. A kinase-dependent checkpoint prevents escape of immature ribosomes into the translating pool. *PLOS Biology* **17**:e3000960. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000329>
- Peña C, Schütz S, Fischer U, Chang Y, Panse VG. 2016. Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation. *eLife* **5**:e21755. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.21755>, PMID: 27929371
- Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, Inuganti A, Griss J, Mayer G, Eisenacher M, Pérez E, Uszkoreit J, Pfeuffer J, Sachsenberg T, Yilmaz S, Tiwary S, Cox J, Audain E, Walzer M, Jarnuczak AF, et al. 2019. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Research* **47**:D442–D450. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>, PMID: 30395289
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**:1605–1612. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>, PMID: 15264254
- Preti M, O'Donohue MF, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaillé ML, Choesmel V, Gleizes PE. 2013. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Research* **41**:4709–4723. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt160>, PMID: 23482395
- Rohou A, Grigorieff N. 2015. CTFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of Structural Biology* **192**:216–221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.08.008>, PMID: 26278980
- Rouquette J, Choesmel V, Gleizes PE. 2005. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *The EMBO Journal* **24**:2862–2872. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600752>, PMID: 16037817
- Scaiola A, Peña C, Weisser M, Böhringer D, Leibundgut M, Klingauf-Nerurkar P, Gerhardt S, Panse VG, Ban N. 2018. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *The EMBO Journal* **37**:e98499. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201798499>, PMID: 29459436
- Scheres SH. 2012. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology* **180**:519–530. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>, PMID: 23000701
- Scheres SH. 2016. Processing of Structurally Heterogeneous Cryo-EM Data in RELION. *Methods in Enzymology* **579**:125–157. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012>, PMID: 27572726
- Schütz S, Fischer U, Altvater M, Nerurkar P, Peña C, Gerber M, Chang Y, Caesar S, Schubert OT, Schlenstedt G, Panse VG. 2014. A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *eLife* **3**:e03473. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.03473>, PMID: 25144938

- Schütz S**, Michel E, Damberger FF, Oplová M, Peña C, Leitner A, Aebersold R, Allain FH, Panse VG. 2018. Molecular basis for disassembly of an importin:ribosomal protein complex by the escortin Tsr2. *Nature Communications* **9**:3669. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06160-x>, PMID: 30201955
- Schwanhäusser B**, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**:337–342. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10098>, PMID: 21593866
- Selmer M**, Dunham CM, Murphy FV, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V. 2006. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**:1935–1942. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1131127>, PMID: 16959973
- Sloan KE**, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJ, Watkins NJ. 2013. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *Journal of Cell Biology* **200**:577–588. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201207131>, PMID: 23439679
- Soudet J**, Gélugne JP, Belhabich-Baumas K, Caizergues-Ferrer M, Mouglin A. 2010. Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **29**:80–92. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.307>, PMID: 19893492
- Strunk BS**, Novak MN, Young CL, Karbstein K. 2012. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* **150**:111–121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.044>, PMID: 22770215
- Sulima SO**, Hofman IJF, De Keersmaecker K, Dinman JD. 2017. How Ribosomes Translate Cancer. *Cancer Discovery* **7**:1069–1087. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0550>, PMID: 28923911
- Tafforeau L**, Zorbas C, Langhendries JL, Mullineux ST, Stamatopoulou V, Mullier R, Wacheul L, Lafontaine DL. 2013. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Molecular Cell* **51**:539–551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.011>, PMID: 23973377
- Thoms M**, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, Kratzat H, Hayn M, Mackens-Kiani T, Cheng J, Straub JH, Stürzel CM, Fröhlich T, Berninghausen O, Becker T, Kirchhoff F, Sparrer KMJ, Beckmann R. 2020. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* **369**:1249–1255. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc8665>, PMID: 32680882
- Timm DE**, Bowman V, Madsen R, Rauch C. 2018. Cryo-electron microscopy structure of a human PRMT5:mep50 complex. *PLOS ONE* **13**:e0193205. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193205>, PMID: 29518110
- Turowski TW**, Lebaron S, Zhang E, Peil L, Dudnakova T, Petfalski E, Granneman S, Rappsilber J, Tollervey D. 2014. Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Research* **42**:12189–12199. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku878>, PMID: 25294836
- Weis F**, Giudice E, Churcher M, Jin L, Hilcenko C, Wong CC, Traynor D, Kay RR, Warren AJ. 2015. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**:914–919. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3112>, PMID: 26479198
- Widmann B**, Wandrey F, Badertscher L, Wyler E, Pfannstiel J, Zemp I, Kutay U. 2012. The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits. *Molecular Biology of the Cell* **23**:22–35. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-07-0639>, PMID: 22072790
- Wyler E**, Zimmermann M, Widmann B, Gstaiger M, Pfannstiel J, Kutay U, Zemp I. 2011. Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies. *RNA* **17**:189–200. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.2325911>, PMID: 21097556
- Zemp I**, Wild T, O'Donohue MF, Wandrey F, Widmann B, Gleizes PE, Kutay U. 2009. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *Journal of Cell Biology* **185**:1167–1180. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200904048>, PMID: 19564402
- Zemp I**, Wandrey F, Rao S, Ashiono C, Wyler E, Montellese C, Kutay U. 2014. CK1δ and CK1ε are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation. *Journal of Cell Science* **127**:1242–1253. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.138719>, PMID: 24424021
- Zheng SQ**, Palovcak E, Armache JP, Verba KA, Cheng Y, Agard DA. 2017. MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature Methods* **14**:331–332. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4193>, PMID: 28250466
- Zivanov J**, Nakane T, Forsberg BO, Kimanius D, Hagen WJ, Lindahl E, Scheres SH. 2018. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* **7**:e42166. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42166>, PMID: 30412051

Figures and figure supplements

The final step of 40S ribosomal subunit maturation is controlled by a dual key lock

Laura Plassart et al

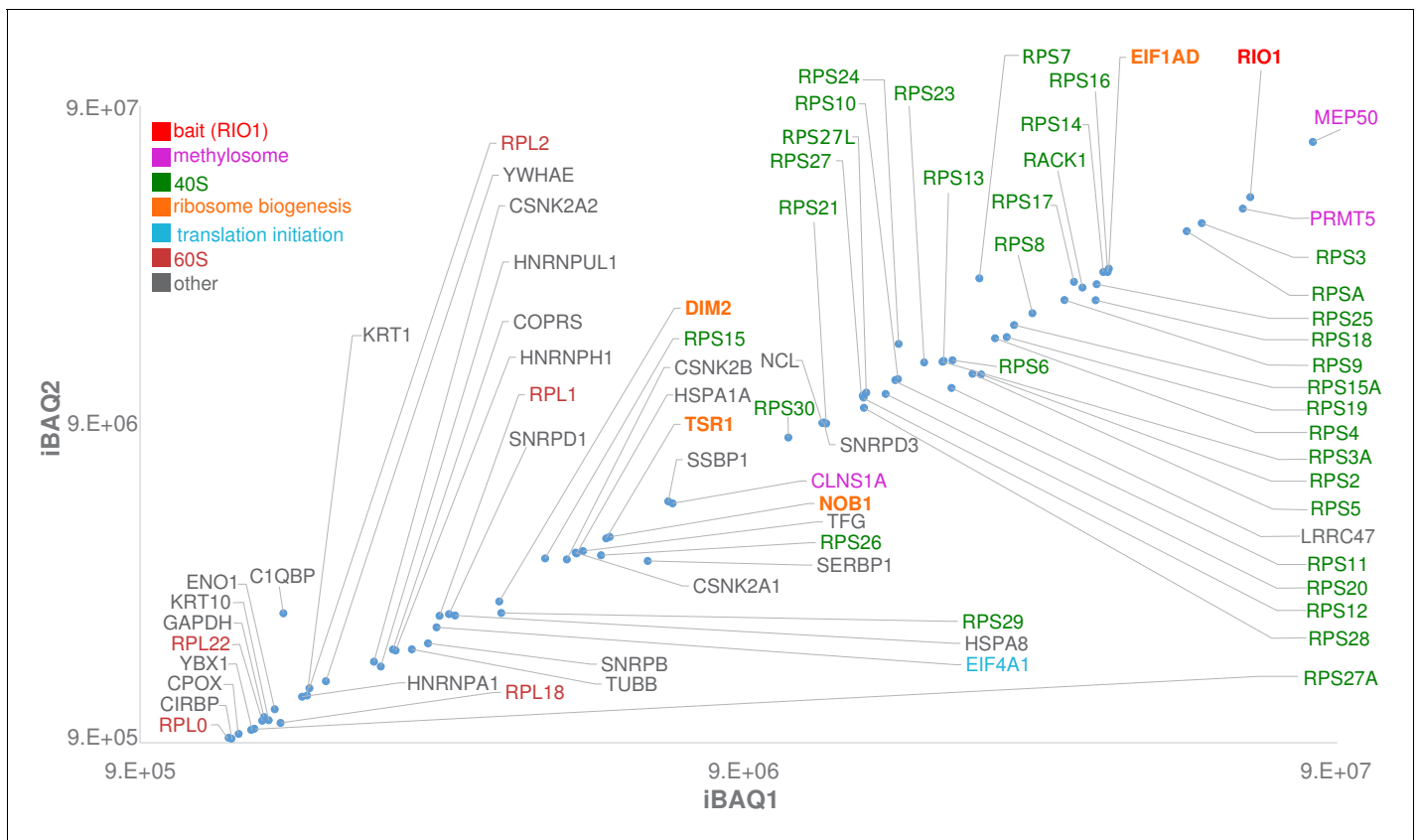


Figure 1. Label-free bottom-up proteomic analysis of RIO1(kd)-StHA co-purified proteins. The most intense proteins (first two logs) with an observed/observable peptide ratio > 30% are displayed and color coded as indicated on the graph. Three independent experimental replicates were performed. This plot represents iBAQs (intensity-based absolute quantification) of experimental replicate 1 (iBAQ1) against experimental replicate 2 (iBAQ2). The iBAQ value is obtained by dividing protein intensities by the number of theoretically observable tryptic peptides (*Schwanhäusser et al., 2011*). Other plots are displayed in **Figure 1—figure supplement 2**. Of note, USP16, which was recently identified as a key player in both ribosome biogenesis and translation (*Montelese et al., 2020*), was also identified among RIO1(kd)-StHA proteic partners. It ranked at the 62th position when quantifying proteins based on their normalized abundances and at the 98th position when quantifying proteins based on their iBAQs (see the PRIDE repository [*Perez-Riverol et al., 2019*]; dataset identifier: PXD019270).

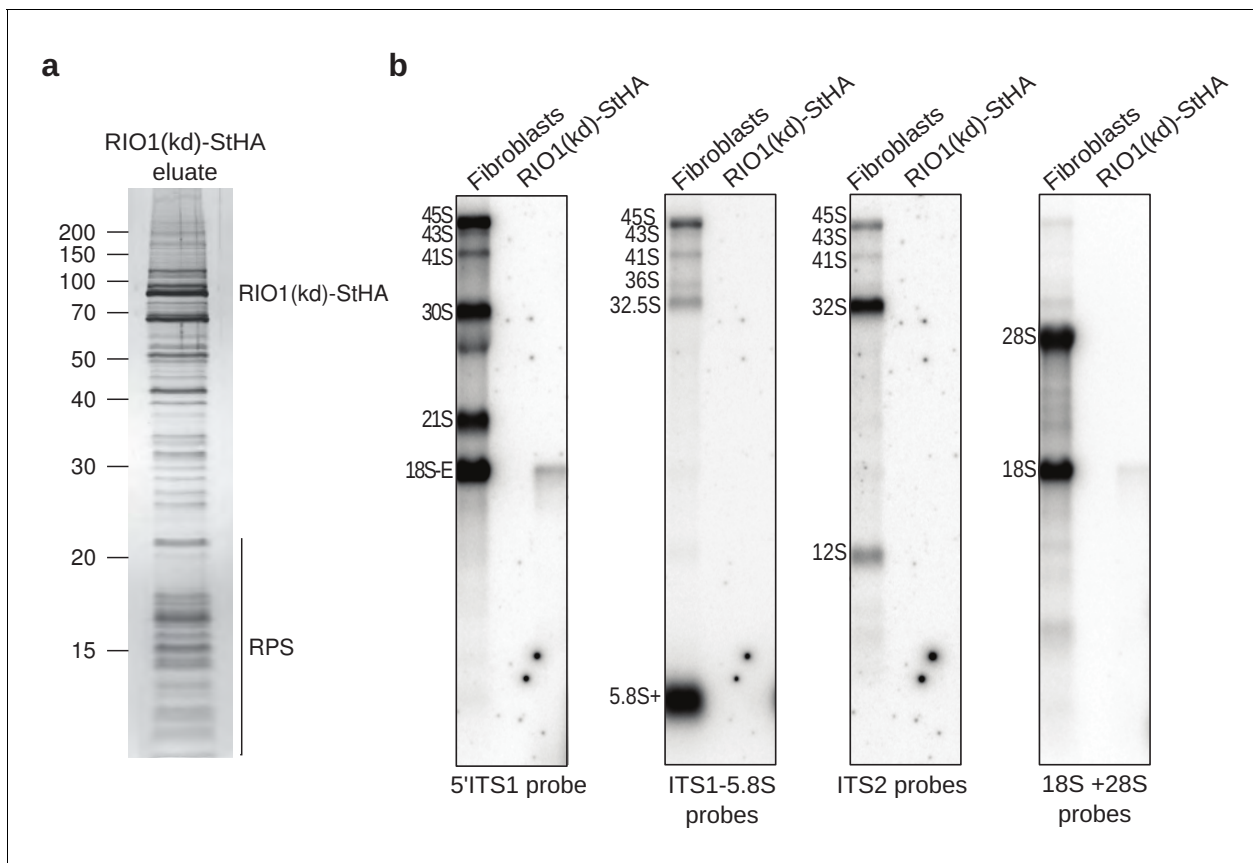


Figure 1—figure supplement 1. Purification of RIO1(kd)-StHA-containing particles. (a) RIO1(kd)-StHA purification products analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining. (b) Northern blot analysis of the RNA content of the RIO1(kd)-StHA pre-40S particles (right lanes) compared to fibroblast total RNA (left lanes), revealed with 5'ITS1, ITS1-5.8S, ITS2, and 18S + 28S probes (0.2 µg/lane).

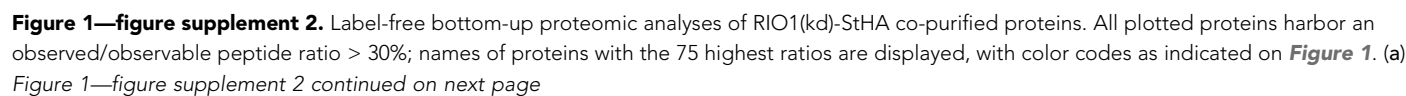


Figure 1—figure supplement 2 continued

iBAQs of experimental replicate 1 (iBAQ1) against experimental replicate 3 (iBAQ3). (b) iBAQs of experimental replicate 2 (iBAQ2) against experimental replicate 3 (iBAQ3).

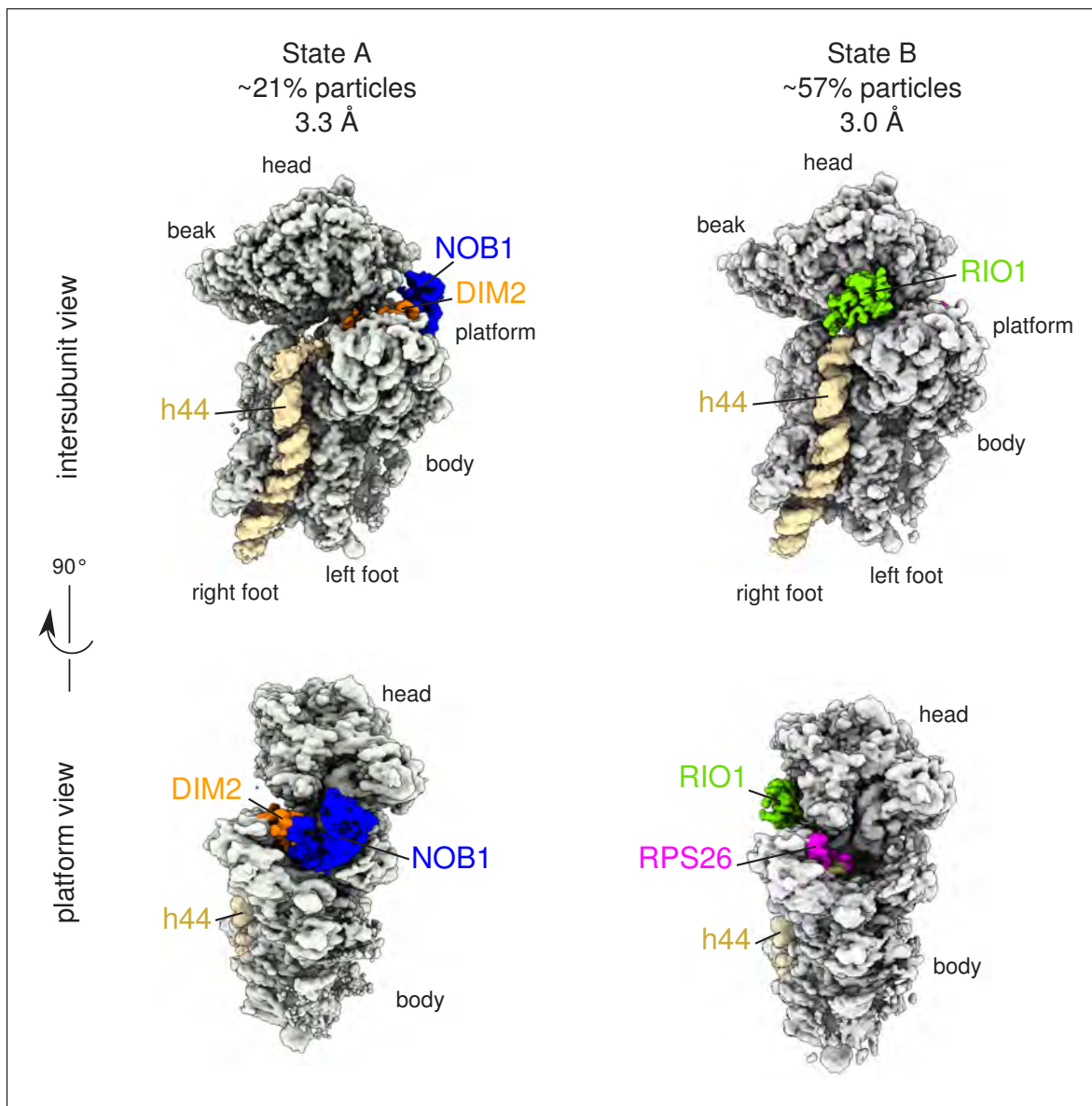


Figure 2. Cryo-EM and single-particle analysis reveal two distinct structural states, pre- (state A) and post- (state B) 18S-E rRNA cleavage. Surface views of cryo-EM maps of RIO1(kd)-StHA pre-40S particles in structural state A (left) and state B (right). Ribosomal proteins, rRNA segments, and RBFs of interest have been segmented and colored as indicated on the figure. Image processing details are shown in **Figure 2—figure supplements 1 and 2**.

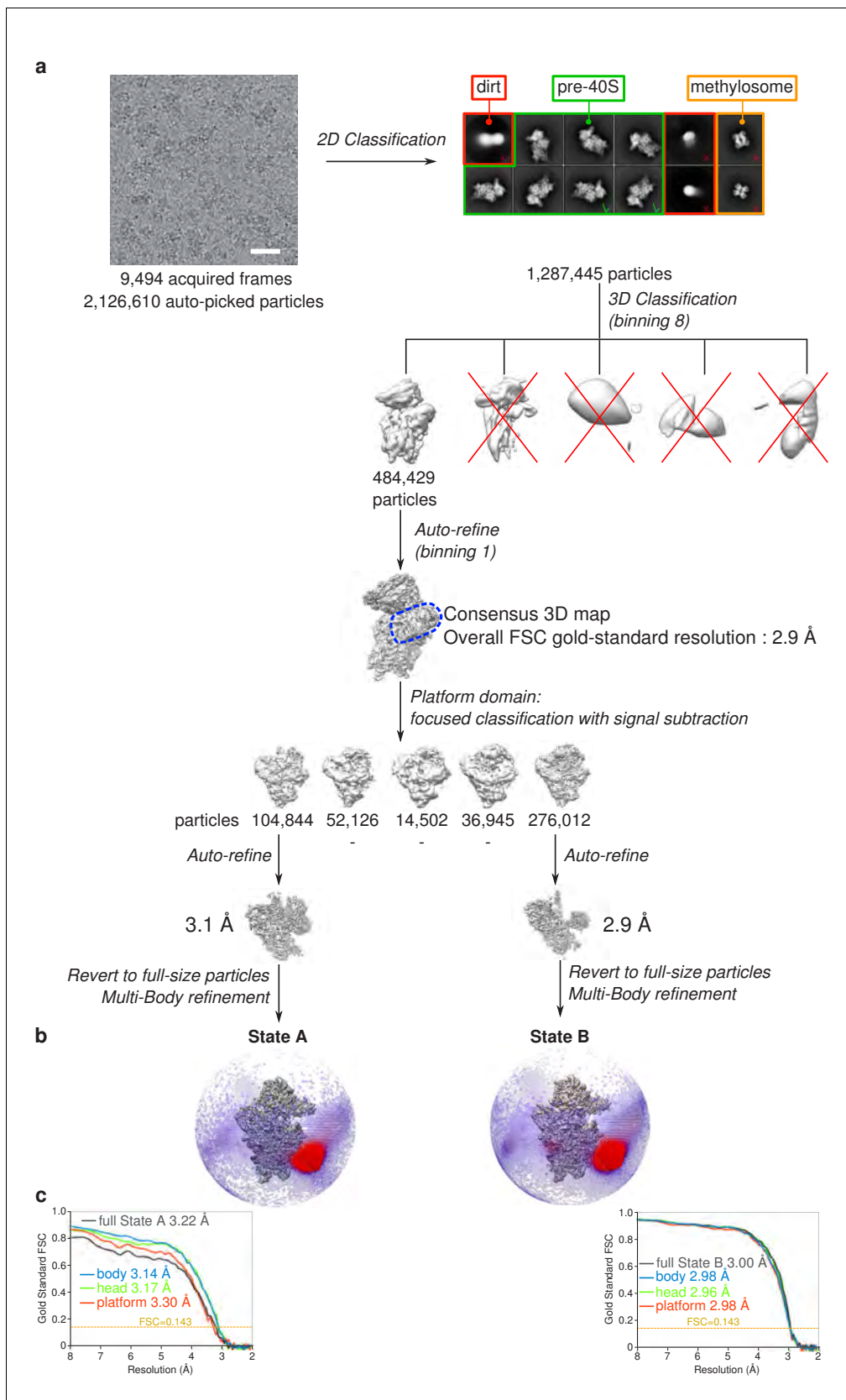


Figure 2—figure supplement 1. Cryo-EM image processing scheme. (a) Single-particle analysis strategy applied for obtaining the states A and B RIO1 (kd)-StHA structures. (b) States A (left) and B (right) cryo-EM maps and Euler angle distribution as seen along the interface side. (c) Gold-standard FSC curves for the various cryo-EM maps obtained for states A (left) and B (right).

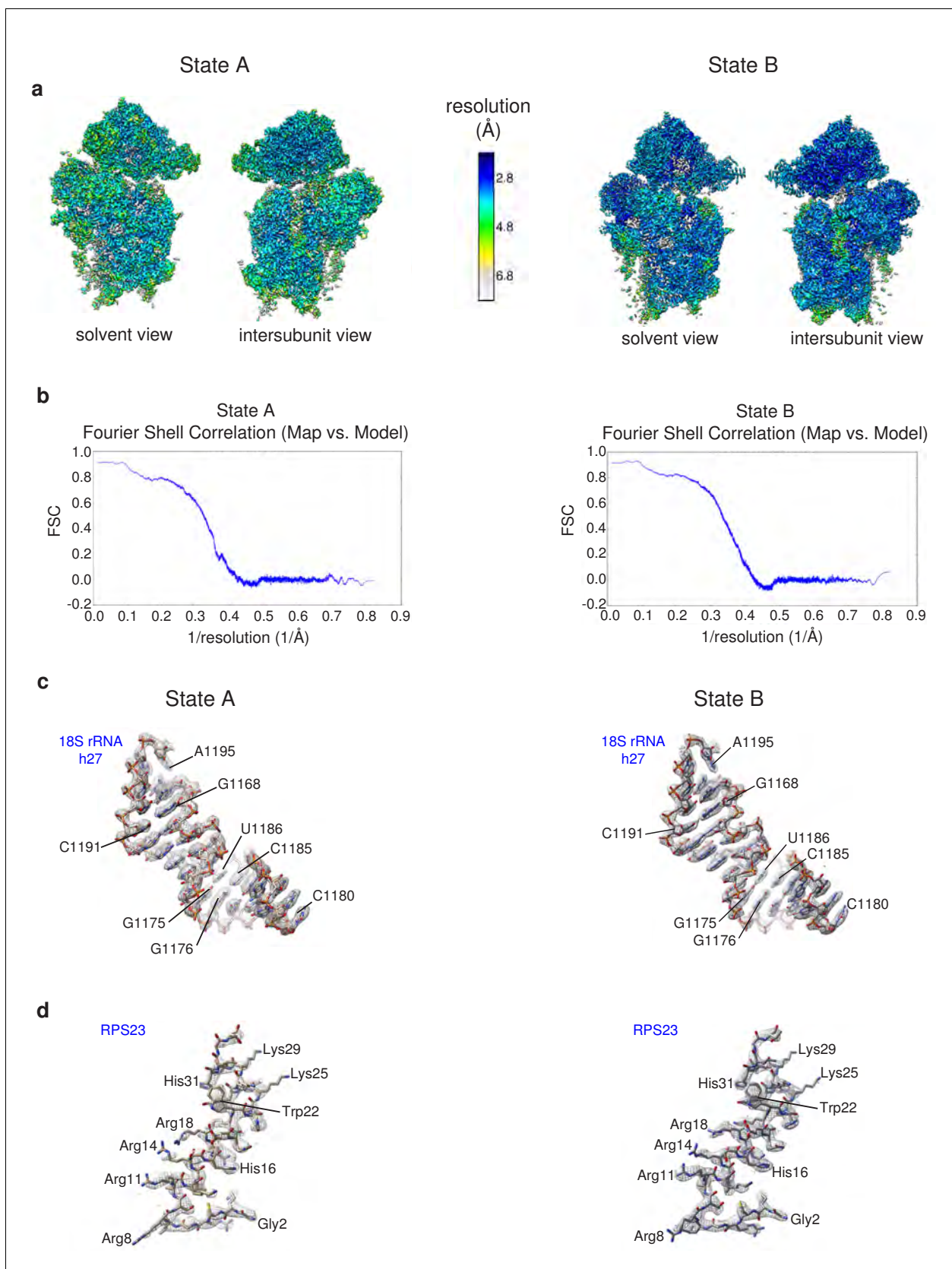


Figure 2—figure supplement 2. Details of the cryo-EM structures/model validation. (a) Composite post-processed maps of state A (left) and state B (right) colored according to local resolution estimations calculated by the Resmap program (Kucukelbir et al., 2014). (b) Validation of the atomic model using Fourier Shell Correlation (FSC) plots. Figure 2—figure supplement 2 continued on next page

Figure 2—figure supplement 2 continued

models derived from the cryo-EM maps of hRIO1(kd)-StHA pre-40S particles: model to map Fourier Shell Correlation estimation calculated by Molprobit for state A (left) and state B cryo-EM data. (c, d) Details of the atomic models of state A (left) and state B pre-40S particles showing 18S rRNA helix 27 (c) and N-terminal domain of RPS23 (d); cryo-EM map density is represented by a gray mesh.

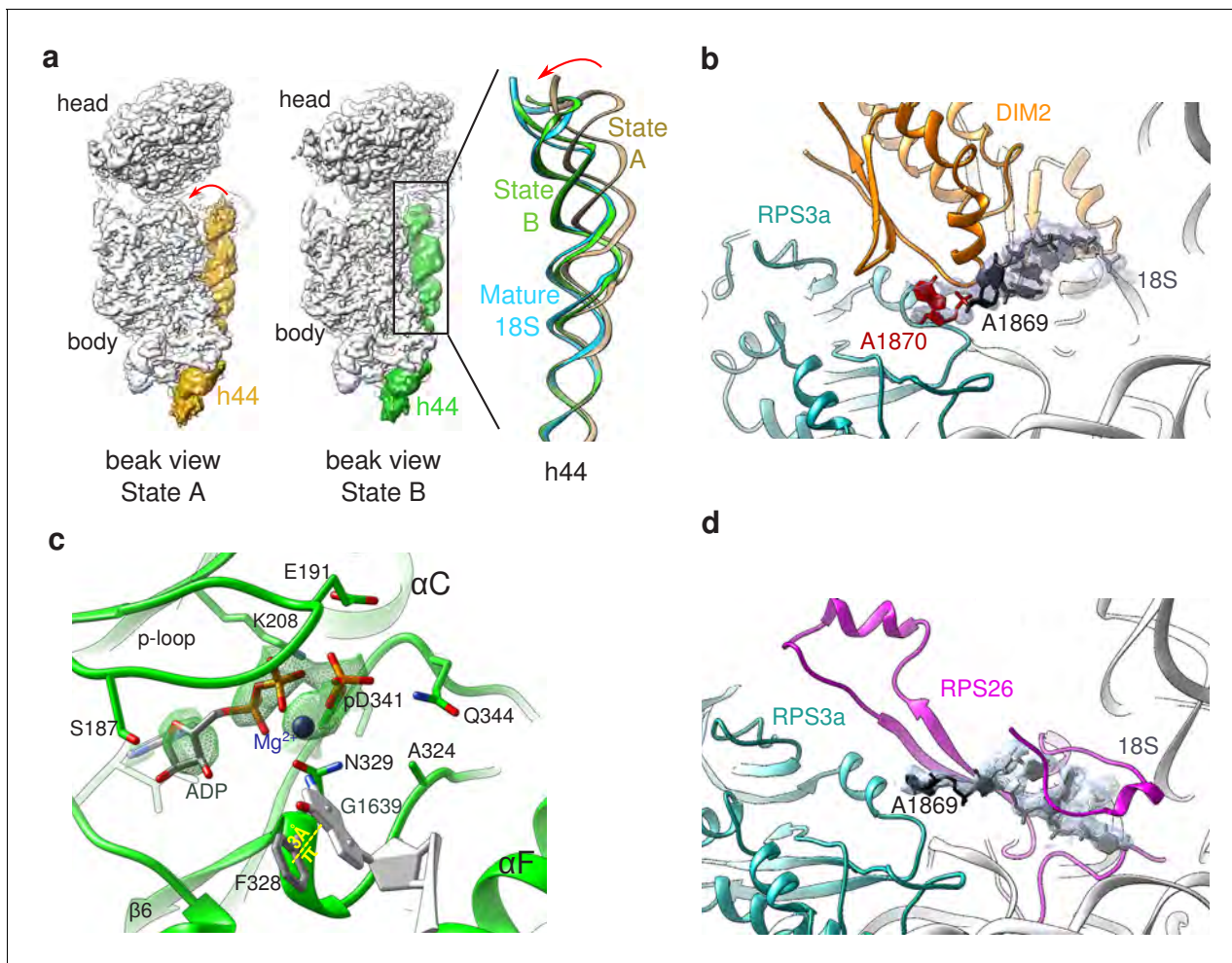


Figure 3. Structural details of RIO(kd)-StHA pre-40S particles. (a) The upper part of 18S rRNA helix h44 is in an immature position in structural state A. The cryo-EM density map corresponding to this helix has been segmented (beige density); the atomic model of rRNA h44 in structural state A is represented in golden; superimposed 18S rRNA h44 as found in structural state B and in the mature 40S subunit (PDB 6EK0 *Natchiar et al., 2018*) are in green and blue, respectively. (b) Close-up on the platform domain of structural state A. Segmented cryo-EM density corresponding to 18S-E pre-rRNA is shown as a grey mesh. The 3'-end of the mature 18S rRNA (nucleotides 1865–1869) is shown in black, while A1870 in the ITS1 is in red. The 18S rRNA is otherwise shown as a gray ribbon. DIM2 is in orange; RPS3a is in turquoise. NOB1 was removed from this representation for the sake of clarity. (c) The catalytic pocket of RIO1 is in an 'active' state within structural state B pre-40S particles, and carries an ADP and a phospho-aspartate (pD341). The cryo-EM density corresponding to ADP, p-Asp, and magnesium is shown as a green mesh. RIO1 is shown in green; ADP in dark gray, Mg^{2+} in dark violet, and 18S rRNA G1639 closing RIO1 catalytic domain by a pi-stacking interaction (yellow dashed line) with RIO1 Phe 328 in light gray. (d) Close-up on the platform domain of structural state B. Segmented cryo-EM density corresponding to 18S rRNA 3'-end is shown as a light gray mesh. 18S rRNA 3'-end (nucleotides 1865–1869) is shown in black, while otherwise as gray ribbon. RPS26 is in magenta and RPS3a in turquoise.

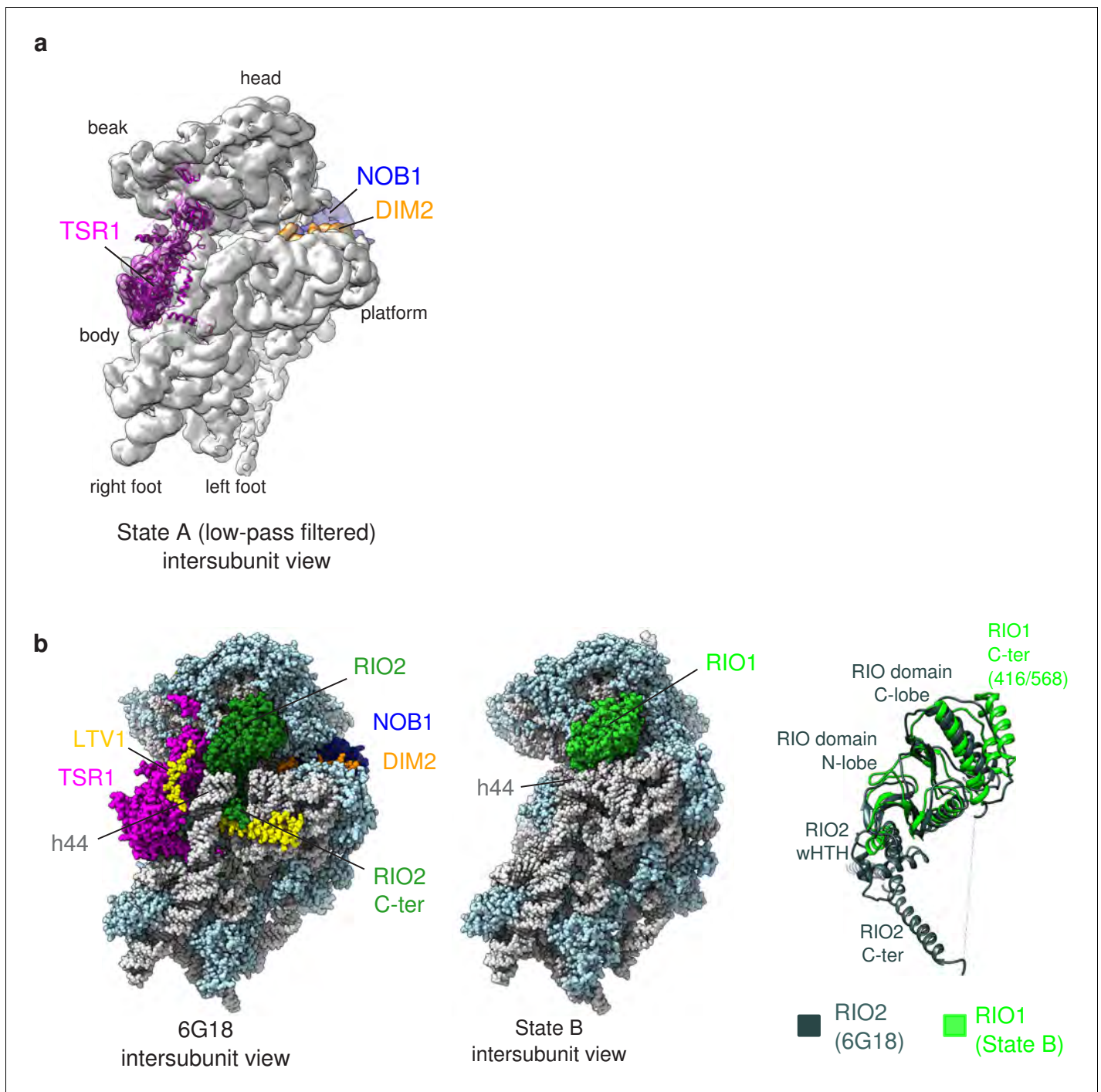


Figure 3—figure supplement 1. Details of the structural analysis of hRIO1(kd)-StHA pre-40S particles. (a) Low-pass filtered cryo-EM map of state A reveals a density on the intersubunit side under the beak (colored in magenta), which can unambiguously accommodate the atomic structure of TSR1 (ribbons colored in magenta; atomic model from [Ameismeier et al., 2018](#), PDB-ID 6G18). (b) RIO1 replaces RIO2 on the back of the head of pre-40S particles. (Left) Atomic model of intermediate cytoplasmic pre-40S particle (state C of [Ameismeier et al., 2018](#), PDB-ID 6G18) featuring RIO2, displayed in dark green. The upper part of rRNA helix h44 is lifted from the rest of the body, allowing the C-terminal domain of RIO2 as well as a domain of LTV1 (yellow) to be deeply inserted within the pre-40S particle. (Middle) Atomic model of state B of hRIO1(kd)-StHA pre-40S particles. RIO1 is shown in light green. The upper part of rRNA helix h44 is close to the rest of the particle, preventing the C-terminal domain of RIO1 to occupy this region. (Right) Superimposition of RIO2 (dark green) and RIO1 as found on the two pre-40S particles herein presented.

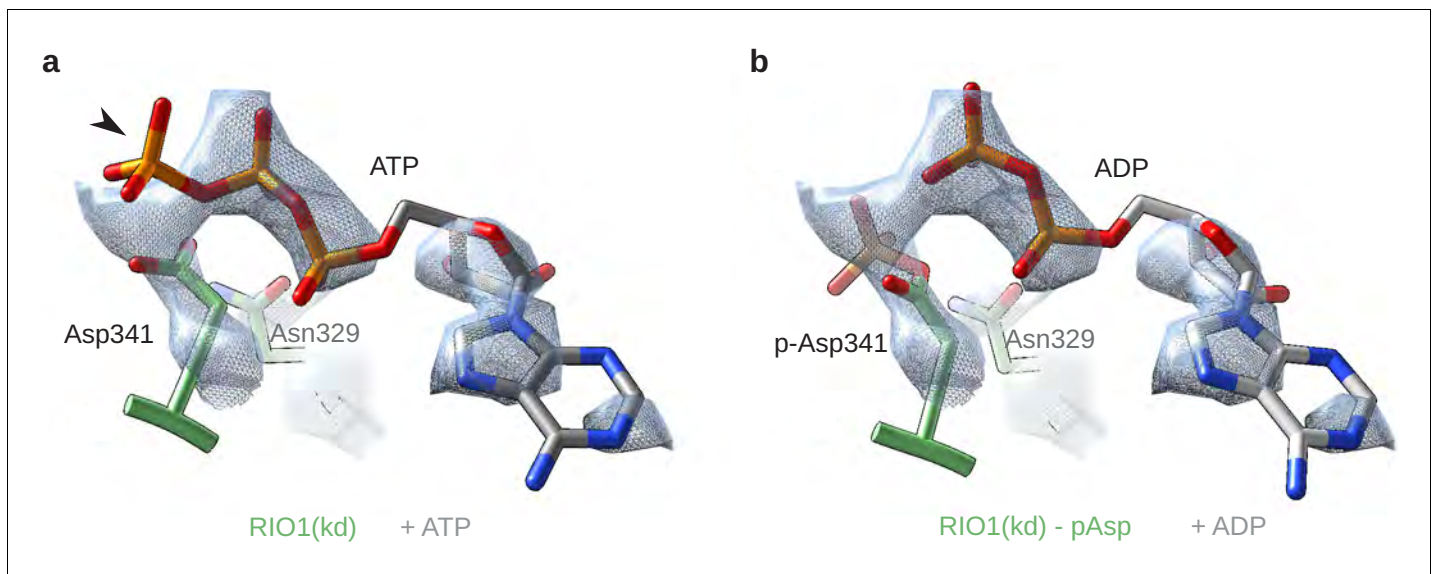


Figure 3—figure supplement 2. RIO1(kd) carries an hydrolyzed ATP in its catalytic site. (a) Cryo-EM density map (blue-gray mesh) of the catalytic site of RIO1 (green) fitted with an ATP molecule (gray/orange). The arrowhead shows the y-phosphate moiety sticking out of the EM density. (b) Same area of the cryo-EM map, this time fitted with an ADP (gray/orange) and a phospho-aspartate (p-Asp 341) carried by RIO1.

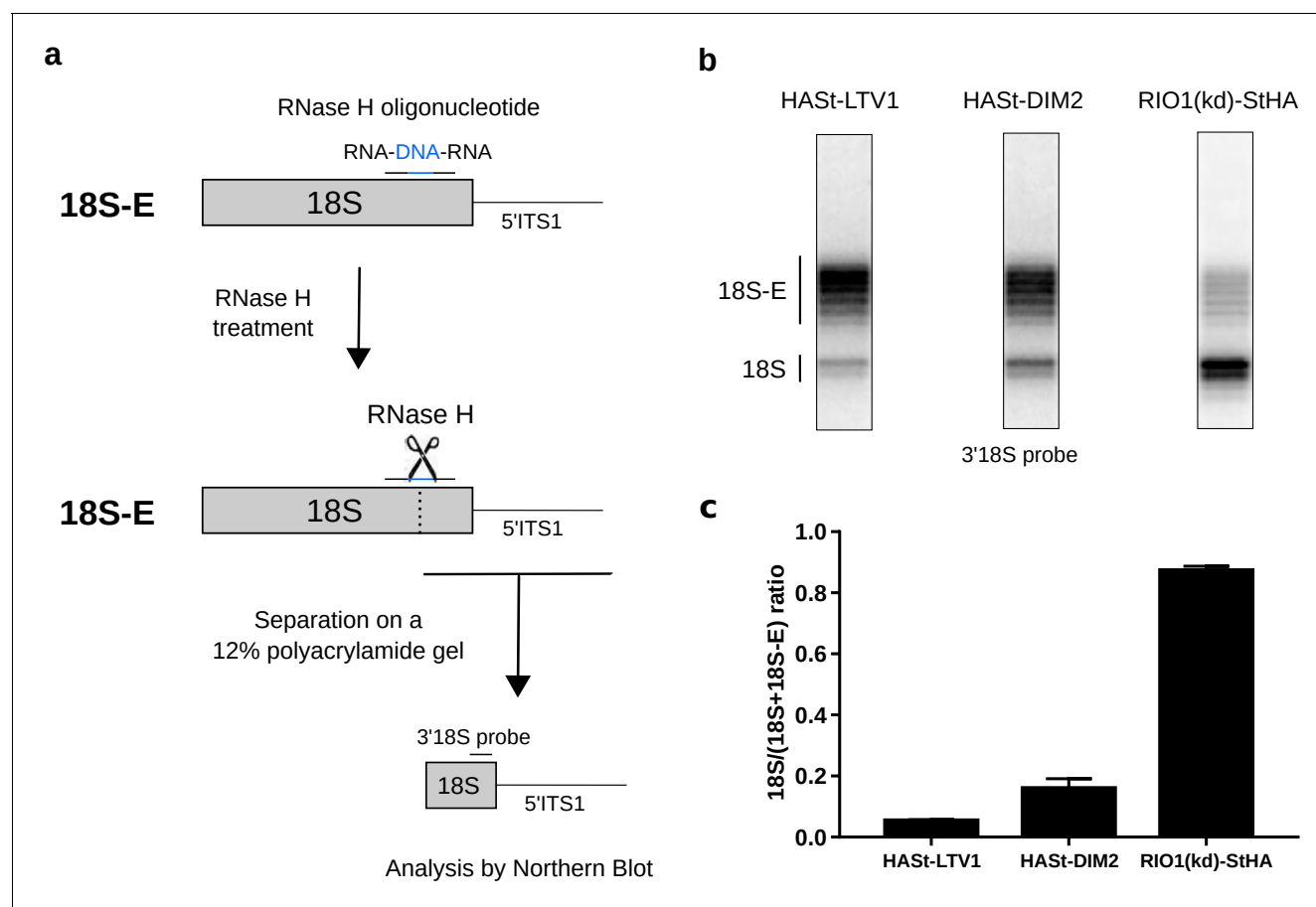


Figure 4. Late RIO1(kd)StHA pre-40S particles contain a high proportion of mature 18S rRNA. (a) Diagram representing steps of the pre-40S rRNA digestion by RNase H. (b) RNase H assays were performed on RNAs extracted from pre-40S particles purified with the mentioned StHA-tagged bait and separated on a 12% polyacrylamide gel. The 18S rRNA and its precursors were revealed by the 3'18S radiolabeled probe. Bands are separated with single nucleotide resolution, as shown in **Figure 4—figure supplement 1**. (c) Signals corresponding to the 18S-E and 18S rRNAs were quantified by phosphorimaging and represented by the 18S/(18S + 18S-E) ratio for the different purified pre-40S particles. The average of three independent experiments is shown, with the standard deviation indicated on top of the histogram.

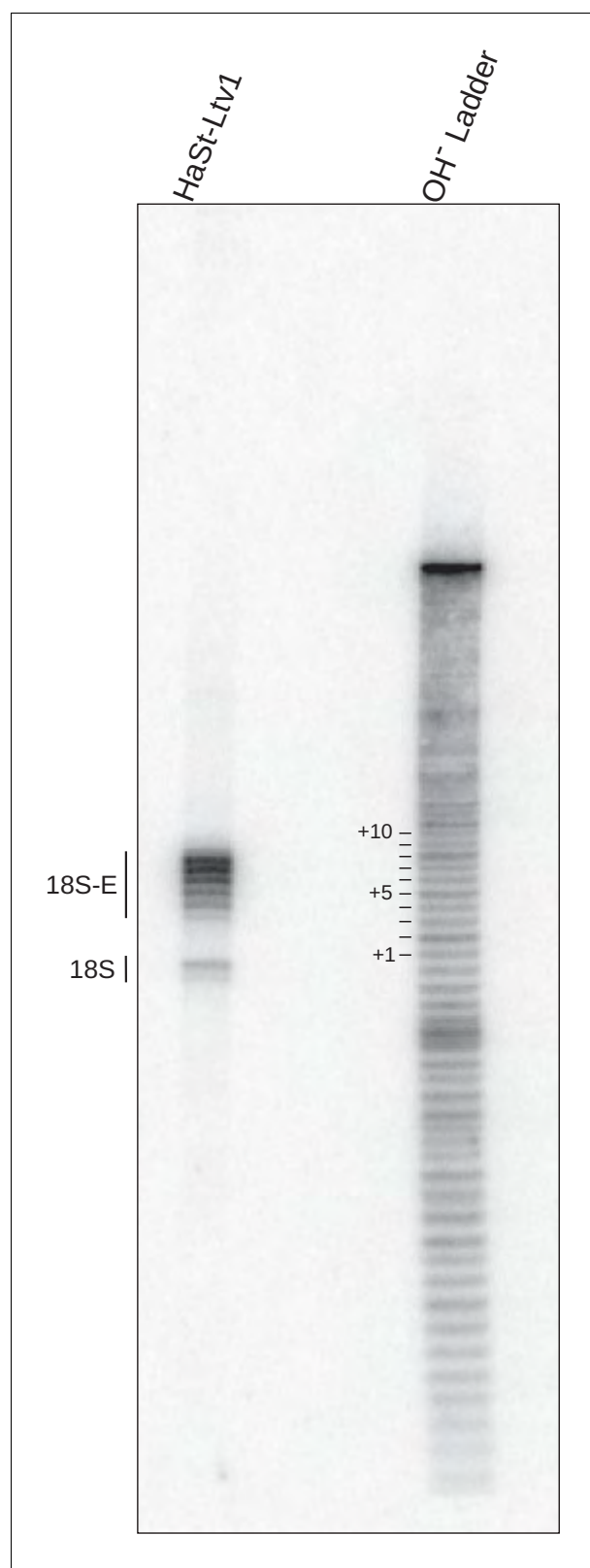


Figure 4—figure supplement 1. Assessment of the size of the ITS1 in purified pre-40S particles. Comparison of RNase H digestion and alkaline hydrolysis assays shows nucleotide resolution between bands. (Left) RNase H digestion of rRNAs from pre-40S particles purified using a HAST-tagged version of LTV1 as bait (HAST-LTV1).
Figure 4—figure supplement 1 continued on next page

Figure 4—figure supplement 1 continued

(Right) Alkaline hydrolysis (OH^- ladder) of an RNA molecule containing the 18S-ITS1 sequence recognized by the 3'18S probe at its 5' end (see **Supplementary file 1**). The samples were fractionated on a 12% polyacrylamide gel, and northern blot was probed with the 3'18S probe.

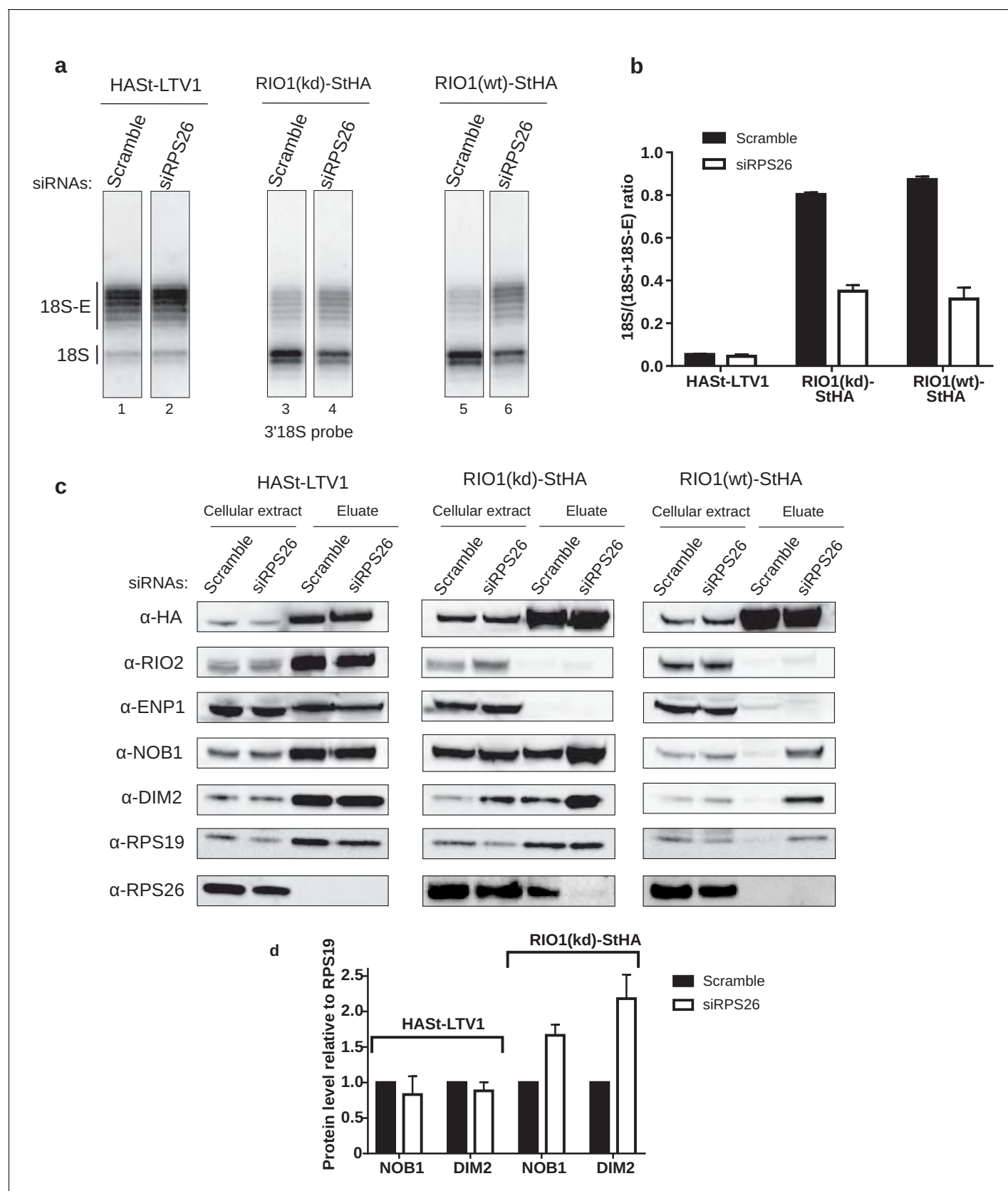


Figure 5. RPS26 is required for rRNA cleavage at site 3 as well as NOB1 and DIM2 release. HEK cell lines expressing tagged version of LTV1, the catalytically inactive RIO1-D324A (RIO1 (kd)) or wild-type RIO1 (RIO1(wt)) were treated with scramble or RPS26 siRNAs for 48 hr. (a) RNase H assays were

Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

conducted as in **Figure 4** on rRNAs of pre-40S particles purified with the mentioned StHA-tagged bait, either from RPS26-depleted or from control cells (scramble siRNA). **(b)** Signals corresponding to the 18S-E and 18S rRNA detected in **(a)** were quantified and represented as the 18S/(18S + 18S-E) ratio for the different pre-40S particles. Error bars, s.d. (n = 3) **(c)** Cell extracts and purified particles were analyzed by western blot using the indicated antibodies. **(d)** Bands corresponding to DIM2 and NOB1 (in the eluates) were quantified, corrected for pre-40S particle loading (using RPS19) and normalized to the control condition (set to 1). Error bars, s.d. (n = 3).

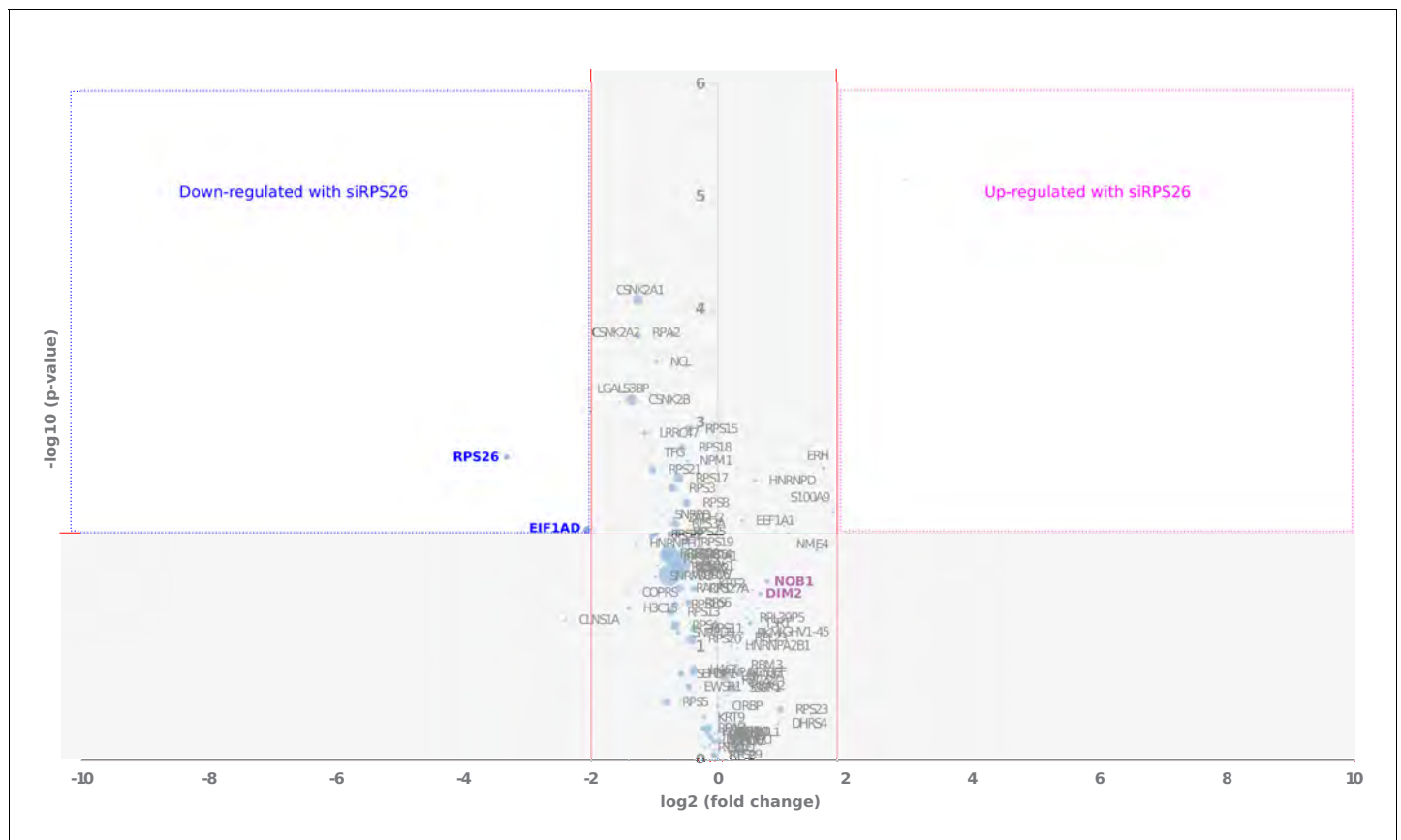


Figure 5—figure supplement 1. Comparative proteomics of RIO1(kd)-StHA particles composition upon RPS26 depletion. The Volcano plot shows in abscissa the fold change of protein abundance (siRPS26/control pre-40S particles), and in ordinate the statistical significance of the differential expression of a given protein (p -value of a t -test). The diameters of the dots are proportional to the mean IBAQ value calculated for each protein. Upper left (blue lining) and right (magenta lining) quadrants of the plots reveal proteins that are significantly up- or down-regulated within RIO1(kd)-StHA purified particles upon RPS26 depletion, respectively.

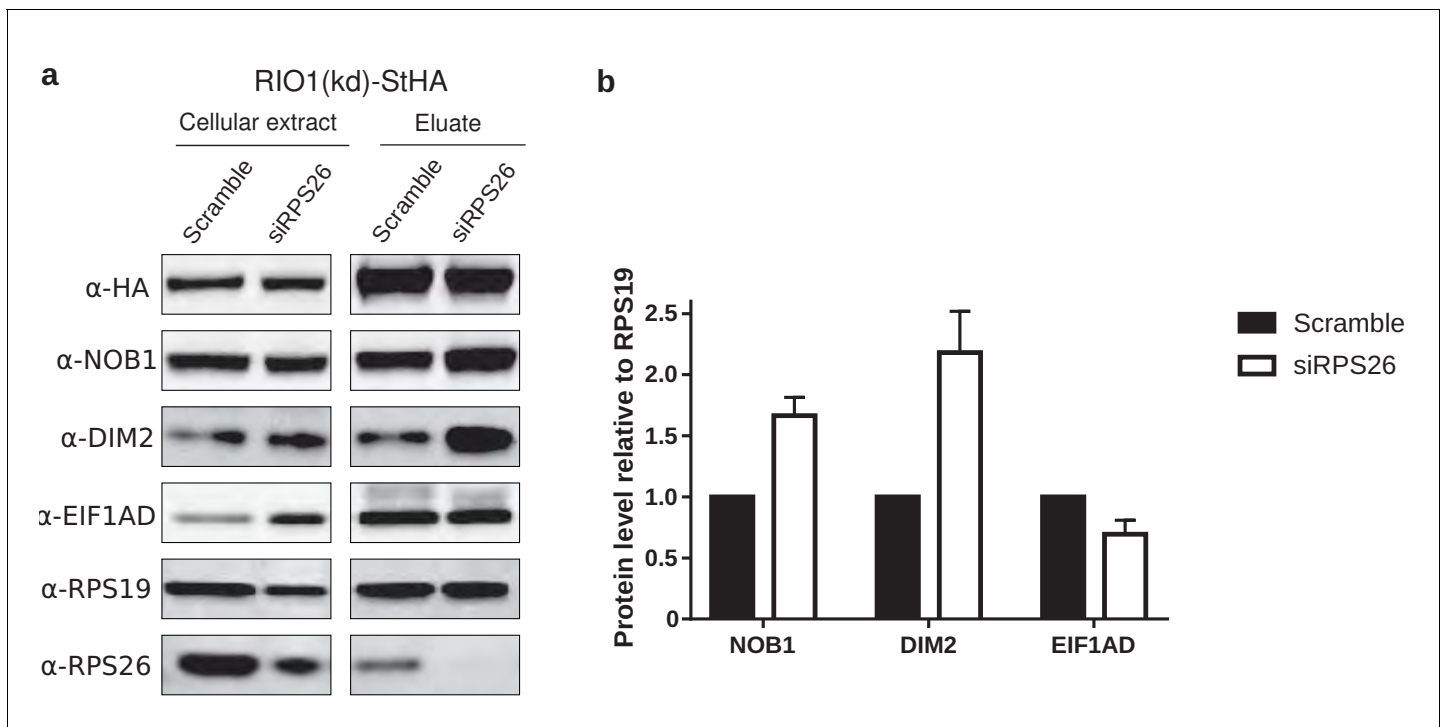


Figure 5—figure supplement 2. Western blot analysis of EIF1AD association to pre-40S particles upon depletion of RPS26. (a) Cell extracts and purified particles were analyzed by western blot using the indicated antibodies. (b) Bands corresponding to NOB1, DIM2, and EIF1AD (in the eluates) were quantified, corrected for pre-40S particle loading (using RPS19), and normalized to the control condition (set to 1). Error bars, s.d. (n = 3).

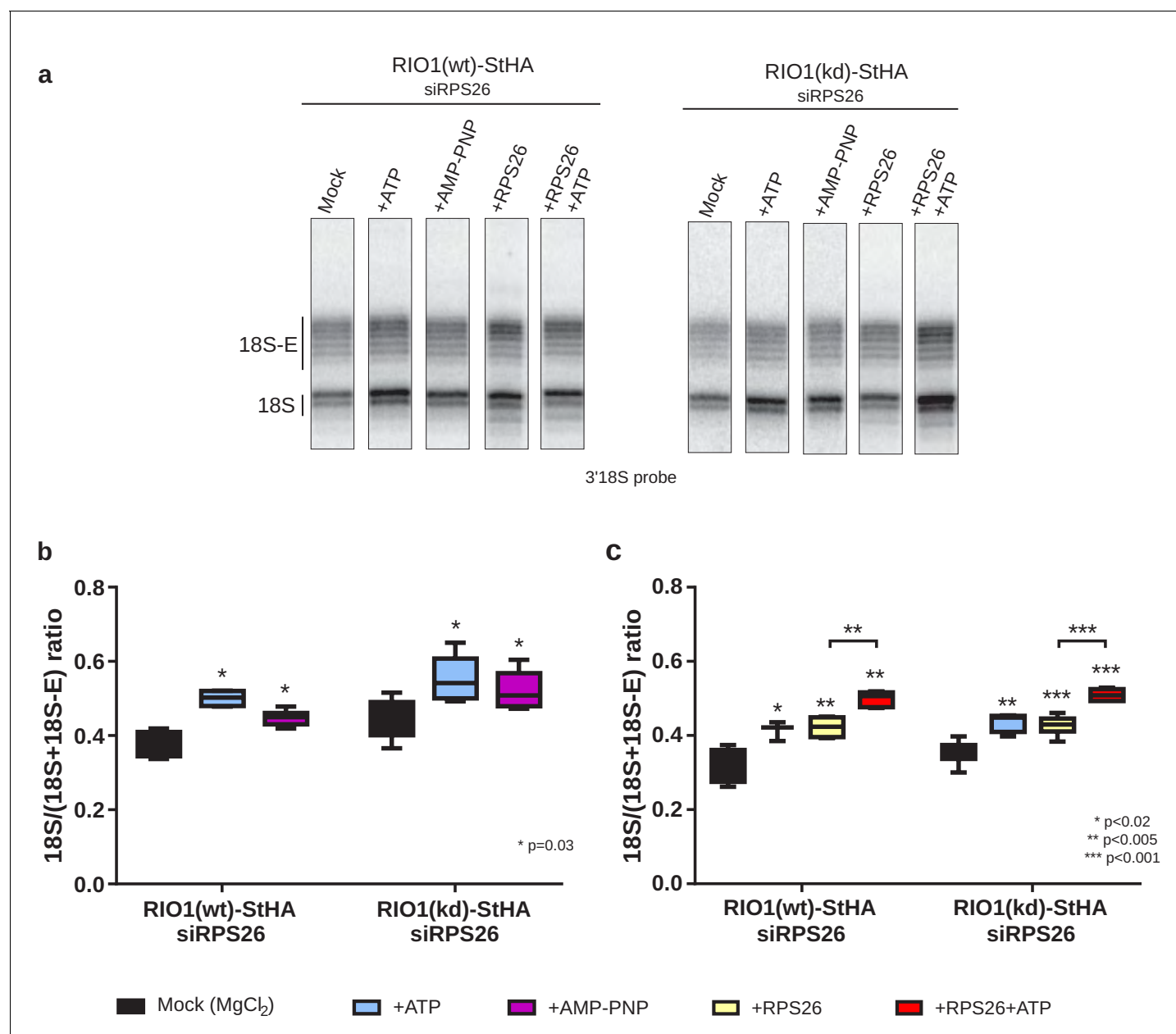


Figure 6. In vitro cleavage of the 18S-E pre-rRNA within pre-40S particles is stimulated by ATP addition. HEK cell lines expressing tagged versions of wild-type RIO1 'RIO1(wt)' or of the catalytically inactive 'RIO1(kd)' were treated with RPS26 siRNAs for 48 hr to enrich particles in state A. Pre-40S particles were purified and incubated for 1 hr in buffer alone (mock condition) or in the presence of either 1 mM ATP, 1 mM AMP-PNP, 2 μ g of RPS26, or 2 μ g of RPS26 plus 1 mM ATP. (a) RNAse H assays were performed on the RNAs extracted from the particles. (b) The variation of cleavage efficiency upon addition of ATP or AMP-PNP is indicated by the 18S/(18S + 18S-E) ratio. The data correspond to five independent experiments. Statistical analysis was performed with a unilateral paired Wilcoxon test ('sample greater than mock') indicating p-values of 0.031 for all samples. (c) The variation of cleavage efficiency upon addition of ATP and/or RPS26 is indicated by the 18S/(18S + 18S-E) ratio. The data correspond to three to six independent measurements for each point. Statistical analysis was performed with a unilateral unpaired Wilcoxon test ('sample greater than mock' or '+RPS26+ATP greater than +RPS26').

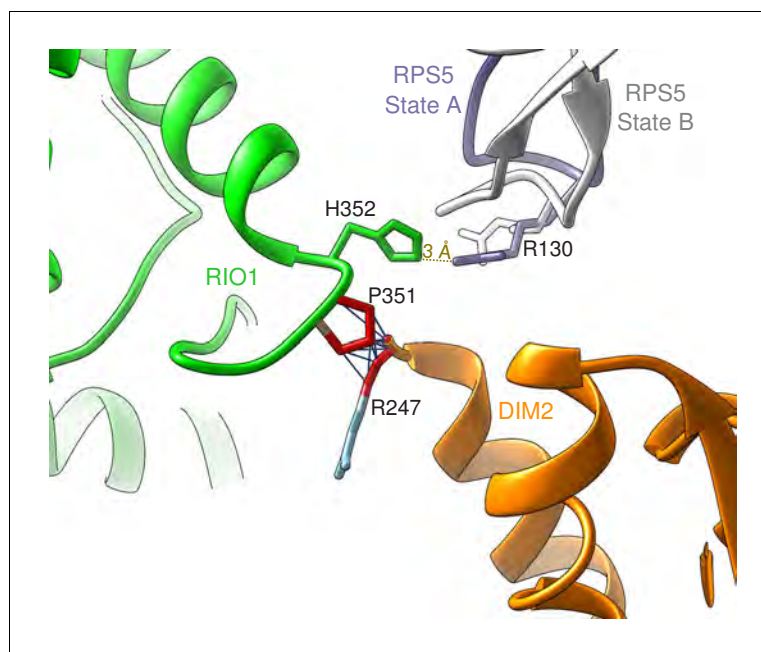


Figure 6—figure supplement 1. Superimposition of atomic models of states A and B reveals overlapping distances (gray lines) between atoms of Proline 351 from RIO1 (green) and of Arginine 247 from DIM2 (orange). RPS5, which seems to be repositioned upon association of RIO1/dissociation of DIM2 from the pre-40S particle, is shown in violet (state A) or white (state B).

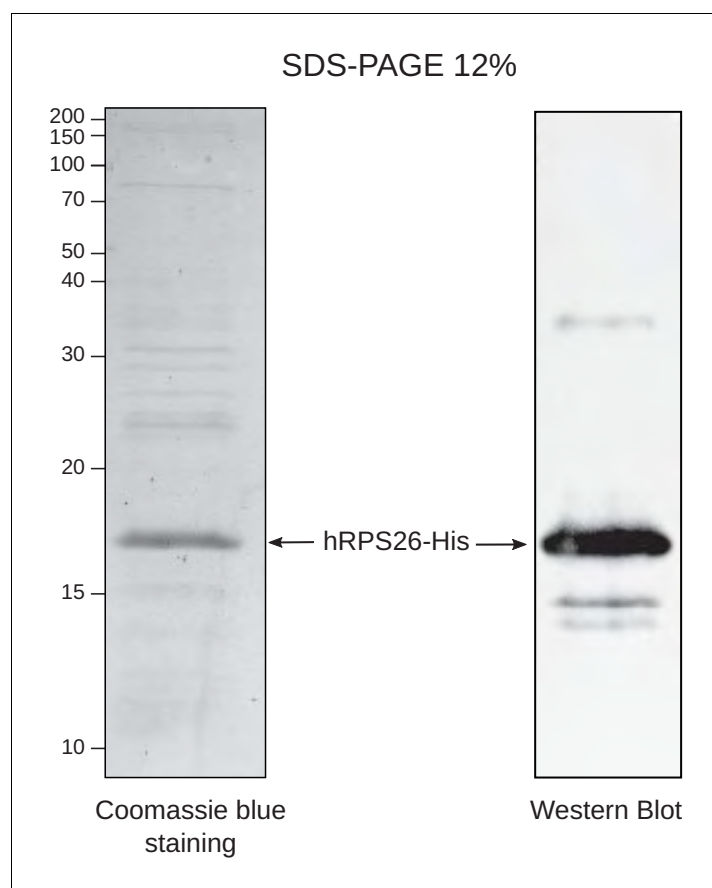


Figure 6—figure supplement 2. Purification of recombinant hRPS26-His. hRPS26-His purification analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or western blot.

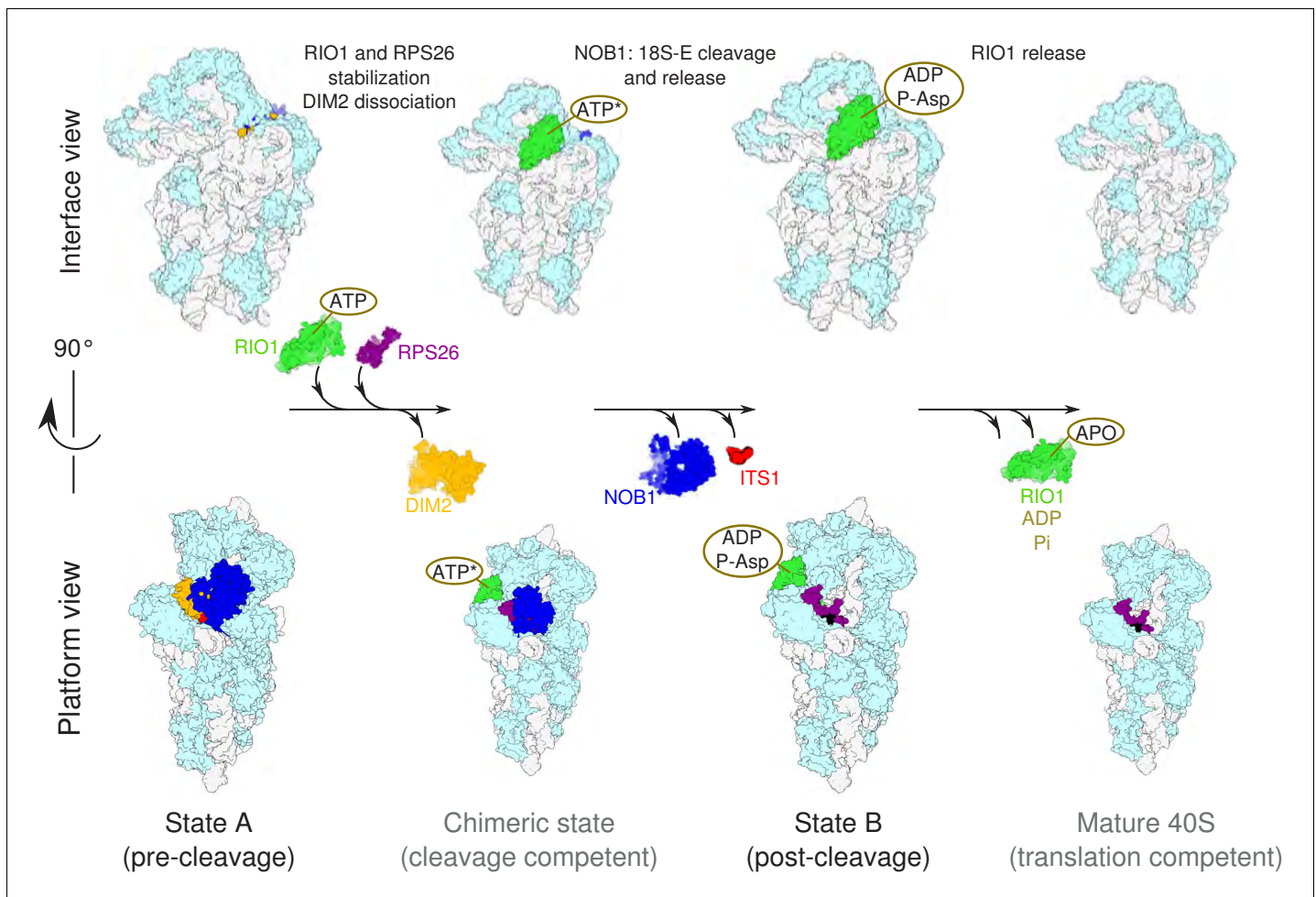


Figure 7. Model of the pre-40S last maturation steps triggered by RIO1 and RPS26. Upper and lower panels represent interface and platform views of the small ribosomal subunit, respectively. A putative ITS1 cleavage-competent state is shown to illustrate the transition between the pre-cleavage (state A) and post-cleavage (state B) structures that were resolved in this study. Status of ATP hydrolysis within RIO1 for this maturation state is not known, and thus marked as 'ATP*'.

3. Bilan et Perspectives

Cette analyse structure/fonction nous a permis de caractériser avec précision les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de la dernière étape de maturation de l'ARNr 18S par NOB1. Le rôle de la protéine ribosomique RPS26 et sa coopération avec l'ATPase RIO1 a pu être décrit. Mon travail m'a permis de mettre en place et réaliser l'ensemble des expériences fonctionnelles présentées dans cet article. Parmi ces données fonctionnelles, j'ai d'ailleurs pu, pour la première fois, mettre au point des expériences de clivage *in vitro* sur des particules pré-ribosomiques humaines. Ces expériences de clivage *in vitro* nous ont permis d'accéder à des informations clés sur le rôle de l'ATPase RIO1 et de RPS26 durant la maturation de l'ARNr 18S.

L'analyse structurale de particules pré-ribosomiques par cryo-EM est un champ de recherches très récent, et en plein essor. Les premières structures 3D haute résolution de particules pré-ribosomiques ont été publiées il y a environ 5 ans (Heuer et al., 2017; Kater et al., 2017; Scaiola et al., 2018; Wu et al., 2016). Du fait de la nouveauté de la technique et du sujet, les mécanismes proposés dans ces publications se basaient principalement sur les structures obtenues, et n'étaient que peu étayés par des analyses fonctionnelles. Dans notre cas, il nous a paru essentiel d'approfondir nos données structurales par des données fonctionnelles, afin de pouvoir proposer un modèle au plus proche de ce qui peut se passer dans la cellule. Ceci préfigure peut-être que la « simple » détermination de structure 3D par cryo-EM ne suffira plus pour publier dans des revues à fort impact.

Après la publication de cet article, j'ai tenté de compléter les données fonctionnelles concernant le facteur EIF1AD. Pour rappel, EIF1AD est retrouvé dans nos analyses de spectrométrie de masse après purification des particules pré-40S avec RIO1(kd), mais nous n'avons jamais pu voir ce facteur dans nos structures 3D. Une étude structurale très similaire à la nôtre, mais menée sur un nombre de particules bien plus élevé, a permis de visualiser la position d'EIF1AD sur des particules pré-40S tardives purifiées via RIO1(kd). Des analyses d'immunofluorescence dans des conditions de pertes de fonction suggèrent qu'EIF1AD serait un facteur de maturation de la petite sous-unité ribosomique, jamais identifié jusqu'alors (Ameismeier et al., 2020). Pour aller plus loin sur le rôle putatif d'EIF1AD dans la biogenèse de la petite sous-unité 40S nous avons voulu déterminer si EIF1AD était associé aux particules pré-40S tardives, ou plus spécifiquement à RIO1. Pour cela, j'ai réalisé, en complément des expériences réalisées dans l'article, des immunoprécipitations (IP) en utilisant l'anticorps α -EIF1AD. Les analyses en western blot montrent que seul RIO1 est immunoprécipité avec eIF1AD, et qu'aucune

des protéines ribosomiques testées n'est immunoprécipitée. L'interaction d'EIF1AD se ferait donc plus spécifiquement avec RIO1, et non directement avec la particule pré-40S. Ce résultat pose la question de savoir si EIF1AD a réellement un rôle dans la maturation de la petite sous-unité ribosome en tant que facteur de maturation ou est retrouvé dans ce processus via son interaction avec RIO1. RIO1 est connu pour appartenir à plusieurs complexes macromoléculaires dont le méthylosome (Widmann et al., 2012), une interaction forte entre RIO1 et eIF1AD influant sur l'association de RIO1 aux particules pré-ribosomiques n'est donc pas à exclure.

En perspective de ce projet, il serait intéressant de pouvoir décrire les mécanismes moléculaires qui permettent à RIO1 de venir s'associer aux pré-40S. En effet, on a vu dans cette étude, grâce aux structures cryo-EM, que RIO1 était positionnée à la même place que RIO2 sur la particule pré-40S. On peut alors se demander comment l'échange entre les deux protéines se fait, est-ce que RIO2 se dissocie des pré-40S ce qui laisse ensuite la place à RIO1. Ou faut-il une coopération entre RIO2 et RIO1 qui permettrait de déclencher le relargage de RIO2 et l'association consécutive de RIO1 ?

II. Caractérisation structurale et fonctionnelle de ribosomes mutants RPS15-P131S, “oncoribosomes”

Comme indiqué en introduction, de nombreuses mutations somatiques de protéines ribosomiques ont récemment été identifiées comme responsables de l'apparition de cancers (pour revue, (Sulima et al., 2017)). Par exemple, le gène codant pour la protéine ribosomique RPS15 est muté dans de nombreux cas de formes agressives de leucémies lymphoïdes chroniques (CLL). De manière intéressante, ces mutations sont retrouvées sur la partie C-terminale de RPS15, cette extrémité C-ter est spécifique des eucaryotes. Au sein de ce domaine, les résidus Proline 131 (Pro131), Histidine 137 (His137) et Sérine 138 (Ser138) sont ceux qui sont le plus hautement mutés dans les cas de CLL (Bretones et al., 2018). Les auteurs de cet article ont également étudié l'effet de la surexpression de cette protéine mutée sur des cellules humaines. D'une part, la mutation réduirait la stabilité de la protéine, ce qui pourrait impacter sa disponibilité pour s'incorporer dans des ribosomes fonctionnels. D'autre part, la fraction de RPS15 mutées incluse dans les ribosomes fonctionnels diminuerait la fidélité de la traduction, et altère globalement le protéome cellulaire. Ces observations sont étayées par une étude structurale récente, qui a montré le positionnement de l'extrémité C-terminale de la protéine RPS15 dans le site de décodage, et souligné son rôle dans l'élongation de la traduction (Bhaskar et al., 2020). Dans cet article il est proposé que la partie C-Ter de RPS15 permette le maintien de l'ARNt-aa « cognate » sur le codon de l'ARNm durant son accommodation dans le site A du ribosome. L'extrémité C-terminale de RPS15 interviendrait dans le maintien du cadre de lecture et donc dans le maintien de la fidélité de la traduction.

De plus, la protéine RPS15 est aussi nécessaire à l'export de la petite sous-unité pré-40S durant la biogenèse des ribosomes (Léger-Silvestre et al., 2004; O'Donohue et al., 2010; Rouquette et al., 2005).

La deuxième partie de ma thèse s'inscrit pleinement dans ce contexte. J'ai débuté ce projet, qui est également nouveau pour l'équipe, il y a environ un an. Mon but est de comprendre l'impact de mutations présentes sur RPS15 sur la synthèse protéique par les ribosomes, mais également sur les processus de biogenèse du ribosome dans ces conditions mutantes et oncogéniques. Je me suis intéressée plus particulièrement à l'étude de l'effet de la mutation ponctuelle P131S, car elle est l'une des plus répandues dans les cas de CLL (Bretones et al., 2018). Pour cela nous avons entamé une étude structure/fonction de ces « oncoribosomes ». Dans le cadre de ce projet, nous collaborons avec l'équipe du Pr Kim de Keersmaecker (KU Leuven), qui a utilisé des approches de Crispr-Cas9 afin de générer des lignées cellulaires lymphoïdes de souris (Ba/F3) n'exprimant que la protéine RPS15 mutée sur P131S. Nous disposons donc de lignées cellulaires Ba/F3 exprimant

RPS15 sauvage (WT) ou mutée (RPS15-P131S). Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai procédé à la purification et à l'analyse structurale, par cryo-EM, de polysomes WT et mutants, afin de pouvoir observer l'effet de la mutation sur des ribosomes en cours de traduction.

1. Préparation et caractérisation des polysomes de Ba/F3

a. Préparation des polysomes

Tout d'abord, afin de pouvoir observer l'impact que peut avoir la mutation P131S de RPS15 sur la traduction, il m'a fallu spécifiquement purifier des ribosomes en cours de traduction. C'est le cas des polysomes, qui sont formés de ribosomes actifs en cours de traduction et seraient donc constitués d'un mélange de plusieurs états du ribosome au cours de l'élongation. La première étape a donc été la purification des polysomes en conditions sauvage (WT) et mutante (RPS15-P131S) à partir des cellules Ba/F3. Le processus de préparation des polysomes est schématisé dans la **Figure 47**. Pour cela, une fois une quantité de cellules Ba/F3 suffisante atteinte ($\sim 60 \times 10^6$ cellules), elles sont lysées. Après clarification, l'extrait cytoplasmique obtenu est déposé sur un gradient de saccharose 10-50%, qui sera ensuite ultracentrifugé. Par la suite, le gradient est collecté et un profil de sédimentation est obtenu. Les fractions correspondant aux polysomes sont sélectionnées, elles vont ensuite passer par trois bains de dialyse successifs afin d'éliminer le sucre des fractions. L'échantillon de polysomes une fois dialysé devra être concentré afin d'obtenir un échantillon de polysomes ayant une concentration finale en ARN d'environ 500ng/ μ L. Cet échantillon de polysomes concentré sera finalement utilisé pour préparer des grilles de cryo-EM.

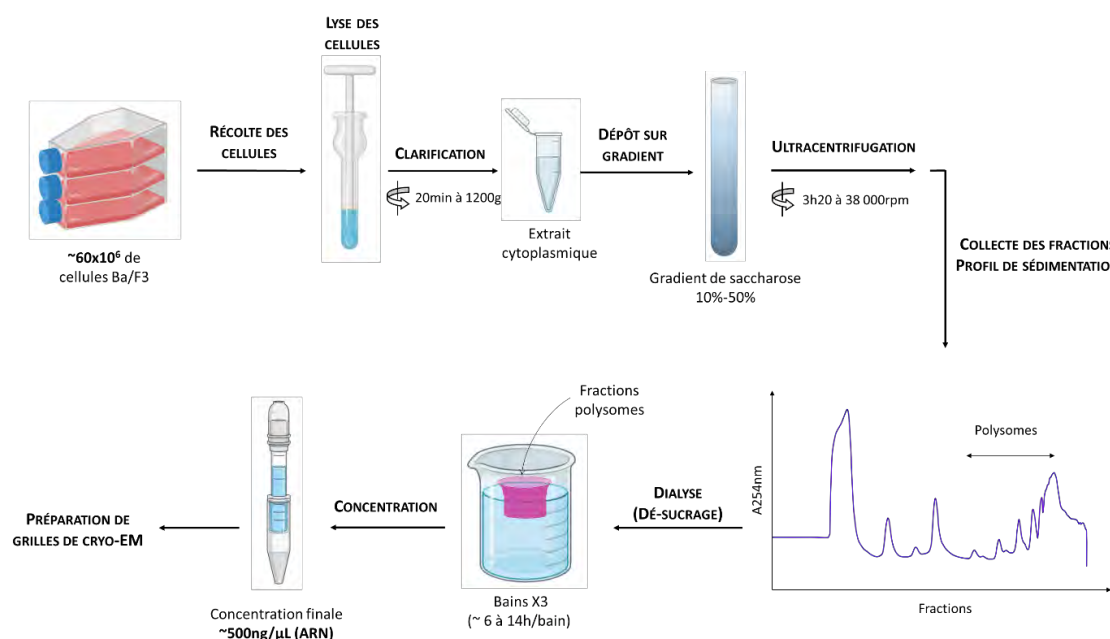


Figure 47 : Workflow de la préparation des polysomes à partir de cellules de Ba/F3. Le profil de sédimentation présenté correspond à un gradient réalisé à partir d'extrait cytoplasmique de cellules Ba/F3 WT.

b. Caractérisation des polysomes WT et RPS15-P131S

Lors de la purification des polysomes en condition WT et mutante par gradient de saccharose, les profils de sédimentation ainsi obtenus ont été analysés et comparés. L'analyse de ces profils de sédimentation nous a permis d'observer des effets de la mutation P131S de RPS15 sur la traduction (**Figure 48**). Il est important de préciser que cette expérience a été répétée au moins quatre fois, et que les mêmes effets sont à chaque fois observés.

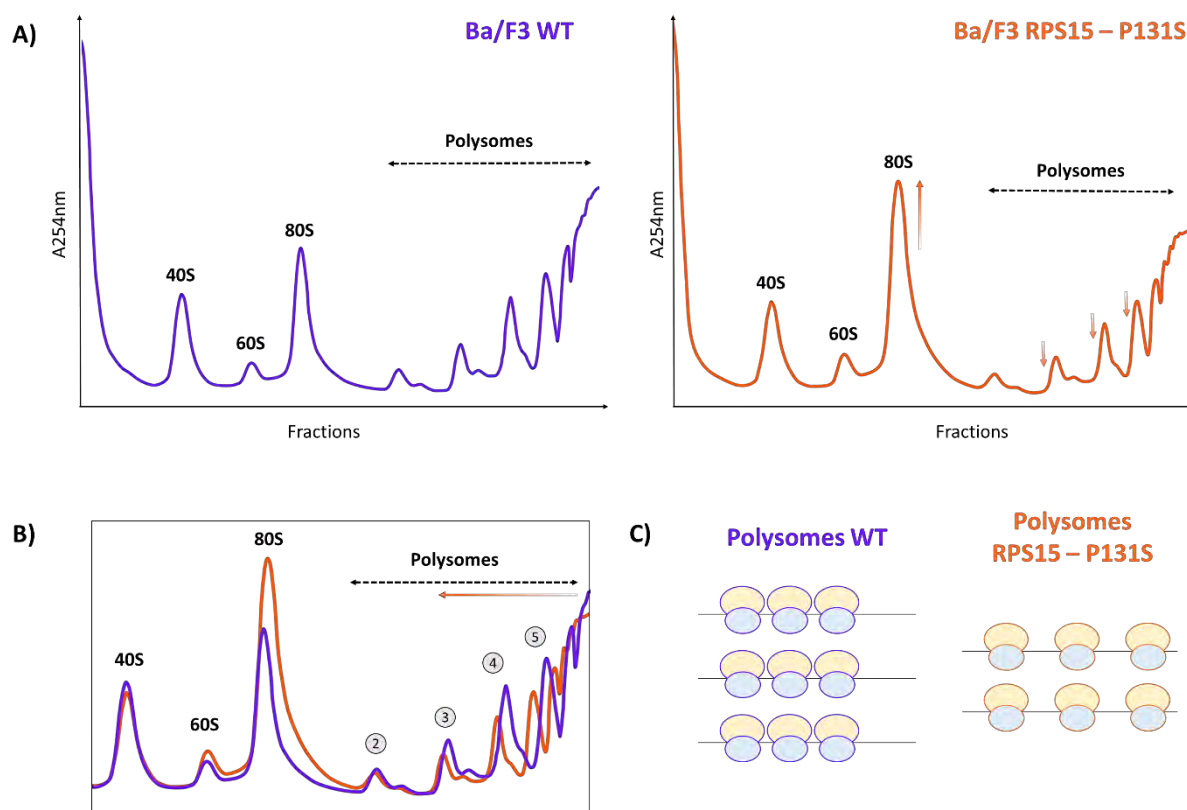


Figure 48 : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et RPS15-P131S. **A)** Profils de sédimentation obtenus à partir de gradients de saccharose 10-50% réalisés sur des extraits cytoplasmiques de cellules Ba/F3 WT (violet, panel de gauche) et RPS15-P131S (orange, panel de droite). Les effets de la mutation sur la hauteur des pics sont indiqués par des flèches oranges. **B)** Superposition des profils de sédimentation des conditions WT (violet) et RPS15-P131S (orange), le nombre de ribosome par ARNm est indiqué pour chacun des pics de polysome. **C)** Schéma d'interprétation des différences de sédimentation des polysomes selon les conditions indiquées, l'ARNm est représenté par une ligne noire, et les ribosomes par une sous-unité 40S bleue et une sous-unité 60S jaune.

Si l'on compare les profils de sédimentation de particules ribosomiques RPS15-P131S à celles de la condition WT, le pic correspondant aux particules 80S (pic de monosomes) augmente, tandis que ceux correspondant aux polysomes diminuent (**Figure 48A**). Ces données indiquent

une baisse globale du niveau de traduction en condition mutante. Le pic de monosomes (80S), qui comprend des ribosomes vides, des ribosomes en initiation de traduction ainsi que des ribosomes seuls en élongation sur de très petits ARNm (Arava et al., 2003), voit une forte augmentation en condition mutante. Ceci pourrait s'expliquer notamment par des défauts d'initiation de la traduction, qui empêcheraient les ribosomes mutants de passer vers la phase d'élongation. D'autre part, lorsque l'on superpose les profils de sédimentation des deux conditions (**Figure 48B**), on observe qu'à partir des 3-somes (3 ribosomes sur un ARNm), les pics des polysomes mutants sont « en avance » par rapport à ceux des sauvages. Les polysomes formés en condition mutante semblent moins denses, et donc migrent moins loin dans le gradient de saccharose par rapport à leurs homologues sauvages (**Figure 48C**). Plusieurs hypothèses, évoquées dans la revue de (Mathews et al., 2000), pourraient expliquer ce phénomène de moindre densité, et ne sont pas mutuellement exclusives : 1) la vitesse d'élongation est globalement plus lente pour les ribosomes mutants ; dans ce cas, le nombre de ribosomes pour un ARNm de longueur donnée serait réduit. 2) Le nombre de ribosomes qui « ratent un tour » et interrompent prématurément le cycle d'élongation (ribosomes abortifs) est augmenté en condition mutante. 3) l'initiation de la traduction est fortement ralentie en condition mutante, ce qui diminue la densité des ribosomes en élongation par ARNm. Il n'est pas forcément évident de trancher entre ces différentes hypothèses ; des analyses de polysome profiling (Ingolia et al., 2019) sont en cours qui pourront peut-être en partie répondre à cette question (cf. ci-après). L'utilisation de drogues pouvant bloquer spécifiquement l'initiation ou l'élongation de la traduction (Gerashchenko et al., 2021), ainsi que de composés permettant de booster ces processus (Polyamines (Dever and Ivanov, 2018)), pourrait également apporter des éléments de réponse (cf. ci-après).

L'ensemble de ces observations (augmentation du pic de monosomes, baisse globale du nombre de polysomes, ainsi que l'altération de la densité des polysomes mutants) met en évidence que la mutation RPS15-P131S diminue l'efficacité et la vitesse de traduction. Ceci renforce l'idée, suggérée par Bretones et al. (2018), que les processus de synthèse protéique sont globalement altérés pour ces « oncoribosomes ».

L'analyse des profils de sédimentation en saccharose est également utilisée en routine pour mettre en évidence des défauts de biogenèse des sous-unités ribosomiques. Par exemple, l'haplo-insuffisance de presque toutes les RPS induite par siRNA, puisqu'elle entraîne la baisse de biogenèse de la petite sous-unité ribosomique, induit une baisse drastique (voire la disparition) du pic de la sous-unité 40S et une augmentation nette du pic de la sous-unité 60S libre (O'Donohue et al., 2010). Dans le cas de la mutation ponctuelle RPS15-131S, les pics de chacune des sous-unités ribosomiques libres ne semblent que très peu modifiés par rapport aux conditions sauvages (**Figure 48A, B**). Le faible effet observé sur les profils de sédimentation présentés n'est

pas reproductible sur l'ensemble des profils de sédimentation réalisé. Ce résultat est en adéquation avec des données préliminaires d'analyses des pré-ARNr réalisés par Northern Blot, qui ne montrent pas non plus de différences majeures entre les précurseurs des ARNr des conditions WT et mutantes. La mutation RPS15 – P131S ne semble donc pas entraîner de défauts majeur de la maturation de la petite sous-unité ribosomique.

2. Analyse structurale des polysomes

a. Acquisition des images

Les grilles de cryo-EM préparées à partir des fractions de polysomes sont ensuite observées grâce au microscope électronique Talos Arctica de la plateforme METI de notre institut (cf. Matériels et Méthodes partie IV.2).

Au total, j'ai acquis trois jeux de données différents sur ce microscope : tout d'abord un premier jeu de 8 275 images de polysomes mutants (RPS15 - P131S). Celui-ci m'a principalement servi à mettre en place le processus global d'analyse des images, et notamment de trier l'hétérogénéité structurale, c'est-à-dire obtenir des structures 3D de ribosomes à différents états de traduction. Cependant, ce jeu a été obtenu à partir de plusieurs grilles de cryo-EM, qui ont été obtenues à partir de préparations de polysomes différentes, dont certaines issues de cellules en condition de stress, et d'autres congelées et vieilles de plusieurs mois. Les résultats de cette analyse ne seront pas présentés ici car l'état variable de l'échantillon ne permet pas d'assurer la validité des structures de ribosomes obtenues. Les deux autres jeux de données ont été obtenus à partir de grilles de cryo-EM préparées avec des préparations de polysomes « frais », issus de cellules en bonnes conditions métaboliques. Un jeu de données de 7 139 images pour les polysomes WT et un autre de 7 129 images pour les polysomes RPS15-P131S ont été acquis.

Sur les images des conditions WT et mutante il est possible d'observer la présence de ribosomes seuls, mais aussi de plusieurs ribosomes regroupés en polysomes, et donc vraisemblablement en cours de traduction (voir image sur la **Figure 50**).

b. Analyse d'images

Ces deux jeux de données ont ensuite été traités séparément avec le logiciel RELION 3.1, mais avec un processus d'analyse identique qui va être décrit par la suite (**Figures 49, 50**).

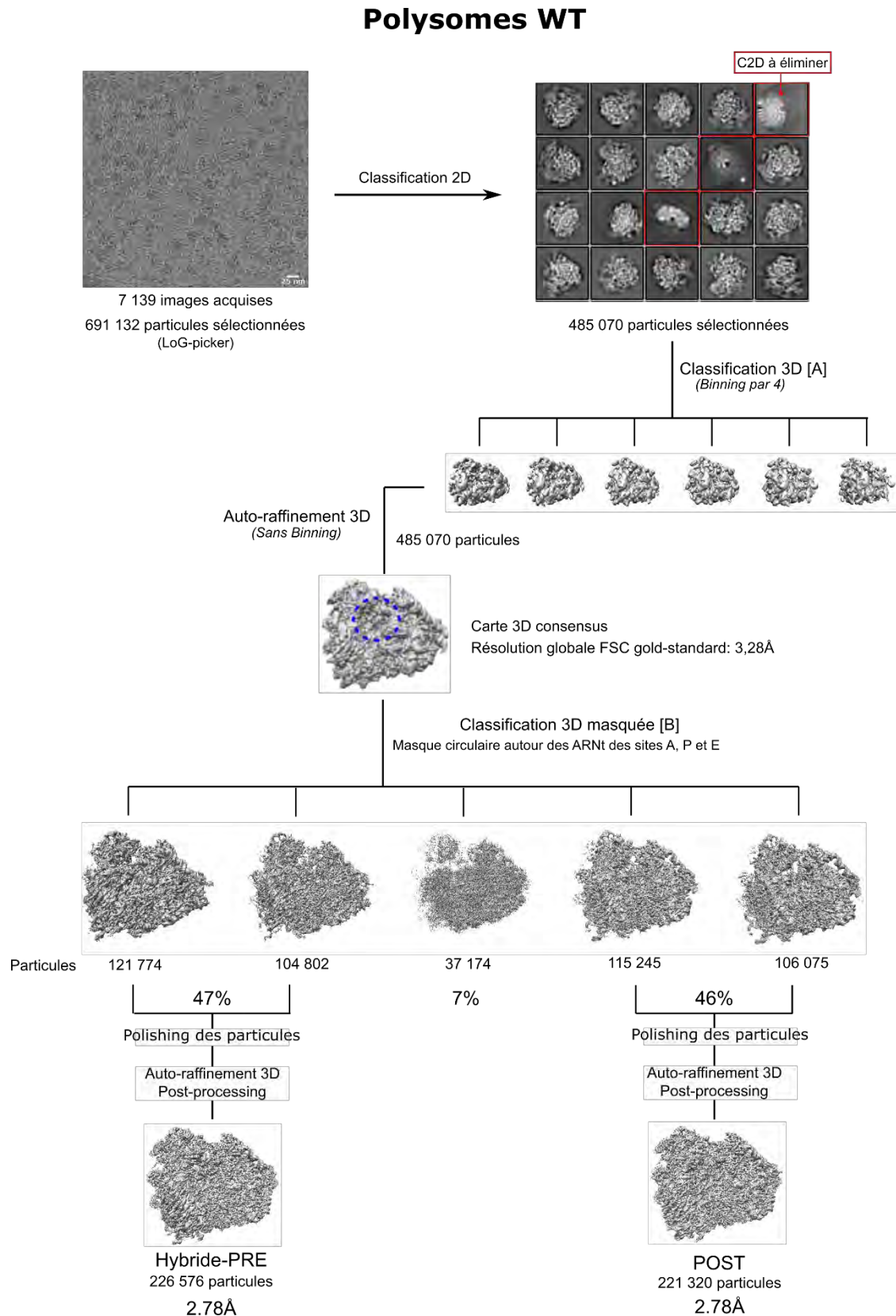


Figure 49 : Schéma récapitulatif des étapes de traitement des images cryo-EM des ribosomes WT. Deux états majoritaires d'élongation de la traduction ont été obtenus, appelés Hybride-PRE et POST et ont une résolution finale de 2,8 Å calculée après le polishing des particules et le post-processing.

Polysomes RPS15 P131S

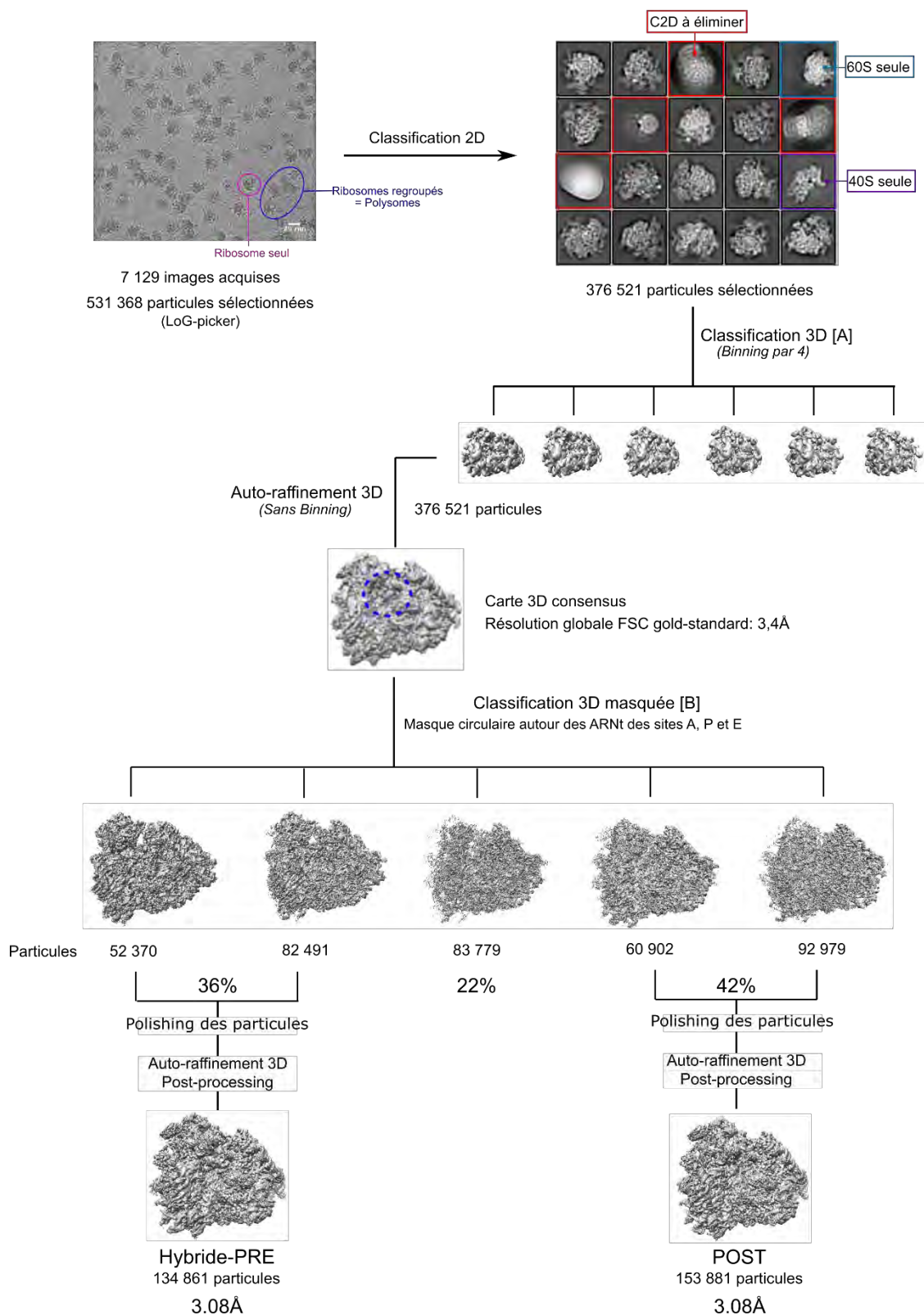


Figure 50 : Schéma récapitulatif des étapes de traitement des images cryo-EM des ribosomes mutants RPS15-P131S. Deux états d'élongation de la traduction majoritaires ont été obtenus : Hybride-PRE et POST et ont une résolution finale de 3,1 Å calculée après le polishing des particules et le post-processing.

Une première étape de pré-traitement des images doit tout d'abord être réalisée. Cette étape consiste à aligner et sommer les images d'un même champ, puis à estimer leur CTF. Ensuite, les particules correspondant à des ribosomes sont sélectionnées sur ces images de manière automatisée grâce au programme Laplacian-of-Gaussian (LoG). Puis, afin de faire un premier tri dans ces particules sélectionnées, une classification 2D de l'ensemble des particules est lancée. La classification 2D permet d'observer les différentes vues de nos particules, mais aussi d'éliminer des particules aberrantes qui ne correspondent pas à des ribosomes (bord de carbone, glace, autres macromolécules...).

La classification 2D des polysomes WT génère exclusivement des vues différentes de ribosomes, ainsi que des particules aberrantes (voir classes 2D **Figure 49**). Mais il est intéressant de noter que contrairement à l'échantillon WT, pour les ribosomes mutants, la classification 2D se compose à la fois de ribosomes, de particules aberrantes, mais aussi de sous-unités 60S et 40S libres (voir classes 2D **Figure 50**). Ceci pourrait indiquer un potentiel défaut d'association ou une plus grande facilité de dissociation des sous-unités ribosomiques. Pour chacun des jeux de données, seules les particules correspondant à des vues de ribosomes ont été gardées pour la suite du traitement.

Par la suite, afin d'éliminer d'éventuelles particules aberrantes résiduelles, une étape de classification 3D avec alignement a été réalisée sur les particules ribosomiques sélectionnées. Chacune des classes 3D obtenues représente des ribosomes entiers et bien définis, et pas de structure en blob qui proviendrait de particules aberrantes : cette étape de classification 3D n'a donc pas permis d'éliminer de particules supplémentaires pour la suite du traitement, et indique que le processus de « nettoyage » des particules a été correctement effectué (voir classification 3D [A] **Figures 49, 50**). À partir de l'ensemble de ces particules, une première structure 3D « consensus » a été obtenue par auto-raffinement 3D. La résolution de cette carte a été déterminée selon le « gold-standard FSC » de RELION (cf. Matériels et Méthodes partie V.2.e). Pour les ribosomes WT, l'auto-raffinement 3D de 485 070 particules a généré une structure 3D consensus à 3.3 Å de résolution. Pour les ribosomes RPS15-P131, la structure 3D consensus, obtenue à partir de 376 521 particules, a atteint une résolution de 3.4 Å. (voir cartes 3D consensus **Figures 49, 50**). Ces premières cartes « consensus » correspondent à un mélange des états structuraux des ribosomes présents dans chacun des échantillons.

Après avoir obtenu cette première structure 3D « consensus » du ribosome, basée sur l'ensemble des particules, nous avons voulu déterminer s'il existait plusieurs états structuraux du ribosome, à différentes étapes de l'élongation de la traduction par exemple. Ces états structuraux se différencient principalement par l'occupation des sites A, P et E des deux sous-unités ribosomiques par les ARNt (cf. Introduction partie III.2). Pour cela, j'ai lancé des classifications 3D

masquées sans imposer d'alignement. Différents masques ont été testés avant de trouver la zone du ribosome sur laquelle lancer la classification 3D, qui permettait le mieux de séparer les états structuraux. J'ai donc finalement utilisé un masque regroupant les trois ARNt. Ce masque est un masque circulaire créé sous Chimera qui correspond aux ARNt présents dans les sites A, P et E. Il a été réalisé à partir des modèles PDB 5AJ0 (état POST du ribosome humain dans Behrmann et al., 2015) et 6Y0G (état classique-PRE du ribosome humain dans Bhaskar et al., 2020) ajustés dans la carte consensus obtenue précédemment. En utilisant ce masque, j'ai réalisé une classification 3D dite focalisée (masquée et sans imposer d'alignement), et trié les particules en 5 classes 3D. Pour les deux types de ribosomes, cette étape a permis la distinction de deux états d'élongation du ribosome : les états Hybride-PRE et POST, qui correspondent aux étapes avant et après la translocation des ARNt des sites A et P vers les sites P et E, respectivement (cf. Introduction partie III.2 et classifications 3D masquées [B] **Figures 49, 50**). La validation de ces états d'élongation est discutée au paragraphe (d.) Interprétation des cartes. Pour chaque type de ribosome, les particules correspondant à chacun des états ont été regroupées, puis elles ont été polishées afin d'aider à améliorer la résolution de la carte de densité (Zivanov et al., 2019) (cf. Matériels et Méthodes partie V.2.g). Pour les ribosomes WT, les structures Hybride-PRE et POST représentent 226 576 (47%) et 221 320 (46%) particules, respectivement, et leur résolution, après auto-raffinement 3D et post-processing a été estimée à 2.8 Å. Pour les ribosomes RPS15-P131S, les structures Hybride-PRE et POST représentent 134 861 (36%) et 153 881 (42%) particules, respectivement, et leur résolution, après auto-raffinement 3D et post-processing a été estimée à 3.1 Å (voir panel du bas **Figures 49, 50**).

c. Modèles atomiques

À partir de ces cartes de cryo-EM, j'ai pu reconstituer un modèle atomique de ribosome de souris pour chacun des états d'élongation obtenus. Pour cela, je me suis basée sur des structures atomiques existantes : pour la sous-unité 60S, j'ai utilisé le modèle PDB 6SWA de souris (Kraushar et al., 2021). Pour la sous-unité 40S, c'est le modèle PDB 5AJ0 que j'ai employé, il correspond à une structure de ribosome humain dans un état POST (Behrmann et al., 2015). À partir de cette structure de sous-unité 40S humaine, j'ai modifié les protéines ribosomiques et l'ARNr 18S pour qu'ils correspondent aux éléments présents dans la sous-unité 40S de souris. Enfin, pour les ARNt je me suis servie de ceux présents dans les modèles atomiques PDB 5AJ0 et 6Y0G, cette dernière étant la structure d'un ribosome humain dans l'état Hybride-PRE (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020).

La qualité des cartes cryo-EM est globalement très bonne et permet de positionner sans ambiguïté les chaînes latérales de la plupart des acides aminés des protéines ribosomiques.

L'exemple de la protéine RPS23 de la carte WT/POST est présenté dans la **Figure 51A**. De plus, les cartes de cryo-EM nous ont aussi permis de distinguer clairement la majorité des nucléotides des ARNr, avec des densités distinctes pour les phosphates, les bases et les sucres, ainsi que certaines modifications de l'ARNr. La **Figure 51B** montre les modifications clairement identifiées pour les nucléotides A1031, C1248, C1842 de l'ARNr 18S. Ces modifications de l'ARNr 18S sont visibles à la fois sur les ribosomes WT et mutants. Les modifications des ARNr de souris n'ont, à ce jour, pas été déterminées de manière systématique. Certaines modifications des ARNr sont altérées dans différents types de cancer (Dalla Venezia et al., 2019; Marcel et al., 2013). Dans le cadre de ce projet de recherche, des analyses de RiboMethSeq sont actuellement menées par le Dr. F. Catez, de l'équipe du Dr JJ Diaz (CRC Lyon), afin de déterminer si les mutations affectant la protéine ribosomique RPS15 ont également un impact sur les 2'O-méthylations des ARNr « mutants ». Les structures que j'ai obtenues vont pouvoir être utilisées comme un outil supplémentaire afin de valider la présence de certaines modifications dans les ribosomes WT et RPS15-P131S quand celles-ci sont visibles en cryo-EM.

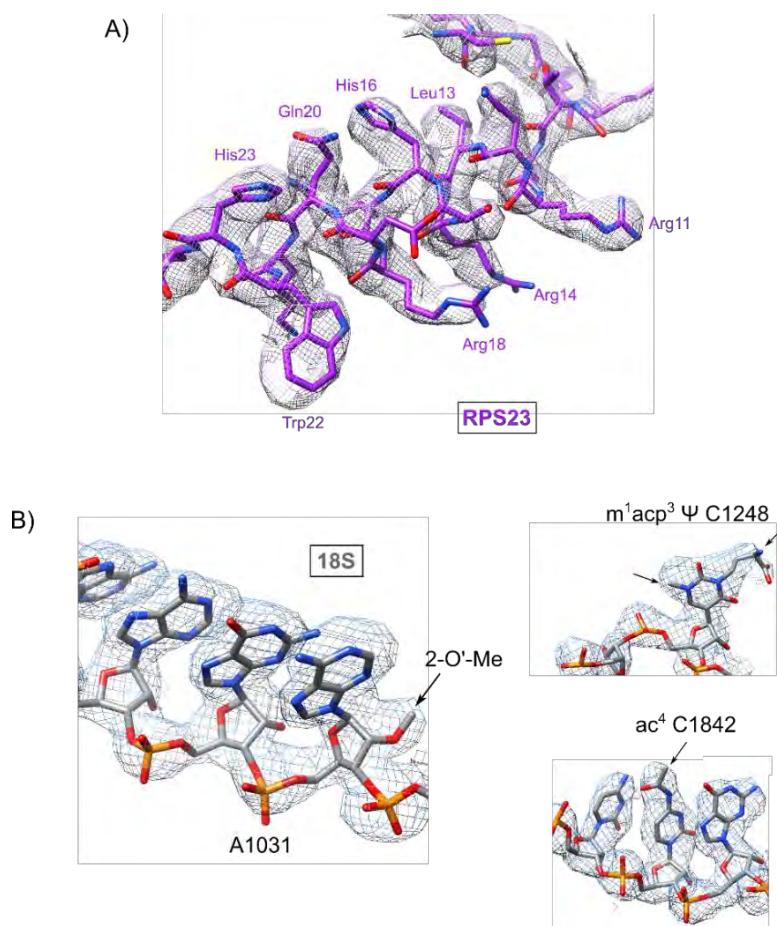


Figure 51 : Détails de la carte de densité électronique (représentée en mesh) et des modèles atomiques dérivés. A) Carte cryo-EM du ribosome WT/POST (mesh grisé) et modèle atomique d'une partie de la protéine RPS23 (violet). **B)** Carte cryo-EM (mesh grisé) et modèle atomique de segments de l'ARNr 18S (gris). Les modifications de l'ARNr 18S sont indiquées par des flèches.

d. Interprétation des cartes

L'ensemble des cartes de densité des ribosomes WT obtenues ont été analysées et comparées entre elles, afin d'identifier et comprendre leurs spécificités et ainsi déterminer les différents états structuraux présents dans notre jeu de données (**Figure 52**).

Dans un premier temps, nous avons voulu contrôler que les structures 3D obtenues correspondaient à des ribosomes fonctionnels. Au vu des différentes étapes de préparation des polysomes il était en effet primordial de valider que les ribosomes observés en cryo-EM étaient toujours des ribosomes actifs, en cours de traduction. La présence de densités électroniques correspondant à une chaîne polypeptidique naissante dans chacune des structures obtenues (voir **Figure 52A**, densité annotée CN en gris) confirme que les polysomes purifiés sont toujours fonctionnels, et contiennent principalement des ribosomes actifs.

L'observation des classes 3D obtenues a permis de constater la présence de deux états structuraux différents que ce soit pour la condition WT, comme mutante. Les deux états structuraux se distinguent l'un de l'autre par la position de la sous-unité 40S par rapport à la sous-unité 60S. En effet, lorsque l'on aligne les grandes sous-unités ribosomiques de ces deux états structuraux, il est possible d'observer la rotation de la sous-unité 40S. Dans la configuration « tournée » appelée Hybride-PRE, la petite sous-unité 40S a subi une rotation d'environ 11° comparée à la sous-unité 40S de l'état POST (sans rotation) (**Figure 52B**). De plus, l'analyse de ces deux états structuraux a aussi permis de distinguer de la densité électronique correspondant à des ARNt. Ces ARNt sont retrouvés dans des configurations différentes selon l'état structural. Dans l'état Hybride-PRE, les ARNt adoptent, comme le nom l'indique, des conformations hybrides. En effet, le ribosome possède un ARNt-peptidyl entre les sites A et P (A/P), avec l'anticodon apparié à l'ARNm dans le site A, du côté de la sous-unité 40S, et le peptide attaché au bras accepteur dans le site P, du côté de la sous-unité 60S. Il contient aussi un ARNt-déacylé entre les sites P et E (P/E), pour lequel l'anticodon est apparié à l'ARNm dans le site P et le bras accepteur de l'ARNt est lui dans le site E (**Figure 52A, panel du haut**). Il est intéressant de préciser que les caractéristiques décrites, quant au degré de rotation de la sous-unité 40S ainsi qu'au positionnement des ARNt dans le ribosome, pour cet état Hybride-PRE sont identiques à celles retrouvées sur l'état structurale « Hybride-PRE-2/Rotated-2 PRE » de l'article (Behrmann et al., 2015) (cf. **Figure 22** de l'introduction partie III + **Figure 52A, panel du haut**). L'état POST possède quant à lui une sous-unité 40S non tournée ainsi que des ARNt placés dans des configurations classiques avec l'ARNt-peptidyl en P/P et l'ARNt-déacylé en E/E (**Figure 52A, panel du bas**). De la même manière, cet état semble identique à l'état POST décrit dans l'article de (Behrmann et al., 2015).

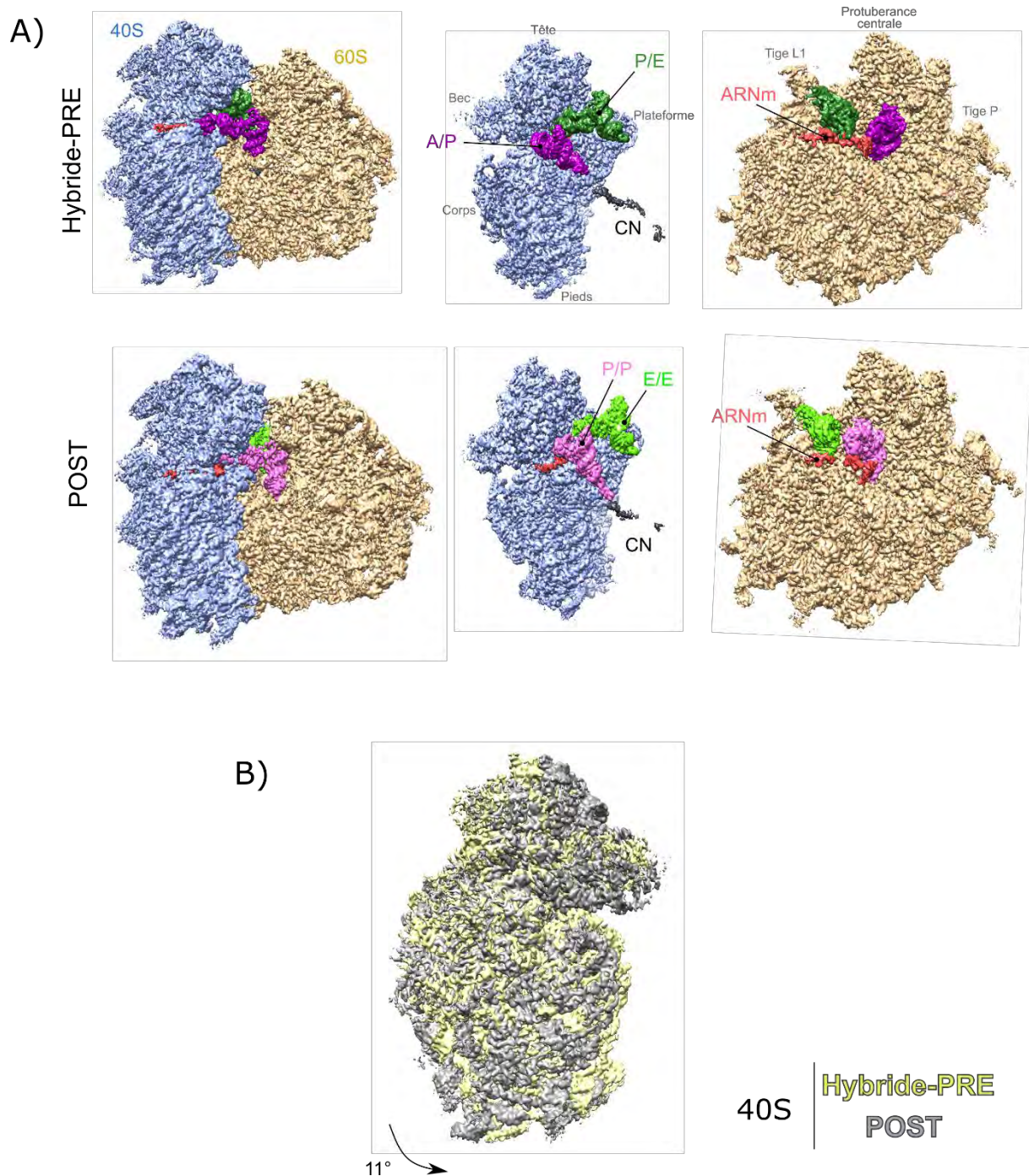


Figure 52 : Caractéristiques structurales des états Hybride-PRE et POST du ribosome WT.
A) Cartes de cryo-EM des états Hybride-PRE (panel du haut) et POST (panel du bas). À gauche se trouve la carte de densité électronique du ribosome entier avec la petite sous-unité 40S en bleu et la grande sous-unité 60S en orange. Au milieu et à droite se trouvent les cartes segmentées de la 40S et de la 60S respectivement avec l'ARNm représenté en rouge, l'ARNt-peptidyl en rose (A/P : foncé et P/P : clair), l'ARNt-déacylé en vert (P/E : foncé et E/E : clair), la chaîne peptidique naissante (CN) est en gris foncé. **B)** Comparaison des positions des sous-unités 40S dans l'état Hybride-PRE (jaune) et l'état POST (gris) représentées par leur cartes cryo-EM. La comparaison est basée sur un alignement commun avec la sous-unité 60S et sont indiqués : la direction et le degré de rotation lors de la transition entre les deux états.

e. Effet de la mutation RPS15-P131S sur le ribosome en cours de traduction

La détermination des structures de ribosomes en cours de maturation en condition WT et mutante nous a permis d'identifier certains effets de la mutation P131S de RPS15 sur le processus de traduction.

Nous avons tout d'abord comparé les structures des ribosomes WT et mutants des deux états structuraux afin de déterminer si la mutation avait un effet sur la structure de RPS15. Dans nos cartes de ribosomes WT, le domaine C-ter de RPS15 est clairement visible jusqu'au résidu S138 (**Figure 53, panel de gauche**). Ces données sont tout à fait comparables à celles décrites dans (Bhaskar et al., 2020) qui montrent que l'extrémité C-Ter de RPS15 est en partie ordonnée pour les états POST et Hybride-PRE. Les auteurs de cette étude arrivent en effet à distinguer de la densité électronique jusqu'à l'acide aminé 139 de RPS15. En revanche, pour nos cartes de ribosomes mutants RPS15-P131S, la densité correspondant à RPS15 n'est interprétable que jusqu'à l'acide aminé 129 (**Figure 53, panel de droite**). La mutation de la proline 131 en sérine n'est donc pas visible, et semble totalement désorganiser le domaine C-terminal de RPS15 dans les états d'élongation hybride-PRE et POST.

Il est important de rappeler que l'extrémité C-ter de RPS15 est spécifique aux eucaryotes ; il a été proposé qu'elle soit nécessaire au maintien des ARNt logés dans le site A du ribosome durant les changements de conformation de ce dernier. Elle permettrait, lors de l'accommodation de l'ARNt-aa cognate pour passer d'une configuration A/T à A/A, le maintien de l'ASL de l'ARNt sur le codon de l'ARNm, empêchant ainsi un décalage du cadre de lecture. Cette extrémité C-ter serait ainsi essentielle au maintien de la fidélité de la traduction (Bhaskar et al., 2020; Bretones et al., 2018).

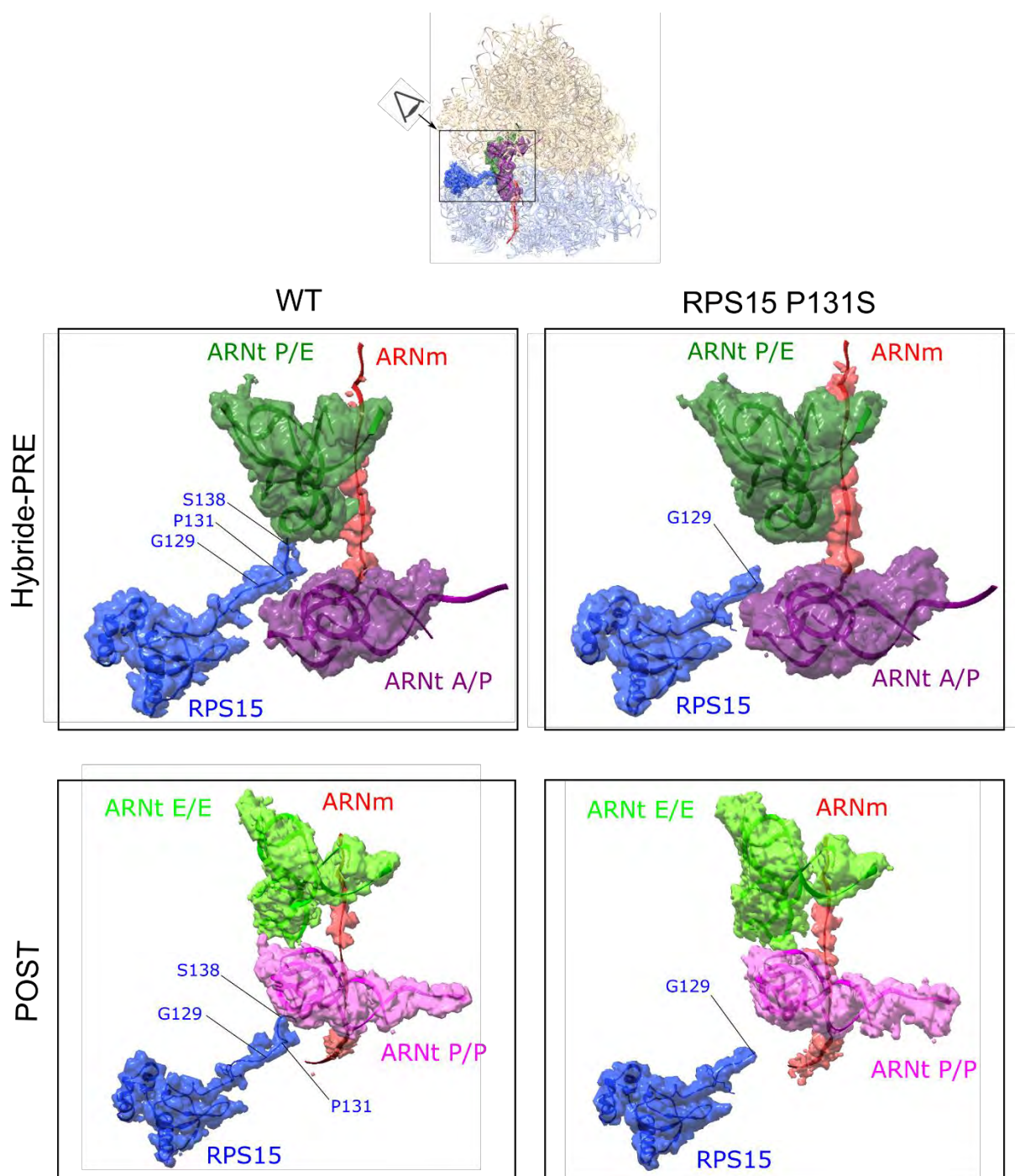


Figure 53 : Effet de la mutation RPS15-P131S sur la structure du ribosome. Sur le panel du haut, la structure du ribosome avec la sous-unité 60S en orange et la sous-unité 40S en bleu clair, indique l'angle de vue des zooms réalisés sur le panel du bas. Sur les zooms sont représentés les éléments du centre de décodage avec les ARNt et l'ARNm ainsi que RPS15 (en bleu) par leur densité électronique et leur structure. Les acides aminés des extrémités de RPS15 visibles sur la carte de densité ainsi que la proline 131 sont indiqués.

D'autre part, pour les deux conditions WT et RPS15-P131S, j'ai calculé la proportion de particules appartenant aux états d'élongation Hybride-PRE et POST, ainsi que du reste des particules ne donnant lieu à aucune structure interprétable. Ce calcul pourrait en effet refléter la cinétique de l'élongation de la traduction en conditions WT et mutantes. Les états les plus peuplés représenteraient des minimas locaux dans leur paysage énergétique, et les changements de conformations, pour passer au minimum suivant, sont énergétiquement coûteux. La comparaison des pourcentages obtenus permet d'observer une différence entre le WT et le mutant. En effet, pour les polysomes WT, la proportion de particules composant chacun des deux états structuraux résolus est quasiment identique (POST : 46% et Hybride-PRE : 47%) contrairement aux polysomes mutants pour lesquels l'état POST (42%) est plus peuplé que l'état Hybride-PRE (36%). De plus, les particules mal résolues s'accumulent dans la condition mutante (22%) comparé à ces mêmes particules en condition WT (7%) (**Tableau 3**).

Etat structural		Hybride-PRE	POST	Mal résolu
% de particules	WT	47%	46%	7%
	RPS15-P131S	36%	42%	22%

Tableau 3 : Pourcentage de particules retrouvées dans les différents états structuraux identifiés, des conditions WT et mutantes (RPS15 -P131S).

L'état POST des polysomes mutants semble ainsi favorisé, ce qui n'est pas observé pour les polysomes WT. De plus, il est intéressant de noter que pour les polysomes mutants la population de particules dans l'état Hybride-PRE s'appauvrit, alors que celle des particules mal résolues est augmentée. Ces observations amènent à penser que les polysomes RPS15-P131S ont plus de difficultés à repartir dans un nouveau cycle d'élongation, en favorisant l'état POST, ou en déclenchant des mécanismes de dissociation des ribosomes. Pour rappel, après l'état POST le ribosome relance un nouveau cycle d'élongation en accommodant un nouvel ARNt-aa dans le site A du ribosome, c'est donc cette étape qui pourrait être impactée par la mutation.

L'ensemble de ces résultats me permet de proposer une hypothèse afin d'expliquer comment, mécaniquement, la mutation P131S de RPS15 entraîne des défauts de traduction, qui pourraient favoriser l'apparition de cancers. Cette mutation semble déstabiliser l'extrémité C-ter de RPS15, et empêcher l'accommodation et le maintien optimal des ARNt-aa au site A du ribosome. Ceci pourrait alors causer un ralentissement de l'étape d'accommodation, le premier événement de l'élongation, des décalages du cadre de lecture et une diminution de la fidélité de traduction. À l'échelle de la cellule, cette mutation semble provoquer une baisse globale des phénomènes de traduction, qui se traduit par une baisse du nombre de ribosomes en traduction et un ralentissement de la croissance cellulaire. Comment ces phénomènes d'hypo-prolifération peuvent se transformer en mécanismes cancéreux (par définition plutôt hyper-prolifératifs) reste à définir, notamment pour les cas de CLL agressives et réfractaires aux chimiothérapies, où les mutations du domaine C-ter de RPS15 sont retrouvées dans plus de 25 % des cas.

3. Discussion et Perspectives

L'étude structurale des polysomes que nous avons réalisée ici nous a permis de mettre en évidence deux états structuraux différents du ribosome pendant la traduction. Pour les deux conditions WT et mutantes, les états Hybride-PRE et POST ont été obtenus. Ces états sont ceux qui sont retrouvés en majorité lors d'une analyse structurale de polysomes précédente, effectuée sans ajout de drogue bloquant la traduction (POST : 38% et Rotated-2-PRE (équivalent à notre Hybride-PRE) : 24%) (Behrmann et al., 2015). Mais les auteurs de cette étude ont également pu décrire six autres états structuraux de l'élongation de la traduction. Même si dans cette publication, le jeu de données obtenu est cinq fois plus grand que ceux utilisés ici (1 823 338 particules contre ~400 000 ici), leur processus d'analyse d'images est plus poussé que le nôtre et ils utilisent une méthode différente de purification des polysomes. Afin de visualiser plus d'états de traduction dans nos jeux de données, nous pensons donc utile d'optimiser à la fois notre méthode de préparation d'échantillon, ainsi que nos processus d'analyse d'images.

Tout d'abord, il serait utile d'approfondir et d'optimiser encore les étapes d'analyses d'images qui ont été réalisées sur nos jeux de données. En effet, la classification 3D masquée réalisée nous permet d'observer seulement deux états structuraux ainsi qu'une ou deux classes mal résolues (**Figures 49, 50**). Cette classification 3D est obtenue à partir d'un masque correspondant aux trois ARNt présents dans les sites A, P et E, mais cette classification n'a jamais fait ressortir de structure de ribosomes contenant un ARNt en A/A. Des étapes différentes et/ou supplémentaires de traitement des images doivent être testées. Nous avons par exemple très récemment testé de nouvelles classifications 3D sur les particules de l'état POST -WT, en les classifiant (sans recherche d'orientation) contre une structure de ribosome humain dans l'état

Classique-PRE (PDB : 6Y0G). Cette approche « ciblée » a permis de faire ressortir un sous-ensemble d'environ 20 000 particules ribosomiques effectivement dans un état classique-PRE contenant des ARNt dans les sites A/A, P/P et E/E, que nous avons ensuite pu auto-raffiner jusqu'à à 3.8 Å de résolution. Cette nouvelle structure 3D doit maintenant être optimisée par une étape de polishing des particules. Il est intéressant de noter que cette approche a aussi été utilisée sur les particules de la condition mutante et qu'aucune structure correspondant à un état classique-PRE n'a pu être identifiée. Pour rappel, l'état classique-PRE correspond à l'étape après l'accommodation de l'ARNt-aa dans le site A de la sous-unité 60S. De plus, dans cet état classique-PRE, Bhaskar et al. (2020) ont pu déterminer la structure de la totalité de l'extrémité C-ter de RPS15, qui s'étend jusqu'à l'acide aminé 145. Ceci semble aussi être le cas dans notre carte de ribosome classique-PRE WT. Cette extrémité apparaît plus ordonnée que dans les états Hybride-PRE et POST, où la densité des cartes cryo-EM n'était interprétable que jusqu'à l'acide aminé 139.

D'autre part, nous avons pour l'instant préparé des polysomes par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, à partir d'extraits cytoplasmiques « bruts », non traités par des drogues bloquant les ribosomes à diverses étapes de la traduction. Il est donc très probable qu'avec ce mode de préparation, le taux de run-off (ribosomes qui continuent et terminent la traduction au cours de la préparation) et de dissociation de co-facteurs de traduction ne soient pas négligeables, et aient un impact sur nos observations. Pour limiter le run-off des polysomes, le traitement de cultures cellulaires par le cycloheximide (CHX) est couramment employé pour préparer des fractions polysomales (O'Donohue et al., 2010). Pour rappel, le CHX est un antibiotique capable de se loger dans le site E du ribosome, ce qui va empêcher à l'ARNt-déacylé de transloquer dans le site E du ribosome, bloquant ainsi le cycle d'élongation (Garreau de Loubresse et al., 2014; Myasnikov et al., 2016). Dans l'article de Bhaskar et al., (2020) qui étudie le positionnement du domaine C-ter de RPS15 dans des ribosomes humains, les auteurs utilisent du cycloheximide (CHX) lors de la préparation de leur échantillon. Cela leur a permis de décrire trois états structuraux différents : classique-PRE, Hybride-PRE, POST.

Dans ce contexte, comme nous ne distinguons pas au départ de structure classique-PRE dans nos préparations polysomales non traitées, nous avons entamé des études de polysomes après traitement des cellules au CHX. Pour cela, les polysomes ont été préparés comme indiqué précédemment (**Figure 47**) c'est-à-dire sur gradient de saccharose 10-50%, mais cette fois-ci avec ou sans traitement au CHX. Cette expérience a été répétée au moins quatre fois pour chacune des conditions WT/RPS15-P131S et avec/sans CHX. Les profils de sédimentation de ces gradients sont présentés dans les **Figures 54 et 55**.

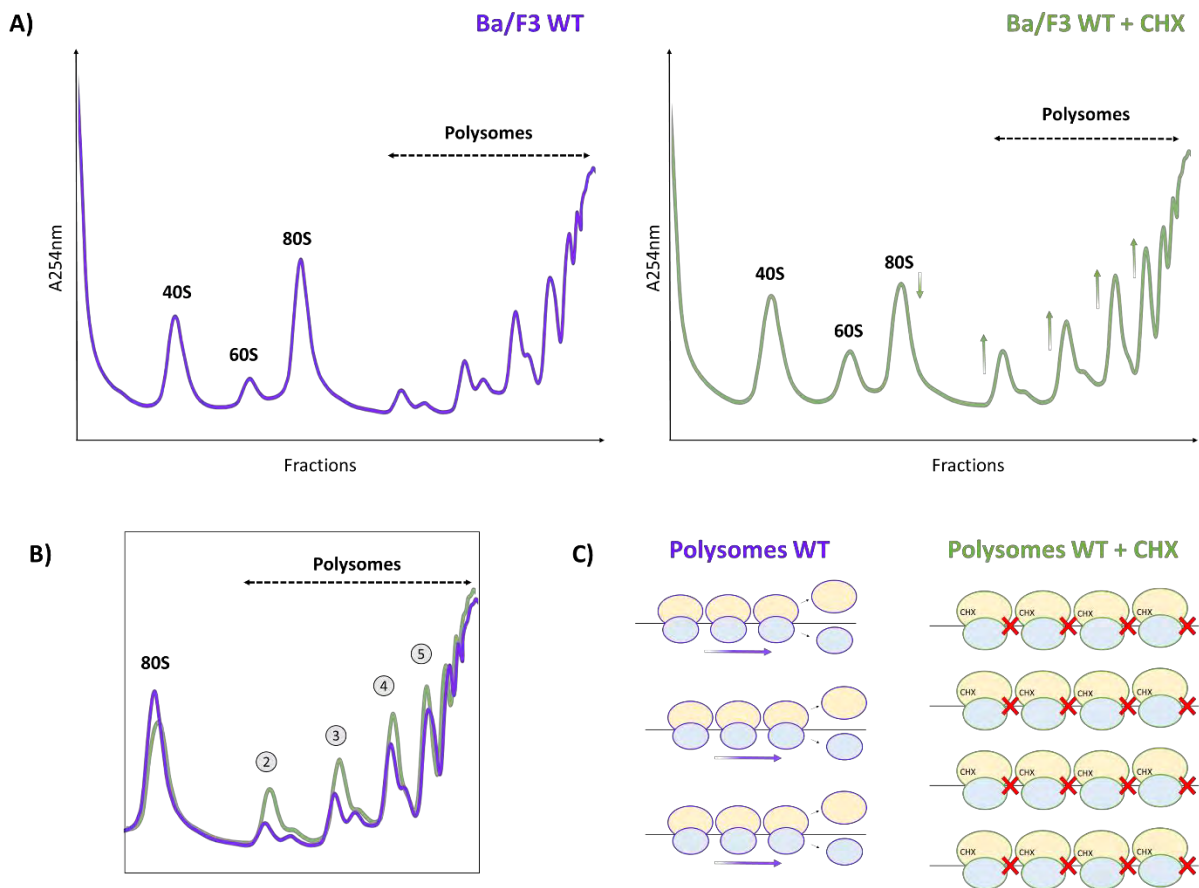


Figure 54 : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et WT + cycloheximide (CHX). **A)** Profils de sédimentation obtenus à partir de gradients de saccharose 10-50% réalisés sur des extraits cytoplasmiques de cellules Ba/F3 WT en violet et après traitement des cellules Ba/F3 WT au CHX en vert. Les effets du traitement au CHX sont indiqués par des flèches vertes. **B)** Superposition des profils de sédimentation, correspondant aux pics de ribosomes 80S et polysomes des conditions WT (violet) et WT + CHX (vert), le nombre de ribosome par ARNm est indiqué pour chacun des pics de polysome. **C)** Représentation schématique des polysomes selon les conditions indiquées, l'ARNm est représenté par une ligne noire, et les ribosomes par une sous-unité 40S bleue et une sous-unité 60S jaune.

La comparaison des profils de sédimentation des cellules WT avec (**Figure 54 A et B, profils verts**) et sans (**Figure 54 A et B, profils violets**) traitement au CHX permet de montrer, comme cela était attendu, une augmentation de la proportion de polysomes dans la cellule, observé par l'augmentation des pics de polysomes et une diminution du pic de 80S (**Figure 54 A, B**). Les pics de polysomes semblent avoir migrés au même endroit du gradient, ce suggère que le traitement au CHX n'influe pas sur la densité de ribosomes par ARNm en conditions WT (**Figure 54C**).

J'ai ensuite procédé à l'analyse des profils de sédimentation de ribosomes mutants obtenus après traitement de cellules Ba/F3 RPS15-P131S au CHX (**Figure 55**). Comme pour les extraits WT, la comparaison de profils de sédimentation de cellules Ba/F3 RPS15-P131S avec ou sans traitement au cycloheximide montre une augmentation des pics de polysomes (données non présentées ici).

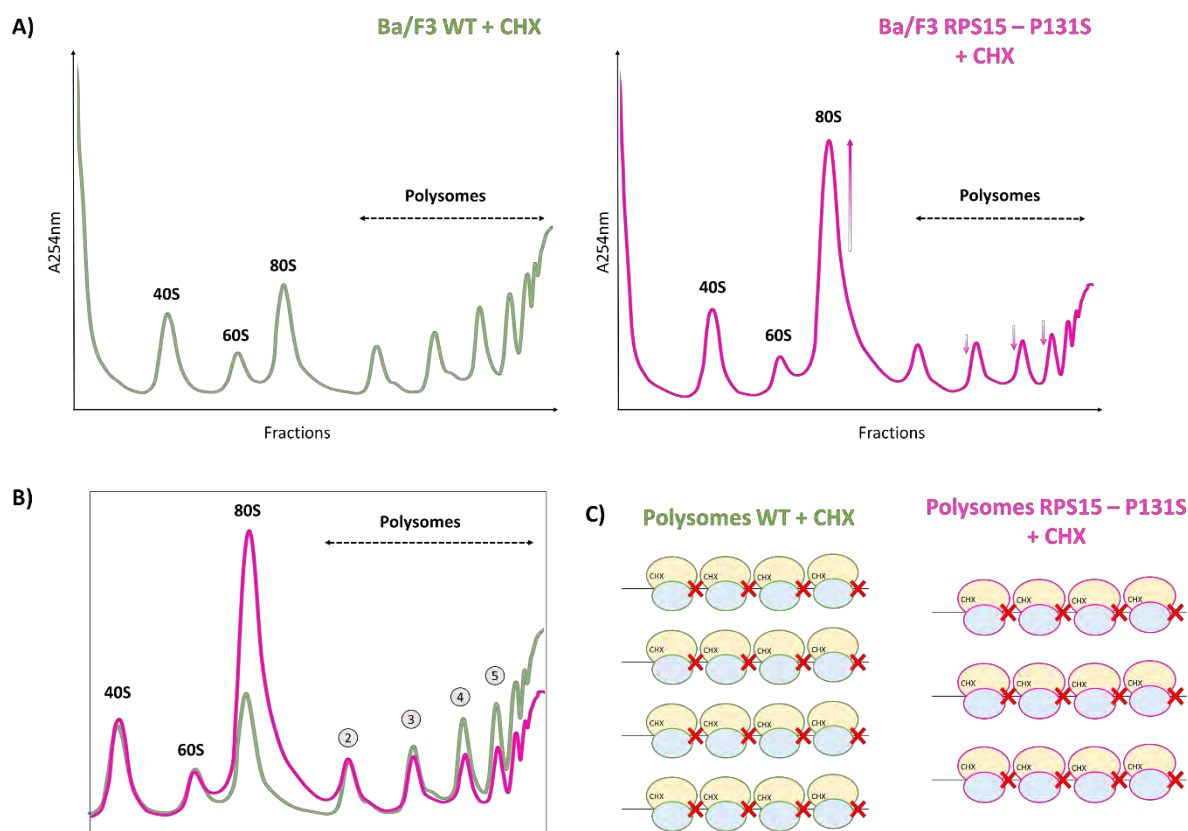


Figure 55 : Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose 10-50% en condition WT et mutante (RPS15-P131S) après traitement au cycloheximide (CHX). **A)** Profils de sédimentation obtenus à partir de gradients de saccharose 10-50% réalisé sur des extraits cytoplasmiques de cellules Ba/F3 WT traitées au CHX en vert et des cellules Ba/F3 RPS15-P131S traitées au CHX en rose. Les effets de la mutation sont indiqués par des flèches roses. **B)** Superposition des profils de sédimentation des conditions WT + CHX (vert) et RPS15-P131S + CHX (rose) le nombre de ribosome par ARNm est indiqué pour chacun des pics de polysome. **C)** Représentation schématique des polysomes selon les conditions indiquées, l'ARNm est représenté par une ligne noire, et les ribosomes par une sous-unité 40S bleue et une sous-unité 60S jaune.

Comme dans nos observations précédentes en conditions non traitées, la comparaison des profils de sédimentation à partir de cellules WT (**Figure 55 A et B, profils verts**) et mutantes (**Figure 55 A et B, profils rose**) traitées au CHX montrent que la mutation RPS15-P131S induit une augmentation drastique du pic de particules 80S, et une diminution des pics correspondant aux polysomes. De manière intéressante, lorsque les cellules Ba/F3 mutantes sont traitées au CHX,

la vitesse de migration des polysomes et donc la densité de ribosomes par ARNm semble restaurée par rapport aux polysomes WT, contrairement à ce qui a été observé précédemment sans traitement (**Figure 48B et 55B**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en présence de CHX, les ribosomes restent bloqués sur l'ARNm, ainsi leur densité pourrait être restaurée grâce à l'accumulation des ribosomes sur l'ARNm. Une hypothèse pour expliquer ces observations serait que la mutation P131S de RPS15, en changeant l'affinité d'accommodation et la vitesse de translocation des ARNt-aa au site A, bloque principalement le tout premier cycle d'élongation et induise une augmentation des ribosomes 80S en initiation. De plus, la vitesse de turn-over des cycles d'élongation et/ou la fréquence d'événements abortifs seraient également modifiées par la mutation, ce qui changerait la densité de ribosomes par ARNm. Le traitement au cycloheximide utilisé contrerait (et masquerait) cet effet sur la vitesse d'élongation.

Dans ce contexte, il sera intéressant de résoudre les structures de ces ribosomes traités au CHX en condition WT et mutante. Le CHX, en bloquant les ribosomes sur les ARNm, permettrait peut-être de stabiliser l'état structural classique-PRE de la condition mutante, qui n'a pour l'heure pas pu être identifié dans notre jeu de données.

De plus, il pourrait aussi être utile de tester des drogues permettant de booster le processus de la traduction telles que les polyamines, comme la spermidine, qui est utilisée en routine lors de la préparation des polysomes pour leurs analyses structurales (Behrmann et al., 2015; Bhaskar et al., 2020; Budkevich et al., 2011, 2014; Djumagulov et al., 2021; Flis et al., 2018; Shao et al., 2016).

En parallèle, nous avons aussi remis en question la méthode de préparation d'échantillon de polysomes. En effet, nous nous sommes rendus compte que l'étape de dialyse permettant le désucrage des fractions de gradients correspondant aux polysomes, suivie de leur concentration étaient des étapes qui demandaient beaucoup de temps (**Figure 47**). Dans ces conditions, le laps de temps qui s'écoule entre la récolte des cellules Ba/F3 et la préparation des grilles de cryo-EM est de plusieurs jours, et pourrait expliquer que l'on perd certains états moins peuplés et moins stables durant ces étapes. Afin de pallier ce problème, nous avons cherché des alternatives de préparation des polysomes, et pour l'heure deux techniques différentes sont en cours d'optimisation.

La première méthode consiste à réaliser la préparation des polysomes par gradients de saccharose, mais une fois les fractions de polysomes sélectionnées au lieu de les dialyser, elles sont diluées dans du tampon afin de diluer le saccharose, puis ultracentrifugées. Ceci permet la formation d'un culot au fond du tube correspondant aux polysomes. Ce culot de polysomes est

ensuite resuspendu dans du tampon afin finalement d'être directement utilisé pour la préparation des grilles de cryo-EM. Cette méthode permet d'accélérer le processus de préparation des polysomes (45 minutes d'ultra centrifugation contre 24 à 48h de dialyse!) afin d'éviter potentiellement la perte d'états structuraux. Des polysomes WT préparés dans ces conditions sont en cours d'analyse après observation par cryo-EM.

La deuxième technique est le Ribo Mega-SEC ; elle consiste à purifier les polysomes sans utiliser le gradient de saccharose, mais par chromatographie d'exclusion par la taille. Pour cela, l'extrait cytoplasmique préparé comme indiqué pour le gradient est directement injecté dans une uHPLC sur une colonne de chromatographie à exclusion de taille (SEC) (Yoshikawa et al., 2018). Grâce à cette technique il est possible de séparer les polysomes des sous-unités ribosomiques très rapidement. En effet, une fois les fractions correspondant aux polysomes récupérées elles peuvent, après concentration, être directement utilisées pour la préparation de grilles de cryo-EM. Cette technique évite alors le problème de la présence de sucre dans l'échantillon, incompatible avec la cryo-EM, et accélère aussi la préparation de l'échantillon. Des études préliminaires sont en cours qui permettront d'estimer le rendement et notamment le nombre d'injections nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de polysomes pour pouvoir analyser leur structure par cryo-EM.

4. Conclusion

L'étude structurale et fonctionnelle que j'ai initiée au cours de ma dernière année de thèse a permis de mettre en évidence les effets de la mutation RPS15-P131S sur les mécanismes de traduction. Mes résultats indiquent que la mutation P131S entraîne la déstabilisation de l'extrémité C-ter de RPS15. Cette déstabilisation rendrait l'accommodation de l'ARNt-aa cognate dans le site A du ribosome plus difficile, en empêchant la stabilisation du duplex codon-anticodon par RPS15. Cette mutation serait alors à l'origine de deux conséquences sur le ribosome. La première serait la baisse globale du niveau de traduction en limitant l'étape d'accommodation de l'ARNt-aa. Ceci est observé à la fois par les données fonctionnelles, avec les profils de sédimentation sur lesquels les polysomes mutants sont moins nombreux, et ont une densité altérée par rapport à leurs homologues WT. Ceci pourrait être expliqué par plusieurs phénomènes, comme un changement de la vitesse d'élongation, un ralentissement de l'entrée en élongation, ainsi qu'une augmentation des cycles de traductions abortifs. Cela a aussi été montré par mes données structurales, qui montrent une modification de la proportion de ribosome dans l'état POST majoritaire par rapport à l'état Hybride-PRE, comme si le ribosome mutant avait des difficultés à repartir dans un nouveau cycle d'élongation. La deuxième conséquence serait une perte de fidélité de la traduction, de la même manière en empêchant le maintien du duplex codon-

anticodon entre l'ARNm et l'ARNt logé en A pouvant ainsi causer un décalage du cadre de lecture. L'ensemble de ces résultats sont en parfaite adéquation avec les défauts de traduction décrits dans les cas de CLL causées par des mutations présentes sur l'extrémité C-Ter de RPS15 (Bretones et al., 2018).

Cette étude structure/fonction fait partie d'un vaste projet visant à caractériser de manière globale l'impact de mutations de RPS15 sur le ribosome, pouvant expliquer l'apparition de cancers. L'étude menée dans le cadre de cette thèse va donc être complétée par différentes approches menées par plusieurs équipes avec lesquelles notre équipe est en collaboration. Il sera notamment possible de valider l'hypothèse selon laquelle la densité de ribosomes et la vitesse d'élongation sont altérées en conditions mutantes par rapport aux cellules sauvages. Pour cela, des études de ribosome footprinting (Ingolia et al., 2019) sont réalisées par l'équipe du Pr Kim de Keersmaecker. Elles permettront de déterminer les séquences d'ARNm sur lesquels les ribosomes sont positionnés. La comparaison des données en condition WT et mutantes aidera à indiquer si les ribosomes mutants traduisent des ARNm différents de leurs homologues WT. Cependant, les extraits cytoplasmiques analysés ont tous été traités au cycloheximide ; comme on l'a vu ci-avant sur nos profils de gradients, ce traitement devrait malheureusement empêcher d'évaluer correctement une éventuelle différence de vitesse d'élongation des ribosomes mutants par rapport aux WT. Ces données de NGS seront couplées à des analyses de protéomique cellulaire ciblée (whole cell shotgun proteomics), également menées par l'équipe du Pr Kim de Keersmaecker. Celles-ci permettront de comparer le protéome de cellules Ba/F3 WT à celui de leurs homologues RPS15-P131S, et d'estimer si les protéines produites sont différentes dans les deux lignées cellulaires.

De plus, des analyses par spectrométrie de masse seront nécessaires à l'étude de la composition exacte des ribosomes WT et mutants. Ceci permettra alors de déterminer si la mutation RPS15-P131S a un impact sur la composition en protéines ribosomique des ribosomes. Ces données pourront être corrélées avec les structures de ribosomes obtenues. En outre, les structures de ribosomes déterminées lors de cette étude seront aussi utiles pour la corrélation des données de Ribo-MethSeq. Cette technique vise à identifier les modifications de l'ARNr, et la comparaison de données obtenues en condition WT et mutantes aidera de déterminer si la mutation RPS15-P131S est à l'origine de changements dans la composition des ARNr pour la modification 2'-O-méthylation. Finalement, les structures obtenues lors de cette étude, et l'ensemble de ces données structures fonctions devraient permettre de comprendre comment la mutation RPS15-P131S peut induire l'apparition de cancers.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Durant ma thèse, j'ai réalisé deux projets consécutifs portant sur l'étude de (pré)ribosomes, en utilisant la même approche mêlant analyses fonctionnelles et structurales par cryo-EM. La complémentarité de ces deux approches permet en effet de caractériser très précisément des mécanismes moléculaires complexes. La compréhension des processus assurant l'assemblage et le bon fonctionnement des ribosomes sont un réel enjeu, encore plus d'actualité avec la découverte des ribosomopathies et de cancers associés à des défauts ribosomiques.

La cryo-EM s'est avérée être une technique de choix dans l'étude des ribosomes, notamment grâce à la possibilité de pouvoir trier l'hétérogénéité structurale des complexes présents au sein d'un même échantillon. La cryo-EM a d'ailleurs été largement utilisée pour déterminer des structures de ribosomes en action, en permettant d'obtenir des « snapshots » du ribosome en cours de synthèse ou encore en traduction. D'une part, cette méthodologie a contribué fortement, ces dernières années, à la compréhension des étapes d'assemblage des sous-unités ribosomiques humaines. Il a été possible d'accéder à la structure de plusieurs intermédiaires de maturation, ce qui a permis de déterminer le positionnement des différents facteurs de maturation ainsi que des protéines ribosomiques. Ceci a aidé dans la compréhension du rôle de certains facteurs de maturation en étudiant par exemple leurs interactions avec différents composants ribosomiques. Ces structures ont aussi été utiles dans la description des changements conformationnels que doivent subir les pré-ribosomes afin qu'ils puissent atteindre une structure mature et fonctionnelle. Cependant, les analyses structurales donnent des informations « statiques » sur les assemblages moléculaires étudiés (positionnement, morphogénèse des sous-unités ribosomiques, etc...). Le rôle précis des facteurs de maturation et des composants ribosomiques n'est que suggéré par ces données structurales. Afin d'accéder à une description complète et précise des étapes de maturation des sous-unités ribosomiques, il est important de pouvoir les combiner à des approches fonctionnelles.

Dans ce contexte, les travaux de ma thèse sur les précurseurs de la petite sous-unité ribosomique humaine ont permis de mieux caractériser les toutes dernières étapes de sa maturation. Les données structurales ont tout d'abord permis pour la première fois de localiser de manière précise le facteur de maturation RIO1 sur les particules pré-40S. De plus, basé sur les structures obtenues il a été possible de proposer des hypothèses expliquant les dernières étapes de maturation de la sous-unité 40S. J'ai donc ensuite validé ce modèle par des analyses fonctionnelles. Des expériences de perte de fonction de la protéine ribosomique RPS26 ainsi que la mise en place d'expériences de maturation *in vitro* m'ont permis de décrire les dernières étapes de maturation cytoplasmique des particules pré-40S humaines. L'ensemble de ces données a contribué à la compréhension du rôle de RPS26 combiné à l'ATPase RIO1 dans le déclenchement de la dernière étape de maturation de l'ARNr 18S par NOB1.

De manière plus globale et d'un point de vue structural, la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité 40S chez l'Homme commence à être bien étudiée, notamment grâce à nos travaux (Larburu et al., 2016, cet article) et à ceux de l'équipe de R. Beckmann (Ameismeier et al., 2020, 2018). La structure 3D du SSU processome, qui se forme dans le nucléole lors des toutes premières étapes de la maturation de la sous-unité 40S, a également été récemment résolue (Singh et al., 2021). À ce jour, du fait de la rapidité des étapes nucléoplasmiques de la maturation de la particule pré-40S, les informations structurales concernant celles-ci restent faibles. Il serait donc intéressant de pouvoir les caractériser, en utilisant par exemple des mutants bloquant la maturation de la petite sous-unité avant son export nucléaire. Dans ce contexte, il reste encore du travail afin de pouvoir avoir une vue d'ensemble des différents états structuraux correspondant à chacune des étapes de la maturation de la pré-40S chez l'Homme.

La cryo-EM a aussi été largement utilisée pour la compréhension des mécanismes de traduction. Ce processus a été initialement étudié chez la bactérie, et même si la traduction semble conservée, il existe tout de même des divergences entre procaryotes et eucaryotes qui ont été mises en évidence notamment par la cryo-EM. Lors de la synthèse protéique le ribosome subit de nombreux changements de conformation nécessaires au déroulement des différentes étapes permettant l'ajout des acides aminés pendant la phase d'élongation. L'avantage de la cryo-EM dans l'étude de ce processus a été son pouvoir à séparer différents états structuraux présents dans une même préparation de polysomes. Ceci a permis la description de mouvements du ribosome pendant le processus de traduction. Cette technique a par exemple permis de décrire le mouvement d'enroulement de la sous-unité 40S après l'étape d'accommodation de l'ARNt-aa dans le ribosome, qui n'avait pas été décrit chez la bactérie et semble donc spécifique aux eucaryotes. Les études structurales des ribosomes en cours de traduction sont fréquemment associées à des analyses de smFRET qui est une technique utilisant le transfert d'énergie entre deux fluorophores pour mesurer des distances entre deux molécules (ici des ARNt par exemple). Les données de smFRET permettent ainsi d'observer et donc de confirmer les changements conformationnels décrits (Ferguson et al., 2015; Flis et al., 2018).

Durant la seconde partie de ma thèse, j'ai participé à l'initiation d'un nouveau projet dans l'équipe qui vise à caractériser les effets de mutations de protéines ribosomiques oncogéniques sur les processus de traduction. Pour cela, je me suis servie du microscope électronique Talos Arctica nouvellement installé sur la plateforme METI du laboratoire, afin de déterminer la structure 3D de ribosomes en cours de traduction dans des conditions sauvages et mutantes. Le fait de pouvoir utiliser un microscope sur place a permis d'accélérer l'acquisition des images, et

donc d'augmenter significativement les résultats obtenus en un temps donné. En effet, j'ai pu en moins d'un an acquérir trois jeux de données de plus de 7 000 images. Leur analyse par les méthodes de particules isolées a permis d'obtenir des structures 3D résolues à 2.7 – 3.0 Å ce qui participe notamment à la validation de l'installation de ce nouveau cryo-microscope. Au-delà de cet aspect technique, mes travaux de thèse ont permis de caractériser les structures cryo-EM « d'oncoribosomes » portant la mutation RPS15-P131S. Celles-ci renforcent l'idée (initialement proposée par (Bhaskar et al., 2020; Bretones et al., 2018)) que les mutations du domaine C-terminal de RPS15 déstabilisent l'extrémité C-ter de RPS15, ce qui empêcherait l'accommodation et le maintien optimal des ARNt-aa dans le site A du ribosome. Ceci pourrait alors avoir pour conséquences un ralentissement du passage de la phase d'initiation à celle d'élongation, des ratages des cycles d'élongation entraînant à leur tour une baisse globale du taux de traduction, ainsi qu'une perte de la fidélité de traduction. Afin de pouvoir décrire l'efficacité du ribosome WT et mutant dans le processus de traduction, il serait utile de compléter les données structurales par des analyses fonctionnelles. Il pourrait par exemple être intéressant de réaliser des expériences de traduction *in vitro* par des essais de méthionine-puromycine. Cet essai, aussi appelé essai de formation de peptide, a pour but de reporter l'activité peptidyl-transférase du ribosome en analysant la formation du dipeptide entre la méthionine radiomarquée et la puromycine (Lorsch and Herschlag, 1999). Ceci permet d'analyser l'étape d'élongation de la traduction. Ainsi, ces données seraient utiles pour déterminer si la mutation impacte l'efficacité du ribosome à former des liaisons peptidiques et donc la phase d'élongation de la traduction.

Finalement, ces données structurales, obtenues durant ma dernière année de thèse, représentent une preuve de concept, puisqu'elles pourront également être appliquées à d'autres mutations de composés ribosomiques, afin de comprendre leur effet sur les processus de traduction. Ainsi, il sera peut-être possible dans un futur proche, grâce à des approches de cryo-EM/SPA entièrement automatisées, d'obtenir des diagnostics structuraux de ribosomes en cours de traduction, afin de caractériser en routine des ribosomes potentiellement pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abeyrathne, P.D., Koh, C.S., Grant, T., Grigorieff, N., Korostelev, A.A., 2016. Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome. *Elife* 5, e14874. <https://doi.org/10.7554/eLife.14874>
- Alter, B.P., Giri, N., Savage, S.A., Rosenberg, P.S., 2018. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* 103, 30–39. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178111>
- Ameismeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., Beckmann, R., 2018. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* 558, 249–253. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0193-0>
- Ameismeier, M., Zemp, I., van den Heuvel, J., Thoms, M., Berninghausen, O., Kutay, U., Beckmann, R., 2020. Structural basis for the final steps of human 40S ribosome maturation. *Nature* 587, 683–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2929-x>
- Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D.A., Jacobson, A., 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453, 1276–1280. <https://doi.org/10.1038/nature06974>
- Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., Beckmann, R., 2013. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85. <https://doi.org/10.1038/nature12104>
- Aubert, M., O'Donohue, M.-F., Lebaron, S., Gleizes, P.-E., 2018. Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases. *Biomolecules* 8. <https://doi.org/10.3390/biom8040123>
- Badertscher, L., Wild, T., Montellese, C., Alexander, L.T., Bammert, L., Sarazova, M., Stebler, M., Csucs, G., Mayer, T.U., Zamboni, N., Zemp, I., Horvath, P., Kutay, U., 2015. Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells. *Cell Reports* 13, 2879–2891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.061>
- Bai, D., Zhang, J., Li, T., Hang, R., Liu, Y., Tian, Y., Huang, D., Qu, L., Cao, X., Ji, J., Zheng, X., 2016. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12310>
- Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R.A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P.B., Steitz, T.A., 1998. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* 93, 1105–1115. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81455-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81455-5)
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B., Steitz, T.A., 1999. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400, 841–847. <https://doi.org/10.1038/23641>
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2000. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* 289, 905–920. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>
- Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Molloy, K.R., Chait, B.T., Klinge, S., 2017. The complete structure of the small-subunit processome. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 944–953. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3472>
- Basu, A., Das, P., Chaudhuri, S., Bevilacqua, E., Andrews, J., Barik, S., Hatzoglou, M., Komar, A.A., Mazumder, B., 2011. Requirement of rRNA methylation for 80S ribosome assembly on a cohort of cellular internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* 31, 4482–4499. <https://doi.org/10.1128/MCB.05804-11>
- Baudin-Baillieu, A., Fabret, C., Liang, X.-H., Piekna-Przybylska, D., Fournier, M.J., Rousset, J.-P., 2009. Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Res* 37, 7665–7677. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp816>
- Baxter-Roshek, J.L., Petrov, A.N., Dinman, J.D., 2007. Optimization of Ribosome Structure and Function by rRNA Base Modification. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000174>

- Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T.V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P.A., Vos, M.R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P., Spahn, C.M.T., 2015. Structural Snapshots of Actively Translating Human Ribosomes. *Cell* 161, 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.052>
- Ben-Shem, A., de Loubresse, N.G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., 2011. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution 334, 6.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., 2010. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* 330, 1203–1209. <https://doi.org/10.1126/science.1194294>
- Bhar, S., Zhou, F., Reineke, L.C., Morris, D.K., Khincha, P.P., Giri, N., Mirabello, L., Bergstrom, K., Lemon, L.D., Williams, C.L., Toh, Y., Elghetany, M.T., Lloyd, R.E., Alter, B.P., Savage, S.A., Bertuch, A.A., 2020. Expansion of germline RPS20 mutation phenotype to include Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 41, 1918–1930. <https://doi.org/10.1002/humu.24092>
- Bhaskar, V., Graff-Meyer, A., Schenk, A.D., Cavadini, S., von Loeffelholz, O., Natchiar, S.K., Artus-Revel, C.G., Hotz, H.-R., Bretones, G., Klaholz, B.P., Chao, J.A., 2020. Dynamics of uS19 C-Terminal Tail during the Translation Elongation Cycle in Human Ribosomes. *Cell Reports* 31, 107473. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.037>
- Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A., Zhang, Y., 2004. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J* 23, 2402–2412. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600247>
- Borovjagin, A.V., Gerbi, S.A., 2004. Xenopus U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction. *RNA* 10, 942–953. <https://doi.org/10.1261/rna.5256704>
- Bretones, G., Álvarez, M.G., Arango, J.R., Rodríguez, D., Nadeu, F., Prado, M.A., Valdés-Mas, R., Puente, D.A., Paulo, J.A., Delgado, J., Villamor, N., López-Guillermo, A., Finley, D.J., Gygi, S.P., Campo, E., Quesada, V., López-Otín, C., 2018. Altered patterns of global protein synthesis and translational fidelity in RPS15-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 132, 2375–2388. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-804401>
- Brilot, A.F., Chen, J.Z., Cheng, A., Pan, J., Harrison, S.C., Potter, C.S., Carragher, B., Henderson, R., Grigorieff, N., 2012. Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film. *Journal of Structural Biology* 177, 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.02.003>
- Brown, A., Shao, S., 2018. Ribosomes and cryo-EM: a duet. *Current Opinion in Structural Biology* 52, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.07.001>
- Budkevich, T., Giesebrecht, J., Altman, R.B., Munro, J.B., Mielke, T., Nierhaus, K.H., Blanchard, S.C., Spahn, C.M.T., 2011. Structure and Dynamics of the Mammalian Ribosomal Pretranslocation Complex. *Molecular Cell* 44, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.040>
- Budkevich, T.V., Giesebrecht, J., Behrmann, E., Loerke, J., Ramrath, D.J.F., Mielke, T., Ismer, J., Hildebrand, P.W., Tung, C.-S., Nierhaus, K.H., Sanbonmatsu, K.Y., Spahn, C.M.T., 2014. Regulation of the Mammalian Elongation Cycle by Subunit Rolling: A Eukaryotic-Specific Ribosome Rearrangement. *Cell* 158, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.044>
- Bursać, S., Brdovčak, M.C., Pfannkuchen, M., Orsolić, I., Golomb, L., Zhu, Y., Katz, C., Daftuar, L., Grabušić, K., Vukelić, I., Filić, V., Oren, M., Prives, C., Volarević, S., 2012. Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20467–20472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218535109>
- Bussiere, C., Hashem, Y., Arora, S., Frank, J., Johnson, A.W., 2012. Integrity of the P-site is probed during maturation of the 60S ribosomal subunit. *J Cell Biol* 197, 747–759. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112131>
- Campbell, M.G., Cheng, A., Brilot, A.F., Moeller, A., Lyumkis, D., Veisler, D., Pan, J., Harrison, S.C., Potter, C.S., Carragher, B., Grigorieff, N., 2012. Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy. *Structure* 20, 1823–1828. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.026>
- Carron, C., Balor, S., Delavoie, F., Plisson-Chastang, C., Faubladiet, M., Gleizes, P.-E., O'Donohue, M.-F., 2012. Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *J Cell Sci* 125, 4532–4542. <https://doi.org/10.1242/jcs.106419>

- Carron, C., O'Donohue, M.-F., Choessel, V., Faubladier, M., Gleizes, P.-E., 2011. Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* 39, 280–291. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq734>
- Cerezo, E., Plisson-Chastang, C., Henras, A.K., Lebaron, S., Gleizes, P., O'Donohue, M., Romeo, Y., Henry, Y., 2019. Maturation of pre-40S particles in yeast and humans. *WIREs RNA* 10, e1516. <https://doi.org/10.1002/wrna.1516>
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26, 5029–5037. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210327>
- Cheng, J., Lau, B., Venuta, G.L., Ameisemeier, M., Berninghausen, O., Hurt, E., Beckmann, R., 2020. 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science* 369, 1470–1476. <https://doi.org/10.1126/science.abb4119>
- Crepin, T., Shalak, V.F., Yaremchuk, A.D., Vlasenko, D.O., McCarthy, A., Negrutskii, B.S., Tukalo, M.A., El'skaya, A.V., 2014. Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 42, 12939–12948. <https://doi.org/10.1093/nar/gku974>
- Da Costa, L., Narla, A., Mohandas, N., 2018. An update on the pathogenesis and diagnosis of Diamond-Blackfan anemia. *F1000Res* 7, F1000 Faculty Rev-1350. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15542.1>
- Daftuar, L., Zhu, Y., Jacq, X., Prives, C., 2013. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network. *PLoS One* 8, e68667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068667>
- Dai, M.-S., Lu, H., 2004. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 279, 44475–44482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403722200>
- Dalla Venezia, N., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F., Diaz, J.-J., 2019. Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. *Int J Mol Sci* 20, 1226. <https://doi.org/10.3390/ijms20051226>
- Dameshek, W., 1967. Riddle: what do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and “hypoplastic” leukemia have in common? *Blood* 30, 251–254.
- Dauwerse, J.G., Dixon, J., Seland, S., Ruivenkamp, C.A.L., van Haeringen, A., Hoefsloot, L.H., Peters, D.J.M., Boers, A.C., Daumer-Haas, C., Maiwald, R., Zweier, C., Kerr, B., Cobo, A.M., Toral, J.F., Hoogeboom, A.J.M., Lohmann, D.R., Hehr, U., Dixon, M.J., Breuning, M.H., Wiczorek, D., 2011. Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat Genet* 43, 20–22. <https://doi.org/10.1038/ng.724>
- De Keersmaecker, K., Sulima, S.O., Dinman, J.D., 2015. Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood* 125, 1377–1382. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-569616>
- Decatur, W.A., Fournier, M.J., 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Dever, T.E., Dinman, J.D., Green, R., 2018. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a032649. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649>
- Dever, T.E., Ivanov, I.P., 2018. Roles of polyamines in translation. *J Biol Chem* 293, 18719–18729. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338>
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J.M., Tonevitsky, A.G., Stark, H., Rodnina, M.V., Wahl, M.C., 2005. Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121, 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.015>
- Djumagulov, M., Demeshkina, N., Jenner, L., Rozov, A., Yusupov, M., Yusupova, G., 2021. Accuracy mechanism of eukaryotic ribosome translocation. *Nature* 600, 543–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04131-9>

- Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kubyshkin, V., Starosta, A.L., Wilson, D.N., Budisa, N., Rodnina, M.V., 2015. Entropic Contribution of Elongation Factor P to Proline Positioning at the Catalytic Center of the Ribosome. *J Am Chem Soc* 137, 12997–13006. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b07427>
- Doherty, L., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.-F., Clinton, C., Schneider, H.E., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Glader, B., Arceci, R.J., Farrar, J.E., Atsidaftos, E., Lipton, J.M., Gleizes, P.-E., Gazda, H.T., 2010. Ribosomal Protein Genes RPS10 and RPS26 Are Commonly Mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet* 86, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.015>
- Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C.A., Thomas, G., 2013. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep* 4, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.045>
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.-N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., Dahl, N., 1999. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169–175. <https://doi.org/10.1038/5951>
- Dubochet, J., Booy, F.P., Freeman, R., Jones, A.V., Walter, C.A., 1981. Low Temperature Electron Microscopy. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 10, 133–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.10.060181.001025>
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., Golub, T.R., 2008. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339. <https://doi.org/10.1038/nature06494>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Esser, D., Siebers, B., 2013. Atypical protein kinases of the RIO family in archaea. *Biochem Soc Trans* 41, 399–404. <https://doi.org/10.1042/BST20120317>
- Estrozi, L.F., Navaza, J., 2008. Fast projection matching for cryo-electron microscopy image reconstruction. *Journal of Structural Biology* 162, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.01.014>
- Farley-Barnes, K.I., McCann, K.L., Ogawa, L.M., Merkel, J., Surovtseva, Y.V., Baserga, S.J., 2018. Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number. *Cell Reports* 22, 1923–1934. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.056>
- Ferguson, A., Wang, L., Altman, R.B., Terry, D.S., Juetter, M.F., Burnett, B.J., Alejo, J.L., Dass, R.A., Parks, M.M., Vincent, C.T., Blanchard, S.C., 2015. Functional Dynamics within the Human Ribosome Regulate the Rate of Active Protein Synthesis. *Molecular Cell* 60, 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.013>
- Ferreira-Cerca, S., Kiburu, I., Thomson, E., LaRonde, N., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gku542>
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., Milkereit, P., 2005. Roles of Eukaryotic Ribosomal Proteins in Maturation and Transport of Pre-18S rRNA and Ribosome Function. *Molecular Cell* 20, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.005>
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., Milkereit, P., 2007. Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins. *Molecular Cell* 28, 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.029>
- Ferreira-Cerca, S., Sagar, V., Schäfer, T., Diop, M., Wesseling, A.-M., Lu, H., Chai, E., Hurt, E., 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. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2403>
- Ferretti, M.B., Ghalei, H., Ward, E.A., Potts, E.L., Karbstein, K., 2017. Rps26 directs mRNA-specific translation by recognition of Kozak sequence elements. *Nat Struct Mol Biol* 24, 700–707. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3442>

- Finch, A.J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L.F., Goyenechea, B., Menne, T.F., Fernández, Á.G., Simpson, P., D'Santos, C.S., Arends, M.J., Donadieu, J., Bellanné-Chantelot, C., Costanzo, M., Boone, C., McKenzie, A.N., Freund, S.M.V., Warren, A.J., 2011. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* 25, 917–929. <https://doi.org/10.1101/gad.623011>
- Flis, J., Holm, M., Rundlet, E.J., Loerke, J., Hilal, T., Dabrowski, M., Bürger, J., Mielke, T., Blanchard, S.C., Spahn, C.M.T., Budkevich, T.V., 2018. tRNA Translocation by the Eukaryotic 80S Ribosome and the Impact of GTP Hydrolysis. *Cell Reports* 25, 2676–2688.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.040>
- Frank, J., Penczek, P., Grassucci, R., Srivastava, S., 1991. Three-dimensional reconstruction of the 70S *Escherichia coli* ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA. *J Cell Biol* 115, 597–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.597>
- Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., Thomas, G., 2012. Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev* 26, 1028–1040. <https://doi.org/10.1101/gad.189951.112>
- Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Spahn, C.M.T., Grassucci, R.A., Svergun, D.I., Frank, J., Penczek, P., n.d. Solution Structure of the *E. coli* 70S Ribosome at 11.5 Å Resolution 13.
- Gandin, V., Senft, D., Topisirovic, I., Ronai, Z.A., 2013. RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes & Cancer* 4, 369–377. <https://doi.org/10.1177/1947601913486348>
- Ganot, P., Bortolin, M.L., Kiss, T., 1997. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89, 799–809. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80263-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80263-9)
- Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M.V., Yusupova, G., Yusupov, M., 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 513, 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature13737>
- Geerlings, T.H., Faber, A.W., Bister, M.D., Vos, J.C., Raué, H.A., 2003. Rio2p, an Evolutionarily Conserved, Low Abundant Protein Kinase Essential for Processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 22537–22545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300759200>
- Gerashchenko, M.V., Peterfi, Z., Yim, S.H., Gladyshev, V.N., 2021. Translation elongation rate varies among organs and decreases with age. *Nucleic Acids Res* 49, e9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1103>
- Ghalei, H., Schaub, F.X., Doherty, J.R., Noguchi, Y., Roush, W.R., Cleveland, J.L., Stroupe, M.E., Karbstein, K., 2015. Hrr25/CK1δ-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth. *Journal of Cell Biology* 208, 745–759. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409056>
- Gilles, A., Frechin, L., Natchiar, K., Biondani, G., von Loeffelholz, O., Holvec, S., Malaval, J.-L., Winum, J.-Y., Klaholz, B.P., Peyron, J.-F., 2020. Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells* 9, 629. <https://doi.org/10.3390/cells9030629>
- Goldfarb, K.C., Cech, T.R., 2017. Targeted CRISPR disruption reveals a role for RNase MRP RNA in human preribosomal RNA processing. *Genes Dev* 31, 59–71. <https://doi.org/10.1101/gad.286963.116>
- Goudarzi, K.M., Lindström, M.S., 2016. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int J Oncol* 48, 1313–1324. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3387>
- Gould, H.J., Martini, O.H., King, H.S., 1972. 80S ribosomal proteins. *Biochem J* 129, 31P–32P.
- Gripp, K.W., Curry, C., Olney, A.H., Sandoval, C., Fisher, J., Chong, J.X.-L., Genomics, U.C. for M., Pilchman, L., Sahraoui, R., Stabley, D.L., Sol-Church, K., 2014. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dysostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164, 2240–2249. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36633>
- Gutierrez, E., Shin, B.-S., Woolstenhulme, C.J., Kim, J.-R., Saini, P., Buskirk, A.R., Dever, T.E., 2013. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell* 51, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.021>
- Heiss, N.S., Knight, S.W., Klauck, S.M., Wiemann, S., Poustka, A., Dokal, I., 1998. X-I inked dyskeratosis congenita is caused 19, 7.

- Hellen, C.U.T., 2018. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Henning, S., Adhikari, R., 2017. Chapter 1 - Scanning Electron Microscopy, ESEM, and X-ray Microanalysis, in: Thomas, S., Thomas, R., Zachariah, A.K., Mishra, R.K. (Eds.), *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46141-2.00001-8>
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., Gleizes, P.-E., 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes: Pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *WIREs RNA* 6, 225–242. <https://doi.org/10.1002/wrna.1269>
- Henras, A.K., Soudet, J., G rus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Moug n, A., Henry, Y., 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2334–2359. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8027-0>
- Heuer, A., Thomson, E., Schmidt, C., Berninghausen, O., Becker, T., Hurt, E., Beckmann, R., 2017. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *eLife* 6, e30189. <https://doi.org/10.7554/eLife.30189>
- Hinnebusch, A.G., 2014. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annual Review of Biochemistry* 83, 779–812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
- Hock, A.K., Vousden, K.H., 2014. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim Biophys Acta* 1843, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.022>
- Horn, H.F., Vousden, K.H., 2008. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 27, 5774–5784. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.189>
- Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I.P., von Lindern, M., 2012. Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* 119, 262–272. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-358200>
- Idol, R.A., Robledo, S., Du, H.-Y., Crimmins, D.L., Wilson, D.B., Ladenson, J.H., Bessler, M., Mason, P.J., 2007. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.02.001>
- Ingolia, N.T., Hussmann, J.A., Weissman, J.S., 2019. Ribosome Profiling: Global Views of Translation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a032698. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032698>
- Jenner, L.B., Demeshkina, N., Yusupova, G., Yusupov, M., 2010. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 17, 555–560. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1790>
- Johnson, A.W., Lund, E., Dahlberg, J., 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* 27, 580–585. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02208-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02208-9)
- Johnson, M.C., Ghalei, H., Doxtader, K.A., Karbstein, K., Stroupe, M.E., 2017. Structural Heterogeneity in Pre-40S Ribosomes. *Structure* 25, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.011>
- Kampen, K.R., Sulima, S.O., Vereecke, S., De Keersmaecker, K., 2020. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res* 48, 1013–1028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz637>
- Kapp, L.D., Lorsch, J.R., 2004. The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>
- Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y.L., Bange, G., Kressler, D., Berninghausen, O., Sinning, I., Hurt, E., Beckmann, R., 2017. Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell* 171, 1599–1610.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.039>
- Keersmaecker, K.D., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., Lahortiga, I., Luc , R., Yan, J., Hulselmans, G., Vranckx, H., Vandepoel, R., Sweron, B., Jacobs, K., Mentens, N., Wlodarska, I., Cauwelier, B., Cloos, J., Soulier, J., Uyttebroeck, A., Bagni, C., Hassan, B.A., Vandenberghe, P., Johnson, A.W., Aerts, S., Cools, J., 2013. Exome sequencing identifies

- mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 45, 186–190. <https://doi.org/10.1038/ng.2508>
- Khairulina, J., Graifer, D., Bulygin, K., Ven'yaminova, A., Frolova, L., Karpova, G., 2010. Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation. *Biochimie* 92, 820–825. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.031>
- Khajuria, R.K., Munschauer, M., Ulirsch, J.C., Fiorini, C., Ludwig, L.S., McFarland, S.K., Abdulhay, N.J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D.R., Jovanovic, M., Ellis, S.R., Fulco, C.P., Engreitz, J.M., Schütz, S., Lian, J., Gripp, K.W., Weinberg, O.K., Pinkus, G.S., Gehrke, L., Regev, A., Lander, E.S., Gazda, H.T., Lee, W.Y., Panse, V.G., Carr, S.A., Sankaran, V.G., 2018. Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* 173, 90–103.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.036>
- Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., Klaholz, B.P., 2015. Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature14427>
- King, T.H., Liu, B., McCully, R.R., Fournier, M.J., 2003. Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs that Form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center. *Molecular Cell* 11, 425–435. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00040-6)
- Kirsch, J.F., Siekevitz, P., Palade, G.E., 1960. Amino acid incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from guinea pig liver microsomes. *J Biol Chem* 235, 1419–1424.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.-P., Caizergues-Ferrer, M., Kiss, T., 1996. Site-Specific Ribose Methylation of Preribosomal RNA: A Novel Function for Small Nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077–1088. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81308-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81308-2)
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Ban, N., 2012. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.007>
- Knight, S.W., Heiss, N.S., Vulliamy, T.J., Greschner, S., Stavrides, G., Pai, G.S., Lestringant, G., Varma, N., Mason, P.J., Dokal, I., Poustka, A., 1999. X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet* 65, 50–58. <https://doi.org/10.1086/302446>
- Knüppel, R., Christensen, R.H., Gray, F.C., Esser, D., Strauß, D., Medenbach, J., Siebers, B., MacNeill, S.A., LaRonde, N., Ferreira-Cerca, S., 2018. Insights into the evolutionary conserved regulation of Rio ATPase activity. *Nucleic Acids Res* 46, 1441–1456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1236>
- Koch, B., Mitterer, V., Niederhauser, J., Stanborough, T., Murat, G., Rechberger, G., Bergler, H., Kressler, D., Pertschy, B., 2012. Yar1 Protects the Ribosomal Protein Rps3 from Aggregation. *J Biol Chem* 287, 21806–21815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365791>
- Kos, M., Tollervey, D., 2010. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* 37, 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.024>
- Kozak, M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125–8148. <https://doi.org/10.1093/nar/15.20.8125>
- Kramer, E.B., Vallabhaneni, H., Mayer, L.M., Farabaugh, P.J., 2010. A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 16, 1797–1808. <https://doi.org/10.1261/rna.2201210>
- Kraushar, M.L., Krupp, F., Harnett, D., Turko, P., Ambrozkiwicz, M.C., Sprink, T., Imami, K., Günnigmann, M., Zinnall, U., Vieira-Vieira, C.H., Schaub, T., Münster-Wandowski, A., Bürger, J., Borisova, E., Yamamoto, H., Rasin, M.-R., Ohler, U., Beule, D., Mielke, T., Tarabykin, V., Landthaler, M., Kramer, G., Vida, I., Selbach, M., Spahn, C.M.T., 2021. Protein Synthesis in the Developing Neocortex at Near-Atomic Resolution Reveals Ebp1-Mediated Neuronal Proteostasis at the 60S Tunnel Exit. *Molecular Cell* 81, 304–322.e16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.037>
- Kressler, D., Hurt, E., Baßler, J., 2017. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 640–654. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.05.005>
- Kressler, D., Linder, P., de La Cruz, J., 1999. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897–7912. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.12.7897>

- Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., Hurt, E., 2008. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J Cell Biol* 181, 935–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801181>
- Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., Nielsen, H., 2016. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 44, 7884–7895. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw482>
- Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 282–295. <https://doi.org/10.1038/nrm1354>
- Lafontaine, D., Vandenhaute, J., Tollervey, D., 1995. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev.* 9, 2470–2481. <https://doi.org/10.1101/gad.9.20.2470>
- Lafontaine, D.L.J., Preiss, T., Tollervey, D., 1998. Yeast 18S rRNA Dimethylase Dim1p: a Quality Control Mechanism in Ribosome Synthesis? *Mol Cell Biol* 18, 2360–2370.
- Lake, J.A., 1976. Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *Journal of Molecular Biology* 105, 131–159. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90200-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90200-X)
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., Andersen, J.S., 2007. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* 17, 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.064>
- Larburu, N., Montellese, C., O'Donohue, M.-F., Kutay, U., Gleizes, P.-E., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw714>
- LaRonde-LeBlanc, N., Guszczynski, T., Copeland, T., Wlodawer, A., 2005. Structure and activity of the atypical serine kinase Rio1. *FEBS Journal* 272, 3698–3713. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04796.x>
- LaRonde-LeBlanc, N., Wlodawer, A., 2005. A Family Portrait of the RIO Kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 37297–37300. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500013200>
- Lazdins, I.B., Delannoy, M., Sollner-Webb, B., n.d. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization 15.
- Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., Tollervey, D., 2012. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* 19, 744–753. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2308>
- Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choessel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., Gleizes, P.-E., 2004. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *The EMBO Journal* 23, 2336–2347. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600252>
- Lestrade, L., Weber, M.J., 2006. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 34, D158–162. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj002>
- Lezzerini, M., Penzo, M., O'Donohue, M.-F., Marques Dos Santos Vieira, C., Saby, M., Elfrink, H.L., Diets, I.J., Hesse, A.-M., Couté, Y., Gastou, M., Nin-Velez, A., Nikkels, P.G.J., Olson, A.N., Zonneveld-Huijssoon, E., Jongmans, M.C.J., Zhang, G., van Weeghel, M., Houtkooper, R.H., Wlodarski, M.W., Kuiper, R.P., Bierings, M.B., van der Werff Ten Bosch, J., Leblanc, T., Montanaro, L., Dinman, J.D., Da Costa, L., Gleizes, P.-E., MacInnes, A.W., 2020. Ribosomal protein gene RPL9 variants can differentially impair ribosome function and cellular metabolism. *Nucleic Acids Res* 48, 770–787. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1042>
- Liao, J.-M., Zhou, X., Gatignol, A., Lu, H., 2014. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene* 33, 4916–4923. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.430>

- Ljungström, V., Cortese, D., Young, E., Pandzic, T., Mansouri, L., Plevova, K., Ntoufa, S., Baliakas, P., Clifford, R., Sutton, L.-A., Blakemore, S.J., Stavroyianni, N., Agathangelidis, A., Rossi, D., Höglund, M., Kotaskova, J., Juliusson, G., Belessi, C., Chiorazzi, N., Panagiotidis, P., Langerak, A.W., Smedby, K.E., Oscier, D., Gaidano, G., Schuh, A., Davi, F., Pott, C., Strefford, J.C., Trentin, L., Pospisilova, S., Ghia, P., Stamatopoulos, K., Sjöblom, T., Rosenquist, R., 2016. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood* 127, 1007–1016. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-674572>
- Lorsch, J.R., Herschlag, D., 1999. Kinetic dissection of fundamental processes of eukaryotic translation initiation in vitro. *EMBO J* 18, 6705–6717. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6705>
- Loveland, A.B., Demo, G., Grigorieff, N., Korostelev, A.A., 2017. Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity. *Nature* 546, 113–117. <https://doi.org/10.1038/nature22397>
- Ludwig, L.S., Gazda, H.T., Eng, J.C., Eichhorn, S.W., Thiru, P., Ghazvinian, R., George, T.I., Gotlib, J.R., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Lodish, H.F., Lander, E.S., Sankaran, V.G., 2014. Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20, 748–753. <https://doi.org/10.1038/nm.3557>
- Ma, C., Wu, S., Li, N., Chen, Y., Yan, K., Li, Z., Zheng, L., Lei, J., Woolford, J.L., Gao, N., 2017. Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat Struct Mol Biol* 24, 214–220. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3364>
- Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., Bourdon, J.-C., Jordan, L., Thompson, A., Tafer, Y., Cong, R., Bouvet, P., Saurin, J.-C., Catez, F., Prats, A.-C., Puisieux, A., Diaz, J.-J., 2013. p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* 24, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.013>
- Mathews, M., Sonenberg, N., Hershey, J. W., 2000. Origins and principles of translational control. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES* 1–32.
- McKenney, K.M., Rubio, M.A.T., Alfonzo, J.D., 2017. The Evolution of Substrate Specificity by tRNA Modification Enzymes. *Enzymes* 41, 51–88. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.03.002>
- McQuillen, K., Roberts, R.B., Britten, R.J., 1959. SYNTHESIS OF NASCENT PROTEIN BY RIBOSOMES IN *ESCHERICHIA COLI*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45, 1437–1447.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., 2012. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 19, 560–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>
- Melnikov, S., Mailliot, J., Shin, B.-S., Rigger, L., Yusupova, G., Micura, R., Dever, T.E., Yusupov, M., 2016. Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *Journal of Molecular Biology* 428, 3570–3576. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.011>
- Merrick, W.C., Pavitt, G.D., 2018. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a033092. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>
- Miller, L., Brown, DonaldD., 1969. Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. *Chromosoma* 28. <https://doi.org/10.1007/BF00284259>
- Mitterer, V., Gantenbein, N., Birner-Gruenberger, R., Murat, G., Bergler, H., Kressler, D., Pertschy, B., 2016. Nuclear import of dimerized ribosomal protein Rps3 in complex with its chaperone Yar1. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep36714>
- Mitterer, V., Shayan, R., Ferreira-Cerca, S., Murat, G., Enne, T., Rinaldi, D., Weigl, S., Omanic, H., Gleizes, P.-E., Kressler, D., Plisson-Chastang, C., Pertschy, B., 2019. Conformational proofreading of distant 40S ribosomal subunit maturation events by a long-range communication mechanism. *Nat Commun* 10, 2754. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10678-z>
- Miyoshi, M., Okajima, T., Matsuda, T., Fukuda, M.N., Nadano, D., 2007. Bystin in human cancer cells: intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem J* 404, 373–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20061597>

- Moazed, D., Noller, H.F., 1989. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342, 142–148. <https://doi.org/10.1038/342142a0>
- Molavi, G., Samadi, N., Hosseingholi, E.Z., 2019. The roles of moonlight ribosomal proteins in the development of human cancers. *J Cell Physiol* 234, 8327–8341. <https://doi.org/10.1002/jcp.27722>
- Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A.K., Kutay, U., Gleizes, P.-E., O'Donohue, M.-F., 2017. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res* 45, 6822–6836. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx253>
- Morgado-Palacin, L., Varetto, G., Llanos, S., Gómez-López, G., Martinez, D., Serrano, M., 2015. Partial Loss of Rpl11 in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Rep* 13, 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.038>
- Mullineux, S.-T., Lafontaine, D.L.J., 2012. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie* 94, 1521–1532. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.001>
- Murray, J., Savva, C.G., Shin, B.-S., Dever, T.E., Ramakrishnan, V., Fernández, I.S., n.d. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *eLife* 5, e13567. <https://doi.org/10.7554/eLife.13567>
- Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L., Strobel, S.A., 2000. A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289, 947–950. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.947>
- Myasnikov, A.G., Kundhavai Natchiar, S., Nebout, M., Hazemann, I., Imbert, V., Khatter, H., Peyron, J.-F., Klaholz, B.P., 2016. Structure–function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics. *Nat Commun* 7, 12856. <https://doi.org/10.1038/ncomms12856>
- Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., Klaholz, B.P., 2017. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* 551, 472–477. <https://doi.org/10.1038/nature24482>
- Ni, J., Tien, A.L., Fournier, M.J., 1997. Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* 89, 565–573. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80238-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80238-x)
- Niemenen, T.T., O'Donohue, M.-F., Wu, Y., Lohi, H., Scherer, S.W., Paterson, A.D., Ellonen, P., Abdel-Rahman, W.M., Valo, S., Mecklin, J.-P., Järvinen, H.J., Gleizes, P.-E., Peltomäki, P., 2014. Germline Mutation of RPS20, Encoding a Ribosomal Protein, Causes Predisposition to Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Without DNA Mismatch Repair Deficiency. *Gastroenterology* 147, 595–598.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.009>
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>
- Nomura, M., 1970. Bacterial Ribosome. *Bacteriol Rev* 34, 228–277.
- O'Donohue, M.-F., Choesmel, V., Faubladiere, M., Fichant, G., Gleizes, P.-E., 2010. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J. Cell Biol.* 190, 853–866. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005117>
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Tarry, M.J., Carter, A.P., Ramakrishnan, V., 2001. Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit. *Science* 292, 897–902. <https://doi.org/10.1126/science.1060612>
- Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J., Ramakrishnan, V., 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111, 721–732. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01086-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01086-3)
- Olejniczak, M., Uhlenbeck, O.C., 2006. tRNA residues that have coevolved with their anticodon to ensure uniform and accurate codon recognition. *Biochimie* 88, 943–950. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.005>
- Orlova, E.V., Saibil, H.R., 2011. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. *Chem. Rev.* 111, 7710–7748. <https://doi.org/10.1021/cr100353t>
- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., 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*. *Molecular Cell* 16, 943–954. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.031>
- Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347–358. <https://doi.org/10.1126/science.1096303>
- Palade, G.E., 1955. A SMALL PARTICULATE COMPONENT OF THE CYTOPLASM. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 59–68.
- Paolini, N.A., Attwood, M., Sondalle, S.B., Vieira, C.M. dos S., van Adrichem, A.M., di Summa, F.M., O'Donohue, M.-F., Gleizes, P.-E., Rachuri, S., Briggs, J.W., Fischer, R., Ratcliffe, P.J., Wlodarski, M.W., Houtkooper, R.H., von Lindern, M., Kuipers, T.W., Dinman, J.D., Baserga, S.J., Cockman, M.E., MacInnes, A.W., 2017. A Ribosomopathy Reveals Decoding Defective Ribosomes Driving Human Dysmorphisms. *Am J Hum Genet* 100, 506–522. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.034>
- Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., 1998. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *EMBO J* 17, 7490–7497. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7490>
- Pausch, P., Singh, U., Ahmed, Y.L., Pillet, B., Murat, G., Altegoer, F., Stier, G., Thoms, M., Hurt, E., Sinning, I., Bange, G., Kressler, D., 2015. Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nat Commun* 6, 7494. <https://doi.org/10.1038/ncomms8494>
- Pellegrino, S., Demeshkina, N., Mancera-Martinez, E., Melnikov, S., Simonetti, A., Myasnikov, A., Yusupov, M., Yusupova, G., Hashem, Y., 2018. Structural Insights into the Role of Diphthamide on Elongation Factor 2 in mRNA Reading-Frame Maintenance. *Journal of Molecular Biology* 430, 2677–2687. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.006>
- Pellegrino, S., Terrosu, S., Yusupova, G., Yusupov, M., 2021. Inhibition of the Eukaryotic 80S Ribosome as a Potential Anticancer Therapy: A Structural Perspective. *Cancers (Basel)* 13, 4392. <https://doi.org/10.3390/cancers13174392>
- Peña, C., Schütz, S., Fischer, U., Chang, Y., Panse, V.G., 2016. Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation. *eLife* 5, e21755. <https://doi.org/10.7554/eLife.21755>
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040774>
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Piekna-Przybylska, D., Decatur, W.A., Fournier, M.J., 2007. The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis. *Nucleic Acids Research* 36, D178–D183. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm855>
- Pillet, B., Mitterer, V., Kressler, D., Pertschy, B., 2017. Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins. *BioEssays* 39, e201600153. <https://doi.org/10.1002/bies.201600153>
- Preti, M., O'Donohue, M.-F., Montel-Lehry, N., Bortolin-Cavaillé, M.-L., Choesmel, V., Gleizes, P.-E., 2013. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res* 41, 4709–4723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt160>
- Punjani, A., Rubinstein, J.L., Fleet, D.J., Brubaker, M.A., 2017. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods* 14, 290–296. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
- Rao, S., Lee, S.-Y., Gutierrez, A., Perrigoue, J., Thapa, R.J., Tu, Z., Jeffers, J.R., Rhodes, M., Anderson, S., Oravec, T., Hunger, S.P., Timakhov, R.A., Zhang, R., Balachandran, S., Zambetti, G.P., Testa, J.R., Look, A.T., Wiest, D.L., 2012. Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood* 120, 3764–3773. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415349>

- Ridanpää, M., Eenennaam, H. van, Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., vanVenrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., Mäkitie, O., Kaitila, I., Chapelle, A. de la, 2001. Mutations in the RNA Component of RNase MRP Cause a Pleiotropic Human Disease, Cartilage-Hair Hypoplasia. *Cell* 104, 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00205-7)
- Rocchi, L., Pacilli, A., Sethi, R., Penzo, M., Schneider, R.J., Treré, D., Brigotti, M., Montanaro, L., 2013. Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 41, 8308–8318. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt587>
- Rodnina, M.V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., Wintermeyer, W., 1996. Initial binding of the elongation factor Tu.GTP.aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J Biol Chem* 271, 646–652. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.646>
- Rouquette, J., Choesmel, V., Gleizes, P.-E., 2005. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J* 24, 2862–2872. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600752>
- Rual, J.-F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P., Vidal, M., 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein–protein interaction network. *Nature* 437, 1173–1178. <https://doi.org/10.1038/nature04209>
- Sanghai, Z.A., Miller, L., Molloy, K.R., Barandun, J., Hunziker, M., Chaker-Margot, M., Wang, J., Chait, B.T., Klinge, S., 2018. Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature* 556, 126–129. <https://doi.org/10.1038/nature26156>
- Sankaran, V.G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J.-A., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Orkin, S.H., Nathan, D.G., Lander, E.S., Gazda, H.T., 2012. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 122, 2439–2443. <https://doi.org/10.1172/JCI63597>
- Scaiola, A., Peña, C., Weissner, M., Böhringer, D., Leibundgut, M., Klingauf-Nerurkar, P., Gerhardt, S., Panse, V.G., Ban, N., 2018. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *The EMBO Journal* 37. <https://doi.org/10.15252/embj.201798499>
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., Hurt, E., 2006. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 441, 651–655. <https://doi.org/10.1038/nature04840>
- Scheres, S.H.W., 2016. Processing of Structurally Heterogeneous Cryo-EM Data in RELION, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 125–157. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012>
- Scheres, S.H.W., 2012. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology* 180, 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>
- Scheres, S.H.W., Chen, S., 2012. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. *Nat Methods* 9, 853–854. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2115>
- Schmidt, C., Becker, T., Heuer, A., Braunger, K., Shanmuganathan, V., Pech, M., Berninghausen, O., Wilson, D.N., Beckmann, R., 2016. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res* 44, 1944–1951. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1517>
- Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brümmendorf, T.H., Gerding, U., Platzbecker, U., Büsche, G., Knüchel, R., Chen, M.C., Waters, C.S., Chen, E., Chu, L.P., Novina, C.D., Lindsley, R.C., Carr, S.A., Ebert, B.L., 2016. Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat Med* 22, 288–297. <https://doi.org/10.1038/nm.4047>
- Schütz, S., Fischer, U., Altwater, M., Nerurkar, P., Peña, C., Gerber, M., Chang, Y., Caesar, S., Schubert, O.T., Schlenstedt, G., Panse, V.G., 2014. A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *eLife* 3, e03473. <https://doi.org/10.7554/eLife.03473>

- Schütz, S., Michel, E., Damberger, F.F., Oplová, M., Peña, C., Leitner, A., Aebersold, R., Allain, F.H.-T., Panse, V.G., 2018. Molecular basis for disassembly of an importin:ribosomal protein complex by the escortin Tsr2. *Nat Commun* 9, 3669. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06160-x>
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., Cate, J.H.D., 2005. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* 310, 827–834. <https://doi.org/10.1126/science.1117230>
- Sengupta, J., Bussiere, C., Pallesen, J., West, M., Johnson, A.W., Frank, J., 2010. Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *J Cell Biol* 189, 1079–1086. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001124>
- Senissar, M., Manav, M.C., Brodersen, D.E., 2017. Structural conservation of the PIN domain active site across all domains of life. *Protein Sci* 26, 1474–1492. <https://doi.org/10.1002/pro.3193>
- Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., Hegde, R.S., 2016. Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell* 167, 1229–1240.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.046>
- Shayan, R., Rinaldi, D., Larburu, N., Plassart, L., Balor, S., Bouyssié, D., Lebaron, S., Marcoux, J., Gleizes, P.-E., Plisson-Chastang, C., 2020. Good Vibrations: Structural Remodeling of Maturing Yeast Pre-40S Ribosomal Particles Followed by Cryo-Electron Microscopy. *Molecules* 25, 1125. <https://doi.org/10.3390/molecules25051125>
- Shin, B.-S., Katoh, T., Gutierrez, E., Kim, J.-R., Suga, H., Dever, T.E., 2017. Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic Acids Res* 45, 8392–8402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx532>
- Simonetti, A., Guca, E., Bochler, A., Kuhn, L., Hashem, Y., 2020. Structural Insights into the Mammalian Late-Stage Initiation Complexes. *Cell Rep* 31, 107497. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.061>
- Singh, S., Vanden Broeck, A., Miller, L., Chaker-Margot, M., Klinge, S., 2021. Nucleolar maturation of the human small subunit processome. *Science* 373, eabj5338. <https://doi.org/10.1126/science.abj5338>
- Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G.J.M., Watkins, N.J., 2013. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 200, 577–588. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207131>
- Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., Frank, J., 2004. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* 23, 1008–1019. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600102>
- Stark, H., Mueller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., Heel, M. van, 1995. The 70S Escherichia coli ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* 3, 815–821. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00216-7)
- Strunk, B.S., Karbstein, K., 2009. Powering through ribosome assembly. *RNA* 15, 2083–2104. <https://doi.org/10.1261/rna.1792109>
- Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L., Karbstein, K., Skiniotis, G., 2011. Ribosome Assembly Factors Prevent Premature Translation Initiation by 40S Assembly Intermediates. *Science* 333, 1449–1453. <https://doi.org/10.1126/science.1208245>
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., Karbstein, K., 2012. A Translation-Like Cycle Is a Quality Control Checkpoint for Maturing 40S Ribosome Subunits. *Cell* 150, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.044>
- Sulima, S.O., Gülay, S.P., Anjos, M., Patchett, S., Meskauskas, A., Johnson, A.W., Dinman, J.D., 2014. Eukaryotic rpl10 drives ribosomal rotation. *Nucleic Acids Research* 42, 2049–2063. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1107>
- Sulima, S.O., Hofman, I.J.F., De Keersmaecker, K., Dinman, J.D., 2017. How Ribosomes Translate Cancer. *Cancer Discov* 7, 1069–1087. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0550>

- Sulima, S.O., Kampen, K.R., De Keersmaecker, K., 2019. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* 8, 229. <https://doi.org/10.3390/cells8030229>
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., Lafontaine, D.L.J., 2013. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors. *Molecular Cell* 51, 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.011>
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., Isobe, T., 2018. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res* 46, 9289–9298. <https://doi.org/10.1093/nar/gky811>
- Taylor, D.J., Nilsson, J., Merrill, A.R., Andersen, G.R., Nissen, P., Frank, J., 2007. Structures of modified eEF2-80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *The EMBO Journal* 26, 2421–2431. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601677>
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., Hurt, E.C., 1993. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72, 443–457. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90120-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90120-f)
- Tomecki, R., Labno, A., Drazkowska, K., Cysewski, D., Dziembowski, A., 2015. hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A1, but not at site A0. *RNA Biol* 12, 1010–1029. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1073437>
- Traugh, J.A., Traut, R.R., 1973. Recent advances in the preparation of mammalian ribosomes and analysis of their protein composition. *Methods Cell Biol* 7, 67–103. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61772-0](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61772-0)
- Turowski, T.W., Lebaron, S., Zhang, E., Peil, L., Dudnakova, T., Petfalski, E., Granneman, S., Rappsilber, J., Tollervey, D., 2014. Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Research* 42, 12189–12199. <https://doi.org/10.1093/nar/gku878>
- Ulirsch, J.C., Verboon, J.M., Kazerounian, S., Guo, M.H., Yuan, D., Ludwig, L.S., Handsaker, R.E., Abdulhay, N.J., Fiorini, C., Genovese, G., Lim, E.T., Cheng, A., Cummings, B.B., Chao, K.R., Beggs, A.H., Genetti, C.A., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Vlachos, A., Lipton, J.M., Atsidaftos, E., Glader, B., Narla, A., Gleizes, P.-E., O'Donohue, M.-F., Montel-Lehry, N., Amor, D.J., McCarroll, S.A., O'Donnell-Luria, A.H., Gupta, N., Gabriel, S.B., MacArthur, D.G., Lander, E.S., Lek, M., Da Costa, L., Nathan, D.G., Korostelev, A.A., Do, R., Sankaran, V.G., Gazda, H.T., 2018. The Genetic Landscape of Diamond-Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet* 103, 930–947. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.027>
- Vanrobays, E., Gelugne, J.-P., Gleizes, P.-E., Caizergues-Ferrer, M., 2003. Late Cytoplasmic Maturation of the Small Ribosomal Subunit Requires RIO Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 23, 2083–2095. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.6.2083-2095.2003>
- Vanrobays, E., Gleizes, P.E., Bousquet-Antonelli, C., Noaillic-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., Gélugne, J.P., 2001. Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO J* 20, 4204–4213. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4204>
- Vasil'ev, V.D., 1974. [Morphological model of a small 30S ribosomal subparticle]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 219, 994–995.
- Venema, J., Tollervey, D., 1999. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33, 261–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.261>
- Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Kang, J., Onel, K., Sharaf, R.N., Alter, B.P., Lipton, J.M., 2018. Increased risk of colon cancer and osteogenic sarcoma in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 132, 2205–2208. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-848937>
- Voorhees, R.M., Ramakrishnan, V., 2013. Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 203–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-113009-092313>
- Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P.J., Dokal, I., 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 413, 432–435. <https://doi.org/10.1038/35096585>

- Vulliamy, T.J., Dokal, I., 2008. Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex. *Biochimie* 90, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.017>
- Walne, A.J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., Al-Qurashi, F.-H., Aljurf, M., Dokal, I., 2007. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 16, 1619–1629. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm111>
- Wang, C., Meier, U.T., 2004. Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *EMBO J* 23, 1857–1867. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600181>
- Warner, J.R., 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 437–440. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01460-7)
- Warner, J.R., 1977. In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. *J Mol Biol* 115, 315–333. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90157-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90157-7)
- Watkins, N.J., 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: Box C/D and H/ACA snoRNPs. *WIREs RNA* 3, 397–414. <https://doi.org/10.1002/wrna.117>
- Watson, Z.L., Ward, F.R., Méheust, R., Ad, O., Schepartz, A., Banfield, J.F., Cate, J.H., 2020. Structure of the bacterial ribosome at 2 Å resolution. *eLife* 9, e60482. <https://doi.org/10.7554/eLife.60482>
- Weinberg, R.A., Loening, U., Willems, M., Penman, S., 1967. Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 1088–1095. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.3.1088>
- Weinberg, R.A., Penman, S., 1970. Processing of 45 s nucleolar RNA. *Journal of Molecular Biology* 47, 169–178. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90337-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90337-2)
- Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C.C., Traynor, D., Kay, R.R., Warren, A.J., 2015. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nat Struct Mol Biol* 22, 914–919. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3112>
- Wells, G.R., Weichmann, F., Colvin, D., Sloan, K.E., Kudla, G., Tollervey, D., Watkins, N.J., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw213>
- Wells, G.R., Weichmann, F., Sloan, K.E., Colvin, D., Watkins, N.J., Schneider, C., 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 Res* 45, 4796–4809. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1344>
- Welting, T.J.M., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J.M., 2004. Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* 32, 2138–2146. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh539>
- Widmann, B., Wandrey, F., Badertscher, L., Wyler, E., Pfannstiel, J., Zemp, I., Kutay, U., 2012. The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits. *MBoC* 23, 22–35. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-07-0639>
- Wild, T., Horvath, P., Wyler, E., Widmann, B., Badertscher, L., Zemp, I., Kozak, K., Csucs, G., Lund, E., Kutay, U., 2010. A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export. *PLoS Biol* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000522>
- Wilson, D.N., Cate, J.H.D., 2012. The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011536. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wilson, D.N., Nierhaus, K.H., 2006. The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 63, 2725–2737. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6125-4>
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J., Ma, C., Lei, J., Dong, M.-Q., Woolford, J.L., Gao, N., 2016. Diverse roles of assembly factors revealed by

- structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature* 534, 133–137. <https://doi.org/10.1038/nature17942>
- Wyler, E., Zimmermann, M., Widmann, B., Gstaiger, M., Pfannstiel, J., Kutay, U., Zemp, I., 2011. Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies. *RNA* 17, 189–200. <https://doi.org/10.1261/rna.2325911>
- Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Brandenburg, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., Ruggero, D., 2006. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 312, 902–906. <https://doi.org/10.1126/science.1123835>
- Yoshikawa, H., Larance, M., Harney, D.J., Sundaramoorthy, R., Ly, T., Owen-Hughes, T., Lamond, A.I., 2018. Efficient analysis of mammalian polysomes in cells and tissues using Ribo Mega-SEC. *eLife* 7, e36530. <https://doi.org/10.7554/eLife.36530>
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D., Noller, H.F., 2001. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* 292, 883–896. <https://doi.org/10.1126/science.1060089>
- Zaher, H.S., Green, R., 2009. Fidelity at the Molecular Level: Lessons from Protein Synthesis. *Cell* 136, 746–762. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.036>
- Zemp, I., Wandrey, F., Rao, S., Ashiono, C., Wyler, E., Montellese, C., Kutay, U., 2014. CK1 and CK1 are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation. *Journal of Cell Science* 127, 1242–1253. <https://doi.org/10.1242/jcs.138719>
- Zemp, I., Wild, T., O'Donohue, M.-F., Wandrey, F., Widmann, B., Gleizes, P.-E., Kutay, U., 2009. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *The Journal of Cell Biology* 185, 1167–1180. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904048>
- Zhang, K., 2016. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *Journal of Structural Biology* 193, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.003>
- Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X., He, F., 2010. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res* 38, 6544–6554. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq536>
- Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K.A., Cheng, Y., Agard, D.A., 2017. MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat Methods* 14, 331–332. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4193>
- Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Liao, P., Lu, H., 2013. Ribosomal Protein S14 Negatively Regulates c-Myc Activity. *J Biol Chem* 288, 21793–21801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445122>
- Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B.O., Kimanius, D., Hagen, W.J., Lindahl, E., Scheres, S.H., 2018. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* 7, e42166. <https://doi.org/10.7554/eLife.42166>
- Zivanov, J., Nakane, T., Scheres, S.H.W., 2020. Estimation of high-order aberrations and anisotropic magnification from cryo-EM data sets in RELION-3.1. *IUCr* 7, 253–267. <https://doi.org/10.1107/S2052252520000081>
- Zivanov, J., Nakane, T., Scheres, S.H.W., 2019. A Bayesian approach to beam-induced motion correction in cryo-EM single-particle analysis. *IUCr* 6, 5–17. <https://doi.org/10.1107/S205225251801463X>
- Zorbas, C., Nicolas, E., Wacheul, L., Huvelle, E., Heurgué-Hamard, V., Lafontaine, D.L.J., 2015. The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 26, 2080–2095. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0073>