



HAL
open science

Etude structurale de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine par cryo-microscopie électronique et analyse d'images

Natacha Larburu

► **To cite this version:**

Natacha Larburu. Etude structurale de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine par cryo-microscopie électronique et analyse d'images. Biologie moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30336 . tel-01452636

HAL Id: tel-01452636

<https://theses.hal.science/tel-01452636v1>

Submitted on 2 Feb 2017

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Natacha LARBURU

le vendredi 20 novembre 2015

Titre :

ETUDE STRUCTURALE DE LA BIOGENESE DE LA PETITE SOUS-UNITE
RIBOSOMIQUE HUMAINE PAR CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET ANALYSE
D'IMAGES

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie structurale et fonctionnelle

Unité de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR 5099 CNRS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Célia PLISSON-CHASTANG
Pierre-Emmanuel GLEIZES

Jury :

Patrick SCHULTZ
Nicolas LEULLIOT
Reynald GILLET

Yaser HASHEM
Célia PLISSON-CHASTANG
Pierre-Emmanuel GLEIZES

Directeur de Recherche
Professeur d'Université
Professeur d'Université
Chargé de Recherche
Chargé de Recherche
Professeur d'Université

Président de Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-Directrice de thèse
Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : Patrick Shultz, Nicolas Leulliot, Reynald Gillet et Yaser Hashem d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je veux remercier l'équipe « dynamique et désordre de l'assemblage des ribosomes » : Célia, Pierre-Em, Marie-Françoise, Nathalie, Ramtin, Franck, Marlène, Anna. Nous avons partagé des discussions scientifiques ou non. Vous avez été les témoins de mon évolution aux cours de cinq années particulières.

Je veux en particulier, te dire merci Célia. Tu n'as pas seulement été mon mentor, tu as aussi joué le rôle de deuxième maman à Toulouse. La première fois qu'on s'est vu, tu me présentais le microscope, avec des étoiles dans les yeux. Je me souviens que j'étais arrivée en stage sans trop savoir ce que j'allais faire par la suite, mais après cette discussion j'avais alors une petite idée de ce qui me plairait de faire dans le futur. Par la suite, tu m'as transmis cette passion de la microscopie électronique. Tu m'as aidé au cours des différentes étapes de ma thèse. Ta patience, ta gentillesse m'ont beaucoup apporté mais surtout je reteindrai ta joie de vivre communicative. C'est une fierté d'avoir été formé et travaillé avec toi au cours de ces différentes années. Tu es une super encadrante de thèse et je suis persuadée que tu vas former un grand nombre de thésards par la suite.

Je veux aussi remercier Pierre-Em. Si j'avais un mot pour définir Célia ce serait donc la passion et l'émerveillement et pour toi Pierre-Em, ce serait l'optimisme. Tout au long de ma thèse, tu as su me rassurer. Parmi les nombreuses conversations que l'on a partagées, je me souviendrai en particulier de celle improbable sur le nombril des particules. J'ai été épaté par ta faculté à citer des papiers. Merci pour tout ce que tu m'as apporté.

Je souhaite remercier toute les personnes qui ont joué un rôle dans ces travaux : Christian de l'équipe du Pr Kutay qui a notamment purifié les particules, Marie-Françoise, Lola et Nathalie qui ont obtenu les données fonctionnelles, Alain du service informatique, Nicolas et l'équipe Calmip qui m'ont appris comment fonctionne un cluster de calcul.

Un petit mot pour les filles du plateau. Le plateau représente pour moi le meilleur endroit du labo. D'ailleurs tout le monde savait que si je n'étais pas dans les étages, j'étais au plateau. Je pense par ailleurs que beaucoup de personne au cours de ces différentes années m'ont entendu dire la fameuse phrase « je descends au plateau ». Le plateau est très convivial et c'est surtout grâce à votre bonne humeur, Steph et Vanessa. Je ne compte pas le nombre de fous rires qu'on a eu ensemble. J'ai adoré partagé tous ces moments avec vous.

Je souhaite aussi remercier Anthony, pour plusieurs choses mais en particulier pour ta tartiflette qui m'a donné des forces pour ma soutenance.

Je souhaite remercier chacune des personnes du LBMÉ, en fait de l'IBCG pour toutes les discussions que l'on a eu dans les couloirs ou au cours des bières sessions notamment. Vous m'avez tous apporté quelque chose, je sors grandie de ces années passées à vos côtés.

Je souhaite maintenant remercier mes amis. Tout d'abord, mes amis du 64 : et parmi eux en particulier Emilie, Cindy, Alexis et Norah, la petite dernière. Ça a toujours une bouffée d'air de se retrouver quand je rentrais et qu'on se racontait toutes nos péripéties. Maintenant que je vais partir pour de nouvelle aventure, après avoir visité Toulouse, il va être tant pour vous de venir visiter d'autres contrées.

Tommy, on s'est connu à Toulouse mais tu fais partie de mes amis du 64. Tu es d'ailleurs le seul basque que je connaisse vivant à Toulouse. Milesker !

Je souhaite aussi remercier Maud ma binôme de TP, binôme un jour, binôme toujours ! Anne, François, Maral Duy Khanh, Ramtin, Elise, Alix, Steve et Clément pour tous les moments qu'on a partagé.

Ramtin, je suis contente d'avoir connu comme jamais. Et comme tu dirais la thèse c'est terminado et la suite commence maintenant ! Tes fameuses imitations de Patrick Bruel vont me manquer.

Un petit mot spécial pour « ma promo » Elise, Alix, Steve et Clément. On forme une super équipe. Je très heureuse de faire partie de vos amis. Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble. Merci héro ! (petite dédicace à Alix). Je ne vais pas les énumérer sinon il faudrait presque écrire une nouvelle thèse qui pourrait s'intituler l'étude comportementale de thesards vivant en groupe. Mais il vaut peut-être mieux que ça reste entre nous...

Un merci tout particulier à Clément ou Tac vu qu'on nous surnomme Tic et Tac. J'ai toujours pu compter sur toi, ne change rien ! Je souligne quand même que lors de nos nombreux débats notamment sur le sport, j'avais la majorité du temps raison et que les peu de fois où j'ai perdu au tarot, c'était juste parce que je le faisais exprès, bien sûr ! J'en profite c'est moi qui écrit ces remerciement, ah la mauvaise foi!

Un grand merci à mes parents et mon frère qui m'ont soutenu et surtout supporter lors de mes moments de stress. Si j'en suis là, c'est grâce à vous !

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	5
Index des figures	7
Résumé	11
Abstract	13
Introduction	15
A- Le ribosome et son assemblage: généralités	17
B- Acteurs de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique eucaryote	22
I- Maturation de l'ARNr : du pré-ARNr 47S à l'ARNr 18S	22
II- Les protéines ribosomiques	30
III- Co-facteurs de maturation	36
C- Du nucléole au cytoplasme: étapes de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique	53
I- Le nucléole : lieu de synthèse des ARN ribosomiques et des étapes précoces de la maturation de la petite sous-unité	53
II- Le nucléoplasme et l'export nucléaire	56
III- Etapes de maturation cytoplasmique	60
D- Apport de la microscopie électronique en transmission dans l'étude du ribosome et de sa formation	67
I- Structures de ribosomes matures	67
II- Structures des particules pré-ribosomiques	70
E- Problématique et objectifs de la thèse	755
Matériels et méthodes	77
A- Purification des particules pré-40S humaines	79
B- Immuno-EM localisation de co-facteurs sur la particule pré-40S LTV1	79
C- Microscopie électronique à transmission	80
I- Grilles de microscopie électronique	80
II- Ionisation	80
III- Préparation des échantillons : La coloration négative	81
IV- Préparation des échantillons pour la cryo-MET	82
V- Transfert de la grille dans le microscope électronique	83
VI- Le microscope électronique à transmission : principes généraux	83

VII- Acquisition des images	94
D- Analyse d'images	96
I- Principes généraux	96
II- Le programme RELION 1.3	97
III- Les ressources informatiques	103
IV- La visualisation des reconstructions 3D : utilisation de CHIMERA	103
Résultats	105
A- Mise en place des outils requis pour l'étude	107
I- Choix des particules pré-40S humaines	107
II- Mise en place des conditions de congélation	112
III- Cryo-MET « haute résolution »	114
B- Analyse structurale de particules pré-40S intermédiaires LTV1	116
I- Pré-traitement	117
II- Classification 2D : stratégie « non restrictive »	117
III- Classification 2D : stratégie « restrictive »	125
IV- Rôle de RACK1 dans la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine	144
C- Analyse structurale de particules pré-40S tardive RIO1(KD)	148
I- Pré-traitement	149
II- Classification 2D	149
III- Classification 3D	151
IV- Raffinement de la classe 3D « K2 »	153
V- Analyse de la structure obtenue	155
Discussion	159
A- Mise en place de l'analyse structurale	161
I- Les particules pré-40S observées présentent des morphologies différentes suivant l'appât de purification employé	161
II- Préparation des échantillons et acquisition d'images	163
III- Analyse d'images	163
B- Analyse des structures des particules pré-40S humaines obtenues	165
I- Composition des différentes particules étudiées	165
II- La particule pré-40S intermédiaire LTV1	167
III- RACK1, acteur du couplage correct de la maturation de la petite sous-unité ribosomique et de l'initiation de la traduction?	172
IV- La particule pré-40S tardive RIO1(KD)	176
C- Comparaison des structures obtenues : modèle de transition structurale entre les particules intermédiaires et tardives	180

Perspectives	185.
A- Caractérisation structurale des particules pré-40S intermédiaires et tardives	187
I.- Diminution de l'hétérogénéité compositionnelle des particules pré-40S intermédiaires	187
II- Fixation légère afin de diminuer la flexibilité des particules pré-40S	187
III- Amélioration de la résolution : acquisition et analyse d'images	188
B- Vérification des modèles de positionnement des co-facteurs sur les particules pré-40S intermédiaires et tardives.	189
C- Etudes des autres particules pré-40S disponibles	190.
Bibliographie	191

Abréviations

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol I	ARN polymérase I
ARN pol II	ARN polymérase II
ARN pol III	ARN polymérase III
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
AU	Acétate d'uranyle
CCD	Charge coupled device
CPN	Complexe de pore nucléaire
Cryo-MET	Cryo-microscopie électronique à transmission
CTF	Fonction de transfert de contraste
Da	Dalton
DFC	« Dense Fibrillar Component », composant fibrillaire dense
ETS	« External Transcribed Spacer »
FC	« Fibrillar Center », centre fibrillaire
FEG	« Field Emission Gun », Canon à émission de champ
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FSC	Fourier shell correlation
GC	« Granular Component », composant granulaire
iRPS	initiation RPS
ITS	« Internal Transcribed Spacer »
MET	Microscope électronique à transmission
Meti	Microscopie électronique intégrative de Toulouse
NES	« Nuclear Export Signal »
NLS	« Nuclear Localisation Signal »
Nup	Nucléoporines

pRPS	progression RPS
RanGAP	« Ran GTPase Activating Protein »
RanGEF	« Ran GTPase Exchange Factor »
RELION	Regularised <u>l</u> ikelihood <u>o</u> ptimisation
RIO(Kd)	RIO1 Kinase dead
RNP	Particules ribonucléoprotéiques
RP	Protéines ribosomiques
RPL	« Ribosomal Protein of the Large subunit »
RPS	« Ribosomal Protein of the Small subunit »
S	Svelberg
snoRNP	small nucleolar RNP
TF	Transformée de Fourier

Index des figures

Figure 1: Structure des sous-unités ribosomiques humaines	17
Figure 2: Positionnement des sites de fixation de l'ARNt sur les sous-unités ribosomiques eucaryotes.....	18
Figure 3: La biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes.	20
Figure 4: Maturation de l'ARN ribosomique 18S chez la levure.	23
Figure 5: Maturation de l'ARN ribosomique 18S chez l'homme.	27
Figure 6: Pseudo-uridylation par les snoRNP H/ACA.....	29
Figure 7: 2'O méthylation par les snoRNP C/D.	29
Figure 8: Implication des iRPS et pRPS dans la biogenèse de la sous-unité 40S chez l'homme.	31
Figure 9: Rôle des protéines ribosomiques dans la formation de la petite sous-unité ribosomique.....	32
Figure 10: Transport actif de molécules au travers du complexe de pore nucléaire.	34
Figure 11: Position des co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S cytoplasmique de levure.....	42
Figure 12: Organisation du nucléole chez l'Homme et chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Figure 13: Machinerie d'export des particules pré-40S.....	59
Figure 14: Modèle de maturation cytoplasmique de la particule pré-40S chez la levure	63
Figure 15: Modèle hypothétique de l'implication des kinases CK1, RIO2 et RIO1 dans les étapes cytoplasmique de la maturation de la petite sous-unité ribosomique chez l'Homme... ..	66
Figure 16: Voies parallèles et assemblage séquentiel de la petite sous-unité chez les procaryotes, in vitro.....	71
Figure 17: Visualisation du réseau d'interaction formé par les co-facteurs Arx1, Jij1 et Rei1.	71
Figure 18: Visualisation de co-facteurs de maturation sur un précurseur de la grande sous-unité chez la levure.....	72
Figure 19: Différences structuraux entre la grande sous-unité mature et la particule pré-60S.....	73
Figure 20: Position des sept co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S cytoplasmique de levure.	74
Figure 21: Principe de coloration négative	81
Figure 22: Principe de la congélation ultra-rapide de l'échantillon en vue de son observation en cryo-MET	82
Figure 23: Schéma du microscope électronique à transmission	84
Figure 24: Différentes source d'émission d'électrons.	84
Figure 25: Schéma des détecteurs	87
Figure 26 : Principe de la théorie de la formation de l'image.....	88
Figure 27 : Interaction des électrons avec l'échantillon.....	89
Figure 28: Courbes représentant la fonction de transfert de contraste.	93
Figure 29: Principale étapes de l'analyse d'images avec RELION 1.3.....	98

Figure 30: Représentation de la CTF estimée par CTFFIND3 pour l'image et transformée de Fourier (TF) de cette image brute	99
Figure 31: Modèle de la maturation de la petite sous-unité chez l'Homme.	107
Figure 32: Etude de la composition protéique des particules pré-40S disponibles par western blot.....	108
Figure 33: Détermination de la composition des particules pré-40S purifiées	108
Figure 34 : Composition en ARNr des particules pré-40S purifiées en étiquetant soit LTV1, ENP1 ou DIM2.....	109
Figure 35: Observation des différentes particules pré-40S après coloration négative.....	111
Figure 36: Stratégie mise en place pour une analyse structurale haute performance.	114
Figure 37: Exemple de contamination présente sur les images.	115
Figure 38 : Champs de particule pré-40S LTV1 observés par cryo-MET	117
Figure 39: Classification 2D des particules en 500 classes : stratégie dite non restrictive... ..	118
Figure 40: Structure 3D consensus de la particule pré-40S LTV1	119
Figure 41: Exemple de classification 3D des 84 813 particules LTV1	123
Figure 42: Les particules LTV1 présentent un fort degré d'hétérogénéité structurale	125
Figure 43: Classification 2D des particules en 500 classes.....	126
Figure 44: Structure 3D de la particule pré-40S LTV1.....	127
Figure 45: Section identiques des structures 3D consensus de la particule pré-40S LTV1 obtenue par la méthode dite non restrictive en a) et restrictive en b).....	128
Figure 46: Structure 3D de la particule pré-40S LTV1.....	129
Figure 47: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S intermédiaires LTV1 et de la particule mature.....	130
Figure 48: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S LTV1 et de la petite sous-unité.....	131
Figure 49: Chronologie d'association de RPS10 et RPS26 aux particules pré-40S.....	132
Figure 50: Comparaison de la structure 3D de la particule pré-40S LTV1 humaine et de la structure 3D de la particule pré-40S de levure.. ..	133
Figure 51: Localisation hypothétique des co-facteurs sur la particule pré-40S LTV1.	135
Figure 52: Immuno-localisation en MET d'ENP1 sur la particule pré-40S LTV1.	137
Figure 53 : Classification 3D des 54 436 particules conservées pour l'analyse d'images avec un nombre de classes K=8.	139
Figure 54: Visualisation des sections des variants K5, K7 et K8 générés lors de la classification 3D.....	140
Figure 55 : Localisation intracellulaire de RACK1 visualisé par immunofluorescence.....	142
Figure 56 Analyse par northern blot des précurseurs de l'ARNr après 48h de traitement avec des siRNA contre l'ARNm RACK1	144
Figure 57: Localisation intracellulaire des précurseurs de l'ARNr 18S : fractionnement subcellulaire et hybridation in situ.	145
Figure 58: Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose après déplétion de RACK1. .	147
Figure 59 : Image d'un champ de particule pré-40S RIO1(KD) observé par cryo-MET	149
Figure 60: Résultats de la classification 2D.....	150
Figure 61: Classification 3D des 32 864 particules conservées avec un nombre de classes K=4.....	152

Figure 62: Structure 3D de la particule pré-40S RIO1(KD). 154

Figure 63: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S intermédiaires RIO1(KD) et de la sous-unité 40S..... 157

Figure 64: Modèle de positionnement des co-facteurs pour la particule pré-40S LTV1 purifiée à un stade de sa maturation dit intermédiaire en a) chez l'Homme et en b) chez la levure...179

Figure 66: Modèle de transition entre le stade de maturation intermédiaire et tardif des particules pré-40S chez l'Homme..... 183

Résumé

La biogenèse des ribosomes eucaryotes est un processus complexe qui implique la production et l'assemblage de 4 ARNr et 80 protéines. La production des deux sous-unités du ribosome, 40S et 60S, débute dans le nucléole par la synthèse d'un long précurseur commun contenant les séquences des ARNr matures et se termine dans le cytoplasme où ont lieu les dernières étapes d'assemblage des protéines ribosomiques et de clivage des ARNr. La production de ribosomes nécessite la participation de plus de 200 co-facteurs, qui catalysent les clivages et modifications des ARNr, coordonnent leur repliement et leur association aux protéines ribosomiques, et assurent des étapes de contrôle-qualité. Ces protéines sont associées aux particules en cours de maturation et absentes des sous-unités matures. Cette voie de synthèse, globalement conservée chez les eucaryotes, a été principalement étudiée chez la levure. Cependant, des études récentes ont montré des différences importantes de ce processus entre levure et mammifères.

Un des verrous importants pour comprendre la fonction des co-facteurs, est l'absence de données sur la structure des précurseurs des sous-unités ribosomiques. J'ai donc entrepris une étude structurale de l'assemblage cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique chez l'Homme par cryo-microscopie électronique à transmission. Le but de ma thèse était de déterminer la structure 3D des précurseurs de la petite sous-unité ribosomique purifiés à différentes étapes de leur maturation.

Ce travail a été conduit en collaboration avec l'équipe du Pr. Ulrike Kutay (ETH Zurich) pour la purification des particules pré-40S à partir de cellules humaines. La première structure 3D de particule pré-40S intermédiaire purifiée en étiquetant le co-facteur LTV1 a été déterminée à 19Å de résolution. Dans un deuxième temps, la structure 3D de la particule pré-40S tardive purifiée à via RIO1(Kd) a aussi été déterminée à 15Å de résolution. Ces données nous ont permis de proposer un modèle de localisation des co-facteurs sur les précurseurs de la petite sous-unité ribosomique et de montrer une nouvelle différence dans la formation de la petite sous-unité chez l'Homme comparé à la levure, du fait de la présence de la protéine RACK1 sur les particules pré-40S humaines. La comparaison des structures des précurseurs de la petite sous-unité obtenues a permis de mettre en lumière l'existence de remodelages structuraux de la particule pré-40S au cours de sa maturation. Ce travail met en lumière les premières structures 3D de particules pré-40S humaines et pose les fondements méthodologiques d'explorations futures de la dynamique structurale des particules pré-ribosomiques.

Abstract

Ribosome biogenesis is a complex process that requires the production and the correct assembly of the 4 rRNAs with 80 ribosomal proteins. In Human, the production of the two subunits, 40S and 60S, is initiated by the transcription of a pre-ribosomal rRNA precursor to the mature 18S, 5.8S, and 28S rRNAs by the RNA polymerase I, which is chemically modified and trimmed by endo- and exoribonuclease, in order to form the mature rRNAs. The nascent pre rRNA associated with ribosomal proteins, small ribonucleoprotein particles (snoRNP) and so called co-factors leading to the assembly of an initial 90S particle. This particle is then split into pre-40S and pre-60S pre-ribosomal particles that follow independent maturation to form the mature subunit into the cytoplasm. Production of eukaryotic ribosomes implies the transient intervention of more than 200 associated proteins and ribonucleoprotein particles, that are absent from the mature subunits. Synthesis of ribosome, globally conserved in eukaryotes, has been principally studied in yeast. However, recent studies reveal that this process is more complex in human compared in yeast.

An important bottleneck in this domain is the lack of structural data concerning the formation of intermediate ribosomal subunits to understand the function of assembly factors. Determination of the structural remodeling of pre-ribosomal particles is crucial to understand the molecular mechanism of this complex process. So I have undertaken a structural study on the assembly of the small ribosomal subunit using cryo-electron microscopy and image analysis. The goal of my thesis is to determine the 3D structures of human pre-40S particles at different maturation stages to see the structural remodeling that occurs during the biogenesis of the small ribosomal subunit.

We are collaborating with the group of Pr Ulrike Kutay at ETH Zurich, who purify human pre-40S particles. The 3D structures of human pre-40S particles purified at an intermediate and late maturation stages, has been determined with a resolution of 19 and 15Å respectively. Supplementary densities, compared to the mature subunit, indicate the presence of assembly factors and show the unexpected presence of the RACK1 protein in the precursor of the human small ribosomal subunit in the cytoplasm. The comparison of the 3D structures of human pre-40S particle allows showing the structural remodeling that occur during the maturation of the small ribosomal subunit. This work provides the first 3D structure of human pre-40S particles and laid the methodological foundations for future exploration of the structural dynamics of pre-ribosomal particles.

Introduction

A- Le ribosome et son assemblage: généralités

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique universel dans le monde vivant. Il catalyse la conversion de l'information génétique contenue dans les ARN messagers (ARNm) en protéines, processus appelé traduction. Il est constitué de deux sous-unités asymétriques, la grande et la petite sous-unité (**Figure 1**). Elles sont définies par leurs coefficients de sédimentation, qui sont respectivement de 60S (Svedberg) et 40S chez les eucaryotes.

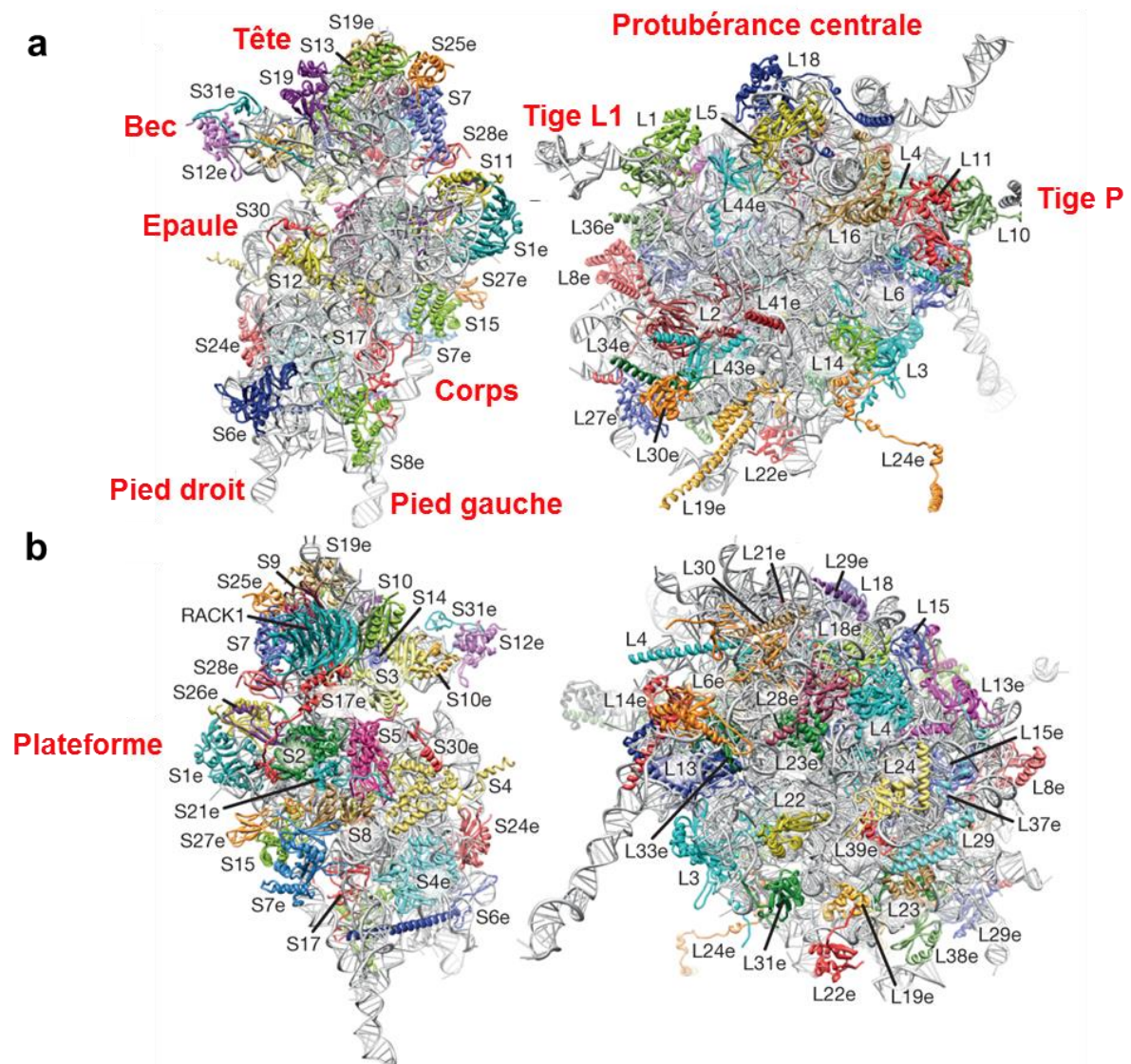


Figure 1: Structure des sous-unités ribosomiques humaines

a) Vue de l'interface et b) vue du solvant de la petite sous-unité à droite et de la grande sous-unité à gauche. Les domaines caractéristiques sont indiqués en rouge avec la tête, le bec, l'épaule, la plateforme, les pieds et le corps pour la petite sous-unité et la protubérance centrale et les tiges L1 et P pour la grande sous-unité (adapté de Anger et al., 2013)

La petite sous-unité du ribosome initie la traduction en se liant aux ARNm et décode l'information contenue dans celui-ci. Elle est d'une forme allongée qui rappelle un canard ou un hippocampe, et possède cinq domaines caractéristiques : la tête, le corps, le bec, la plateforme et l'épaule. La grande sous-unité, 60S, possède le site catalytique impliqué dans le transfert et la formation du lien peptidique. Elle est hémisphérique et se compose d'un domaine central associé à trois protubérances : la protubérance centrale et les tiges P et L1 (**Figure 1**).

Les deux sous-unités ribosomiques possèdent, à leur interface, les trois sites de fixation (APE) de l'ARN de transfert (ARNt) (**Figure 2**). Le site A (pour Aminoacyl) correspond à la position de l'ARNt amino-acylé entrant dans le ribosome. Le site P (pour Peptidyl) contient l'ARNt portant la chaîne polypeptidique naissante. Le site E (pour Exit) correspond à la position de l'ARNt déacylé juste avant qu'il se dissocie du ribosome. Le cœur fonctionnel du ribosome est principalement formé d'ARNr indiquant que le ribosome appartient à la famille des ribozymes. Les protéines ribosomiques sont des éléments essentiels de la structure de ce complexe.

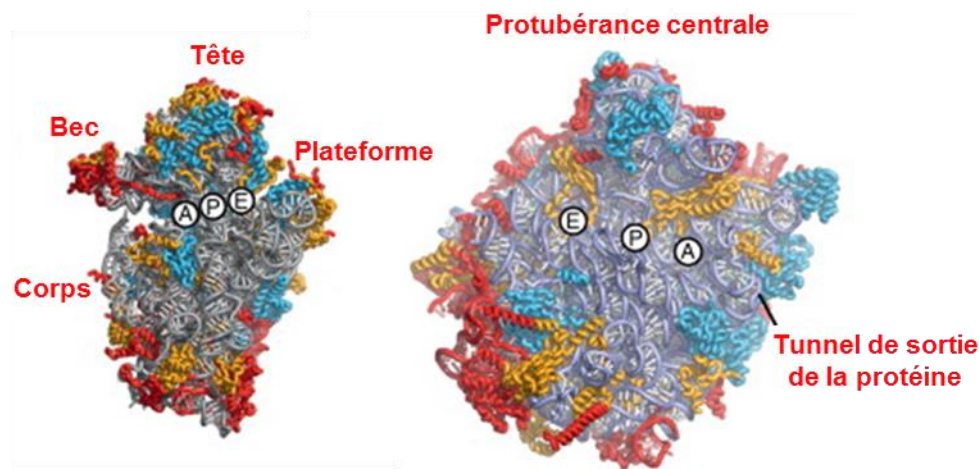


Figure 2: Positionnement des sites de fixation de l'ARNt sur les sous-unités ribosomiques eucaryotes.

*Les sous-unités sont présentées vu de l'interface. Elles correspondent aux structures de la 40S et de la 60S de *Tetrahymena thermophila* (numéro d'accèsion pdb : 2XZM pour la 40S et 4A17, 4A19 pour la 60S). Les régions caractéristiques des sous-unités sont indiquées la tête, le bec, le corps et la plateforme de la petite sous-unité ; la protubérance centrale et le tunnel de sortie de la protéine. APE sont les trois sites de fixation de l'ARNt (Klinge et al., 2012).*

Chez la levure, la grande sous-unité 60S est constituée de trois ARN ribosomiques (ARNr), dénotés 5S, 5.8S et 25S, associés à 46 protéines de la grande sous-unité (RPL pour Ribosomal Protein of the Large subunit); la petite sous-unité 40S se compose de l'ARNr 18S et de 33 protéines de la petite sous-unité (RPS pour Ribosomal Protein of the Small subunit)

(Ben-Shem *et al.*, 2011). Chez l'Homme, la grande sous-unité 60S est formée des ARNr 5S, 5.8S et 28S associés à 47 RPL et la petite sous-unité 40S contient l'ARNr 18S et 33 RPS (Anger *et al.*, 2013 ; Khatter *et al.*, 2015).

En combinant les ARNr et les protéines ribosomiques de la bactérie *Escherichia coli* dans un ordre précis, il est possible de provoquer l'auto-assemblage de ribosomes procaryotes matures et fonctionnels *in vitro* (Nomura, 1970). Ceci est impossible avec des ribosomes eucaryotes, ce qui souligne la complexité plus importante de la structure des sous-unités et des mécanismes de leurs synthèses.

La biogenèse des ribosomes eucaryotes a été très étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui est un modèle d'étude facilement à manipuler d'un point de vue génétique. Chez cet organisme en phase exponentielle de croissance, la transcription des gènes ribosomiques équivaut à 60% de l'activité transcriptionnelle totale et environ 2000 ribosomes sont produits par minute (Warner, 1999). Ainsi, la majeure partie de l'activité métabolique des cellules en prolifération est dédiée à la biogenèse des ribosomes. Les travaux chez la levure ont mis en évidence la participation de centaines de facteurs en *trans* dans la synthèse des ribosomes, protéines et particules RNP (Henras *et al.*, 2008 ; 2015) (**Figure 3**). Ces acteurs-clé sont seulement associés aux particules en cours de maturation et absents des sous-unités matures. Ces protéines seront nommées co-facteurs de maturation dans la suite du manuscrit de thèse. Par ailleurs, la production des ribosomes eucaryotes est compartimentalisée. La plus grande partie de ce processus se déroule dans le noyau, mais les particules pré-ribosomiques exportées dans le cytoplasme ne sont pas encore compétentes pour la traduction et doivent subir des étapes de maturation finales dans le cytoplasme. A l'instar des autres processus de maturation des ARN impliqués dans la traduction, le confinement de la maturation dans le noyau évite les interactions prématurées des ARN ribosomiques avec les acteurs de la traduction. La synthèse des ribosomes est un mécanisme qui semble globalement conservé chez les eucaryotes, cependant un nombre croissant d'études ont montré qu'il s'est encore complexifié chez les plantes ou les animaux.

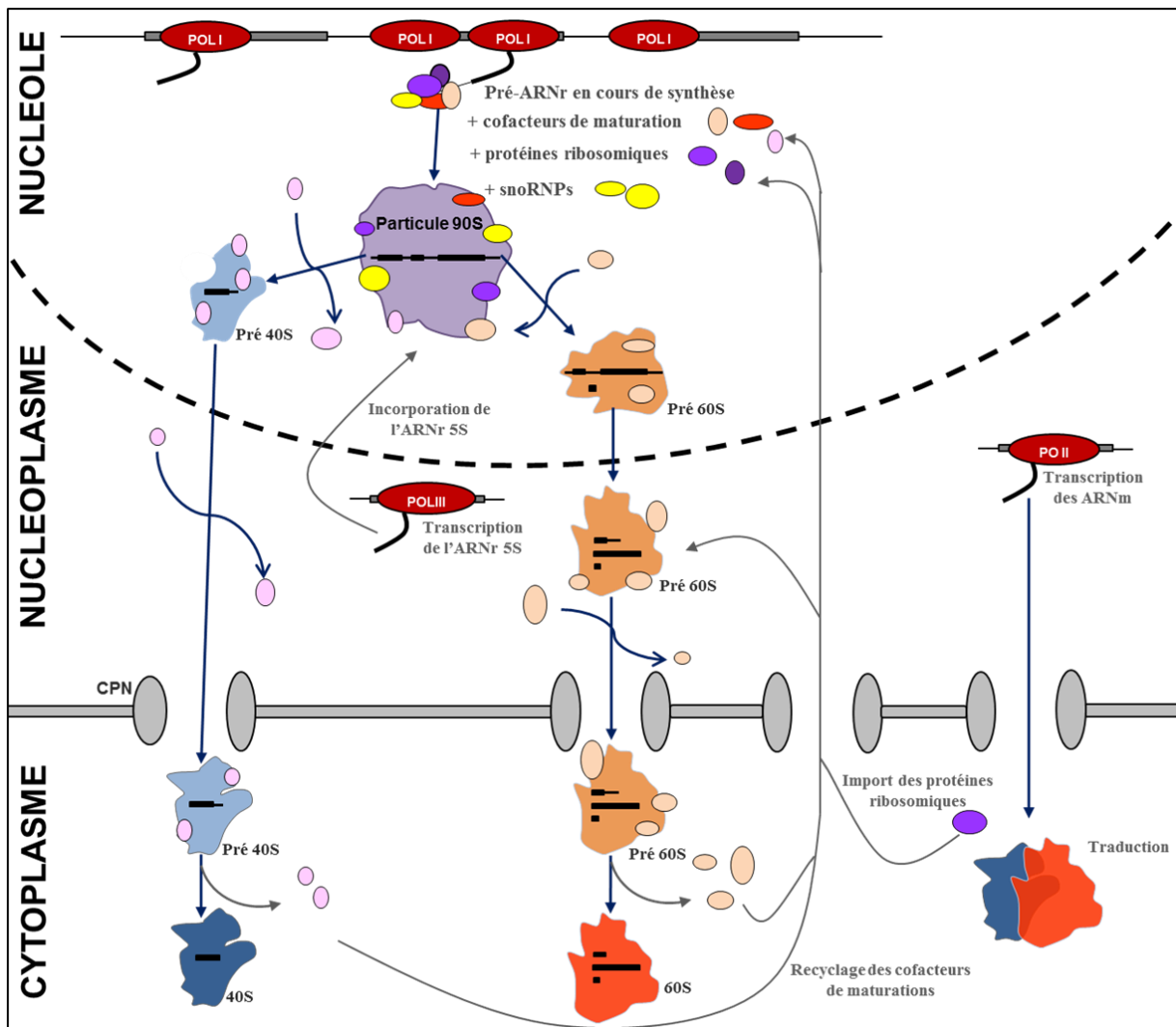


Figure 3: La biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes.

La synthèse des ribosomes eucaryotes débute dans le nucléole par la production du long précurseur polycistronique par l'ARN pol I (POL I). L'association des protéines ribosomiques, des co-facteurs de maturation au pré-ARNr génère la particule 90S. Le clivage du pré-ARNr est à l'origine de la scission de la particule 90S, qui forme les particules pré-40S et pré-60S. Ces complexes subissent des étapes de maturation dans le noyau et sont par la suite exportés dans le cytoplasme où leur maturation finale aura lieu. L'ARN pol III (POL III) synthétise l'ARNr 5S et l'ARN pol II (POL II) les protéines ribosomiques et co-facteurs de maturation nécessaires à la production des sous-unités ribosomiques matures. (Figure adaptée de la thèse de Franziska Wandrey)

L'assemblage et la maturation des sous-unités ribosomiques débutent de manière co-transcriptionnelle dans le voisinage des gènes ribosomiques, entraînant la formation du nucléole. Ce mécanisme nécessite l'action coordonnée des trois ARN polymérases (ARN pol): l'ARN pol I synthétise le long précurseur polycistronique contenant les ARNr matures 18S, 28S/25S et 5,8S. L'ARN pol II permet de transcrire les ARNm des protéines ribosomiques et les co-facteurs de maturation impliqués dans la formation et la maturation des ribosomes. L'ARN pol III produit l'ARNr 5S.

Dans le nucléole, un grand nombre de co-facteurs de maturation et de snoRNP s'associent au long précurseur polycistronique naissant et aux protéines ribosomiques pour former la particule 90S. Certains des facteurs en *trans* sont responsables de méthylations et de pseudo-uridylation de ce long transcrite primaire. Celui-ci subit une suite de clivages, afin d'éliminer les séquences encadrant les ARNr. Ces clivages vont permettre de générer les précurseurs de la petite et de la grande sous-unité ribosomiques. Ces deux particules entrent par la suite dans des voies de maturations différentes, avec peu de co-facteurs de maturation en commun.

Le précurseur de la petite sous-unité est ensuite rapidement exporté vers le cytoplasme au travers du complexe de pore nucléaire (CPN). Par la suite, chez la levure, dans le cytoplasme le pré-ARNr 20S est diméthylé dans la région 3' de l'ARNr 18S. Les co-facteurs de maturation associés à la particule pré-40S vont être séquentiellement recyclés. La dernière étape de la maturation de la particule pré-40S consiste au clivage du pré-ARNr pour former l'ARNr mature 18S, médié par l'endonucléase Nob1. Chez la levure, un modèle propose que cette étape finale de maturation nécessite l'association de la grande sous-unité avec la particule pré-40S, formant ainsi une particule appelée « pseudo-80S ».

Je m'attacherai par la suite à décrire les acteurs et la chronologie de la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S chez les eucaryotes et les récentes études soulignant des divergences évolutives entre la levure et l'Homme.

B- Acteurs de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique eucaryote

I- Maturation de l'ARNr : du pré-ARNr 47S à l'ARNr 18S

I.1- Généralité

Les ARN composants les deux sous-unités ribosomiques, à l'exception de l'ARNr 5S, sont issus d'un long précurseur polycistronique synthétisé par l'ARN polymérase I. Ces séquences sont séparées par des espaceurs transcrits qui sont éliminés par une série d'étapes endo et exonucléolytiques ayant lieu séquentiellement dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme (**Figure 4 et 5**). Nous rappelons brièvement ici les connaissances actuelles sur la formation de l'ARNr 18S. Des revues récentes ont décrit la maturation des ARNr composant la grande sous-unité (Henras *et al.*, 2008 ; 2015).

L'ARNr 18S est flanqué du 5'-ETS et de l'ITS1. Trois étapes peuvent être distinguées dans la formation de cet ARN : (1) l'élimination du 5'-ETS permet la formation de son extrémité 5'. (2) un clivage endonucléolytique dans l'ITS1 le sépare des ARNr de la grande sous-unité 60S. (3) le retrait de la partie 5' de l'ITS1 qui lui est rattachée permet la maturation de son extrémité 3'. Le pré-ARNr naissant est associé co-transcriptionnellement avec des protéines ribosomiques, des co-facteurs de maturation ainsi que des snoRNP nécessaires pour sa maturation. Ainsi, la maturation du 5'-ETS mobilise des facteurs qui s'assemblent en plusieurs modules et se lient sur le transcrit naissant pour former le "SSU processome" (cf paragraphe C.I.2). Chez la levure *S. cerevisiae*, des expériences de marquage métabolique ont montré que le clivage de l'ITS1 se fait majoritairement de manière co-transcriptionnelle, ce qui a été vérifié sur des étalements de gènes ribosomiques en transcription observés par microscopie électronique (méthode des arbres de Miller) (Miller and Beatty, 1969) (Osheim *et al.*, 2004). En revanche, des observations similaires chez les vertébrés suggèrent que le clivage de l'ITS1 est principalement post-transcriptionnel chez les vertébrés (Mougey *et al.*, 1993).

La synthèse des ARNr matures a été largement étudiée chez la levure (**Figure 4**), et plus récemment ré-explorée chez les vertébrés, grâce en particulier à l'utilisation de siRNA pour induire des pertes de fonctions géniques. Des divergences entre l'Homme et la levure ont été

démonstrées. Par exemple, la longueur des espaces transcrits ITS et ETS varie (cf. ci-après), et le nombre d'étapes pour la maturation de l'ARNr 18S est plus élevé chez l'Homme que chez la levure (Mullineux and Lafontaine, 2012 ; Sloan *et al.*, 2013). De plus, l'ARNr 18S de *S. cerevisiae* est exclusivement généré à partir des clivages endo-nucléolytiques dans les séquences des espaces transcrits ITS et ETS, alors qu'une combinaison de traitements endo et exo-nucléolytiques est nécessaire pour les cellules de mammifères (Henras *et al.*, 2015). La formation de l'ARNr 18S mature requiert l'élimination des séquences 5'-ETS et ITS1, et, selon la rapidité de clivage dans ces espaces transcrits, deux voies alternatives de maturation pourront être empruntées (**Figure 5**).

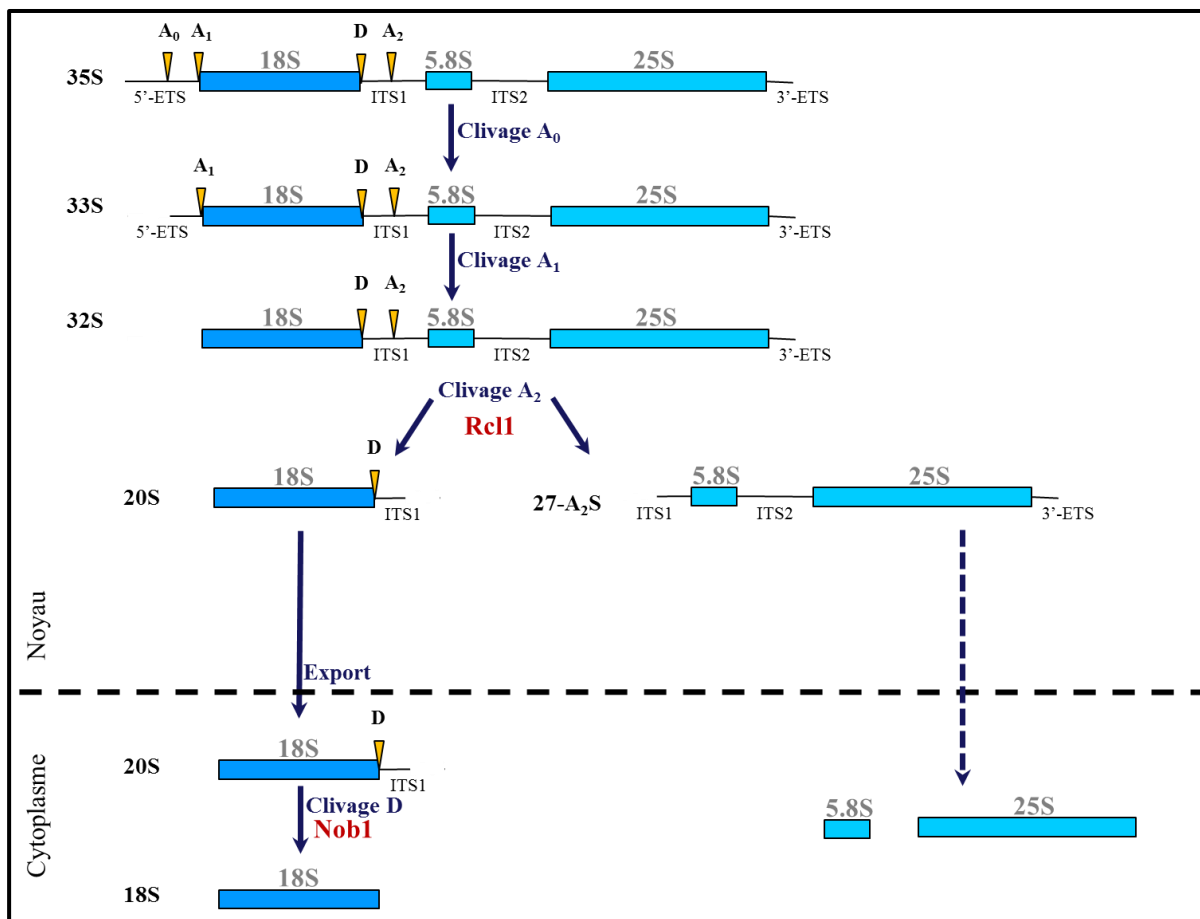


Figure 4: Maturation de l'ARN ribosomique 18S chez la levure.

Les sites de clivage sont montrés par des triangles jaune et les endonucléases connues sont décrites en rouge. La protéine Rcl1 est responsable du clivage au site A₂ du pré-ARNr 32S dans le noyau, permettant la formation des précurseurs de la petite et de la grande sous-unité ribosomiques. Suite à l'export de la particule pré-40S, Nob1 effectue la coupure du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme pour générer l'ARNr 18S mature. Les étapes de la maturation des ARNr de la grande sous-unité ne sont pas indiquées dans ce schéma.

II.2. Elimination du 5'-ETS et formation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S

Chez tous les eucaryotes, les pré-ARNr contiennent deux sites de clivages endonucléolytiques conservés dans le 5'-ETS, appelé A0 et A1 chez la levure (**Figure 4**), ou A0 et 1 chez les vertébrés (**Figure 5**). Chez l'Homme, le site A0 est localisé au niveau de la position G1643 du 5'ETS (Rouquette *et al.*, 2005), alors que le site 1 est situé à quelques nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S (Hannon *et al.*, 1989). La coupure au niveau de ce site génère les pré-ARNr 43S et 26S à partir du pré-ARNr 45S. Les pré-ARNr 40S et 21S sont obtenus à partir des pré-ARNr 43S et 26S respectivement suite au clivage au niveau du site 1. Les intermédiaires 43S et 26S sont très peu abondants, ce qui traduit une forte coordination des clivages A0 et 1, comme cela a été observé par ailleurs chez la levure. Bien que distants de plusieurs centaines de nucléotides, les prédictions de structure secondaire indiquent que ces deux sites sont très proches dans l'espace et encadre la base d'une très longue tige-boucle (Renalier *et al.*, 1989 ; Michot and Bachellerie, 1991). La snoRNP U3 établit des appariements simultanés au voisinage de ces deux sites, ce qui contribue probablement à la formation de cette structure et favorise le clivage quasi-simultané aux deux sites. Les clivages aux sites A₀/A0 et A₁/1 sont effectués par une ou des enzymes toujours inconnues à ce jour.

Chez la levure, la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S est directement générée par le clivage endonucléolytique au site A1 (Venema and Tollervey, 1995). En revanche, chez l'Homme, des travaux *in vitro* suggèrent que deux étapes de maturation seraient nécessaires pour la formation de cette extrémité. La première étape consisterait en un clivage endonucléolytique au site 1, situé à 3 ou 8 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S dans le noyau. Puis une exonucléase présente dans le cytoplasme éliminerait les nucléotides restant pour générer l'extrémité 5' de l'ARNr 18S mature (Hannon *et al.*, 1989 ; Yu and Nilsen, 1992).

Chez les vertébrés et les plantes, un site de clivage endonucléolytique supplémentaire a été décrit. Ce site appelé A' (ou 01) est situé à proximité de l'extrémité 5' du 5'-ETS (nucléotides 410/414 chez l'Homme) (Kent *et al.*, 2009). Il est clivé très précocement, souvent en amont des clivages A0 et 1 (Lazdins *et al.*, 1997). La fréquence de ce clivage est variable suivant les types cellulaires et les espèces. Il n'est d'ailleurs pas strictement requis pour l'élimination du 5'-ETS. Le clivage en A' requiert l'action de plusieurs snoRNP (U3, U14, E1, E3), et est sensible à la perte de fonction de l'exonucléase XRN2 pour une raison encore mal

définie. Il est possible que bien que facultatif, ce clivage A' facilite l'accès de la machinerie de maturation requise pour les étapes ultérieures.

II.3. Clivage de l'ITS1 et formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S

L'ITS1 contient 4 sites de clivage endonucléolytiques appelés D, A2, A3 et B1_L chez la levure. Les sites D et B1_L correspondent à l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et à l'extrémité 5' de la forme longue de l'ARNr 5.8S respectivement. La coupure de l'ITS1 intervient en premier au site A2 et génère les pré-ARNr précurseurs propres aux deux sous-unités. Elle est catalysée par la protéine Rcl1 (Horn *et al.*, 2011). La particule pré-40S ainsi formée contient le pré-ARNr 20S et est rapidement exportée dans le cytoplasme. Le pré-ARNr 20S subit alors une diméthylation de deux résidus adjacents A1779 et A1780, réalisée par le co-facteur de maturation Dim1 (Lafontaine *et al.*, 1995 ; 1998) (cf ci-dessous), puis un clivage de son extrémité 3' au site D réalisé par l'endonucléase Nob1 pour former l'ARNr 18S mature (**Figure 4**) (Fatica *et al.*, 2003 ; Fatica *et al.*, 2004). Ainsi, à la suite de l'élimination de 5' ETS, deux coupures endonucléolytiques aux sites A2 et D sont suffisantes pour générer l'ARNr 18S.

Chez les mammifères, Homme et souris, des travaux récents ont montré que la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S est plus complexe et implique une combinaison d'exo- et d'endonucléases. La taille de l'ITS1 est trois fois plus importante que chez la levure. En effet, l'ITS1 est constitué de 1095 nucléotides chez l'Homme et de seulement 362 nucléotides chez la levure (Klootwijk and Planta, 1989 ; Gonzales *et al.*, 1999). En plus du site générant l'extrémité 3' de l'ARNr 18S, deux sites de clivage endonucléolytique ont été identifiés dans l'ITS1, baptisés sites E et 2 chez l'Homme (**Figure 5**).

Le site 2 est situé à environ 900 nucléotides en aval de l'extrémité 3' du l'ARNr 18S (Mullineux and Lafontaine, 2012). Le site E a été identifié par des approches de 3'-RACE et extension d'amorce entre les nucléotides 78 et 81 après la jonction 18S-ITS1 (Preti *et al.*, 2013 ; Sloan *et al.*, 2013).

Dans les lignées cellulaires humaines, la coupure au niveau du site 2 intervient majoritairement avant le clivage au site E, ce qui sépare les précurseurs de la petite et de la grande sous-unité ribosomiques. Ce clivage peut précéder l'élimination du 5'-ETS ou lui être postérieur, ce qui génère des pré-ARNr différents : 30S, 26S ou 21S. A la suite du clivage 2,

deux exonucléases entrent en jeu pour digérer les extrémités 3' et 5' générées par le clivage. Ainsi, environ 250 nucléotides sont éliminés à partir du pré-ARNr 21S pour former le pré-ARNr 21S-C. La progression de cette enzyme est stoppée par le domaine C : cette région est hyper-conservée chez les mammifères et semble très structurée. Il a été proposé que l'exosome assure cette fonction. Une coupure au niveau du site E génère alors le pré-ARNr 18S-E (Preti *et al.*, 2013). De nouveau, des exonucléases dégradent les produits du clivage dans les deux orientations. La particule pré-40S contenant le pré-ARNr 18S-E est ensuite exportée dans le cytoplasme au travers du complexe de pore nucléaire (Rouquette *et al.*, 2005). L'extrémité 3' de ce précurseur est progressivement dégradée dans le noyau puis dans le cytoplasme (Preti *et al.*, 2013). Les enzymes responsables de ces activités n'ont pas encore été identifiées. La dernière étape est le clivage endonucléolytique du pré-ARNr 18S-E au niveau du site 3 par NOB1 qui génère l'ARNr 18S mature dans le cytoplasme (Rouquette *et al.*, 2005 ; Preti *et al.*, 2013; Sloan *et al.*, 2013). Le traitement exonucléolytique des nucléotides de l'ITS1 du pré-ARNr 18S-E dans le noyau puis le cytoplasme pourrait faciliter l'accès de NOB1 au site 3 (**Figure 5**). Alternativement, il n'est pas exclu que l'extrémité 3' du 18S soit également formée par digestion exonucléolytique.

Le site 2 n'est pas nécessairement le site du premier clivage dans l'ITS1. L'ITS1 peut être directement coupé au site E, ce qui génère les pré-ARNr 18S-E et 36S (Srivastava *et al.*, 2010). Cette voie de maturation semble beaucoup plus commune chez la souris, où l'on retrouve une quantité importante d'ARN 36S.

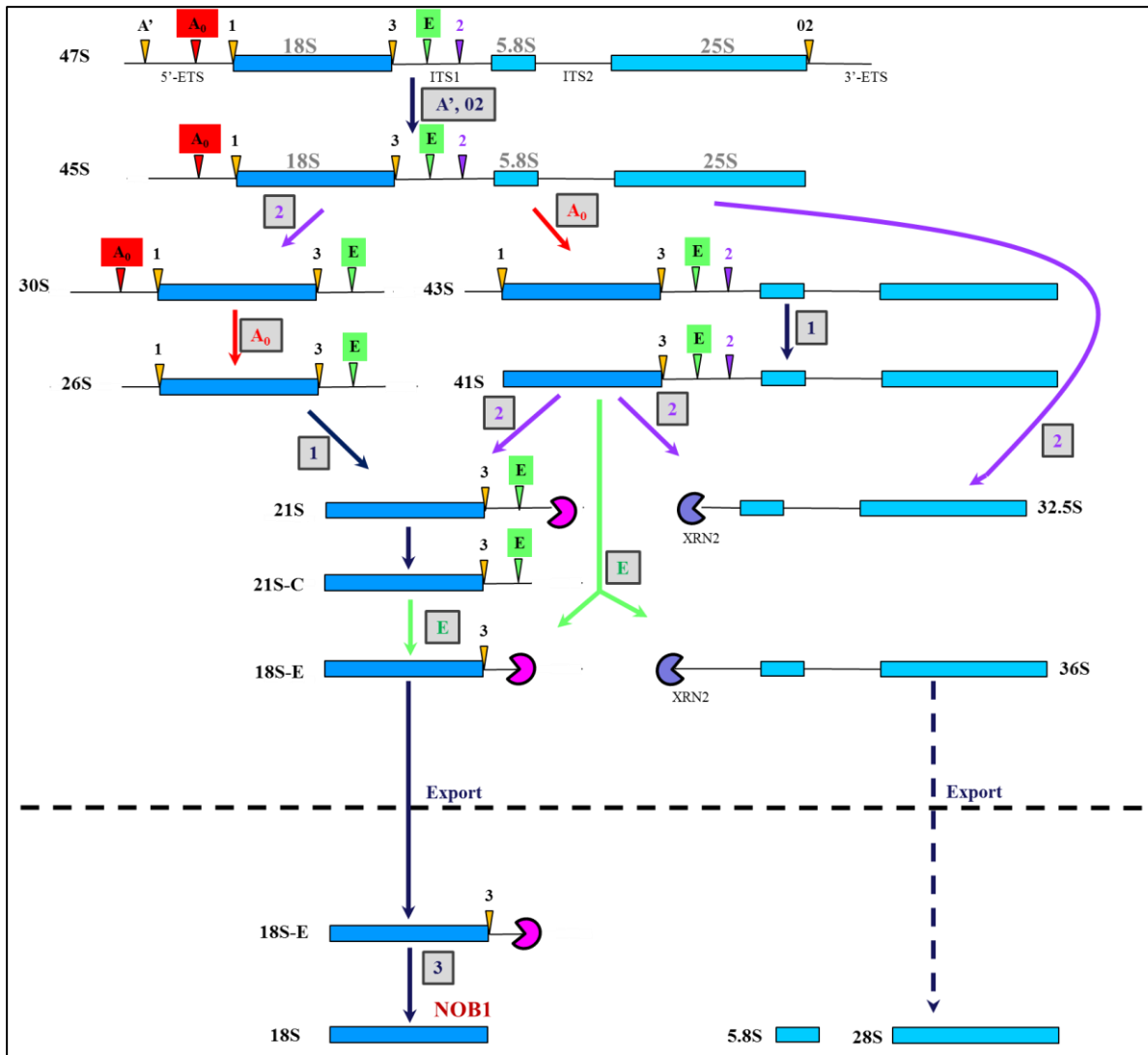


Figure 5: Maturation de l'ARN ribosomique 18S chez l'homme.

Selon la vitesse de clivage dans les séquences 5'-ETS et ITS1, des voies de maturations alternatives seront empruntées pour former l'ARNr 18S mature. Les sites de clivage sont représentés par des triangles de différentes couleurs. Des exo-nucléases sont requises pour la maturation de l'ARNr 18S dans le noyau et le cytoplasme.

II.4. Modifications post-transcriptionnelles des nucléotides

Dans le nucléole, environ 100 nucléotides des ARNr chez la levure et 200 chez l'Homme sont modifiés par les snoRNP (Decatur *et al.*, 2007). En effet, 91 pseudo-uridylation, 105 méthylations de ribose de nucléotides ont été identifiées sur l'ARNr humain (Decatur and Fournier, 2002). Chez la levure, l'ARNr 18S possède 14 nucléotides pseudo-uridylés et 54 nucléotides ayant subi une méthylation (Decatur and Fournier, 2002).

Les snoRNP à boîte C/D ou H/ACA sont requis pour ces modifications du pré-ARNr. Ils catalysent respectivement des méthylations du ribose (addition d'un groupement méthyle à

l'oxygène lié au carbone 2' du ribose ou 2'-O-méthylation) et l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine sur des positions spécifiques dans les séquences des futurs ARNr matures du pré-ARNr (Kiss *et al.*, 2006 ; Watkins and Bohnsack, 2012) (**Figure 6 et 7**). Chaque snoRNP s'apparie avec le pré-ARNr via sa composante ARN, à proximité du nucléotide à modifier guidant ainsi l'activité enzymatique d'une des protéines du corps du snoRNP. De plus, 10 méthylations de base de nucléotides ont aussi été identifiées sur l'ARNr humain. Ces réactions sont effectuées sans l'aide de snoARN (Decatur and Fournier, 2002).

Les nucléotides modifiés sont pour la plupart retrouvés dans des régions importantes pour la fonction du ribosome et sont nécessaires pour l'efficacité et la fidélité de la traduction (Liang *et al.*, 2009 ; Watkins and Bohnsack, 2012 ; Schosserer *et al.*, 2015). En effet, ces nucléotides sont présents au niveau du centre peptidyltransférase, les sites de fixation de l'ARNt, le site de fixation de l'ARNm, le tunnel de sortie du peptide naissant et les sites d'interaction entre les deux sous-unités ribosomiques (Decatur and Fournier, 2002). La suppression d'une modification individuelle dans la région du décodage affecte très peu la croissance cellulaire chez la levure. Cependant, la déplétion de plusieurs modifications simultanément dans ce site est à l'origine d'une diminution du taux de traduction (Liang *et al.*, 2009).

II.4.1 Pseudo-uridylation

Les sno-RNP à boîte H/ACA sont responsables de l'isomérisation de l'uridine en pseudo-uridyne. Chez l'Homme, ces snoRNP à boîte H/ACA possèdent quatre protéines en commun qui sont la dyskerine, GAR1, NHP2, NOP10 ainsi qu'un snoARN à boîte H/ACA (**Figure 6**) (Meier, 2005). La dyskerine chez l'Homme aussi appelé Cbf5 chez la levure est une pseudouridine-transférase qui assure alors l'isomérisation des uridines en pseudo-uridines. Le snoARN est formé de deux tiges-boucles et contient deux motifs conservés qui sont la boîte H et la boîte ACA (Reichow *et al.*, 2007). Ces deux tiges-boucles sont connectées par une région contenant la boîte ACA (**Figure 6**). Le snoARN interagit avec le pré-ARNr via une séquence complémentaire dans laquelle est présent le nucléotide à modifier. Il s'hybride avec le pré-ARNr au niveau de la poche de pseudo-uridylation présents aux niveaux des tiges boucles. Le site de pseudo-uridylation se situe 14 à 16 nucléotides en amont des boîtes H ou ACA.

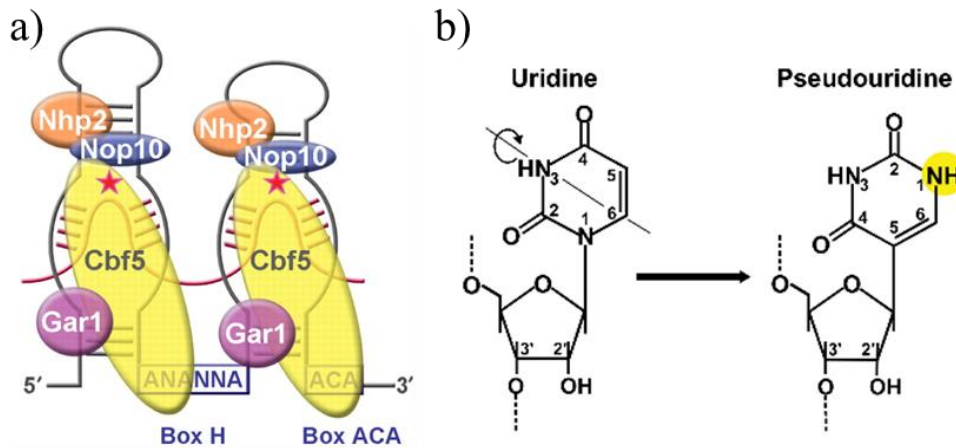


Figure 6: Pseudo-uridylation par les snoRNP H/ACA.

a) Représentation du snoRNP H/ACA formé du snoARN et des ces quatre protéines. Les motifs conservés sont présents à la base des tiges boucles b) La pseudo-uridylation correspond à l'isomérisation d'un uridine (Reichow *et al.*, 2007)

II.4.2- 2'O Méthylation

Chez les eucaryotes, les snoRNP à boîte C/D sont constitués d'un snoARN et de quatre protéines : la fibrillarine, Nop56, Nop58 et 15.5kDa/Snu13 (Reichow *et al.*, 2007) (**Figure 7**). La méthyl-transférase Nop1/fibrillarine est l'enzyme qui catalyse cette réaction. Le snoARN, composant ces particules, est constitué des boîtes conservées C et D et contient également les boîtes C' et D' qui correspondent aux boîtes C et D dégénérées (**Figure 7**). Le snoARN interagit avec la pré-ARNr sur 10 à 20 nucléotides en amont de la boîte D. La réaction de 2'O méthylation est réalisée 5 nucléotides en amont de cette boîte D (Kiss-László *et al.*, 1998).

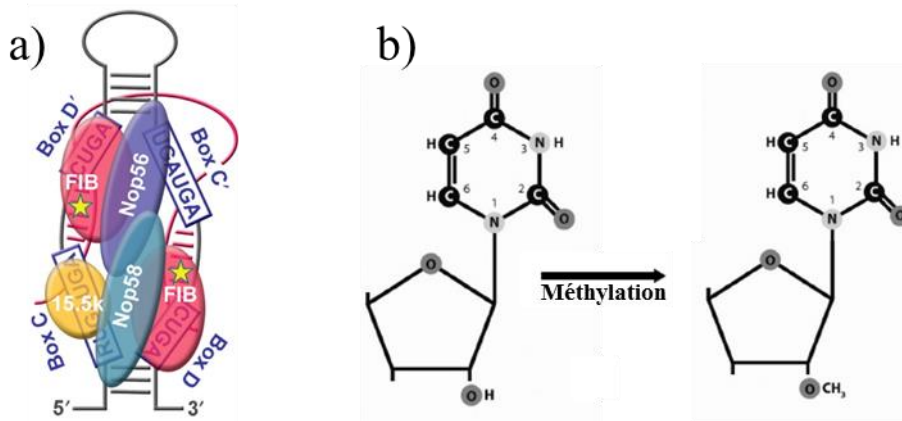


Figure 7: 2'O méthylation par les snoRNP C/D. a) Représentation du snoRNP C/D composé du snoARN et des ces quatre protéines FIB pour fibrillarine, Nop56, Nop58 et 15,5kDa. La 2'O méthylation correspond à l'ajout d'un méthyl en position 2' du ribose (Reichow *et al.*, 2007 ; Henras *et al.*, 2008).

II.4.3 Méthylation par des enzymes ne nécessitant pas l'action de snoARN

Chez l'Homme, 5 bases de l'ARNr 18S et 5 de l'ARNr 28S sont méthylés. Ces modifications sont réalisées par des enzymes ne nécessitant pas la présence de snoARN (Decatur and Fournier, 2002). Par exemple, chez la levure, Dim1, une méthyl-transférase est responsable de la diméthylation du pré-ARNr 20S à proximité du site D, ayant lieu dans le cytoplasme (Lafontaine *et al.*, 1995 ; Lafontaine *et al.*, 1998). Cette réaction est conservée chez l'Homme et est réalisée par l'homologue de Dim1 dans le noyau (Zorbas *et al.*, 2015). D'autres enzymes sont responsables de méthylation du pré-ARNr comme par exemple Bud23 ou Emg1 (cf paragraphe B. III.2).

II- Les protéines ribosomiques

II.1- Rôles des protéines ribosomiques

Un grand nombre de travaux menés chez la levure ou chez les cellules de mammifères ont montré que les protéines ribosomiques (RP) sont requises pour l'assemblage structural et l'export nucléocytoplasmique des sous-unités et dans la maturation des ARNr. Par exemple, seules quelques protéines RPS ne sont pas requises pour la production de l'ARNr 18S : Rps12 et Rps25 chez la levure (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Les structures de ribosomes matures déterminées par cristallographie ou cryo-microscopie électronique (cryo-MET) ont montré que les protéines ribosomiques partagent des caractéristiques communes. En effet, elles possèdent un ou plusieurs domaines globulaires avec des extensions non structurées riches en acides aminés basiques qui se fixent à l'ARNr ou aux autres protéines ribosomiques (Wimberly *et al.*, 2000 ; Melnikov *et al.*, 2012). Au cours de l'assemblage des sous-unités, les RP jouent un rôle de chaperone assistant le repliement correct du pré-ARNr naissant. Les RP sont requises de façon hiérarchique lors de l'assemblage *in vitro* des sous-unités ribosomiques bactériennes (Nomura, 1970).

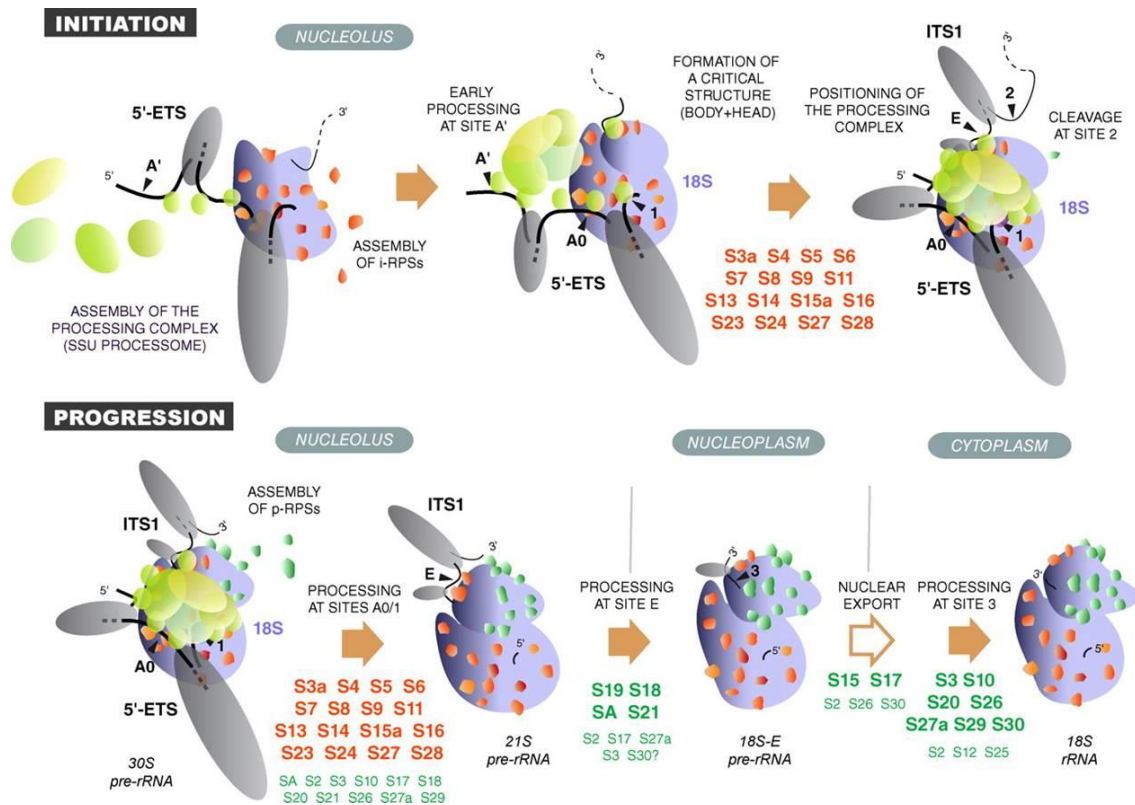


Figure 8: Implication des iRPS et pRPS dans la biogenèse de la sous-unité 40S chez l'homme.

Les iRPS (en orange) et des co-facteurs de maturation (en vert clair) s'associent de façon précoce avec le pré-ARNr 47S. Les pRPS (en vert foncé) sont impliquées dans les étapes de maturation tardive, s'assemblent progressivement à la particule pré-40S. (D'après O'Donohue *et al.*, 2010)

Chez les eucaryotes, la déplétion de ces protéines entraîne un blocage de la maturation à différentes étapes, selon la RP absente. Chez l'Homme, les clivages aux sites A0, 1 et E dépendent de l'assemblage de la moitié des RPS (**Figure 8**) (O'Donohue *et al.*, 2010). En effet, l'absence d'une de ces protéines nommées iRPS (pour initiation RPS) est à l'origine de l'accumulation des précurseurs précoces de l'ARNr 18S (les pré-ARNr 45S et 30S) et de la disparition des autres précurseurs. Ce phénotype indique un défaut complet d'élimination du 5'-ETS (à l'exception du clivage au site A') et de la formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S après clivage de l'ITS1 au site 2 (O'Donohue *et al.*, 2010). Ces protéines interagissent précocement avec le large « domaine 5' » de l'ARNr 18S et forme le corps, la plate-forme et l'arrière de la tête de la particule 40S (**Figure 9**). La deuxième moitié des RPS n'est pas strictement nécessaire pour les clivages dans le 5'-ETS, mais est requise pour la coupure endonucléolytique de l'ITS1 au niveau des sites E et 3 et pour l'export des précurseurs de la petite sous-unité. Elles s'associent plus tardivement à la particule pré-40S (**Figure 8**). Ces pRPS (pour progression RPS) structurent la tête de la particule pré-40S composée principalement d'un « domaine 3' » de l'ARNr 18S (**Figure 9**).

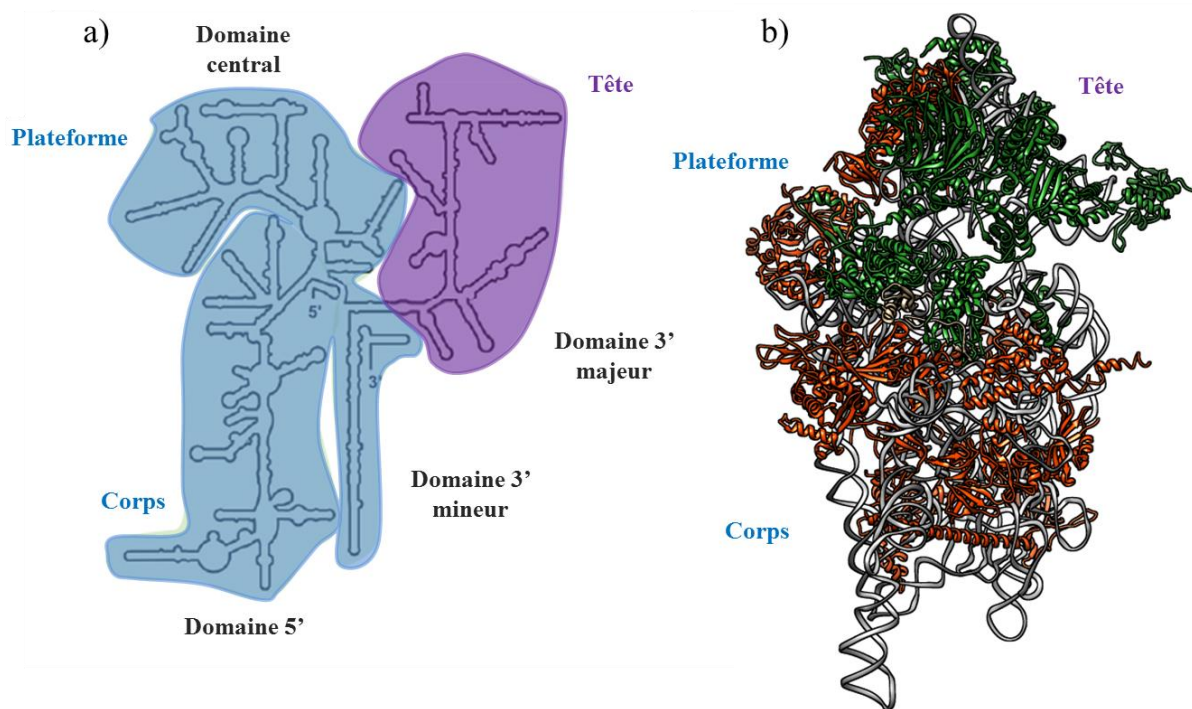


Figure 9: Rôle des protéines ribosomiques dans la formation de la petite sous-unité ribosomique. (a) Structure secondaire de l'ARNr 18S où on peut distinguer les domaines formant les caractéristiques structurales de la particule 40S (plateforme, tête, corps). (b) Positionnement des deux groupes de RPS (iRPS en orange et pRPS en vert) sur la structure 3D de la particule 40S humaine déterminée par cryo-MET (numéro accession pdb : 4V6X) l'ARNr 18S mature est montré en gris. (adapté de Henras *et al.*, 2015)

L'assemblage de la particule 40S se fait donc de façon séquentielle. Il débute par la formation du corps de la petite sous-unité, composé du domaine 5' et du domaine central de l'ARNr 18S grâce à l'association précoce des iRPS puis de la tête grâce à l'interaction des pRPS. Des données similaires ont été obtenues chez la levure, l'association des RPS au niveau la tête de la particule est nécessaire pour l'export et les événements de maturation dans le cytoplasme (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005 ; 2007). Ces observations sont également en adéquation avec les travaux menés chez les procaryotes. En effet, cet assemblage séquentiel et orienté a été mis en évidence par des expériences *in vitro* de cinétique de formation de la petite sous-unité bactérienne (Nomura, 1970 ; Nierhaus, 1991; Mulder *et al.*, 2010).

De la même manière, une étude récente a montré que la grande sous-unité ribosomique se forme aussi de façon séquentielle chez la levure. Il existe une corrélation entre la localisation des RPL et l'assemblage de la particule 60S (Gamalinda *et al.*, 2014).

L'association des RP avec la particule pré-40S est aussi requise pour l'export de cette dernière. En effet, l'absence de certaines d'entre elles a pour conséquence la rétention des particules pré-40S dans le noyau (cf paragraphe C.II .1.3).

II.2- Import des protéines ribosomiques dans le noyau

Suite à leur synthèse dans le cytoplasme, les protéines ribosomiques doivent être transportées dans le noyau pour être incorporées dans des particules pré-ribosomiques en formation. Pour leurs importations, elles passent au travers du complexe de pore nucléaire.

II.2.1- Préambule: Le complexe de pore nucléaire

- Le Complexe de pore nucléaire (CPN)

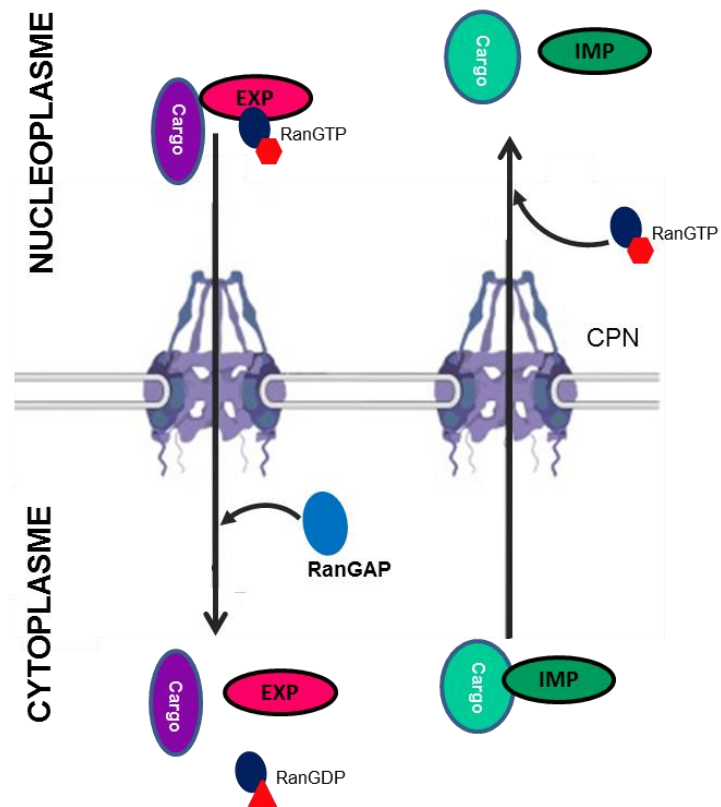
Le CPN est une structure multi-protéique, qui traverse l'enveloppe nucléaire et permet le passage des molécules entre le cytoplasme et le noyau. Il est constitué de nucléoporines, codées par une trentaine de gènes. Le CPN est composé de trois parties : 1) un anneau cytoplasmique à partir duquel partent des structures filamenteuses, 2) une partie centrale ancrée à la membrane nucléaire, 3) d'un anneau nucléaire formant une structure de panier. L'intérieur du CPN correspond à un maillage généré par les nucléoporines, qui présentent une structure flexible, riche en motifs phénylalanine-glycine (FG). Du fait de leur taille, le transport des protéines ribosomiques et des particules pré-ribosomiques se fait de façon active. Ce mécanisme nécessite notamment l'intervention d'une famille de protéines appelées caryophérines, qui regroupe les exportines et les importines. En outre, le transport des composants ribosomiques requiert la GTPase Ran, ainsi que certains co-facteurs de maturation (**Figure 10**).

- La GTPase Ran et le transport actif des molécules au travers du CPN

Les caryophérines établissent un lien entre la molécule à transporter (« cargo ») et les nucléoporines du CPN. Elles permettent un transport bidirectionnel des cargos. Ce transport actif nécessite également la GTPase Ran (**Figure 10**). La protéine Ran est présente sous deux formes dans la cellule : sous forme Ran-GTP dans le noyau et Ran-GDP dans le cytoplasme. Deux autres protéines sont nécessaires au fonctionnement de ce système. La RanGEF (GEF pour Guanosine Exchange Factor) qui permet l'échange du GDP par le GTP et la RanGAP

(GAP pour GTPase Activant Protien) qui active la fonction GTPasique de Ran et stimule l'hydrolyse du GTP.

Figure 10: Transport actif de molécules au travers du complexe de pore nucléaire L'exportine (EXP) se fixe au complexe à transporter (Cargo) via la séquence NES d'une protéine adaptatrice du complexe. Elle est associée à la RanGTP dans le nucléoplasme. Elle facilite le passage du complexe en interagissant avec les nucléoporines du CPN. Une fois le transport effectué, le GTP sera hydrolysé en GDP, réaction activée par la RanGAP. Ceci entraînera la dissociation du complexe de transport. A l'inverse, l'importine (IMP) s'associe de façon stable avec le cargo et se dissocie en présence de RanGTP.



Dans le noyau, en présence de RanGTP, les exportines s'associent aux cargos soit directement, soit par le biais d'une protéine adaptatrice. Dans le premier cas, le cargo possède une séquence d'export nucléaire NES (NES pour nuclear export sequences) et est directement reconnu par l'exportine. Dans le deuxième cas, c'est la protéine adaptatrice qui possède la NES, et qui interagit avec l'exportine. Suite à l'export au travers du CPN, la protéine RanGTP, activée par une RanGAP (RanGTPase activating protein), hydrolyse le GTP. Ceci permet le désassemblage du complexe d'export dans le cytoplasme (**Figure 10**). Inversement, dans le cytoplasme, en présence de GDP, l'importine β interagit avec le cargo à importer dans le noyau. L'importine β se lie à la séquence de localisation nucléaire NLS (NLS pour nuclear localization sequences) soit de manière directe, soit par l'intermédiaire d'une importine α qui reconnaît la séquence NLS. Une fois le passage au travers du CPN effectué, l'association de Ran-GTP à l'importine β entre en compétition avec le cargo et provoque sa libération dans le noyau.

II.2.2- Import des protéines ribosomiques dans le noyau

Chez la levure *S. cerevisiae*, la caryophérine β la plus abondante est Kap123. Elle est notamment impliquée dans l'import des RP (Rout *et al.*, 1997 ; Timney *et al.*, 2006). Cette protéine n'étant pas essentielle, plusieurs autres caryophérines, comme par exemple Kap121 ou Kap108, semblent également pouvoir assurer cette fonction (Sydorsky *et al.*, 2003).

L'import des RP ne requiert pas toujours l'intervention d'adaptateurs. En effet, l'importine- β peut directement se lier à la séquence NLS des RP. Chez les mammifères, certaines RP peuvent s'associer à plusieurs importines. C'est le cas de rpl23a qui peut être reconnue par au moins quatre importines : importine β , importine 5, importine 7, et la transportine. Ces caryophérines interagissent directement avec une région basique de Rpl23a (Jakel and Gorlich, 1998). De la même manière, Rps2 est capable d'interagir avec l'importine β et la transportine mais via une séquence NLS non conventionnelle peu basique (Antoine *et al.*, 2005).

Les RP naissantes possèdent de longs domaines non structurés (cf ci-dessus) et présentent un point isoélectrique supérieur à 10. Par conséquent, elles ont tendance à former des agrégats. Certaines protéines adaptatrices impliquées dans l'import nucléaire des RP jouent aussi le rôle de chaperone. Elles préviennent leur agrégation et permettent de vérifier le repliement correct de ces RP avant leur transport dans le noyau. Cette observation est illustrée par l'exemple de la protéine Rrb1. En effet, Rrb1 interagit avec Rpl3 en cours de traduction. Par la suite, le complexe formé est importé dans le noyau (Pausch *et al.*, 2015). D'autres protéines possèdent un comportement semblable comme Symportin1 (Syo1) qui interagit co-traductionnellement avec Rpl5. Syo1 est un adaptateur caractérisé pour son rôle dans l'import synchronisé de Rpl5 et Rpl11. Il se fixe à l'extrémité N-terminale de Rpl5 et s'associe avec Rpl11 via son domaine C-terminal. La protéine Syo1 interagit alors avec l'importine Kap104 qui permet le passage du complexe formé à travers le CPN (Bange *et al.*, 2013). Une fois dans le noyau, Ran-GTP assure la libération du complexe Syo-Rpl5-Rpl11 de Kap104. Le complexe interagit alors avec l'ARNr 5S avant d'être incorporé aux particules pré-60S (Kressler *et al.*, 2012). En plus de son rôle dans l'import, Syo1 mime l'interaction de Rpl11 avec l'hélice 48 de l'ARNr 25S, ce qui pourrait constituer une étape de contrôle qualité du repliement correct de cette protéine avant son transport (Calvino *et al.*, 2015).

L'intervention de Ran-GTP ne semble pas toujours requise pour dissocier les importines des RP qu'elles transportent. Récemment une étude a mis en évidence une voie d'import des RP indépendante de ce mécanisme chez la levure (Schütz *et al.*, 2014). En effet, la dissociation de Rsp26 de l'importine Kap104 ne nécessite pas l'intervention de RanGTP, mais l'action de co-facteur de maturation Tsr2. De plus, Tsr2 jouerait aussi un rôle de chaperone empêchant l'agrégation de Rps26 jusqu'à sa fixation à la particule précoce 90S. La dissociation de Rps26 de Tsr2 interviendrait au moment de l'incorporation de Rps26 dans les particules précoces 90S (Schütz *et al.*, 2014).

III- Co-facteurs de maturation

III.1- Généralité

La formation des sous-unités ribosomiques nécessite l'intervention d'un nombre élevé de co-facteurs de maturation et de snoRNP requis à diverses étapes de la maturation. Environ 75 snoRNP sont impliqués dans la production des ARNr matures chez la levure et 150 chez l'Homme. Les snoRNP sont considérés comme des chaperons à ARN. Ils sont constitués de protéines et d'une composante ARN. L'ARN interagit avec précurseurs de l'ARNr par appariement de base à proximité du nucléotide à modifier, guidant ainsi l'activité enzymatique d'une des protéines qui lui est associée. Ces particules interviennent lors des étapes précoces de la maturation, et jouent un rôle dans les clivages des pré-ARNr (comme le SnoARN U3, cf. C.I.2), et dans leurs modifications chimiques (cf B.II.4). Les snoRNP à boîte C/D et H/ACA sont responsables des méthylations de ribose et pseudo-uridylation des nucléotides des pré-ARNr respectivement. Les protéines Imp3 et Imp4 sont impliquées dans le repliement correct du sno-ARN U3 (Gerczei *et al.*, 2009).

Les snoRNP et les co-facteurs protéiques de maturation s'associent transitoirement avec les particules pré-ribosomiques et sont absents des sous-unités matures. Certains co-facteurs de maturation sont impliqués dans la synthèse des deux sous-unités (par exemple Rrp12, impliqué dans l'export des particules pré-ribosomiques), mais la plupart sont spécifiques de la maturation de l'une des deux sous-unités ribosomiques. L'association des co-facteurs de

maturation avec la particule pré-40S peut être spécifique d'un compartiment cellulaire. Par exemple, chez l'Homme, les co-facteurs de maturation C21ORF70 et NOC4 interagissent exclusivement avec des précurseurs de la petite sous-unité dans le noyau, tandis que les kinases RIO1 et RIO3 s'associent seulement aux particules pré-40S cytoplasmiques (Wylter *et al.*, 2011 ; Widmann *et al.*, 2012).

Chez la levure, environ 200 co-facteurs de maturation (protéines) sont nécessaires pour la synthèse des sous-unités ribosomiques fonctionnelles. Certaines de ces protéines ont tout d'abord été caractérisées par des criblages génétiques chez la levure. Par la suite, le développement des approches de protéomique, dont la purification d'affinité en tandem couplée à la spectrométrie de masse, a permis d'identifier la majorité des co-facteurs de maturation (Schäfer *et al.*, 2003; Dragon *et al.*, 2002 ; Saveanu *et al.*, 2001 ; 2004). Chez l'Homme, le nombre de co-facteurs de maturation impliqués dans l'assemblage des sous-unités ribosomiques est supérieur à 200. En effet, l'équipe de Denis Lafontaine a réalisé un crible dans des cellules HeLa en déplaçant 625 protéines nucléolaires, les plus abondantes, par la technique d'interférence à ARN (Tafforeau *et al.*, 2013). L'effet de l'absence de ces protéines sur la maturation des ARNr a ensuite été observé. Ces travaux ont permis d'identifier 286 protéines nucléolaires nécessaires à la formation du ribosome. Parmi ces protéines, 153 possèdent un orthologue requis pour la biogenèse des ribosomes chez la levure. 59 d'entre elles ont un homologue chez la levure dont l'implication dans la formation des ribosomes n'a pas été démontrée à ce jour. Les 74 protéines restantes ne possèdent pas d'orthologue chez la levure. Ceci met en évidence la complexification de la biogenèse des ribosomes au cours de l'évolution. Si, chez l'Homme, de nombreux co-facteurs de maturation semblent avoir des rôles similaires à ceux définis chez la levure, environ 30% des co-facteurs de maturation nucléolaires humains possèdent des fonctions supplémentaires ou différentes comparé à leurs homologues chez la levure. Par exemple, RRP6 est uniquement impliqué dans la maturation de l'ITS2 chez la levure, mais est également requis pour la maturation de l'ITS1 chez l'Homme (Tafforeau *et al.*, 2013).

Un autre crible génétique a été effectué sur des cellules humaine, en déplaçant 464 protéines potentiellement impliquées dans la biogenèse des ribosomes. Cette étude souligne que 153 protéines interviennent dans l'assemblage des sous-unités ribosomiques humaines. Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de l'exportine 5 dans l'export des particules pré-60S humaines, inédit chez la levure (Wild *et al.*, 2010).

Ainsi, la biogenèse des ribosomes est plus complexe chez l'Homme comparé à la levure. Des études mettent en lumière des divergences dans ce processus entre ces deux organismes. Par exemple, le co-facteur de maturation Dim1 reste associé aux particules pré-40S cytoplasmiques chez la levure alors que son homologue chez l'Homme, DIMT1L est une protéine nucléaire (Schäfer *et al.*, 2003; Strunk *et al.*, 2011; Zorbas *et al.*, 2015). De même, la déplétion de TSR1 dans des cellules humaines entraîne l'accumulation nucléaire des particules pré-40S, alors que chez la levure, elle conduit à une rétention cytoplasmique des précurseurs de la petite sous-unité (Leger-Silvestre *et al.*, 2004 ; Carron *et al.*, 2011). De plus, chez l'Homme, l'absence d'ENP1 génère l'accumulation du pré-ARNr 21S-C. Ce précurseur constitue un intermédiaire supplémentaire de la maturation de l'ARNr 18S humain comparé à la levure (Carron *et al.*, 2011).

L'association de certains co-facteurs de maturation à la particule pré-40S se fait de manière très transitoire. C'est le cas par exemple de l'hélicase Prp43 et de son partenaire Gno1 (cf ci-dessous). De la même façon, RIO1, qui est impliquée dans les dernières étapes cytoplasmiques de la maturation de la petite sous-unité, n'est, dans des conditions sauvages, pas co-purifiée avec les particules pré-40S cytoplasmiques. Cependant, la liaison de RIO1 aux particules pré-40S est stabilisée par l'inactivation de son activité kinase par une mutation ponctuelle (Widmann *et al.*, 2012; Ferreira-Cerca *et al.*, 2014; Turowski *et al.*, 2014).

Seul un très petit nombre de co-facteurs de maturation reste associé de façon stable à la petite sous-unité ribosomique tout au long de sa maturation. Il s'agit, chez l'Homme, des protéines NOB1, DIM2/PNO1, ENP1, LTV1, TSR1 et RIO2 (Wylter *et al.*, 2011). Ainsi, chez l'Homme, ces co-facteurs de maturation ont pu être utilisés comme appât lors de purification d'affinité afin d'étudier la composition des précurseurs de la petite sous-unité à différentes étapes de sa maturation (Wylter *et al.*, 2011). Chez la levure, en plus de ces 6 co-facteurs de maturation, un autre est stablement associé aux particules pré-40S, il s'agit de la méthyltransférase Dim1 (Schäfer *et al.*, 2003 ; Strunk *et al.*, 2011).

III.2- Plusieurs types d'enzymes parmi les co-facteurs de maturation

Bien que le rôle précis des co-facteurs dans la maturation des sous-unités ribosomiques reste en grande partie méconnu, certains d'entre eux peuvent être regroupés

dans différentes familles enzymatiques, comme notamment les hélicases à ARN, GTPases, kinases, ATPases, méthyl-transférases (Kressler *et al.*, 2010 ; Strunk and Karbstein, 2009).

- Les hélicases à ARN impliquées dans la biogenèse des ribosomes pourraient moduler les interactions ARN-ARN dans les pré-ARNr ou entre les pré-ARNr et les snoRNP. Ainsi, chez la levure, l'hélicase Prp43 semble jouer un rôle dans l'appariement des snoRNP et le pré-ARNr 27S (Bohnsack *et al.*, 2009). Un rôle similaire a été proposé pour DDX21 qui pourrait assister le décrochage de la snoRNP U8 sur la partie 3' de l'ARNr 28S chez la souris (Srivastava *et al.*, 2010).

- Concernant les GTPases, eIF5B (parfois appelée Fun12), est requise pour l'association de la sous-unité 60S avec la particule pré-40S, lors de l'étape finale de maturation du précurseur de la petite sous-unité ribosomique (Lebaron *et al.*, 2012; Strunk *et al.*, 2012) (cf-ci paragraphe C.III.2).

- Des kinases, comme Hrr25 chez la levure, et son homologue CK1 δ /CK1 ϵ (isoforme de la caséine 1) chez l'Homme, jouent un rôle dans le décrochage des co-facteurs de maturation stablement associés aux précurseurs de la petite sous-unité. Elle phosphoryle Ltv1 et Enp1, entraînant ainsi leurs recyclages (Zemp *et al.*, 2009 ; Zemp *et al.*, 2014; Ghalei *et al.*, 2015). Ainsi le substrat et la fonction de Hrr25 ou des isoformes de caséine 1 est maintenant caractérisé. Cependant, pour la plupart des co-facteurs de maturation ayant des activités putatives de kinases, leur rôle dans la maturation de la petite sous-unité et leurs substrats restent à élucider. Par exemple, la kinase atypique RIO3 (uniquement présente chez les eucaryotes supérieurs), a été identifiée comme un composant de particules pré-40S cytoplasmiques tardives (Widmann *et al.*, 2012). Cependant, les données actuelles ne permettent de savoir si l'association de RIO3 avec les particules pré-40S est stable. La déplétion de RIO3 entraîne une accumulation du pré-ARNr 21S, qui est un précurseur nucléaire de l'ARNr 18S (Baumas *et al.*, 2012). La localisation de RIO3 étant cytoplasmique, elle pourrait être impliquée dans le recyclage de co-facteurs de maturation nécessaires à la maturation du pré-ARNr 21S dans le noyau (Baumas *et al.*, 2012).

- Des ATPases sont également requises dans l'assemblage des ribosomes. Le co-facteur de maturation Fap7 est nécessaire pour le clivage au site D du pré-ARNr 20S permettant de former l'ARNr 18S mature (Granneman *et al.*, 2005). Fap7 interagit directement avec Rps14 et empêche l'association prématurée de Rps14 avec la particule pré-40S (Hellmich *et al.*, 2013; Loc'h *et al.*, 2014). La protéine Rps14 est située à proximité du site D du pré-ARNr 20S. La déplétion du domaine ATPase de Fap7 entraîne notamment un

défaut de maturation de l'ARNr 18S. Les auteurs suggèrent qu'en absence du domaine ATPase de Fap7, Rsp14 ne serait pas incorporée dans les particules pré-40S naissantes. Ceci pourrait avoir des conséquences sur la position de l'hélice 45 de l'ARNr 18S et sur la fixation de Rps26 (Hellmich *et al.*, 2013).

- Des méthyl-transférases sont aussi impliquées dans la formation des ribosomes. Elles sont nécessaires pour la viabilité des levures. La protéine Dim1 est responsable de la diméthylation du pré-ARNr 20s dans le cytoplasme chez la levure (Lafontaine *et al.*, 1995 ; Lafontaine *et al.*, 1998). Sa fonction est conservée chez l'Homme. Cependant, DIMT1L, l'homologue de Dim1, exerce sa fonction dans le noyau (Zorbas *et al.*, 2015). De plus, la méthylation de G1575 de l'ARNr 18S par Bud23 est requise pour un export efficace de la particule pré-40S (White *et al.*, 2008). L'activité enzymatique de certaines de ces protéines n'est pas essentielle pour la biogenèse des ribosomes. En effet, des mutations à l'origine de la suppression de l'activité catalytique de la méthylase Emg1 n'altère pas la formation des ribosomes matures (Leulliot *et al.*, 2008). Cependant, la déplétion de cette protéine entraîne un défaut de la maturation de l'ARNr 18S (Eschrich *et al.*, 2002). Son activité pourrait être complétée par d'autres protéines aux fonctions redondantes.

-Par ailleurs, des nucléases sont responsables de clivages au sein du pré-ARN pour donner les ARNr matures. Parmi elles, des endonucléases ont été identifiées dont RCL1 impliquée dans le clivage au site A2 (Horn *et al.*, 2011) ou Nob1 qui clive le pré-ARNr 20S au site D chez la levure et son homologue chez l'Homme, NOB1 responsable de la coupure au site 3 formant l'ARNr 18S. De plus, chez l'Homme, l'action d'exo-nucléase a aussi été démontrée (Prete *et al.*, 2013).

Plusieurs co-facteurs de maturation ne possèdent pas d'activité enzymatique déjà décrite, mais comportent des domaines potentiels de fixation à l'ARNr (GAR, S1, RRM, domaine à doigt de zinc, ...) et/ou des domaines d'interaction protéine-protéine (WD40, HEAT, TPR, HAT). Certains s'assemblent en sous-complexes de protéines avant de s'associer aux particules pré-ribosomiques, comme par exemple, Bms1-Rcl1 qui interagit avec la particule 90S ou pour la formation du « SSU processome ». (Wegierski *et al.*, 2001 ; Karbstein *et al.*, 2005 ; Phipps *et al.*, 2011 ; Delprato *et al.*, 2014).

III.3- Analyses structurale: positionnement des co-facteurs de maturation dans les particules pré-40S

Si l'on a maintenant une idée claire de la temporalité de l'association de certains co-facteurs de maturation sur les sous-unités ribosomiques en formation, cela ne signifie pas pour autant que l'on sache quand ni comment ils agissent sur ces sous-unités. Par exemple, DIM2/PNO1 s'associe à la particule pré-40S du nucléole jusqu'aux dernières étapes cytoplasmiques de maturation. Elle est requise pour que l'endonucléase NOB1 puisse effectuer le clivage final de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S, mais sa fonction précise n'est à ce jour pas établie. Ainsi, le rôle précis de la plupart des co-facteurs de maturation reste à éclaircir.

Afin de répondre à cette question cruciale, divers travaux structuraux ont été entrepris, visant d'abord à localiser ces co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S, mais également tenter de relier la structure de la particule pré-40S aux fonctions des co-facteurs de maturation. Ces travaux ont été menés, pour l'instant, uniquement chez la levure. Ainsi, les sites d'interaction avec le pré-ARNr 20S de six des 7 co-facteurs de maturation stablement associés à la particule pré-40S ont été déterminés par des expériences de CRAC (UV cross-linking and cDNA analysis) (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014). Cette technique consiste à fixer les interactions protéine-ARN par un traitement aux UV. Les complexes protéine-ARN sont alors purifiés dans des conditions dénaturantes afin d'isoler seulement les interactions directes. Les fragments d'ARN sont récupérés, amplifiés et séquencés. Cette expérience permet d'identifier les sites d'interaction d'une protéine avec l'ARN *in vivo*.

En 2011, les équipes de K. Karbstein et I. Skiniotis ont déterminé la structure 3D de particules pré-40S cytoplasmiques de levure par cryo-MET et analyse d'images, à 18Å de résolution (Strunk *et al.*, 2011). Ceci a permis aux auteurs de cette étude de positionner les sept co-facteurs de maturation sur cette particule pré-40S cytoplasmique (**Figure 11**). Les co-facteurs de maturation Ltv1 et Enp1 sont présents au niveau du bec de la particule pré-40S. Tsr1 est situé au-dessous du bec de la particule pré-40S, coté interface avec la grande sous-unité. De même, Rio2 et Dim1 sont présents du côté de l'interface avec la particule 60S : Dim1 se situe au centre du corps tandis que Rio2 est localisé au niveau de la tête de la particule dans le sillon de l'ARNm. Quant au co-facteur de maturation Dim2, il se situe au niveau de la plateforme de la particule. L'endonucléase Nob1 est aussi localisée au niveau de la plateforme du précurseur cytoplasmique de la petite sous-unité. A l'exception du co-facteur

de maturation Tsr1, la position des co-facteurs sur la particule pré-40S est en bon accord avec les données de CRAC.

Ces résultats de cryo-MET ont permis à leurs auteurs de proposer que l'une des fonctions les plus importantes de ces sept co-facteurs de maturation est d'empêcher l'entrée prématurée des particules pré-40S en traduction. En effet leurs positions sur la particule pré-40S bloquent de manière compétitive les sites de liaison de l'ARNm et de certains facteurs d'initiation de la traduction, et empêchent l'association de la petite et de grande sous-unité ribosomiques.

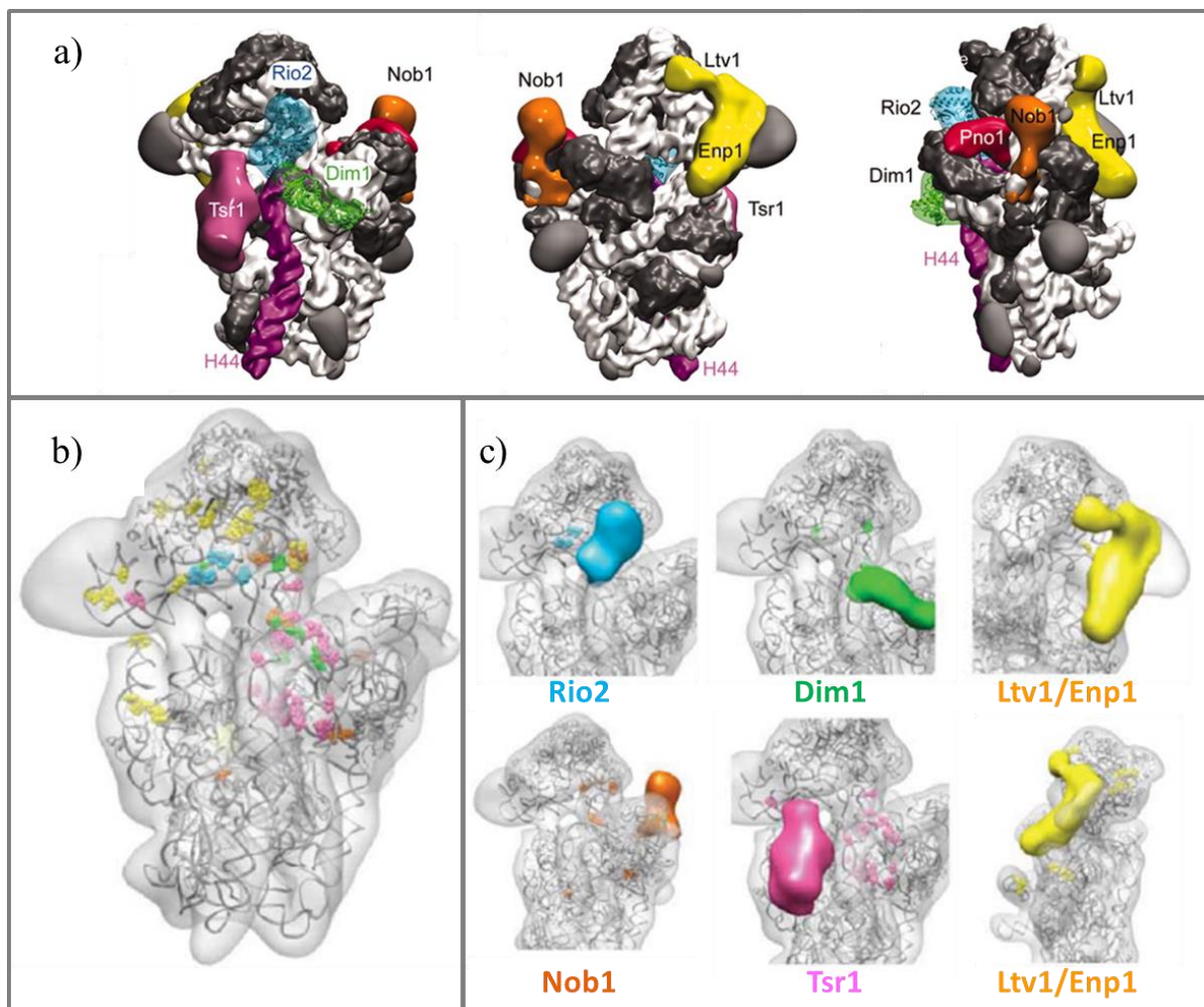


Figure 11: Position des co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S cytoplasmique de levure. a) Positions des co-facteurs de maturation sur la structure 3D de la particule pré-40S déterminée par cryo-MET. Le co-facteur de maturation Enp1 est indiqué en jaune de même que Ltv1. Rio2, Nob1 et Tsr1, Dim2/Pno1 sont indiqués en bleu, orange, rose et rouge respectivement. b) Sites d'interaction des co-facteurs avec l'ARNr 18S déterminés par des expériences de CRAC (Granneman et al., 2010). c) Comparaison des sites d'interaction des co-facteur de maturation avec l'ARNr déterminés par CRAC avec la position des co-facteur de maturation sur la structure 3D de la particule pré-40S. (Figure adaptée de Strunk et al., 2011)

Par la suite, je décris ces sept co-facteurs, impliqués dans la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité.

III.4- Co-facteurs de maturation agissant dans le cytoplasme

III.4.1- Ltv1 (low-temperature viability protein)

Il s'agit d'une protéine non essentielle, composée de 463 acides aminés chez *S.cerevisiae*. Son homologue chez l'Homme est constitué de 475 acides aminés. Ce co-facteur s'associe avec les particules pré-40S dans le nucléoplasme mais est principalement associé à ces complexes dans le cytoplasme chez la levure (Fassio *et al.*, 2010) comme chez l'Homme (Zemp *et al.*, 2009). Le co-facteur de maturation Ltv1 interagit directement avec Enp1 *in vitro* (Campbell and Karbstein, 2011) et forme un complexe stable avec Enp1 et Rps3. En effet, ce complexe peut se dissocier du précurseur de la petite sous-unité en présence d'une forte concentration en sels (Schäfer *et al.*, 2006).

Les données de CRAC chez la levure indiquent que Ltv1 interagit principalement avec les hélices h16 (nucléotides 453-454) et h41/41A (nucléotides 1490-1491) de l'ARNr 18S (Granneman *et al.*, 2010). Sa fixation simultanée avec ces deux hélices suggère que Ltv1 établit un lien entre l'épaule et la tête de la particule (Granneman *et al.*, 2010). Les études de cryo-MET ont également permis de confirmer que le complexe formé de Ltv1 et Enp1, reliait le bec à l'épaule de la particule (**Figure 11**) (Strunk *et al.*, 2011 ; Ghalei *et al.*, 2015). Cependant la position relative de ces deux protéines reste à éclaircir. Au vu de sa position sur la particule pré-40S, ce complexe empêcherait l'association prématurée de Rps10 avec la particule pré-40S (Strunk *et al.*, 2011).

Concernant son implication dans la biogenèse de la petite sous-unité, Ltv1 pourrait jouer le rôle d'adaptateur dans l'export des précurseurs de la petite sous-unité (Seiser *et al.*, 2006 ; Fassio *et al.*, 2010 ; Merwin *et al.*, 2014). Ce co-facteur n'étant pas essentiel, sa fonction pourrait être redondante avec d'autres protéines (cf paragraphe C.II.1).

Chez la levure, la libération de Ltv1 de la particule pré-40S nécessite l'action de la kinase Hrr25 (Ghalei *et al.*, 2015). En effet, Hrr25 phosphoryle Ltv1 causant sa dissociation du précurseur de la petite sous-unité (Schäfer *et al.*, 2006 ; Ghalei *et al.*, 2015). Chez l'Homme, les isoformes de la caséine kinase 1, CK1δ et CK1ε, homologue de Hrr25, phosphorylent LTV1 et ENP1 ce qui pourrait être impliquer dans le recyclage de ces co-facteurs (Zemp *et al.*, 2014). Le co-facteur Rio2 jouerait aussi un rôle dans le recyclage de Ltv1 et Enp1 (cf paragraphe B.III.4.7).

Récemment, des travaux ont montré que la libération de Ltv1 de la particule pré-40S est à l'origine de l'association stable de Rps3 dans sa conformation finale (données non publiées, Brigitte Pertschy, conférence EMBO Ribosome). En effet, le domaine N-terminal de Ltv1 interagit avec le domaine N-terminal de Rps3 et l'ARNr formant l'épaule de la particule (hélice 16), ceci permet de maintenir Rps3 dans une conformation non mature. Quant à la partie C-terminale de Ltv1, elle interagit avec Rps20 et l'ARNr localisé au niveau de la tête de la particule (hélice 41), masquant ainsi l'éventuel site de fixation de la partie N-terminale de Rps3 avec la particule pré-40S.

III.4.2- *Enp1* (Essential Nuclear Protein)

Cette protéine est constituée de 483 acides aminés chez la levure. Son homologue chez l'Homme, la Bystine/ENP1 est composée de 437 acides aminés. Ce co-facteur est présent au sein de la particule, 90S et se dissocie de la particule pré-40S dans le cytoplasme chez l'Homme comme chez la levure (Grandi *et al.*, 2002 ; Schäfer *et al.*, 2003 ; Carron *et al.*, 2011).

Des expériences de CRAC indiquent que le site de fixation de Enp1 avec l'ARNr 18S est localisé au niveau de l'hélice 33 (nucléotides 1256-1259) qui forme du bec de la particule pré-40S (Granemann *et al.*, 2010). De plus, les données de cryo-MET indiquent que le complexe formé de Enp1, Rps3 et Ltv1 est localisé au niveau du bec de la particule (**Figure 11**) (voir ci-dessus, Strunk *et al.*, 2011 ; Ghalei *et al.*, 2015).

Cette protéine joue plusieurs rôles tout au long de la biogenèse des ribosomes. Chez la levure, en absence d'Enp1, on note une accumulation du pré-ARNr 35S. Ainsi elle est requise pour les clivages aux sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S (Chen *et al.*, 2003). Chez l'Homme, en absence de cette protéine, une accumulation des pré-ARNr 41S et 21S, précurseurs nucléaires du l'ARNr 18S, est notamment observée. Ce co-facteur est donc requis pour le clivage au site A2 dans l'ITS1 et la maturation du pré-ARNr 21 en pré-ARNr 18S-E chez l'Homme (Carron *et al.*, 2011). Cette protéine est aussi connue pour interagir avec les snoARN U3 et U14, soulignant son implication dans la maturation précoce de l'ARNr 18S chez la levure (Chen *et al.*, 2003).

L'étape à laquelle Enp1 est recyclé est peu claire et reste à préciser. En effet, Enp1 forme un complexe avec Rps3 et Ltv1, et se dissocie de la particule pré-40S lors de la

première étape de sa maturation cytoplasmique. On ne peut exclure que la libération de Ltv1 soit aussi à l'origine de la dissociation simultanée d'Enp1 du précurseur de la petite sous-unité. De plus, ce co-facteur a été classé comme étant associé aux particules pré-40S cytoplasmiques précoces (Hector *et al.*, 2014) (cf. ci-après). Sa libération, avec celle des co-facteurs Ltv1, Tsr1, et Rio2, permettrait la formation complète de la tête de la particule. Le précurseur de la petite sous-unité résultant pourrait alors s'associer à la particule 60S (Hector *et al.*, 2014). Cependant, Enp1 serait présent dans les particules pseudo-80S correspondant à une étape tardive de la maturation de la petite sous-unité. En effet, en absence des protéines Rli1 ou Dom34, Enp1 co-précipite avec ce type de particule (Strunk *et al.*, 2012). Rli1 et Dom43 pourraient être des protéines impliquées dans la dissociation de la particule pré-40S avec la grande sous-unité (Strunk *et al.*, 2012).

III.4.3- *Tsr1* (Twenty S rRNA accumulation)

Le co-facteur Tsr1 est une protéine de 788 acides aminés chez la levure et de 804 acides aminés chez l'Homme. Chez la levure, cette protéine interagit avec le précurseur de la petite sous-unité dans le nucléole suite au clivage au site A2 et la suit dans le cytoplasme (Schäfer *et al.*, 2003). De même, chez l'Homme, TSR1 s'associerait avec la particule pré-40S dans le nucléole. De plus, cette protéine est présente dans le noyau et en particulier dans le nucléole et faiblement présente dans le cytoplasme, comme l'indique l'étude de sa localisation cellulaire par marquage à la GFP (Carron *et al.*, 2011).

Les données de CRAC indiquent que Tsr1 interagit notamment avec l'hélice 45 (nucléotides 1765-1771), et les hélices 19-26-27 de l'ARNr 18S (Granneman *et al.*, 2010). Cependant, sa zone de localisation est située au niveau de l'interface avec la grande sous-unité au-dessous du bec de la particule pré-40S de levure (Strunk *et al.*, 2011). Sa position sur la structure 3D n'est donc pas en accord avec les données de CRAC (**Figure 11**).

Chez la levure, Tsr1 est impliquée dans les étapes tardives de la formation de l'ARNr 18S mature (Gelperin *et al.*, 2001). Cependant, sa fonction précise dans la biogenèse des ribosomes reste à ce jour inconnue. En effet, en absence de Tsr1, on observe une accumulation cytoplasmique du pré-ARNr 20S (Gelperin *et al.*, 2001 ; Leger-Silvestre *et al.*, 2004). Tsr1 présente une homologie avec la GTPase Bms1 (Gelperin *et al.*, 2001), cependant aucune activité enzymatique n'a été observée à ce jour (Lebaron *et al.*, 2012). Chez l'Homme, ce co-facteur est également requis pour l'export des particules pré-40S dans le cytoplasme. En

effet, sa déplétion est à l'origine d'une accumulation nucléoplasmique des particules pré-40S (Carron *et al.*, 2011).

Les données dans la littérature concernant l'étape de maturation à laquelle Tsr1 est libéré de la particule pré-40S cytoplasmique de levure sont en contradiction. Une étude montre que le recyclage de Tsr1 nécessite la présence de Ltv1, ce qui suggère que Tsr1 serait libéré précocement (Fassio *et al.*, 2010). De plus, au vu de sa position sur la particule pré-40S, l'équipe de K. Karbstein conclut que Tsr1 empêcherait l'association prématurée du précurseur de la petite sous-unité avec la particule 60S (Strunk *et al.*, 2011). Ces observations semblent montrer que Tsr1 serait recyclé avant la formation de la particule pseudo-80S. Cependant, lorsque Fap7, une ATPase impliquée dans l'assemblage de la petite sous-unité, est dépletée, Tsr1 serait associé avec des particules pseudo-80S. De plus en absence de Rli1, acteur potentiel de la dissociation de la particule pseudo-80S, Tsr1 n'est pas retrouvé dans celle-ci. Ces observations suggèrent que Tsr1 serait présent dans les particules pseudo-80S et serait recyclé avant l'action de Rli1 (Strunk *et al.*, 2012).

La structure 3D de Tsr1, ne contenant pas le domaine N-terminal et une boucle flexible interne, a été résolue par cristallographie (données non publiées, Atlanta Cook, conférence EMBO Ribosome). Cette étude révèle que Tsr1 possède une forte homologie structurale avec le domaine de liaison au GTP d'eIF5B, SelB et Ef-Tu, des facteurs d'initiation ou d'élongation de la traduction. Des expériences d'ajustement de structure indiquent qu'elle posséderait le même site de fixation qu'eIF5B et serait orientée de la même façon sur la particule pré-40S. Cette étude conclut que la libération de Tsr1 serait un prérequis à la formation des particules pseudo-80S chez la levure.

III.4.4- *Dim1* (DIMéthylase1)

Cette protéine est composée de 318 acides aminés chez la levure et de 313 acides aminés chez l'Homme. Chez la levure, le co-facteur Dim1 s'associe de façon précoce avec la particule pré-40S, au cours de la formation de la particule 90S et reste associé aux précurseurs cytoplasmiques de la petite sous-unité (Schäfer *et al.*, 2003). Chez l'Homme, cette protéine est uniquement nucléaire (Zorbas *et al.*, 2015).

Les données de CRAC montrent que Dim1 interagit avec les hélices 2-28 (nucléotides 1137-1156) et h44 (nucléotides 1753-1794) de l'ARNr 18S (Granneman *et al.*, 2010). Sa position sur la structure 3D de la particule pré-40S est située au niveau de l'hélice 44 sur le

corps de la particule. Ces données de cryo-MET sont en accord avec les conclusions des expériences de CRAC (**Figure 11**). La fixation de Dim1 sur la particule pré-40S empêche la fixation de facteur d'initiation (eIF1, eIF1A, et eIF3) et prévient donc son entrée prématurée dans la traduction (Strunk *et al.*, 2011).

Dim1 est l'enzyme responsable de la diméthylation des deux adénosines adjacentes présentes dans la boucle entre l'hélice 44 et 45 de l'ARNr 18S à proximité du site D au niveau de la plateforme de la particule pré-40S (Lafontaine *et al.*, 1995 ; Lafontaine *et al.*, 1998). Cette réaction est universellement conservée. Elle se passe dans le cytoplasme chez la levure (Brand *et al.*, 1977) et dans le noyau chez l'Homme (Zorbas *et al.*, 2015). Si la diméthylation n'est pas strictement nécessaire, la présence de Dim1 est essentielle à la maturation de la petite sous-unité. En effet, l'inactivation de Dim1 n'a pas d'effet sur la biogenèse des ribosomes, cependant en son absence, les cellules ne sont pas viables (Lafontaine *et al.*, 1995). Une étude suggère que Dim1 serait recruté sur le pré-ARNr via le co-facteur Dim2 (Vanrobays *et al.*, 2004). L'association de Dim1 avec Dim2 est requise pour les clivages aux sites A1 et A2, et pour la diméthylation du pré-ARNr 20S (Vanrobays *et al.*, 2004).

Chez la levure, l'étape à laquelle Dim1 est libéré de la particule pré-40S n'est pas encore déterminée, de même que les mécanismes entrant en jeu pour son recyclage. En effet, au vu de sa position sur la particule pré-40S, l'équipe de K. Karbstein propose que Dim1 empêche la formation de la particule pseudo-80S (Strunk *et al.*, 2011) Cependant, cette protéine est retrouvée dans les particules pseudo-80S suite à la déplétion de Rli1 (Strunk *et al.*, 2012). Chez l'Homme DIMT1L est nucléaire et n'entre pas dans la composition de particules pré-40S cytoplasmiques (Wyler *et al.*, 2011 ; Zorbas *et al.*, 2015)

La structure 3D de cette protéine chez l'Homme a été déterminée par cristallographie et diffraction aux rayons X (PDB ID: 2ZQ9) (O'Farrell *et al.*, 2008). Elle se compose de deux domaines KH. Le domaine N-terminal consiste en une combinaison d'hélices α et feuillets β , tandis que le domaine C-terminal est composé seulement d'hélices α . Le site catalytique est présent à l'interface de ces deux domaines.

III.4.5- Dim2/Pno1 (*Partner of Nob1*)

Dim2 est une protéine de 274 acides aminés chez la levure et de 252 chez l'Homme. Elle s'associe aux particules pré-40S très précocement, lors de la formation de la particule

90S et reste associée aux particules pré-40S cytoplasmiques chez la levure (Vanrobays *et al.*, 2004 ; 2008) comme chez l'Homme (Widmann *et al.*, 2012).

Les données de CRAC indiquent que Dim2 interagit avec les régions 5' de l'ITS1, avec les hélices 45, 24 et 28 de l'ARNr 18S présentes au niveau du cou et de la plateforme de la particule pré-40S (Turowski *et al.*, 2014). Cette conclusion est confirmée par les données de cryo-MET qui montrent que Dim2 se situe au niveau du bas de la tête et du haut de la plateforme (**Figure 11**). Son site de fixation étant situé à proximité de la position de Rps26 sur la particule pré-40S, sa libération de la particule pré-40S pourrait permettre le recrutement de Rps26 sur le précurseur tardif de la petite sous-unité (Strunk *et al.*, 2011).

La fonction précise de Dim2 dans la biogenèse des ribosomes est encore inconnue. Cependant, des données ont montré que ce co-facteur est impliqué dans le clivage au site A1, A2 et D du pré-ARNr 20S (Vanrobays *et al.*, 2004 ; Woolls *et al.*, 2011; Vanrobays *et al.*, 2008). Cette protéine possède une séquence NES en C-terminal, et pourrait donc être impliquée dans l'export nucléocytoplasmique des particules pré-40S (Vanrobays *et al.*, 2008). De plus, ce co-facteur est aussi nommé Pno1 pour Partner of Nob1, étant considéré comme un régulateur de l'activité enzymatique de Nob1 (Woolls *et al.*, 2011). Le co-facteur Dim2 interagit avec Nob1 via son domaine KH central *in vitro*. Lorsque ce domaine KH de Dim2 est muté, on observe une accumulation du pré-ARNr 20S, témoin d'un défaut de maturation de l'ARNr 18S. Cette association serait donc nécessaire pour le clivage au site D du pré-ARNr 20S (Woolls *et al.*, 2011).

La protéine Dim2 est associée aux particules tardives contenant seulement les co-facteurs Nob1 et Rio1 que ce soit chez la levure ou chez l'Homme (Hector *et al.*, 2014 ; Widmann *et al.*, 2012). Elle serait la dernière des co-facteurs à se dissocier de la particule pré-40S (Strunk *et al.*, 2012).

La structure 3D du complexe Dim2 (constitué de 219 acides aminés) interagissant avec eIf2 et un segment de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S de *E.coli* (11 nucléotides) a été résolue par cristallographie (Jia *et al.*, 2007)(PDB ID: 2E3U). Elle se compose de trois domaines KH, incluant une séquence de huit acides aminés conservés (VIGxxGxxL) impliqués dans la fixation de l'ARN (Vanrobays *et al.*, 2004). Des travaux ont montré que le domaine KH présent en C-terminal de la protéine est nécessaire pour la fixation de ce co-facteur avec le pré-ARNr 20S (Vanrobays *et al.*, 2008).

III.4.6- *Nob1 (Nin1 (One) Binding protein)*

La protéine Nob1 possède 459 acides aminés chez la levure et 412 chez l'Homme. Chez la levure, cette protéine s'associe de façon précoce avec la particule pré-40S dans le nucléole et le reste jusqu'aux étapes finales de maturation dans le cytoplasme. Chez l'Homme, cette protéine n'est pas nucléolaire, et si elle est présente dans le noyau, elle est principalement cytoplasmique (Widmann *et al.*, 2012).

Son site de fixation à l'ARNr 18S a été déterminé par des expériences CRAC et se situe sur l'hélice 40 (nucléotides 1390-1398) et la région 5' de l'ITS1, au niveau de la plateforme, derrière la tête de la particule pré-40S (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014). Des analyses par footprint ont aussi montré que Nob1 s'associe avec des nucléotides de l'ITS1 (Lamanna, and Karbstein, 2009). De plus, des expériences de GST pull down ont montré que Nob1 interagit avec Rps5 et Rps14 *in vitro*, deux protéines importantes pour le clivage au site D du pré-ARNr 20S et localisées au niveau de la plateforme du précurseur de la petite sous-unité (Lamanna and Karbstein 2009 ; Neueder *et al.*, 2010). Ceci est en adéquation avec les données de cryo-MET, qui localisent Nob1 sur la plateforme de la particule pré-40S (**Figure 11**) (Strunk *et al.*, 2011).

Nob1 est l'endonucléase responsable du clivage au site D du pré-ARNr 20S, à l'origine de la formation du l'ARNr 18S mature. Il a aussi été montré que Nob1 catalyse le clivage au site D (Pertschy *et al.*, 2009). La déplétion de ce co-facteur résulte en une accumulation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme (Fatica *et al.*, 2004). De même, chez l'Homme cette enzyme est un composant de la particule pré-40S et pourrait réaliser le clivage du pré-ARNr 18 S-E au site 3, formant ainsi l'ARNr 18S mature (Zemp *et al.*, 2009).

Nob1 est constitué d'un domaine PIN (PilT N-terminus) en N-terminal (acides aminés 1-130), qui est commun avec les nucléases (homologue à la superfamille des RNase H) (Arcus *et al.*, 2004). Ce domaine interagit directement avec l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S *in vitro* (Lamanna and Karbstein, 2009). Des données proposent qu'un réarrangement de l'ARNr 18S serait nécessaire pour que Nob1 puisse exercer sa fonction (Lamanna and Karbstein, 2011). En effet, cette protéine s'associe de façon précoce à la particule pré-40S mais n'exerce sa fonction que dans les étapes finales de la maturation de la petite sous-unité. L'équipe de Karbstein propose le modèle suivant : avant le clivage au site A2 du pré-ARNr 20S, le site de décodage n'est pas complètement formé. L'hélice 44 forme un duplex avec un segment de l'ITS1, empêchant Nob1 d'exercer sa fonction. Le clivage au site A2 permet l'élimination du

segment de l'ITS1. Ceci est à l'origine d'un changement de conformation de l'hélice 44. Nob1 est alors repositionné et peut ainsi cliver le pré-ARNr 20S pour former l'ARNr 18S mature (Lamanna and Karbstein, 2011). Par ailleurs, un autre modèle propose que l'hydrolyse du GTP par eIF5B/Fun12 dans la particule pseudo-80S serait à l'origine d'un changement de conformation de la particule pré-40S nécessaire pour que Nob1 puisse exercer sa fonction (Lebaron *et al.*, 2012).

Comme Dim2, Nob1 serait libéré tardivement du précurseur de la petite sous-unité ribosomique de levure, suite à la dissociation de la particule pseudo-80S médiée par Rli1. En effet, lorsque Rli1 est déplété, Nob1 est présent dans les particules pseudo-80S (Strunk *et al.*, 2012).

La structure 3D de Nob1 de l'archaebactérie *Pyrococcus horikoshii* a été déterminée par RMN (Veith *et al.*, 2012). Elle contient 165 acides aminés. Cette protéine se compose d'un domaine à doigts de Zinc en C-terminal qui est connecté avec le PIN domaine par un lien flexible. Le domaine à doigts de zinc est suffisant pour la fixation de la protéine à l'hélice 40 de l'ARNr 18S. Il constituerait un point d'ancrage de la protéine Nob1 sur la particule pré-40S à proximité du site de clivage D (Veith *et al.*, 2012).

III.4.7- Les kinases atypiques Rio2 et Rio1

Deux kinases, Rio1 et Rio2 sont associées à la particule pré-40S dans le cytoplasme et requises à différentes étapes de sa maturation.

- Rio2 (Right Open reading frame 2)

C'est une protéine composée de 425 acides aminés chez la levure. Son homologue chez l'Homme est formé de 552 acides aminés. Elle fait partie de la famille des protéines kinases atypiques (Manning *et al.*, 2002). Ce co-facteur s'associe de façon stable aux particules pré-40S cytoplasmiques. En effet, Rio2 a été utilisé comme protéine appât afin d'isoler les précurseurs de la petite sous-unité cytoplasmiques chez la levure (Schäfer *et al.*, 2003 ; Strunk *et al.*, 2011). De même, chez l'Homme, RIO2 est un composant stable de la particule pré-40S cytoplasmique (Zemp *et al.*, 2009).

Les données de CRAC chez la levure indiquent que le site d'interaction de Rio2 est situé sur l'hélice 31 (nucléotides 1194-1196), localisée au niveau de la tête de la particule à proximité du site de fixation P des ARNt (Granneman *et al.*, 2010). Ceci est confirmé par sa position sur la structure 3D de la particule pré-40S déterminée par cryo-MET couplée à

l'analyse d'images (**Figure 11**) (Strunk *et al.*, 2011). Au vu de sa localisation, la présence de Rio2 empêcherait l'interaction prématurée notamment de facteurs d'initiation avec la particule pré-40S.

Rio2 est impliquée dans l'export des particules pré-40S chez la levure (Fatica *et al.*, 2004) et chez l'Homme (cf paragraphe C.II.1 ; Zemp *et al.*, 2009). Chez la levure, la déplétion et l'inactivation de l'activité kinase de Rio2 est à l'origine d'une accumulation du pré-ARNr 20S (Geerling *et al.*, 2003 ; Vanroboys *et al.*, 2003). L'activité ATPase de Rio2 est requise pour sa dissociation du précurseur de la petite sous-unité. Le recyclage de Rio2 constituerait un prérequis pour la libération des co-facteurs Enp1 et Ltv1 nécessaire pour la suite de la maturation de la petite sous-unité (Ferreira-Cerca *et al.*, 2012). Chez l'Homme, une étude montre que l'activité enzymatique de RIO2 est nécessaire pour la libération de DIM2, LTV1, NOB1 et pour la maturation du pré-ARNr 18 S-E alors que seule sa présence est requise pour le recyclage de ENP1 (Zemp *et al.*, 2009). De plus, RIO2 est requise pour le recyclage de RRP12, un co-facteur décrit comme impliqué dans l'export chez la levure (Oeffinger *et al.*, 2004 ; Wyler *et al.*, 2011). Cependant, à ce jour, le substrat de RIO2 reste inconnu. La protéine RIO2 humaine ou de levure est capable d'autophosphorylation *in vitro* (Geerlings *et al.*, 2003 ; Zemp *et al.*, 2009).

La libération de Rio2 intervient lors des étapes intermédiaires de la maturation de la petite sous-unité. Que ce soit chez la levure ou chez l'Homme, Rio2 est recyclé avant l'action de Rio1 dans la formation de la particule 40S. En effet, les particules pré-40S purifiées en utilisant une forme catalytiquement inactive de Rio1 comme appât ne contiennent pas Rio2 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014 ; Widmann *et al.*, 2012).

La structure de Rio2 a tout d'abord été déterminée chez l'archaebactérie *Archaeoglobus fulgidus*. Cette étude a révélé que cette protéine contient un domaine N-terminal en « winged helix » (replié en hélice ailée) connecté au domaine kinase RIO (Laronde-Leblanc *et al.*, 2004). Les domaines RIO contiennent la signature kinase et possèdent une insertion de 18 à 27 acides aminés commune qui constitue une boucle flexible (Laronde Leblanc and Woldawer, 2005). Son site actif GxGKES est différent des autres protéines de la famille RIO, ce qui suggère des modes d'action distincts entre ces kinases (Laronde Leblanc and Woldawer, 2005). Récemment, la structure 3D de Rio2 en présence d'ATP, du champignon *Chaetomium thermophilum* déterminée par cristallographie suggère que cette protéine agirait comme une ATPase dans l'assemblage de la petite sous-unité (Ferreira-Cerca *et al.*, 2012). En effet, elle possède au sein de son site actif, un intermédiaire phosphoaspartate qui est typique des ATPases de type P.

- Rio1 (RIght Open reading frame1)

Cette protéine est constituée de 484 acides aminés chez la levure et de 568 acides aminés chez l'Homme. Ce co-facteur s'associe aux particules pré-40S cytoplasmiques de façon dynamique. En effet, l'étude de la composition des particules pré-40S de levure et d'Homme par spectrométrie de masse souligne que Rio1 n'y que rarement détectée (Schäfer *et al.*, 2003 ; Lebaron *et al.*, 2005 ; Widmann *et al.*, 2012). Chez la levure, Rio1 s'associe à la particule pseudo-80S juste avant le clivage du pré-ARNr 20S au site D, mais après le décrochage de Rio2 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). Chez l'Homme, la forme sauvage de RIO1 est stablement associée au méthylosome. Cependant, la forme catalytiquement inactive de RIO1 (RIO1 Kinase-Dead, RIO1(KD)) est stablement associée avec des particules pré-40S qui ne contiennent que NOB1, DIM2 et RIO1(KD). De même que chez la levure, RIO1 interagit avec la particule pré-40S humaine suite au recyclage de RIO2 (Widmann *et al.*, 2012).

Le site d'interaction de Rio1 avec l'ARNr 18S a été déterminé par des expériences de CRAC chez la levure. Il se situe en haut de l'hélice 44 (Turowski *et al.*, 2014).

Chez la levure, Rio1 est requise pour le clivage du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme. Pour cela, la fixation de l'ATP sur Rio1 est essentielle (Turowski *et al.*, 2014). Le clivage au site D est ATP dépendant (Lebaron *et al.*, 2012). Chez l'Homme, RIO1 est essentielle pour la maturation du pré-ARNr 18 S-E et la libération des co-facteurs DIM2 et NOB1 (cf ci-dessus).

La structure 3D de Rio1 déterminée chez l'archaebactérie *Archaeoglobus fulgidus* (constitué de 258 acides aminés), montre que cette protéine contient deux hélices en N-terminal différemment au domaine « winged helix » présent chez Rio2 (Laronde-leblanc *et al.*, 2005). De plus, le site actif de Rio1 est composé de la séquence STGKEA différente de celle composant le site catalytique de Rio2 (Laronde-Leblanc and Woldawer, 2005). Récemment la structure d'un fragment de 352 acides aminés de RIO1 humaine a été déterminée par cristallographie (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). Comme pour Rio2, sa structure en présence d'ATP montre la présence d'un phospho-aspartate au sein du site actif de RIO1.

C- Du nucléole au cytoplasme: étapes de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique

I- Le nucléole : lieu de synthèse des ARN ribosomiques et des étapes précoces de la maturation de la petite sous-unité ribosomique

Les premières étapes de la formation de la petite sous-unité ribosomique consistent en la transcription des gènes ribosomiques, entraînant la formation du nucléole. Un grand nombre de protéines et de snoRNP vont s'associer au long transcrit primaire naissant, pour former la particule 90S. Le pré-ARNr va alors subir des modifications chimiques ainsi qu'une série de clivage dans le nucléole.

I.1- Structure du nucléole

Le nucléole est le lieu de la transcription de l'ADNr en ARNr, des étapes précoces de maturation des ARNr et de leurs assemblages avec les protéines ribosomiques et un grand nombre de co-facteurs de maturation (Venema and Tollervey, 1999). Le nucléole est aussi le site où se déroulent les modifications chimiques des pré-ARNr, médiées par les snoRNP à boîtes C/D et H/ACA.

Le nucléole est un domaine cellulaire non délimité par une membrane. Son architecture reflète le caractère orienté de la biogenèse des ribosomes. Chez l'Homme, le nucléole se compose de trois sous-domaines visibles par microscopie électronique en transmission (MET). Les centres fibrillaires (FC pour Fibrillar Center) sont entourés du composant fibrillaire dense (DFC pour Dense Fibrillar Component) puis du composant granulaire (GC pour Granular Component) (Thiry *et al.*, 2000) (**Figure 12**). L'emplacement de la transcription de l'ADNr dans le nucléole est controversé. Ce processus se passerait soit dans le FC, soit à l'interface entre le FC et le DFC. Les pré-ARNr naissants migrent dans le DFC où ils subissent des modifications post-transcriptionnelles et des clivages (cf. A.I). Les précurseurs de la petite et de la grande sous-unité migrent alors dans le GC. Ils se dirigent ensuite vers le nucléoplasme, puis seront exportés dans le cytoplasme, où auront lieu les étapes finales de maturation. Chez la levure, il a été proposé que le nucléole soit constitué de

seulement deux sous-compartiments le FC et le GC, l'apparition du GC étant liée à l'augmentation au cours de l'évolution de la taille des séquences intergéniques qui séparent les gènes ribosomiques (**Figure 12**) (Thiry and Lafontaine, 2005).

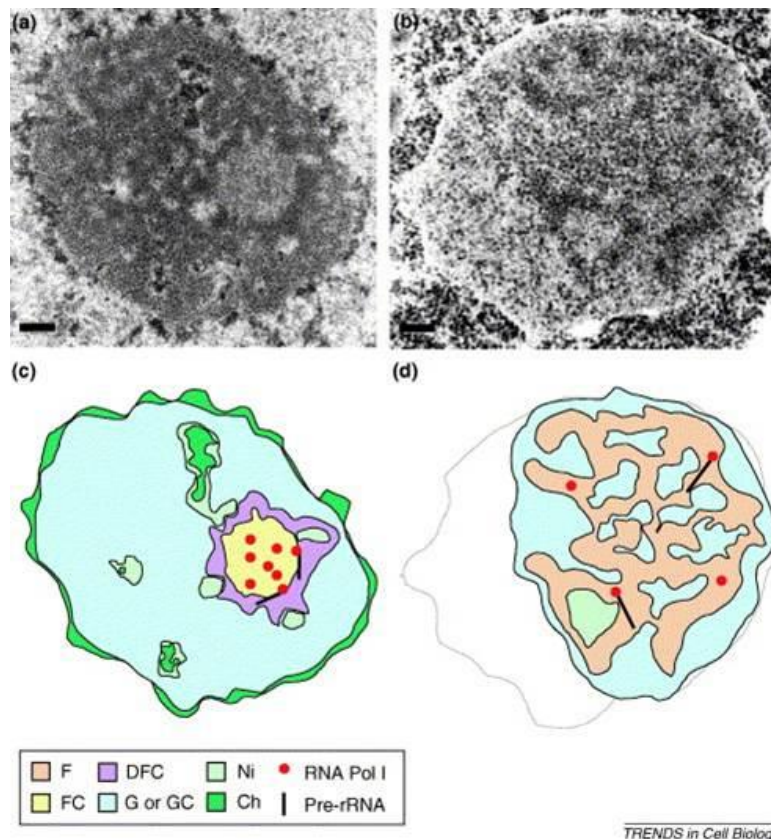


Figure 12: Organisation du nucléole chez l'Homme et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Coupe transversale de cellules observées par MET (a) Nucléole humain (cellule Hep-2), (b) Nucléole de levure, (c,d) schéma du nucléole humain et de levure respectivement. (Lafontaine and Thiry, 2005).

Si pendant des années, le nucléole a été uniquement considéré comme une usine à ribosomes, des études ont montré qu'il possède des fonctions supplémentaires en plus de la biogénèse des ribosomes, comme par exemple, la régulation du cycle cellulaire en réponse à un stress (pour revue Boisvert *et al.*, 2007).

I.2- Le SSU processome

Dans le nucléole, certaines RPS, de nombreux snoRNP et des co-facteurs de maturation vont s'associer co-transcriptionnellement avec le long transcrit primaire pour

former le « SSU (Small Subunit) processome ». Cette particule 90S contient les éléments nécessaires à la maturation précoce de la petite sous-unité ribosomique.

Chez l'Homme et la levure, l'assemblage du "SSU processome" peut être visualisé sous forme de boules terminales présentes sur l'étalement de Miller . Chez la levure, ce complexe de 2.2 MDa se compose d'au moins 72 protéines (Phipps *et al.*, 2011). L'assemblage du SSU processome est hautement hiérarchisé et requiert l'association séquentielle de modules préformés : la snoRNP U3, les sous-complexes UTP-A, UTP-B, UTP-C, Mpp10 et Bms1-Rcl1, ainsi que des protéines individuelles comme Rrp5 et la nucléoline (Phipps *et al.*, 2011). Le complexe UTP-A s'associe en premier au pré-ARNr naissant. L'assemblage de UTP-A et UTP-B est un prérequis pour l'association de la snoRNP U3 au sein du SSU processome (Perez-Hernandez *et al.*, 2007). Par la suite, le module Mpp10 est recruté dans le SSU processome via son interaction avec le snoARN U3 (Henras *et al.*, 2008 ; Perez-Fernandez *et al.*, 2011).

Le snoARN U3 s'apparie avec les séquences du 5'ETS et de l'ARNr 18S ce qui permet d'orchestrer la maturation du pré-ARNr et la régulation de son repliement (Borovjagin and Gerbi, 2004 ; Osheim *et al.*, 2004). Il possède un rôle de chaperon et guide les clivages du précurseur des ARNr aux sites A0, A1 et A2 chez la levure (Phipps *et al.*, 2011). Les protéines Imp3 et Imp4 ainsi que le sous-complexe Mpp10 aident l'interaction base spécifique du snoARN U3 avec la région 5' du pré-ARNr (Granneman *et al.*, 2003 ; Perez-Fernandez *et al.*, 2011).

Le SSU processome est conservé chez les eucaryotes supérieurs. Chez l'Homme, lorsque des protéines formant le UTP-A sont depletées, il ne peut y avoir formation du SSU processome (Turner *et al.*, 2009). Des travaux récents montrent que la présence du complexe UTP-A est nécessaire pour le clivage du 5'-ETS au site A' (Sloan *et al.*, 2013). Les complexes UTP-B et la snoRNP U3 sont importants mais non essentiels pour une coupure efficace à ce site. Les autres composants du « SSU processome » sont impliqués dans des étapes ultérieures au clivage au site A'.

L'absence des protéines constituant le complexe UTP-A, tout comme l'inactivation de la transcription, a pour conséquence l'accumulation d'un intermédiaire du SSU processome : le complexe snoRNP U3 50S. Il est formé uniquement du snoARN U3, de la protéine U3-55K, de la nucléoline, de RRP5 et DBP4 (Turner *et al.*, 2009). La protéine U3-55K est un composant stable de la snoRNP U3. La nucléoline se fixe à l'ARN et jouerait un rôle dans le recrutement de la snoRNP U3 avec le pré-ARNr. De même, RRP5 est impliqué dans

l'association de la snoRNP U3 avec le pré-ARNr. La protéine DBP4 possède une fonction hélicase, qui permettrait de dérouler le pré-ARNr, rendant ainsi certains de ses sites accessibles pour des modifications ou des coupures. La composition de cet intermédiaire du SSU processome semble différente de celui de la levure et des plantes. En effet, chez les plantes, un intermédiaire 50S contenant le snoARN U14 et l'ARN polymérase I a été décrit (Saez-Vasquez *et al.*, 2004). De même, chez la levure, une particule composée d'éléments du « SSU processome » associés à des protéines de l'ARN polymérase I a été observée (Fath 2000). Tandis que chez l'Homme, la snoRNP U3 50S ne comprend ni UBF ni la snoARN U14 (Turner *et al.*, 2009).

II- Le nucléoplasme et l'export nucléaire

Suite au clivage au site A₂/2 dans l'ITS1, le précurseur de la petite sous-unité ribosomique est plus rapidement exporté dans le cytoplasme que celui de la grande sous-unité. En effet, le temps de résidence de la particule pré-40S dans le nucléoplasme est plus court que celui la particule pré-60S (Gleizes *et al.*, 2001). Dans le nucléoplasme, certains co-facteurs de maturation vont s'associer à la particule pré-40S. C'est le cas de Tsr1 et Ltv1, qui sont impliqués dans les étapes de maturation cytoplasmique et l'export des pré-40S (Gelperin *et al.*, 2001 ; Seisser *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données a été confirmé par une étude récente, qui montre que chez la levure, l'association des co-facteurs nucléoplasmiques et l'export de la pré-40S se ferait de façon concomitante et nécessiteraient l'intervention de Rrp12 et l'exportine Crm1 (Morrighi *et al.*, 2014). Chez la levure, le complexe formé par les nucléoporines Nup82-Nup159-Nsp1 (complexe Nup82) est spécifiquement requis pour l'export des particules pré-ribosomiques (Gleizes *et al.*, 2001). Chez la levure en phase exponentielle de croissance, environ 20 particules pré-ribosomiques sont exportées par minute et par pore (Warner, 1999).

II.1- Export des particules pré-40S dans le cytoplasme

II.1.1- Fonction de l'exportine Crm1

L'exportine Crm1 est nécessaire pour l'export des précurseurs des deux sous-unités ribosomiques chez tous les eucaryotes (Thomas and Kutay, 2003).

Le transport Crm1-dépendant requiert l'implication de Ran et de protéines adaptatrices pour fonctionner (cf A.II.1). Chez la levure, les protéines partenaires de Ran/Gsp1 (Rna1/RanGAP, Prp20/RanGEF, Yrb1) sont requises pour l'export de précurseurs des deux sous-unités (Hurt *et al.*, 1999). Ceci est aussi vrai chez les eucaryotes supérieurs. En effet, dans les cellules de hamster, la déplétion de RCC1, l'orthologue de la protéine de levure Prp20, induit un défaut de transport du pré-ARNr des particules pré-60S et pré-40S (Cheng *et al.*, 1995).

La protéine Nmd3 a été identifiée comme un adaptateur de l'exportine Crm1 permettant l'export des particules pré-60S (Gadal *et al.*, 2001). Le site de fixation de Crm1 sur le précurseur de la petite sous-unité n'est pas clairement défini à ce jour. Cependant trois protéines pourraient jouer ce rôle. Il s'agit de Dim2, Rio2 et Ltv1, qui possèdent toutes une séquence NES potentielle (**Figure 13**). La protéine Dim2 semble requise pour le transport des précurseurs de la petite sous-unité. En effet, sa déplétion affecte fortement l'export des particules pré-40S (Vanrobays *et al.*, 2008). Les données obtenues concernant Rio2 s'opposent. Des défauts d'export de la particule pré-40S sont observables chez un mutant thermosensible de Rio2 (Schäfer *et al.*, 2003). Cependant une autre étude montre que cette protéine n'est pas nécessaire pour l'export des pré-40S, mais qu'elle est requise pour la maturation du pré-ARNr 20S : lorsqu'elle est absente, on observe une accumulation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme (Vanrobays *et al.*, 2003). Dans des mutants n'exprimant pas le co-facteur de maturation Ltv1, le taux d'export des précurseurs de la petite sous-unité est réduit (Seiser *et al.*, 2006). Cependant, Ltv1 est une protéine non essentielle et son absence n'affecte qu'en partie le transport des pré-40S. Cette protéine pourrait donc jouer le rôle d'un des adaptateurs (Merwin *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données suggère qu'il y a plusieurs adaptateurs de Crm1 impliqués dans l'export de la particule pré-40S. Ainsi, la déplétion individuelle de chacune de ces protéines ne bloque pas totalement le transport des particules pré-40S. Cependant, on ne peut pas exclure que ces trois protéines jouent un rôle de contrôle qualité. Elles pourraient par

exemple empêcher les particules pré-40S dont la maturation est incomplète dans le noyau de passer dans le cytoplasme, ou être responsable du recyclage d'un co-facteur nécessaire à l'export de la particule pré-40S.

Chez l'Homme, le co-facteur de maturation RIO2 contribue à l'export CRM1-dépendant des particules pré-40S. En effet, lorsque cette protéine est absente ou que son potentiel site de fixation avec CRM1 est muté, on note une accumulation nucléaire des précurseurs de la petite sous-unité et une diminution de la vitesse du transport de ce complexe. Cependant, RIO2 n'est pas strictement requise pour le passage des pré-40S à travers le CPN. Il y aurait donc, comme chez la levure, plusieurs adaptateurs redondants impliqués dans l'export CRM1-dépendant de la particule pré-40S. Le potentiel rôle de LTV1 et DIM2 dans le transport des précurseurs de la petite sous-unité humaine reste à élucider (**Figure 13**) (Zemp *et al.*, 2009).

II.1.2- Autres facteurs d'export nucléaire

De même que Crm1 nécessite l'action du système RanGTP, des données *in vitro* montrent que Rrp12 peut interagir avec les motifs répétés FG des nucléoporines et la GTPase Gsp1/Ran chez la levure (Oeffinger *et al.*, 2004). Rrp12 faciliterait l'export des deux sous-unités ribosomiques, en s'associant aux nucléoporines et à Gsp1 (Oeffinger *et al.*, 2004). Rrp12 intervient de manière coordonnée dans l'export nucléaire de la petite sous-unité et la maturation de la particule 90S (Moriggi *et al.*, 2014). Chez l'Homme, une étude montre que RRP12 est co-exporté avec la particule pré-40S dans le cytoplasme, où il serait par la suite recyclé. Les auteurs suggèrent que ce co-facteur pourrait avoir une fonction dans l'export comme décrit chez la levure (Wyler *et al.*, 2011). Mais son rôle dans le transport des particules pré-40S humaines reste élucider.

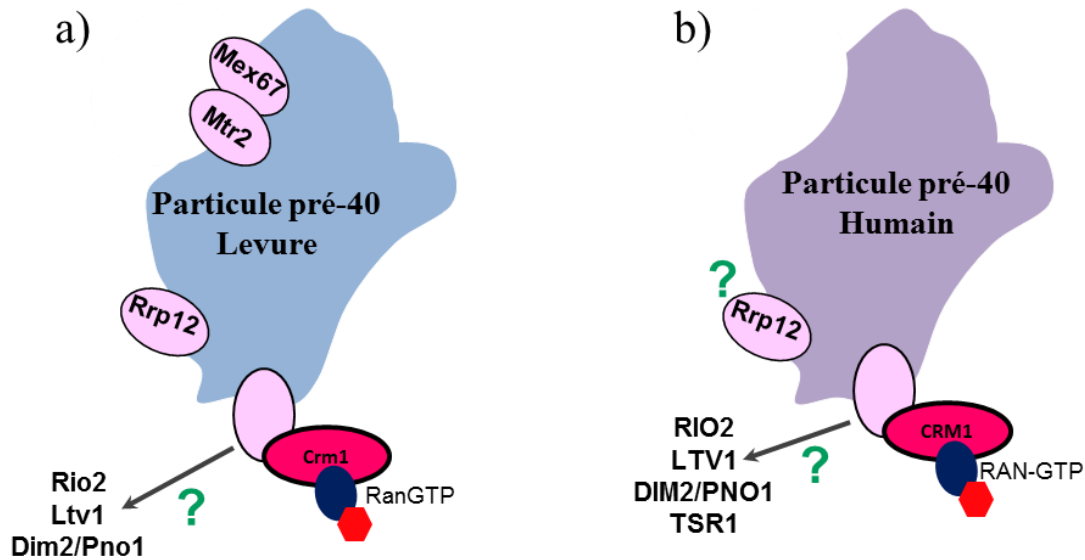


Figure 13: Machinerie d'export des particules pré-40S.
 (a) chez la levure et (b) chez l'Homme.

D'autres facteurs entrent en jeu dans l'export des pré-ribosomes. L'hétérodimère Mex67-Mtr2 a d'abord été décrit pour son implication dans l'export des ARNm et des particules pré-60S (Yao *et al.*, 2007). La surexpression de Mex67-Mtr2 permet de compléter l'absence de Nmd3 et de rétablir l'export des particules pré-60S (Yao *et al.*, 2007). Une étude récente a mis en évidence que le complexe Mex67-Mtr2 est aussi impliqué dans le transport de la particule pré-40S selon le même mode d'action utilisé pour la particule pré-60S (Faza *et al.*, 2012).

II.1.3- Rôle des Rps dans l'export

Chez la levure, une étude montre qu'en absence de Rps15, les particules pré-40S sont retenues dans le noyau. Ainsi, Rps15 serait directement impliquée dans l'export de la particule pré-40S et pas de façon directe dans la maturation des pré-ARNr (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). L'absence des protéines Rps2, Rps3, Rps0 résulte aussi en un défaut de l'export des particules pré-40S (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Une hypothèse serait que lorsque ces RP sont absentes, la particule pré-40S se retrouve bloquée à un stade de maturation et ne peut s'associer aux protéines adaptatrices. L'export de ces particules est alors inhibé de façon indirecte. Chez l'Homme, le rôle central de RPS15 dans l'acquisition de la compétence pour

l'export nucléaire a également été montré (Rouquette *et al.*, 2005). La protéine RPS17 semble aussi être requis dans ce processus (O'Donohue *et al.*, 2010).

III- Etapes de maturation cytoplasmique

III.1- Généralité

Suite à leurs exports dans le cytoplasme, des expériences de purification d'affinité couplées à la spectrométrie de masse ont montré que les particules pré-40S de levure sont stablement associées à sept co-facteurs de maturation : Ltv1, Enp1, Tsr1, Rio2 Dim1, Nob1 et Dim2 (Schäfer *et al.*, 2001 ; Strunk *et al.*, 2011). De plus, à l'exception de Rps10 et Rps26, toutes les RPS sont assemblées sur ce précurseur de la petite sous-unité (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Cette particule pré-40S est constituée du pré-ARNr 20S (Schäfer *et al.*, 2003). La structure de la particule purifiée en étiquetant Rio2 a été déterminée par cryo-MET et analyse d'images à une résolution de 18Å (Strunk *et al.*, 2011).

Afin de produire une particule 40S capable d'exercer sa fonction dans la traduction, la particule pré-40S de levure doit subir les événements suivants :

- la diméthylation du pré-ARNr 20S (par Dim1),
- la libération séquentielle des co-facteurs de maturation,
- le clivage du fragment de l'ITS1 du pré-ARNr 20S pour former l'ARNr 18S mature (par Nob1),
- et l'intégration des protéines ribosomiques Rps26 et Rps10.

Chez la levure, un modèle propose que le clivage du pré-ARNr 20S en ARNr 18S soit réalisé dans une particule pseudo-80S. Cette particule correspondrait à l'association d'une particule pré-40S avec une grande sous-unité ribosomique (Strunk *et al.*, 2012 ; Lebaron *et al.*, 2012). Chez l'Homme, la particule pré-40S cytoplasmique subit les mêmes événements de maturation, à l'exception de la diméthylation du pré-ARNr 18S-E, qui est réalisée dans le noyau. L'interaction de la particule pré-40S avec une particule 60S n'a pas été démontrée jusqu'à présent. Les données actuelles, chez la levure et l'Homme, sur la chronologie de ces événements sont présentées ci-dessous.

III.2- Modèle de la chronologie de la maturation chez la levure

Afin de caractériser la maturation de la petite sous-unité chez la levure, plusieurs approches ont été utilisées. L'étude des effets de déplétion ou de mutation de co-facteurs a fourni des données sur la fonction de ces protéines. Ces approches, combinées aux expériences de protéomique ont été effectuées afin d'étudier la composition de ces précurseurs de la petite sous-unité. La comparaison des résultats obtenus a permis de montrer que les co-facteurs sont séquentiellement relargués des particules pré-40S. Ainsi, les précurseurs cytoplasmiques de la petite sous-unité ont été classifiés en trois types de particules (Strunk *et al.*, 2012 ; Hector *et al.*, 2014) (**Figure 14**):

(1) Les particules pré-40S exportées du noyau sont appelées particules pré-40S précoces. La première étape de la maturation cytoplasmique de ces précurseurs correspondrait à la phosphorylation de Ltv1 et Enp1 par Hrr25. Cette réaction conduit à la libération de Ltv1 de la particule pré-40S, ce qui entraînerait également la dissociation du co-facteur Enp1 (Ghalei *et al.*, 2015). Cette étape permettrait d'une part le recrutement de Rps10, dont le site de fixation est situé à proximité de Ltv1-Enp1 sur le bec de la petite sous-unité ribosomique (Strunk *et al.*, 2011). D'autre part, elle permettrait à Rps3 d'adopter sa conformation « mature » (Holzer *et al.*, 2013 ; et Brigitte Pertschy, données présentées à la conférence EMBO Ribosome Synthesis 2015). Ce remodelage structural serait nécessaire à la poursuite de la maturation de la petite sous-unité ribosomique (Ghalei *et al.*, 2015).

(2) Le relargage de Ltv1 et Enp1 génère une particule pré-40S dite « intermédiaire ». Celle-ci contient les protéines Rps10, Rps3, et les co-facteurs Tsr1, Rio2, Dim1, Dim2 et Nob1 (**Figure 14**). Puis les co-facteurs Tsr1, Rio2 et Dim1 seraient à leur tour recyclés. Les mécanismes de relargage de ces trois co-facteurs sont encore inconnus, mais nécessiteraient l'action de la kinase Rio2 et/ou de Rio1 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2012 ; 2014) (cf ci-avant). La diméthylation du pré-ARNr 20S serait donc réalisée dans l'une de ces deux particules pré-40S, précoce ou intermédiaire.

(3) Le départ de Tsr1, Rio2 et Dim1 donne naissance à une particule pré-40S cytoplasmique dite « tardive ». Celle-ci ne contiendrait que les deux co-facteurs de maturation Dim2 et Nob1. L'incorporation de Rps26 se ferait dans cette particule. En outre, des travaux

soulignent que le pré-ARNr composant des particules pré-40S précoces et intermédiaires est plus flexible que celui des complexes tardifs. Le domaine 3' du pré-ARNr serait restructuré durant les étapes tardives de la maturation. Ce remodelage structural coïncide avec la libération des cofacteurs Rio2, Tsr1, Ltv1 et Enp1 avant l'intervention de Rio1 sur la particule pré-40S. La conclusion de cette étude est que la fonction des cofacteurs associés aux complexes précoces et intermédiaires serait de maintenir la conformation flexible du domaine 3' du pré-ARNr 20S (Hector *et al.*, 2014).

Dans la particule pré-40S tardive a lieu le clivage au site D du pré-ARNr 20S, pour former l'ARNr 18S mature. Un modèle propose que ce clivage ne puisse se faire que lorsque la particule pré-40S est associée à une grande sous-unité, formant ainsi une particule pseudo-80S (**Figure 14**). Cette particule pseudo-80S ne contient pas Ltv1 (Ghalei *et al.*, 2015).

L'association de la particule pré-40S à la 60S est favorisée par le facteur d'initiation eIF5B/Fun12. Celui-ci est connu pour permettre l'association des deux sous-unités ribosomiques lors de l'initiation de la traduction (Pestova *et al.*, 2000). De plus, il a été identifié comme un co-facteur impliqué dans la biogenèse de la petite sous-unité. En effet, la déplétion de cette protéine a pour conséquence une accumulation du pré-ARNr 20S (Li *et al.*, 2009). Par ailleurs, la mutation de Rpl3, une protéine ribosomique de la grande sous-unité, résulte en l'accumulation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme. Le facteur eIF5B/Fun12 se fixe aux particules pré-ribosomiques contenant Rpl3 mutée, mais son activité GTPase est inhibée dans ces conditions. Cette étude suggère que l'association de Rpl3 avec la grande sous-unité ribosomique est importante pour la fonction d'eIF5B/Fun12 dans le clivage du pré-ARNr 20S, ayant lieu dans une particule pseudo-80S (Garcia Gomez *et al.*, 2014). D'autres équipes sont parvenues aux mêmes conclusions concernant le rôle d'eIF5B/Fun12 dans le clivage du pré-ARNr 20S. En effet, le modèle défendu par l'équipe de D. Tollervey suggère que l'hydrolyse du GTP médiée par eIF5B/Fun12 serait à l'origine d'un changement structural de la particule pré-40S. Ceci entraînerait le repositionnement de Nob1, qui pourrait alors exercer sa fonction (Lebaron *et al.*, 2012).

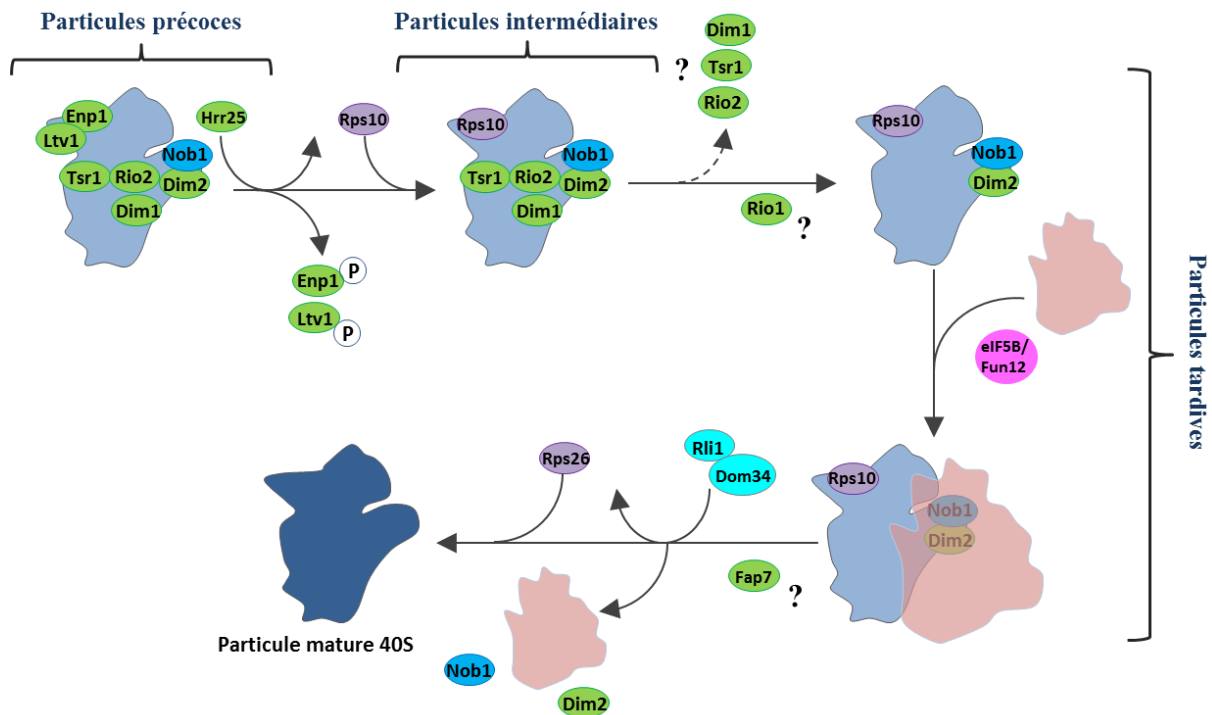


Figure 14: Modèle de maturation cytoplasmique de la particule pré-40S chez la levure.

La particule 40S en cours de formation est indiquée en bleu clair, la grande sous-unité ribosomique en rose, les protéines ribosomiques en violet. Les co-facteurs de maturation 40S sont montrés en vert, en bleu pour l'endonucléase Nob1, en rose pour le co-facteur impliqué dans l'association de la particule pré-40S avec la particule 60S, et en cyan pour les co-facteurs permettant la dissociation de la particule pré-40S de la grande sous-unité (Adapté de Hector *et al.*, 2014 et De La Cruz *et al.*, 2015)

La particule pseudo-80S formée au cours de la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité n'est pas compétente pour l'initiation de la traduction. En effet, les cofacteurs de maturation associés aux précurseurs de la petite sous-unité empêchent le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction (Strunk *et al.*, 2011). Elle ne contient pas d'ARN de transfert (ARNt) notamment (Strunk *et al.*, 2012). Dans le modèle proposé, la formation de la particule pseudo-80S permettrait de contrôler que l'endonucléase Nob1 clive le pré-ARNr 20S seulement dans un précurseur de la petite sous-unité capable d'adopter une conformation compétente pour la traduction. Le cycle de pseudo-traduction permettrait de vérifier que la maturation de la particule pré-40S a été effectuée de façon correcte. Durant cette étape, différents critères seraient testés, notamment la capacité de la particule à interagir avec la grande sous-unité. Il s'agirait donc d'un cycle de contrôle qualité.

Cependant, ce modèle reste encore à étayer. En effet, au vu de la position des co-facteurs Dim1, Dim2 et Tsr1 sur la particule pré-40S cytoplasmique, l'équipe de K. Karbstein conclut que ces protéines empêchent l'association du précurseur de la petite sous-unité avec la grande sous-unité. Cependant, ces co-facteurs seraient associés aux particules pseudo-80S.

Ceci suggère que les conformations de la particule pré-40S et 60S dans la particule pseudo-80S seraient différentes comparées au ribosome mature. Pour tenter de réconcilier ces deux faits, K. Karbstein propose que la particule pré-40S puisse adopter différentes conformations en association avec la grande sous-unité (Karbstein, 2013). De plus, la forte présence de ces particules pseudo-80S a été observée lorsqu'une protéine impliquée dans la maturation de la petite sous-unité était mutée ou déplétée. Dans ces conditions, les particules pré-40S s'accumulent dans le cytoplasme et ont statistiquement plus de chance de rencontrer une grande sous-unité. Il est donc possible que la particule pseudo-80S soit le reflet d'une association stochastique de la particule pré-40S à une sous-unité 60S. En conditions de mutation, ces particules pseudo-80S pourraient correspondre à des ribosomes aberrants, peut-être capables d'initier la traduction (cf ci-dessous), mais incapables d'élongation.

- Lien avec l'initiation de la traduction

Une étude montre un lien possible entre la dernière étape de la formation de la petite sous-unité et l'initiation de la traduction. Le facteur eIF3j/Hcr1 est associé au complexe eIF3 qui est notamment impliqué dans l'association du complexe ternaire (composé de l'ARN de transfert d'initiation associé à la méthionine, et d'eIF2-GTP) avec la petite sous-unité ribosomique pour former le complexe de pré-initiation 43S. Dans un mutant Hcr1 Δ , on observe une accumulation du pré-ARNr 20S, synonyme d'un défaut de maturation de l'ARNr 18S (Valasek *et al.*, 2001). Ce facteur est donc requis pour le clivage du pré-ARNr 20S en ARNr 18S mature avant d'exercer son rôle dans la traduction (Valasek *et al.*, 2001). De plus en absence de Rio1, les particules pré-40S contenant le pré-ARNr 20S sont retrouvées dans des polysomes et des particules pseudo-80S contenant ou pas l'ARNm. Ces particules sont donc capables d'initier la traduction même si leur maturation n'est pas complète (Soudet *et al.*, 2010).

III.3- Etat des connaissances chez l'Homme

Chez l'Homme, l'utilisation de la purification d'affinité en tandem couplée à la spectrométrie de masse a permis d'étudier la composition des précurseurs de la petite sous-unité à différents stades de maturation (Wyler *et al.*, 2011). De plus, les études sur la conséquence des mutations ou de déplétions dans des co-facteurs de maturation par exemple RIO1 ou RIO2 ont permis d'obtenir des données sur la chronologie de maturation de la petite sous-unité. Ainsi, deux stades de maturation dans le cytoplasme ont pu être définis à ce jour (**Figure 15**) :

(1) juste après son export nucléaire, la particule pré-40S dite « intermédiaire » est composée du pré-ARNr 18S-E, de la majorité des RPS et des co-facteurs de maturation RIO2, NOB1, DIM2, TSR1, LTV1, ENP1.

(2) suite à l'action des kinases CK1 δ et CK1 ϵ , RIO2 et RIO1 (cf. ci-après), quatre des co-facteurs ci-dessus se dissocient pour donner lieu à une particule pré-40S dite « tardive » (Zemp *et al.*, 2009 ; Widmann *et al.*, 2012 ; Zemp *et al.*, 2014). Cette particule n'est stablement associée qu'aux co-facteurs NOB1 et DIM2. Lorsque l'activité kinase de RIO1 est supprimée par une mutation ponctuelle, cette protéine mutée est alors stablement associée à la particule pré-40S tardive (Widmann *et al.*, 2012). Comme chez la levure, le clivage au site 3 du pré-ARNr 18S-E est réalisé par NOB1 à ce stade de maturation cytoplasmique tardif. Cependant, jusqu'à présent, l'existence de la particule pseudo-80S n'a pas été prouvée chez l'Homme.

La comparaison entre les modes d'action de RIO1, RIO2 et CK1 δ/ϵ ne permet pas d'établir un modèle clair de la chronologie de formation de la petite sous-unité. Leurs fonctions ne sont pas interchangeables. L'activité de l'une pourrait être nécessaire pour l'action de l'autre. En effet, l'absence d'une seule de ces kinases est à l'origine d'un défaut de maturation cytoplasmique des précurseurs de la petite sous-unité.

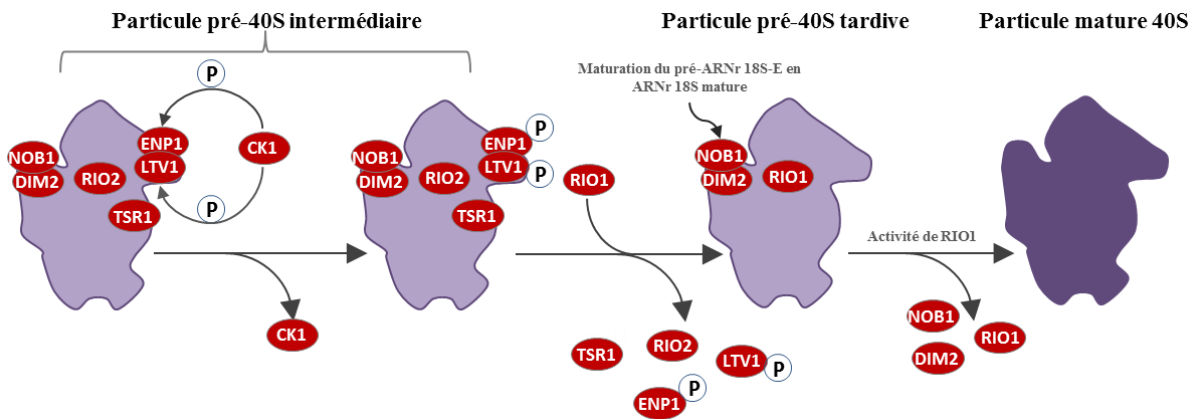


Figure 15: Modèle hypothétique de l'implication des kinases CK1, RIO2 et RIO1 dans les étapes cytoplasmique de la maturation de la petite sous-unité ribosomique chez l'Homme.

CK1 phosphoryle LTV1 et ENP1 entraînant leurs décrochages. Les kinases RIO2 et RIO1 sont nécessaires à la libération de co-facteurs de maturation de la particule pré-40S. (Figure adaptée de la thèse de Franziska Wandrey)

Ainsi, on dispose d'un nombre croissant de données moléculaires et fonctionnelles permettant de proposer des hypothèses sur la fonction des co-facteurs dans la biogenèse des ribosomes. Néanmoins, ce travail se heurte à un déficit de données structurales sur les particules pré-ribosomiques, concernant la localisation, l'interaction des co-facteurs au sein de la particule et les changements conformationnels de la particule pré-40S en formation. Dans cette perspective, j'ai entrepris une étude structurale de la formation de la petite sous-unité chez l'Homme par cryo-MET et analyse d'images (cf. partie E).

D- Apport de la microscopie électronique en transmission dans l'étude du ribosome et de sa formation

I- Structures de ribosomes matures

L'étude structurale de complexes biologiques a fortement évolué depuis l'élaboration du premier microscope électronique en 1931. Le ribosome a été utilisé comme « complexe modèle » pour développer les algorithmes d'analyse d'images. Ils furent tout d'abord observés après coloration négative, dans un état déshydraté, enveloppés dans une solution d'atomes lourds. Grâce à cette approche, la forme globale du ribosome mature et des deux sous-unités ont été déduites. Les domaines caractéristiques de la petite sous-unité 40S (la tête, le bec, la plateforme et le corps) ont alors pu être identifiés, tout comme ceux de la grande sous-unité (Lake *et al.*, 1974 ; Vasiliev 1974). En parallèle, les protéines ribosomiques ont été positionnées sur le ribosome bactérien grâce à l'observation de ce complexe décoré par des anticorps dirigés contre les RP (Wabl, 1974 ; Lake and Kahan, 1975). Ces études ont permis le début de la mise en relation entre les analyses biochimiques sur la fonction des protéines ribosomiques et leur localisation dans le ribosome.

Dans les années 80, Jacques Dubochet et ses collaborateurs ont développé la technique de cryo-MET (Dubochet *et al.*, 1988). Pour cela, les particules biologiques sont congelées ultra-rapidement dans de la glace vitreuse, et sont ainsi visualisées dans un état quasi-natif. La combinaison de cette technique avec le développement d'algorithme d'analyse d'images permettant le calcul de reconstructions 3D est à l'origine de grandes avancées dans l'étude structurale de complexes biologiques macromoléculaires (virus et ribosomes). Le principe de l'analyse d'images repose sur le fait que l'image d'un objet 3D est une projection 2D de cet objet. En combinant différentes vues d'un même objet, il est possible de calculer une reconstruction tridimensionnelle de cet objet. La structure du ribosome a été déterminé à environ 40Å de résolution durant le début des années 90, pour atteindre une résolution proche de 10Å à la fin du vingtième siècle (Frank *et al.*, 1991 ; Stark *et al.*, 1995 ; Malhotra *et al.*, 1998 ; Gabashvili *et al.*, 2000). Ces structures de cryo-MET à moyenne/basse résolution ont joué un rôle important dans la compréhension des processus de traduction. En effet, au cours des dix dernières années, des structures de ribosome entiers ou associés à des composants clés comme l'ARN messager (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) impliqués dans la traduction

ont été déterminées (Spahn *et al.*, 2001 ; Chandramouli *et al.*, 2008 ; Armache *et al.*, 2010). Si les structures ayant une résolution autour de 10Å ont été très utiles pour positionner les sites de fixation des ligands sur le ribosome, elles ne permettent pas de visualiser avec précision l'agencement des différentes molécules constituant le ribosome.

En parallèle, dans les années 80, les premiers cristaux de la grande et de la petite sous-unité ribosomiques procaryotes ont été obtenus (Yonath *et al.*, 1980 ; 1982 ; Trakhanov *et al.*, 1987;1989 ; Yusupova *et al.*, 1991). L'amélioration des sources de rayonnement X (synchrotrons) a permis la détermination des structures 3D de la petite et de la grande sous-unité ribosomique, à des résolutions quasi-atomiques, environ vingt ans après l'obtention des premiers cristaux (Schluenzen *et al.*, 2000 ; Wimberly *et al.*, 2000 ; Ban *et al.*, 1998; Ban *et al.*, 1999; Ban *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001). Ces structures permirent de faciliter l'interprétation des structures basse résolution du ribosome dans différents états fonctionnels obtenus précédemment par MET et cristallographie. En 2009, Ada Yonath, Thomas Steitz et Venkatraman Ramakrishnan recevront le prix Nobel de chimie pour leurs études sur la structure du ribosome bactérien ainsi que sur son mode de fonctionnement. Un an plus tard, la structure 3D du ribosome eucaryote est déterminée par cristallographie à 4.15Å de résolution (Ben Shem *et al.*, 2010). Puis en 2011, la structure de ce complexe a été obtenue à 3Å de résolution. Ceci a fourni une description complète des 79 protéines et plus de 5500 bases de l'ARNr qui composent ce ribosome (Ben Shem *et al.*, 2011). Ces études ont notamment permis de comprendre le processus de décodage de l'ARNm et de souligner la forte conservation des régions importantes du ribosome entre les différents organismes étudiés (Melnikov *et al.*, 2012).

Très récemment, la cryo-MET structurale a connu une révolution grâce au développement d'une nouvelle génération de détecteurs directs d'électrons, ainsi que l'amélioration des algorithmes d'analyse d'images et capacités de calcul des ordinateurs. On est maintenant capable de calculer des structures à des résolutions quasi-atomiques, rivalisant avec les résolutions obtenues par cristallographie aux rayons X (Bai *et al.*, 2013 ; Khatter *et al.*, 2015). Les hélices d'ARNr ainsi que les structures de protéines sont facilement distinguables. Le degré de définition de ces reconstructions 3D permet d'ajuster les structures atomiques connues avec une précision de 3Å ou de reconstituer des structures atomiques *ab initio*.

Les nouveaux détecteurs ne requièrent pas d'étape de conversion d'électrons en photons et détectent directement les électrons, ce qui permet d'améliorer fortement le rapport signal sur bruit des images acquises (Milazzo *et al.*, 2005 ; Faruqi *et al.*, 2011). De plus ces détecteurs ont deux modes d'acquisition d'images : le mode « conventionnel » où une image est acquise durant un temps t , et un mode « movie » pour lequel, durant ce même temps t , une pile d'images de la même zone est acquise. Les radiations du faisceau d'électron entraînant des mouvements des complexes observés, ce mode « movie » permet d'aligner puis de sommer la pile d'images, ce qui permet d'augmenter la résolution de l'image moyennée (Brilot *et al.*, 2012 ; Campbell *et al.*, 2012).

La plupart des complexes moléculaires biologiques possèdent une certaine hétérogénéité compositionnelle et conformationnelle. Si les projections de ces différentes structures ne sont pas classifiées en des sous-groupes homogènes, leurs combinaisons sont à l'origine d'une reconstruction 3D consensus bruitée. Le développement d'algorithmes basés sur les statistiques bayésiennes et le principe de maximum de ressemblance permet d'appliquer la classification 3D non supervisée à l'analyse d'images et d'accéder au tri de l'hétérogénéité structurale de l'échantillon (Scheres, 2012).

La combinaison de ces deux développements a permis de déterminer la structure du ribosome mature de *Tetrahymena thermophila* à 4Å de résolution, à partir de seulement 35 000 particules analysées. Dans cette structure, la densité électronique des chaînes latérales de certains acides aminés était observable (Bai *et al.*, 2013). De plus, avec une résolution autour de 3Å, les petites molécules comme des inhibiteurs peuvent être localisés sur les cartes de densité électronique obtenues par cryo-MET. En effet, au cours de l'année 2013, la structure de ribosome de *Plasmodium falciparum* en complexe avec une drogue a été calculée avec une résolution de 3.2Å. La position ainsi que l'orientation de la drogue a pu alors être déterminée. Ceci a permis d'obtenir des détails moléculaires sur le mode d'action de l'inhibition de la traduction chez les eucaryotes.

L'accès à l'hétérogénéité structurale représente une grande avancée dans le domaine, elle permet non seulement d'améliorer les résolutions des structures calculées mais aussi d'étudier des phénomènes dynamiques. L'étude de la structure du ribosome 80S associé au facteur d'initiation eIF5B illustre ce progrès. L'état structural d'intérêt ne représentait que 3% des images de particules acquises. Grâce à la classification non supervisée basée sur les statistiques bayésienne, la structure 3D du ribosome de levure lié à eIF5B a été calculée à 6Å de résolution à partir de 5 000 particules (Fernandez *et al.*, 2013).

Ces dernières années, l'étude de la structure du ribosome humain a extrêmement progressé. En 2013, la carte de densité électronique obtenue par cryo-MET à une résolution d'environ 6Å, la prédiction de structures secondaires des segments d'extensions de l'ARNr ainsi que la structure cristallographique du ribosome de *Tetrahymena thermophila* ont été utilisées par l'équipe de Roland Beckmann, pour proposer un modèle atomique du ribosome mature humain (Anger *et al.*, 2013). Puis, au cours de l'année 2014, l'équipe dirigée par Bruno Klaholz a réussi à obtenir les premiers cristaux de ribosomes humains (Khatte *et al.*, 2014). Si la structure du ribosome humain n'a pas encore été résolue par cristallographie aux rayons X, cette même équipe l'a déterminé par cryo-MET, à une résolution allant de 2,9Å pour les régions les plus stables à 6Å pour les régions les plus mobiles. Grâce à cette résolution, ils ont pu reconstruire un modèle à partir de la carte de densité électronique. Ceci a permis de révéler des détails sur les contacts inter-sous-unité et sur des régions clés comme le centre peptidyl-transférase (PTC) et la région du décodage notamment (Khatte *et al.*, 2015). Cette structure du ribosome humain à une résolution quasi-atomique pourrait être utilisée dans des approches de drug design et dynamique moléculaire pour la conception de nouveaux médicaments. L'intérêt serait notamment de réduire les effets secondaires des antibiotiques actuels en améliorant leurs spécificités.

II- Structure de particules pré-ribosomiques

La MET couplée à l'analyse d'images constitue donc une méthodologie de choix pour l'étude de complexes macromoléculaires présentant une hétérogénéité structurale. Cette technique a aussi permis de grandes avancées dans l'étude de la maturation des particules pré-ribosomiques. En effet, chez les procaryotes, cette approche couplée avec la spectrométrie de masse a permis de déterminer la structure 3D de 14 intermédiaires de maturation de la petite sous-unité 30S reconstituée *in vitro*. Ceci a montré que le corps et la plateforme de ce complexe se forment avant que le domaine de la tête ne soit assemblé (Mulder *et al.*, 2010) (**Figure 16**).

Une étude plus récente utilisant également la cryo-MET 3D a permis de disséquer l'assemblage de la petite sous-unité 30S *in vivo*. Cinq conformations différentes de la particule pré-30S ont pu être identifiées en l'absence du co-facteur RimM, ce qui souligne l'implication de cette protéine dans la formation de la tête de la particule et la stabilisation de la structure tertiaire de l'ARNr (Guo *et al.*, 2012).

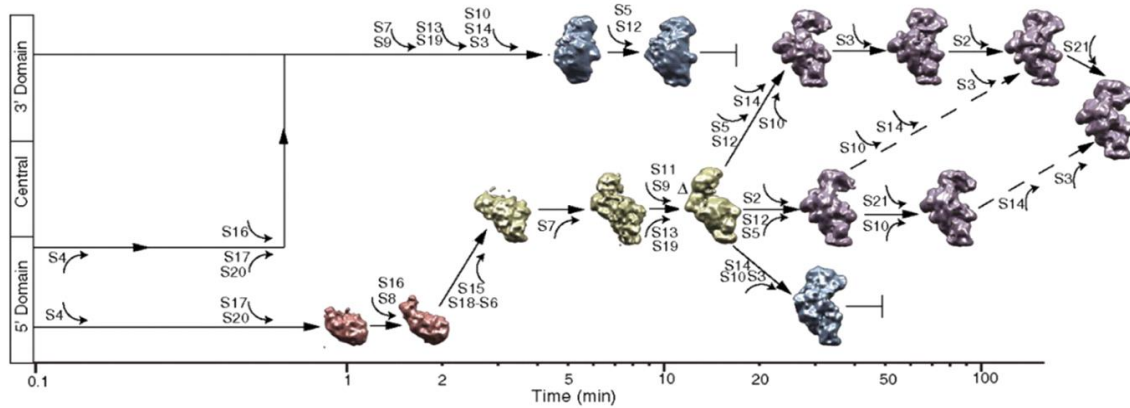


Figure 16: Voies parallèles et assemblage séquentiel de la petite sous-unité chez les procaryotes, in vitro. (D'après Mulder *et al.*, 2010)

En parallèle, l'étude structurale de la biogenèse des ribosomes chez la levure a aussi fortement progressé ces dernières années. En effet, la reconstruction 3D d'une particule pré-60S reconstituée correspondant à l'interaction entre le complexe 60S et Arx1, Rei1 et Jij1 a été calculée à une résolution de 8.1Å (Greber *et al.*, 2012). Les protéines Rei1 et Jij1 impliquées dans le recyclage d'Arx1 interagissent avec le complexe 60S à proximité d'Arx1 et forment un réseau d'interaction (**Figure 17**).

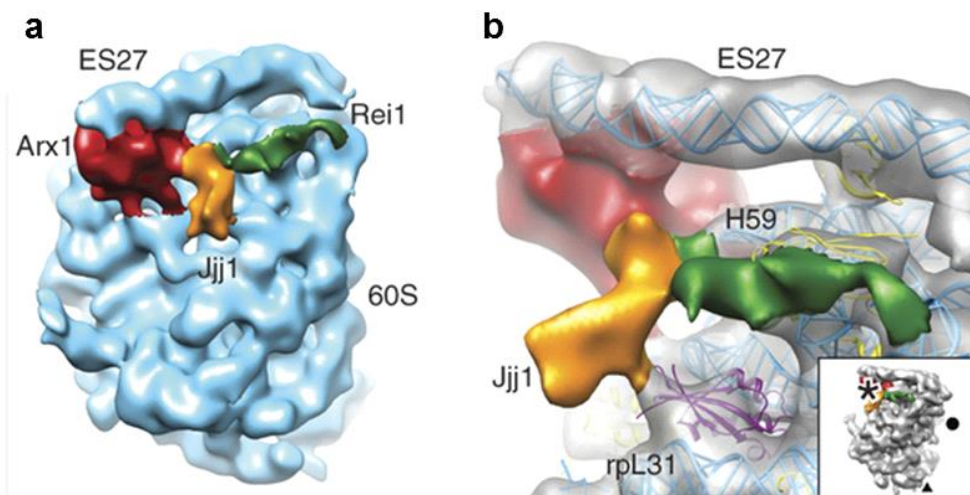


Figure 17: Visualisation du réseau d'interaction formé par les co-facteurs Arx1, Jij1 et Rei1. (a) Structure de la particule pré-60S reconstituée. Les co-facteurs Arx1, Jij1 et Rei1 sont indiqués en rouge, orange et vert respectivement. (b) Jij1 interagit avec Arx1 et Rei1 et est aussi en contact avec Rpl31 indiquée en violet (d'après Greber *et al.*, 2012).

De plus, un précurseur de la grande sous-unité ribosomique a été purifié en utilisant le co-facteur Arx1 comme appât. La structure de cette particule pré-60S a été déterminée par cryo-MET à une résolution de 11.9Å (Bradatsch *et al.*, 2012). Ces travaux ont montré qu'Arx1 se fixe au niveau de sortie de tunnel en contact direct avec le segment d'expansion

ES27. Cette particule contient, en plus d'Arx1, d'autres co-facteurs de maturation, ceux-ci empêcheraient le recrutement prématuré des facteurs associés au ribosome au cours de la traduction. Des hypothèses sur la position de ces co-facteurs ont été émises (**Figure 18**).

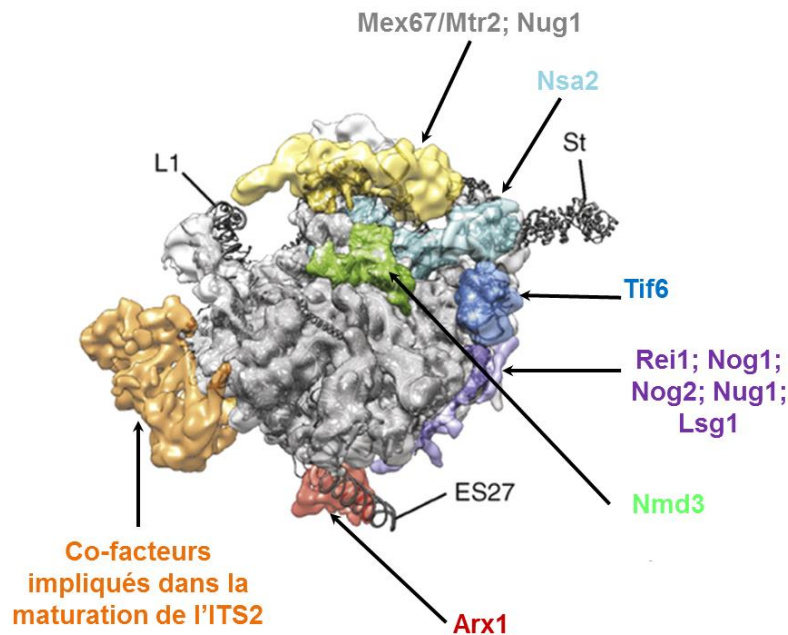


Figure 18: Visualisation de co-facteurs de maturation sur un précurseur de la grande sous-unité chez la levure. Ajustement de la structure cristallographique de la particule 60S mature dans la structure de la particule pré-60S purifiée via Arx1 obtenu par cryo-MET. Les densités supplémentaires correspondantes à ces protéines sont indiquées en jaune ; cyan ; bleu, vert, violet, orange et rouge. La position potentielle de certains co-facteurs est montrée par une flèche (Adaptée de Bradatsch et al., 2012)

Plus récemment, la structure 3D de cette même particule pré-60S a été déterminée à une résolution de 8,7 Å (Leidig et al., 2014). Il s'agit, à ce jour, de la meilleure résolution obtenue pour une reconstruction 3D de particule pré-ribosomiques chez les eucaryotes. Le positionnement sur le complexe pré-60S de protéines ribosomiques : Rpl7, Rpl24 et des co-facteurs de maturation Mrt4, Nog1, Rsa4 et Arx1 ainsi que du facteur d'initiation eIF6, a été déterminé sans ambiguïté. Ces travaux ont de plus montré que la position du sous-complexe composé par l'ARNr 5S, Rpl5 et Rpl11 ne possède pas la même position dans la particule pré-60S comparé à la grande sous-unité. Celle-ci subit une rotation d'environ 180 degrés dans la particule pré-60S. Cette position non mature est accompagnée d'un réarrangement complet des hélices (82 à 88) d'ARNr formant la protubérance centrale ainsi que de l'hélice 38 (**Figure 19**). Ceci permettrait de rendre des sites de fixation accessibles à certains co-facteurs impliqués dans la maturation des précurseurs de la grande sous-unité. Par ailleurs, une étude structurale montre que la snoRNP 5S (constituée de l'ARNr 5S, des protéines Rpl5 et Rpl11)

est recrutée sur la particule pré-60S via le complexe Rpf2-Rrs1. De plus, ces travaux confirment que la snoRNP 5S ne possède pas sa position finale dans la particule pré-60S lors de son incorporation (Madru *et al.*, 2015).

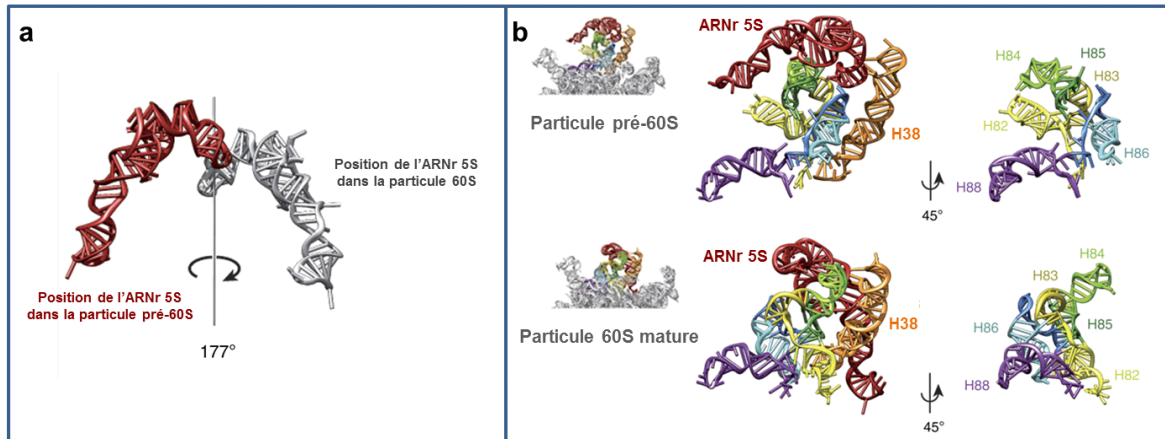


Figure 19: Différences structurales entre la grande sous-unité mature et la particule pré-60S. (a) Comparaison de la position de l'ARNr 5S dans la particule mature 60S (en gris) et dans la particule pré-60S (en rouge). (b) Visualisation de l'hélice 38 (en orange) et des hélices (82-88) de l'ARNr formant la protubérance centrale dans la particule mature et en cours de formation (adaptée de Leidig *et al.*, 2014).

Concernant la petite sous-unité ribosomique, la reconstruction 3D d'un précurseur cytoplasmique intermédiaire de la petite sous-unité à un stade de maturation tardif a été calculée à 18Å de résolution. Cette analyse structurale indique que la localisation des co-facteurs sur ce complexe empêche l'entrée en traduction des particules non matures (**Figure 20**) (Strunk *et al.*, 2011). La résolution obtenue pour cette structure 3D est plus faible que celle obtenue pour les reconstructions 3D des précurseurs de la grande sous-unité. Ceci pourrait notamment s'expliquer par la grande flexibilité de la petite sous-unité ribosomique (cf. discussion).

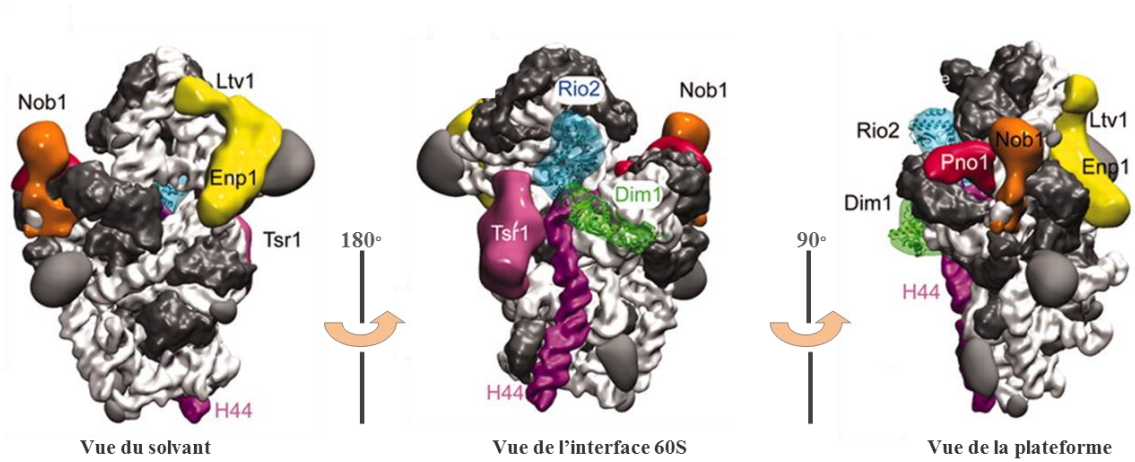


Figure 20: Position des sept co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S cytoplasmique de levure. Les sites de fixation de facteur d'initiation sont masqués par la présence de co-facteurs de maturation. (d'après Strunk et al., 2011).

Chez l'Homme, la purification des particules pré-ribosomiques a longtemps constitué un obstacle majeur à leur études par MET. Ainsi aucune structure 3D, que ce soit de complexes pré-60S ou pré-40S n'a pu être résolue jusqu'à présent chez l'humain.

E- Problématique et objectifs de la thèse

La biogenèse des ribosomes est un processus très complexe qui a été principalement étudiée chez la levure. Au cours des dernières années, les connaissances sur la maturation de la petite sous-unité, chez cet organisme, ont fortement progressé avec l'établissement d'un modèle des étapes de maturation cytoplasmiques de la particule pré-40S, ainsi que la résolution de la structure 3D d'un précurseur cytoplasmique précoce. Récemment, des études de la synthèse des ribosomes chez l'Homme ont montré que malgré le fait que ce mécanisme soit globalement conservé chez les eucaryotes, il existe des divergences entre la levure et l'Homme. En effet, la maturation de l'ARNr 18S est plus complexe chez les eucaryotes supérieurs et certains co-facteurs interviennent à des étapes de maturation qui sont différentes entre ces deux organismes.

Des défauts de la biogenèse des ribosomes ont été récemment associés à une liste croissante de maladies génétiques humaines, appelées ribosomopathies. Au vu des différences entre l'Homme et la levure, il est crucial d'étudier plus spécifiquement la biogenèse des ribosomes chez l'Homme. L'obtention récente de la structure du ribosome mature humain déterminée par cryo-MET a fourni une image de ces particules matures à l'échelle quasi-atomique (Anger *et al.*, 2013 ; Khatter *et al.*, 2015). Cependant les mécanismes structuraux qui sous-tendent l'assemblage des particules pré-ribosomiques restent à définir. Des études ont permis de décrire le rôle de certains co-facteurs dans la maturation de la petite sous-unité du point de vue moléculaire. Cependant, l'absence de données structurales représente un obstacle majeur à la compréhension de la formation des sous-unités ribosomiques.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette perspective. Cette étude vise à mieux comprendre la maturation de la petite sous-unité chez l'Homme. Il s'agit de déterminer la structure 3D de particules pré-40S humaines à différentes étapes de leur maturation cytoplasmique, et ce à la plus haute résolution possible. La comparaison des différentes structures obtenues entre elles et avec la structure de la petite sous-unité mature devrait mettre en évidence les remodelages structuraux que subissent les précurseurs de la petite sous-unité au cours de leurs maturations cytoplasmiques. De même, la comparaison de ces structures avec celle obtenue chez la levure permettra de souligner de potentielles divergences de la formation de la petite sous-unité entre ces organismes. La purification des particules pré-ribosomiques constituant une difficulté, une collaboration internationale a été mise en place

avec l'équipe d'Ulrike Kutay (ETH Zurich). Cette équipe a mis au point un protocole efficace pour purifier des particules pré-40S à différentes étapes de maturation en utilisant comme appât des co-facteurs étiquetés dans la lignée humaine HEK 293.

Le premier objectif de ma thèse a été de mettre en place au laboratoire une stratégie d'analyse structurale « haute performance », basée sur la cryo-MET couplée à l'analyse d'images de particules isolées. Grâce à cette approche, le deuxième objectif de mes travaux a été de déterminer la structure de particules pré-40S purifiées à différentes étapes de maturation cytoplasmique. Tout d'abord, je me suis attachée à déterminer la structure 3D d'une particule pré-40S purifiée grâce à l'étiquetage de la protéine LTV1 à un stade de maturation cytoplasmique intermédiaire, juste après son export dans le cytoplasme. La comparaison de cette structure avec celle de la sous-unité mature, montre la présence de co-facteurs de maturation, et révèle également la présence inattendue de la protéine RACK1. Ensuite, j'ai déterminé la structure 3D d'une particule pré-40S bloquée au stade tardif de sa maturation par l'incorporation d'un mutant inactif de RIO1, juste avant le clivage du pré-ARNr 18S-E par NOB1.

J'ai ainsi déterminé les premières structures 3D de particules pré-40S humaines. La comparaison de ces reconstructions 3D entre elles, et avec la structure de la petite sous-unité mature, me permet de proposer un modèle de morphogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine au cours de sa maturation cytoplasmique.

Matériels et méthodes

A- Purification des particules pré-40S humaines

Les particules pré-40S ont été purifiées par Christian Montellese, doctorant dans l'équipe du Pr. Ulrike Kutay (ETH Zurich). Le protocole établi par Wyler *et al.*, 2011 a été utilisé pour isoler les précurseurs de la petite sous-unité en utilisant différents cofacteurs étiquetés par St-HA comme appâts à partir de cellules humaines HEK 293. L'étiquette St-HA se compose de l'épitope de l'hémagglutinine et du peptide de fixation à la streptavidine. L'expression de la protéine étiquetée est induite par ajout de la tétracycline. Les co-facteurs utilisés comme appât pour purifier les différentes particules pré-40S sont ENP1 étiqueté en son extrémité C-terminale et C21ORF70, DIM2, LTV1 et RIO(Kd) étiquetés en leurs extrémités N-terminale. La méthode utilisée est la purification d'affinité. Tous les échantillons seront dilués dans du tampon composé de 10mM de Tris HCl pH 7,5 ; 100mM KCl, 2mM MgCl₂, et 1 mM DTT à l'exception de particules purifiées en étiquetant RIO1(Kd) (traitées avec 0.1% de glutaraldéhyde pendant 10 minutes sur la glace, la réaction est stoppée par ajout de 20mM de glycine) diluées dans un tampon composé de 10mM Hepes ; 100mM KCl, 2mM MgCl₂. Dans la suite du manuscrit de thèse, les particules pré-40S étudiées seront appelées par le nom du co-facteur utilisé comme appât pour les purifier.

B- Immuno-localisation de co-facteurs sur la particule pré-40S LTV1

Cette approche consiste à incuber les particules pré-40S avec des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt, puis à observer les particules décorées avec les anticorps après coloration négative. La localisation de l'anticorps sur la particule permet de déterminer la région globale de l'interaction de la protéine étudiée sur la particule pré-40S. Pour cela, les différents anticorps à une concentration de 5 ou 10 ng.μl⁻¹ ont été préalablement observés après coloration négative (cf protocole ci-dessous) afin de vérifier leur compatibilité avec la MET.

Les particules pré-40S LTV1 sont incubées avec les anticorps dirigés contre la protéine à localiser durant 20 minutes sur glace (**Tableau 1** concentrations des échantillons utilisées). Cette préparation est ensuite observée après coloration négative par MET (cf paragraphe B.III.2.3) .

	Particule LTV1 seule	Anticorps α ENP1 seul	Particule + Anticorps
Particule LTV1	20 ng. μ l-1	-	20 ng. μ l-1
Anticorps α ENP1	-	10 ng. μ l-1	5.10 ng. μ l-1

Tableau 1: Concentration utilisée pour les expériences d'immuno-localisation d'ENP1

C- Microscopie électronique à transmission

I- Grilles de microscopie électronique

Les grilles utilisées pour la coloration négative doivent être recouvertes d'un matériau jouant le rôle de support sur lequel sera déposé l'échantillon. Des grilles en cuivre recouvertes d'un film de carbone, continu et uniforme ont été utilisées pour cette étude (QUANTIFIOL[®] CF300-Cu 300 mesh).

Pour la cryo-MET, des grilles portant un film de carbone troué («grilles à trous») ont été utilisées. Ces trous sont calibrés et disposés de façon régulière sur la grille. Ceci permet l'automatisation de l'acquisition des images. Les grilles utilisées dans cette étude sont des QUANTIFIOL[®] holey carbon film, R2/1 ou R2/2 correspondant à des trous de 2 μ m espacés de 1 μ m ou 2 μ m respectivement.

II- Ionisation

Le film de support en carbone des grilles est généralement hydrophobe, ainsi lorsqu'une goutte de solution aqueuse est déposée, elle aura tendance à minimiser les contacts avec le carbone. Pour une répartition homogène de la solution sur la grille, le film de carbone doit être rendu hydrophile. Pour cela, les grilles sont placées dans une cloche sous vide. Lorsque que la tension est appliquée entre la cathode et l'anode situées au-dessus de la chambre, le potentiel d'électrons ionise l'air résiduel à l'intérieur de la chambre, formant ainsi un plasma d'ozone. Les charges négatives vont alors se déposer sur le film de carbone, le

rendant hydrophile. Ce traitement est effectué à l'aide de l'ionisateur Pelco EasiGlow. Lors de cette étude, les grilles sont placées dans une chambre sous vide (0.45 mBar) et un courant d'intensité de 25 mA est appliqué durant 30 secondes.

III- Préparation des échantillons : La coloration négative

La coloration négative a été développée par Horne et a été par la suite fortement utilisée pour l'observation de complexes macromoléculaires. Cette technique consiste à enrober l'échantillon dans une solution d'atomes lourds afin de le préserver tout en augmentant le contraste (Brenner and Horne, 1959). Elle repose sur l'utilisation de contrastant comme l'acétate d'uranyle (AU). Celui-ci va alors préférentiellement se fixer sur les régions hydratées accessibles de l'échantillon. Ainsi en coloration négative, on n'observe pas directement l'échantillon mais la répartition du contrastant autour et sur celui-ci (**Figure 21**).

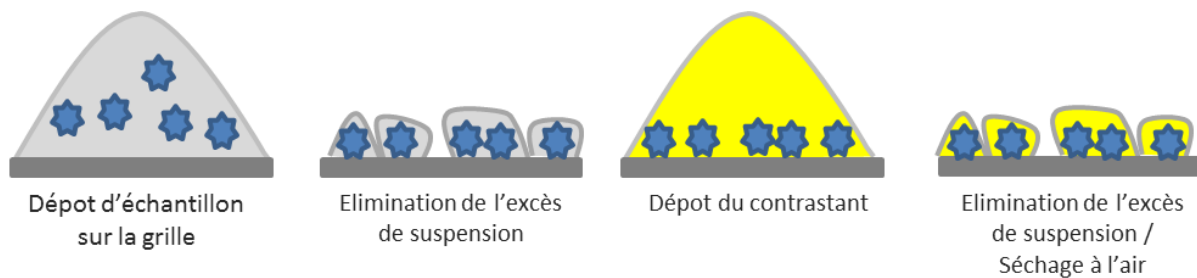


Figure 21: Principe de coloration négative

Cette technique a été employée en première approche pour l'observation des diverses particules pre-40S purifiées. Ceci a permis de vérifier que ces complexes sont adaptés à une analyse structurale par MET. La solution contenant les précurseurs de la petite sous-unité sont déposés sur une grille carbonée ionisée comme indiqué ci-dessus. L'excès de suspension est éliminé par absorption avec un papier filtre (Whatman 1). Par la suite, 3.5µl d'acétate d'uranyle 1% sont déposés sur la grille et immédiatement enlevé par absorption avec le papier filtre (Whatman 1). Une goutte de AU (3,5 µl) est à nouveau déposée sur la grille. L'excès de liquide est absorbé avec le papier filtre (Whatman 1) trente secondes plus tard. La grille est laissée à sécher à l'air libre.

IV- Préparation des échantillons pour la cryo-MET

Cette technique permet de visualiser directement l'échantillon en s'affranchissant des artefacts dû à l'utilisation de contrastant. Il est alors hydraté, inclus dans de la glace amorphe et observé dans un état quasi-natif. Le but est d'obtenir une glace amorphe transparente aux électrons. Pour cela, il est nécessaire de congeler ultra-rapidement l'échantillon afin d'empêcher la formation de cristaux de glaces opaques aux électrons et entraînant des dommages dans la structure des particules étudiées.

La congélation est faite à l'aide d'un automate de congélation EM GP (Leica) qui possède une chambre dont la température et l'humidité sont contrôlées et réglables. La solution de pré-ribosomes purifiés (3.5µl) est déposée extemporanément après l'ionisation sur une grille à trous maintenue dans la chambre à 20°C. L'excès de suspension est absorbé avec un papier filtre (Whatman 1). La grille est alors très rapidement plongée dans un bain d'éthane liquéfié à -183°C par de l'azote liquide. Le temps durant lequel le papier filtre est en contact avec la grille (buvardage ou blot) est varié afin de mettre en place les conditions de congélation qui donneront une épaisseur de glace optimale pour l'observation de l'échantillon (Figure 22).

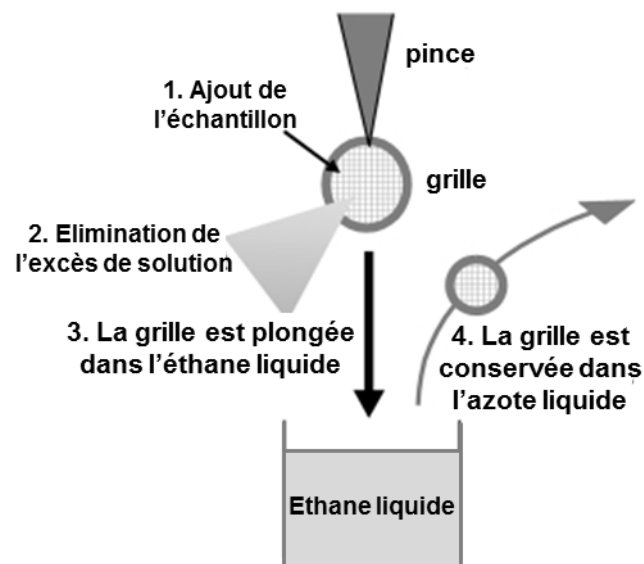


Figure 22: Principe de la congélation ultra-rapide de l'échantillon en vue de son observation en cryo-MET (adaptée de Saibil and Orlova, 2011)

L'utilisation de l'éthane comme fluide permet de congeler très rapidement l'échantillon, sans phénomène de caléfaction, et en évitant la formation de glace cristalline.

Après cette étape, la grille est transférée dans un porte-objet cryo ou stockée dans un centenaire d'azote liquide. Les échantillons sont par la suite manipulés et conservés dans l'azote liquide afin d'éviter toute transition d'un état vitreux vers un état cristallin de la glace (se produisant au-dessus de -165°C).

V- Transfert de la grille dans le microscope électronique

Le transfert de grille dans le porte objet se fait à l'aide d'une station de cryo-transfert afin de ne pas rompre la chaîne du froid et d'éviter les contaminations. Le porte-objet présente un dewar et à l'extrémité de la tige métallique l'emplacement de la grille qui est maintenu dans le froid par conduction thermique. Le transfert de la grille se fait dans des vapeurs d'azote liquide dans la chambre de la station de cryo-transfert.

Les transferts de grilles dans les MET Titan Krios et Polara se font via un système de cartouche. Le principe reste le même, il s'agit de conserver la chaîne du froid et de rester en dessous de -165°C pour que la glace ne change pas d'état.

VI- Le microscope électronique à transmission : principes généraux

Malgré leur diversité, les microscopes électroniques en transmission sont constitués d'éléments principaux communs : un ensemble de pompage destiné à assurer le vide nécessaire pour la propagation libre d'électrons dans la colonne, une source d'électron, des lentilles électromagnétiques, un système de détection permettant l'observation et l'enregistrement d'image ainsi qu'un étage porte-objet (**Figure 23**).

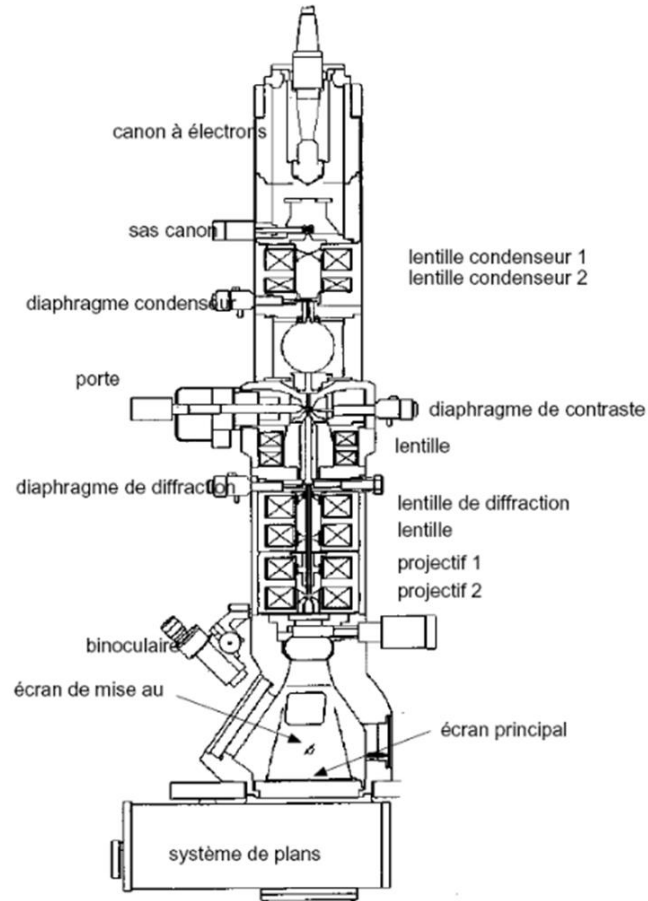


Figure 23: Schéma du microscope électronique à transmission

VI.1- La source d'électrons

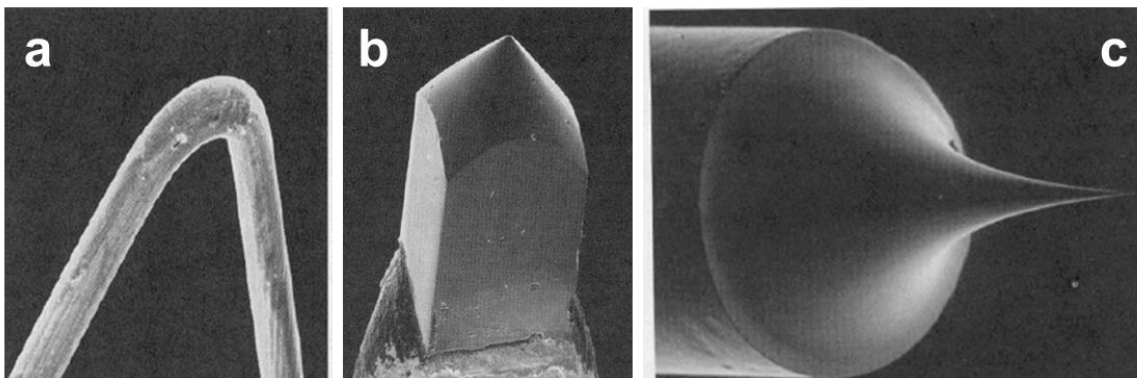


Figure 24: Différentes source d'émission d'électrons.

a) le filament en tungstène, b) cristal de hexaborure de lanthane et c) pointe en tungstène en FEG.

VI.1.1- Sources thermiques

En chauffant le filament à haute température par effet joule, une fraction d'électrons va acquérir l'énergie suffisante pour être arrachée du filament et être ainsi libérée dans le vide. Les sources d'électrons de ce type sont le filament en tungstène, en forme de V, et la pointe en hexaborure de lanthane (LaB_6) (**Figure 24a et b**). Ces deux sources doivent être chauffées à 2500°C et 1500°C respectivement. Comparée au filament en tungstène, le cristal en hexaborure de lanthane LaB_6 délivre un flux de courant environ 30 fois supérieur à partir d'une zone d'émission réduite. Ceci influe directement sur la qualité de l'image.

VI.1.2- Canons à émission de champ (sources FEG)

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

	Filament en tungstène	Cristal en hexaborure de lanthane	Canons à émission de champ (source FEG)
Énergie d'extraction (eV)	≈ 4.5	2.7	4.5
Densité de courant [A cm^{-2}]	1.3	≈ 25	10^4 - 10^6
Température de fonct ^{nt} [K]	2500	1400 - 2000	300
Brillance [$\text{A cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$]	$5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^9$
Dispersion en énergie [eV]	1 - 2	0.5 - 2	0.2 - 0.4
Pression de fonct ^{nt} [Pa]	$10^{-2} - 10^{-3}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$10^{-7} - 10^{-8}$

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes sources d'électrons

VI.2- Les Détecteurs

Du fait des dommages induit par la radiation du faisceau, seul un nombre limité d'électrons peut être utilisé lors de l'acquisition d'image. Il est donc très important de détecter efficacement ces électrons. L'un des paramètres qui permet d'évaluer les performances d'un détecteur : l'efficacité quantique de détection (DQE pour Detective Quantum Efficiency). Il exprime la façon dont le rapport signal sur bruit entrant est dégradé par les erreurs dues au processus de détection. Un détecteur parfait n'ajoute pas de bruit et a donc un DQE de 1. Dans la pratique tous les détecteurs ont un DQE inférieur 1.

Durant plusieurs décennies, le film photographique a été un support très utilisé pour acquérir des images en MET. Il se compose de cristaux d'halogénure d'argent/ bromure d'argent noyé dans de un film de gélatine. Les électrons transmis modifient la structure des cristaux d'halogénure d'argent pour former des micro-agrégats d'argent métallique. Ceux-ci forment l'image latente. Suite à un certain temps d'exposition, l'image latente est révélée par un développement photographique. Afin d'obtenir l'image et pouvoir l'analyser, le film doit être sorti du microscope, révélé dans une chambre noir puis scanner. Ainsi le film photographique permet de visualiser directement les électrons, cependant, l'image est accessible qu'après développement. Jusqu'à présent le film photographique était le détecteur de choix pour calculer une reconstruction 3D à haute résolution.

Encore utilisée en routine, l'ancienne génération de caméras numériques repose sur la technologie CCD (Charge Coupled Device). Le principe de cette technologie est basé sur l'interaction du photon avec le silicium, composant du capteur CCD, qui cède alors toute son énergie à un électron appartenant à un atome de silicium. Les électrons sont collectés. Le nombre d'électrons est proportionnel à la quantité de lumière reçue. En MET, une couche supplémentaire (le scintillateur) au-dessus du capteur CCD est utilisée pour convertir les électrons en photons (celui étant sensible aux photons). Cette conversion est une source importante de bruit supplémentaire dans les images cryo-MET.

Cependant, si le capteur CCD possède des performances inférieures (DQE environ égale à 0.1) par rapport au film photographique (DQE environ égale à 0.3), il permet la visualisation en temps réel de l'image mais aussi l'automatisation de l'acquisition des images.

Récemment, l'objectif a été de fabriquer des détecteurs avec un DQE élevé permettant aussi l'automatisation de l'acquisition des images. Il s'agissait de combiner les avantages du film et des capteurs CDD. L'utilisation des détecteurs directs d'électron composé de capteur monolithique à pixel actifs (MAPS en anglais) a ainsi vu le jour. Ils reposent sur le principe que les électrons incidents passent au travers d'une fine membrane semi-conductrice, leur énergie est alors détectée par l'électronique directement fabriqué sur la membrane (CMOS). Elle convertit directement les électrons en signal. Ceci permet de visualiser facilement chaque électron incident individuellement. Contrairement au capteur CDD, il n'y a pas d'étape de conversion d'électron en photon (**Figure 25**). Le rapport signal sur bruit des images acquises avec les détecteurs directs d'électrons est donc amélioré. En plus d'avoir un DQE élevé, ces caméras sont rapides et donc capable de prendre plusieurs images en une seconde. Ceci permettra de corriger les mouvements de l'échantillon sous le faisceau et donc d'augmenter la résolution de l'image.

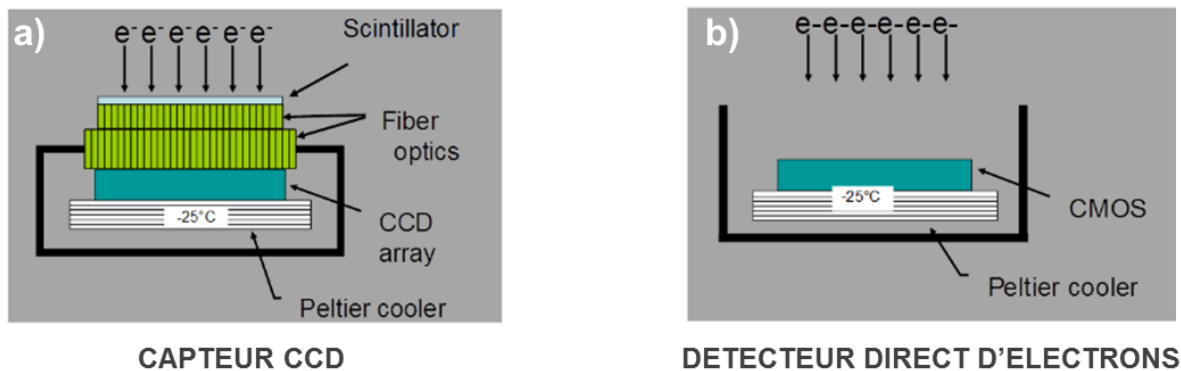


Figure 25: Schéma des détecteurs

En a) Schéma de l'ancienne génération de caméra reposant sur la technologie CCD qui nécessite une étape de conversion des électrons en photon à l'origine d'une diminution du rapport signal sur bruit. En b) Schéma du détecteur direct d'électron (d'après FEI)

VI.3- Les lentilles électromagnétiques et formation de l'image

L'imagerie d'objet biologique en MET repose sur un principe qui est semblable à l'imagerie par microscopie photonique. Pour un microscope photonique, les photons servent de source de radiation, ils passent à travers l'échantillon et sont focalisés via des lentilles en verre vers le plan image de la lentille. En MET, le faisceau est composé d'électrons émis à

partir d'une source dans le vide et ensuite accélérés dans la colonne du microscope avec de voltage d'accélération allant typiquement de 80 à 300kV. Au vue de leurs charges, les électrons vont subir la force de Lorentz dans des champs électromagnétiques, à l'origine de leurs changements de trajectoire. Tout au long de colonne, le trajet des électrons est donc contrôlé par les lentilles électromagnétiques. Il s'agit de bobine de fils de cuivre parcourues par un courant électrique stabilisé.

De même que les lentilles en verre, les électrons seront focalisés par les lentilles électromagnétiques qui vont condenser le faisceau et former l'image de l'échantillon traversé dans le plan image de la lentille. Les électrons vont converger au niveau du plan focal de la lentille aussi appelé plan de Fourier, formant ainsi la figure de diffraction, caractéristique de la géométrie de l'échantillon (**Figure 26**). Elle correspond à la transformée de fourrier de l'objet observé. La conversion de la figure de diffraction en image nécessite alors l'application de l'opération de la transformée de fourrier inverse.

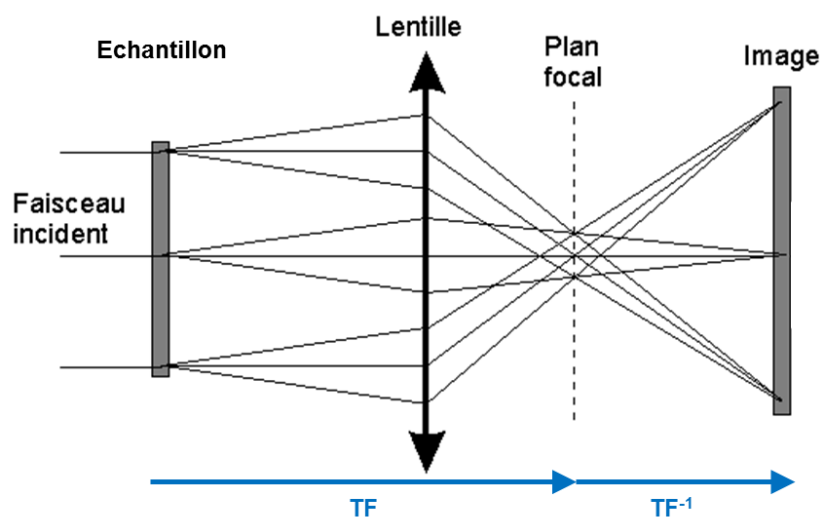


Figure 26 : Principe de la théorie de la formation de l'image
(avec TF : transformée de Fourier, et TF^{-1} transformée de Fourier inverse)

VI.4- Interaction des électrons avec l'échantillon

En MET, la formation de l'image est dû à l'interaction des électrons avec l'échantillon. L'échantillon est une lame mince d'épaisseur suffisamment faible pour que le

nombre d'interactions soit limité. Lorsqu'un électron passe à proximité d'un atome de l'objet, on distingue deux types de diffusion (**Figure 27**).

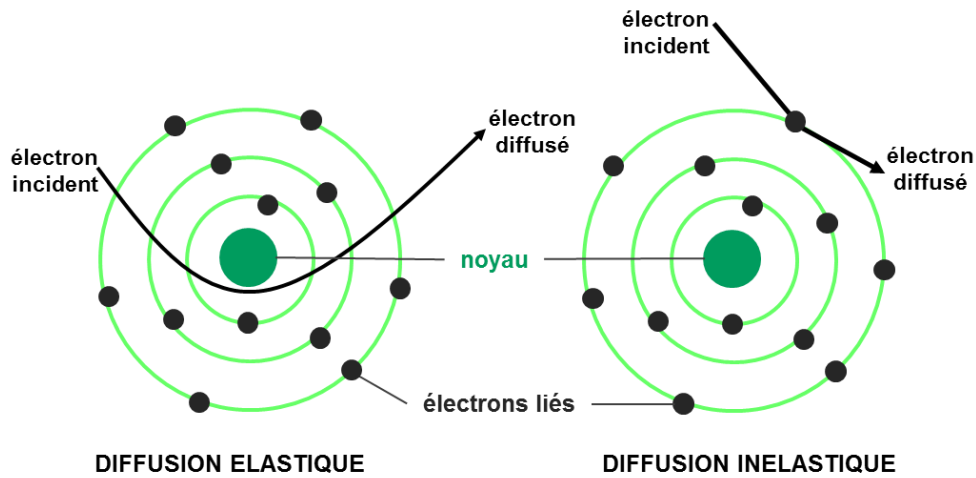


Figure 27 : Interaction des électrons avec l'échantillon.

La diffusion élastique se fait sans perte d'énergie contrairement à la diffusion inélastique.

Les électrons qui s'approchent le plus des atomes sont fortement attirés et sont donc par conséquent significativement déviés de leurs trajectoires initiales (d'un angle en moyenne de 10^{-2} radian) et ceci sans perte d'énergie (**Figure 27**). Il s'agit de la diffusion élastique. Ces électrons seront alors éliminés par le diaphragme objectif.

Tandis que les électrons traversant le nuage électronique, interagissent avec des particules de même masse et peuvent ainsi transmettre leurs énergies. Les électrons changent alors de niveau énergétique ou sont parfois éjectés transformant l'atome en ion et formant des radicaux libres, à l'origine de dommages de l'échantillon. Il s'agit de diffusion inélastique pour laquelle les électrons sont peu déviés et perdent de leurs énergies (**Figure 27**). Dans ce cas la distribution angulaire est faible (de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} radian). Ceci contribue à la diminution du contraste de l'image par ajout de bruit.

Si un électron n'interagit pas avec l'échantillon, alors cet électron conserve sa trajectoire initiale et son énergie.

L'angle de déviation d'un électron diffusé élastiquement, par rapport à sa trajectoire initiale, dépend du numéro atomique de l'atome. Ceci explique le fait que les échantillons biologiques essentiellement composés d'atomes légers (C, N, O,) ont un contraste

intrinsèquement faible. Il est nécessaire de l'augmenter grâce notamment à l'utilisation de solution d'atomes lourds (coloration négative) et l'augmentation de la défocalisation.

D'après la dualité onde corpuscule, le faisceau d'électrons peut être aussi considéré comme une somme d'ondes électromagnétiques. L'image de l'échantillon est le résultat de tous les électrons transmis. Le contraste de l'image est issu de deux composantes : le contraste d'amplitude dû aux électrons diffusés de manière élastique et stoppés par le diaphragme objectif. Il contribue fortement aux images acquises après coloration négative du fait de l'utilisation d'une solution d'atomes lourds entraînant une déviation significative des électrons diffusés de façon élastique. Ainsi les zones où sont reparties le contrastant apparaîtront sombre.

Les électrons diffusés élastiquement passant à travers le diaphragme objectif qui interfèrent de façon constructives avec les électrons non déviés, sont à l'origine du constate de phase. Les décalages de phase produisent des interférences seulement au-dessus ou au-dessous du plan focal, induisant des variations de contraste. Le contraste de phase résulte donc en grande majorité de la défocalisation.

VI.5- Résolution théorique

La différence significative entre la microscopie photonique et MET est le pouvoir résolutif des deux méthodes. Ceci correspond à la distance minimale nécessaire pour distinguer deux points proches d'un objet. Si le microscope était parfait, la résolution serait directement corrélée à la longueur d'onde de la source utilisée. La résolution théorique est calculée selon l'équation suivante,

$$R_{th} = \frac{0.61 \times \lambda}{n \times \sin\alpha}$$

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. De plus, en microscopie électronique à transmission, la longueur d'onde λ dépend de la tension accélératrice V selon l'approximation suivante :

$$\lambda = \frac{12.3}{\sqrt{V}}$$

Ainsi pour une tension accélératrice de 200kV, la longueur d'onde est égale 0.0025 nm.

VI.6- Limitation de la résolution

VI.6.1- La diffraction

Indépendamment des lentilles, la résolution est limitée par le phénomène de diffraction. En effet, selon la théorie d'Abbe, l'image d'un point n'est pas un point mais un disque de diffusion (tache d'Airy) correspondant à un disque central et des cercles concentriques qui s'atténuent dans le plan image. Ce disque de diffusion est dû au phénomène de diffraction induit par le diaphragme de la lentille. Son diamètre peut être calculé par la formule suivante :

$$D = 1.22 \times \frac{\lambda}{n \times \sin\alpha}$$

Deux points voisins auront pour images deux taches dont le recouvrement peut empêcher de distinguer les deux points images. Plus le diamètre de la tache d'Airy est faible, plus il sera facile de séparer deux proches de l'objet et donc meilleur sera le pouvoir de résolution. Ceci souligne l'intérêt du choix des électrons comme source.

La plus petite distance entre deux disques de Airy pour qu'ils apparaissent partiellement séparés est égale au ½ diamètre du disque (d'où la formule de la résolution théorique R_{th} , ci-dessus). Ainsi pour un microscope opérant à 200KV, la résolution théorique maximale est 0.0014Å. Cependant, en pratique, cette résolution est limitée par les imperfections des lentilles électromagnétiques.

VI.6.2- Défauts des lentilles électromagnétiques

Les défauts des lentilles sont à l'origine de la diminution de la résolution atteignable en microscopie électroniques à transmission. Il existe plusieurs types d'aberrations.

L'un des principaux facteurs limitant de la résolution est l'aberration sphérique. Celle-ci est dû au fait que les électrons passant près du centre de la lentille sont moins déviés de leurs trajectoires initiales que les électrons passant aux bords de la lentille. Les électrons vont donc converger à des distances focales différentes et ainsi l'image d'un point sera un disque de moindre confusion (ds). Le rayon du disque de moindre diffusion est proportionnel à la constante d'aberration sphérique C_s .

De plus, les électrons ne possèdent pas tous exactement la même longueur d'onde. Ces variations de vitesse sont la conséquence de trois évènements : les fluctuations de la tension accélératrice, les variations de vitesse des électrons émis par la cathode dépendant de la source d'émission d'électron. Les canons à émission de champs ont des dispersions d'énergie moins grandes. L'autre phénomène est la perte d'énergie des électrons diffusant de manière inélastique en traversant l'échantillon. Lors de leurs passages dans la lentille, les électrons ayant des longueurs d'onde différentes ne convergent pas précisément au même point, les moins rapides seront les plus déviés. L'image d'un point sera également un disque de moindre diffusion dont le rayon dépend de la constante d'aberration chromatique C_c .

Un autre défaut de la lentille est l'origine de la déformation de l'image. Il s'agit de l'astigmatisme qui repose sur la différence de convergence selon les axes de la lentille. Ainsi l'image d'un point n'est pas circulaire mais elliptique. Ce défaut peut être facilement corrigé. Lors de cette étude, les images présentant de l'astigmatisme ont été éliminées.

En plus de ces trois principaux défauts de lentilles électromagnétiques, d'autres éléments comme des dommages causés par les radiations de faisceau d'électrons peuvent aussi être une cause de la diminution de la résolution.

VI.7- La fonction de transfert de contraste (CTF)

Le microscope électronique à transmission va introduire des modifications sur le contraste de l'image qui sont définies par la notion de fonction de transfert de contraste (CTF). L'image d'un objet observé par MET est affectée par la CTF du microscope. La CTF du microscope peut être décrite par une fonction sinusoïdale, qui va imposer, sur l'image acquise, des inversions de contraste périodiques en fonction des fréquences spatiales. Le

contraste d'amplitude et de phase sont modulés par le CTF du microscope. Sa formule est la suivante :

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

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

Avec k correspondant à la fréquence spatiale, W au pourcentage dû au contraste d'amplitude, γ au déphasage, λ à la longueur d'onde, Cs à la constante d'aberration sphérique et ΔZ à la défocalisation de l'image.

La CTF dépend donc de la constante d'aberration sphérique, de la tension accélératrice et donc de la longueur d'onde des électrons mais aussi de la défocalisation (Zhu et al., 1997).

Au niveau des inversions de phase (appelé zéro), l'information transmise est nulle. La position des zéro dépend du défocus de l'image (**Figure 28**). Il est donc très important d'acquérir des images en faisant une gamme de défocus pour avoir l'information sur toute la gamme de fréquence. Une image très défocalisée possède un contraste élevé. Cependant son premier zéro est alors déplacé vers les basses fréquences. A l'inverse, une image peu défocalisée a un rapport signal sur bruit faible mais son premier zéro est décalé vers les hautes fréquences. Cette image présentera plus de détails et sera plus résolue cependant aura un contraste plus faible, comparé à l'image plus défocalisée.

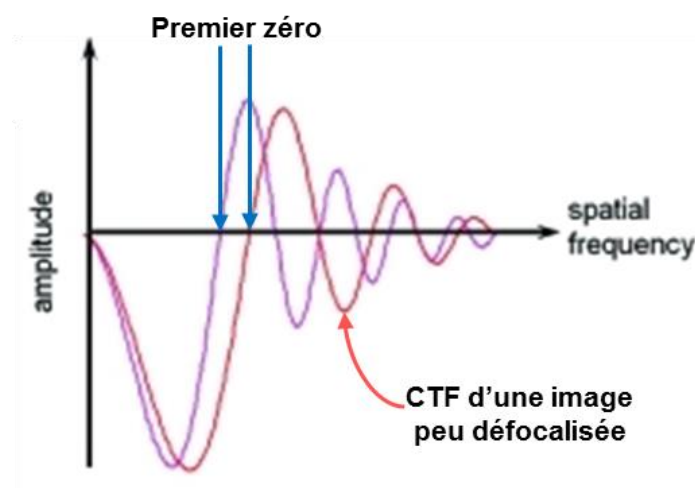


Figure 28: Courbes représentant la fonction de transfert de contraste. La courbe rouge correspond à une image proche du focus, et moins défocalisée que l'image correspondant à la courbe rose (adaptée de Orlova and Saibil., 2011)

L'image 2D de la CTF est formée de cercles concentriques appelés anneaux de Thon. La forme des anneaux témoigne de la qualité de l'image et de la présence d'éventuels défauts comme l'astigmatisme ou le déplacement de l'échantillon durant l'acquisition de l'image.

Durant l'analyse d'images, la CTF sera corrigée afin d'inverser des contrastes de manière périodique en fonction du défocus calculé auparavant. Le contraste est alors positif ou nul pour l'ensemble des fréquences spatiales. Le spectre de puissance des images sera aussi inspecté afin de juger de leurs qualités.

Aux hautes fréquences spatiales (correspondant à la haute résolution), les oscillations augmentent rendant la récupération de l'information difficile. De plus comme le faisceau d'électrons n'est pas parfait (non monochromatique et non ponctuelle), il faut appliquer une autre fonction à la CTF qui est la fonction d'enveloppe du microscope. Ceci résulte en l'atténuation de la CTF, correspondant à une diminution de son amplitude aux hautes fréquences.

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

La fonction d'enveloppe correspond à la multiplication de trois exponentielles. La première exponentielle permet de décrire la taille de la source (Q), le deuxième terme tient compte de l'instabilité de la défocalisation D_s (defocus spread) et le troisième terme rend compte des variations de tous les autres paramètres, avec E_g qui est la largeur à mi-hauteur de la fonction de type Gaussien.

VII- Acquisition des images

VII.1- Microscopes utilisés

VII.1.1- Microscope local

L'observation des échantillons en cryo-MET pour la vérification et le choix des meilleures grilles de cryo-MET est effectuée à l'aide du microscope électronique à transmission Jeol JEM2100 du plateau Meti (Microscopie électronique intégrative de Toulouse). Ce microscope est équipé d'un cristal de LaB6 opérant sous une tension d'accélération de 200kV. Il possède un filtre de perte d'énergie post-colonne Gatan GIF Quantum, couplée à une caméra Gatan Ultrascan US4000 4Kx4K.

La dose d'électron doit être faible pour minimiser les dommages et préserver l'échantillon mais assez forte pour que les images aient un rapport signal sur bruit suffisant pour l'analyse d'images. La prise d'images des particules pré-ribosomiques est effectuée en « mode low dose » (faible dose d'électron) à l'aide du logiciel Serial-EM. La zone d'intérêt sur la grille est recherchée à faible grossissement (mode « view » grossissement $\times 6000$). La position des carreaux présentant une glace qui ne semble pas contaminée et dont l'épaisseur paraît optimale est enregistrée. La mise au point qui consiste à trouver la focale et puis à appliquer une valeur de défocus est effectuée à proximité de la zone à imager (« mode focus », grossissement $\times 100\ 000$). Ceci se fait avec un grossissement plus grand que celui utilisé pour l'acquisition des images. La zone d'intérêt n'est donc jamais exposée avant l'acquisition de l'image à l'exception du moment de sa recherche avec une très faible dose d'électron. La prise de vue (« mode record », grossissement $\times 40\ 000$) est effectuée à une dose ne dépassant pas 20 électrons par Å^2 .

VII.1.2- Microscopes à haute performances

- Le Tecnai F30 Polara

L'acquisition des images de particules purifiées en utilisant DIM2 comme appât a été effectuée sur le microscope électronique en transmission Tecnai F30 Polara (FEI) du plateau de microscopie électronique IGBMC de Strasbourg. Ce microscope, opérant à 100kV, est doté d'un canon à émission de champs (FEG) comme source d'électron. L'acquisition des images entièrement automatisée, est réalisée à l'aide du logiciel EPU sur une caméra détecteur direct d'électrons FALCON 4k (FEI).

- Le Titan Krios

Les images des particules pré-40S purifiées en utilisant LTV1-TAP ou RIO1-Kd-TAP comme appât, ont été acquises sur le microscope FEI Titan Krios au Netherlands Center for Electron Nanoscopies (NeCEN, Leiden, Pays-Bas). Ce microscope, opérant à 300kV, est équipé d'un canon à émission de champs (FEG) et possède un correcteur pour l'aberration sphérique ($CS= 0.0023\text{mm}$). L'acquisition des images entièrement automatisée, est réalisée à l'aide du logiciel EPU, sur une caméra à détecteur direct d'électrons (la Falcon I, FEI). La prise d'image des particules pré-40S purifiées en étiquetant LTV1 a été effectuée à un grossissement de 59 000 correspondant à une taille de pixel de 1.136\AA avec des valeurs de défocalisation de $1.6\ \mu\text{m}$, $2.1\ \mu\text{m}$ et $2.5\ \mu\text{m}$. durant 96 heures. Le mode movie, consommateur de temps, n'a pas été utilisé pour ce jeu de donnée. De plus, RELION n'avait pas encore été implémenté pour traiter les images du mode movie.

De même que pour les particules pré-40S LTV1, la prise d'image des particules purifiées en utilisant RIO1-Kd comme appât a été effectué à un grossissement de 59 000 correspondant à une taille de pixel de 1.12\AA sur la camera Falcon II back thined. L'acquisition d'image a été effectuée avec des valeurs de défocus allant de -1 à $-2.5\ \mu\text{m}$ et une dose d'électron de $40\ \text{e}/\text{\AA}^2$, durant 48 heures. Le mode movie a été utilisé lors de l'acquisition du jeu de donnée. Pour cela, durant une exposition, 7 images du même champ de particules ont été acquises et enregistrées.

D- Analyse d'images

I- Principes généraux

Le principe de reconstruction de structures 3D à partir d'images de microscopie électronique en transmission repose sur le théorème des sections centrales (Natterer, 1986). En cryo-MET, les images des particules sont des projections 2D de l'objet, orientées de façon aléatoire dans la glace vitreuse. La transformée de Fourier de chacune de ces projections 2D est une section centrale de la transformée de Fourier 3D de l'objet. Ainsi, si l'on peut déterminer l'orientation relative des particules imagées par MET, on peut les combiner pour reconstruire la structure 3D de ces particules. La reconstruction 3D obtenue dépendra de la qualité des images mais aussi de la répartition des particules dans l'espace.

Dans cette étude, la méthode dite des particules isolées a été utilisée pour déterminer la structure 3D des particules pré-40S, à l'aide du programme RELION 1.3 (Scheres, 2012).

II- Le programme RELION 1.3

RELION (REgularised Likelihood Optimisation), est une suite de programmes développée par Sjors Scheres au MRC à Cambridge. Elle utilise une approche de statistique bayésienne, afin de décrire la probabilité maximale d'orientation de chaque particule imagée, en prenant en compte la flexibilité structurale de cette particule, ainsi que, entre autres, la variabilité du rapport signal/bruit dans le jeu de donnée d'images acquises (Scheres, 2012). Ce programme permet de trier l'hétérogénéité structurale de l'échantillon, sans que l'utilisateur en ait une connaissance a priori. D'autre part, et par une méthodologie dite de « Gold Standard FSC », ce programme permet de réduire au maximum les biais de référence. RELION 1.3 a récemment été employé pour déterminer la structure de différentes macromolécules, à des résolutions quasi-atomiques (Brown *et al.*, 2014 ; Voorhees *et al.*, 2014 ; Pang *et al.*, 2015 ; Yan *et al.*, 2015).

Les principales étapes de calcul de la reconstruction 3D sont résumées dans la **Figure 29** ci-dessous. Elles consistent en 5 étapes, décrites ci-dessous :

- 1) le pré-traitement, qui requiert l'estimation de la CTF de chacune des images, puis la sélection automatique des particules et leurs extractions des images,
- 2) une étape de classification 2D, afin d'éliminer les images ne correspondant pas aux complexes d'intérêt,
- 3) une étape de classification 3D, qui permet de trier l'hétérogénéité structurale, et de reconstruire des structures 3D de variants structuraux,
- 4) une étape de raffinement 3D de chacune des structures obtenues ci-dessus, dans laquelle un processus itératif auto-géré permet de calculer une structure 3D à la plus haute résolution possible,
- 5) enfin, une étape de post-traitement permet d'estimer la résolution des structures 3D obtenues en 4) selon les critères dits de « Gold Standard FSC », et d'appliquer un filtre passe bande adéquat à ces structures, afin de diminuer le poids relatif des basses fréquences spatiales par rapport à celui des hautes fréquences spatiales de la structure.

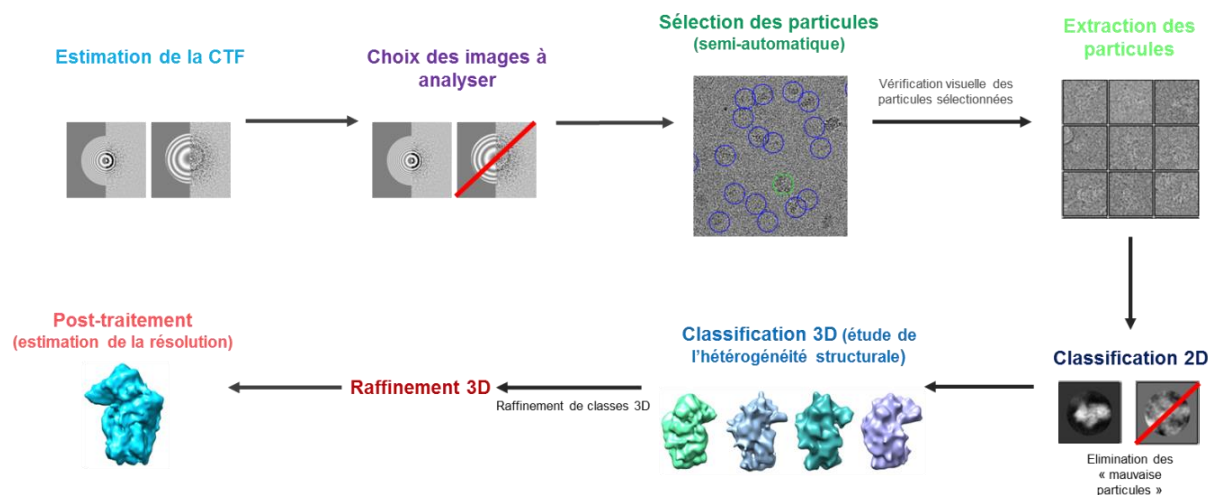


Figure 29: Principale étapes de l'analyse d'images avec RELION 1.3

II.1- Pré-traitement

Les images sont tout d'abord sélectionnées par une pré-visualisation rapide. Celles présentant des défauts flagrants (contaminations, zones sans glace...) sont éliminées.

Ensuite, le spectre de puissance des images conservées est calculé, afin d'estimer leur défocus, grâce au programme CTFFIND3 (**Figure 30**) (Mindell and Grigorieff, 2003).

Afin d'augmenter le rapport signal/bruit et de minimiser le temps de calcul, le programme divise l'image en 8, calcule le spectre de puissance de chacune des parts de l'image et les somme. CTFFIND3 ajuste ensuite les modulations de l'amplitude de la CTF visibles sur ce spectre de puissance avec une CTF théorique, calculée à l'aide des paramètres suivants : le voltage, la constante d'aberration sphérique et le contraste d'amplitude.

Un fichier texte au format STAR est créé contenant le nom des images, les paramètres du microscope électronique (le voltage, le grandissement) ainsi que les valeurs de défocus calculées. Ces données serviront à corriger les modulations induites par la fonction de transfert de contraste de chacune des particules dans les étapes suivantes de l'analyse d'images.

A la fin de cette opération, le spectre de puissance de chacune des images est inspecté. Les images présentant des aberrations (astigmatisme ou déplacement de l'échantillon durant l'acquisition de l'image) sont éliminées. Seules les images ayant un spectre de puissance sur lequel les anneaux de Thon sont visibles et circulaires seront analysées plus avant (**Figure 30**).

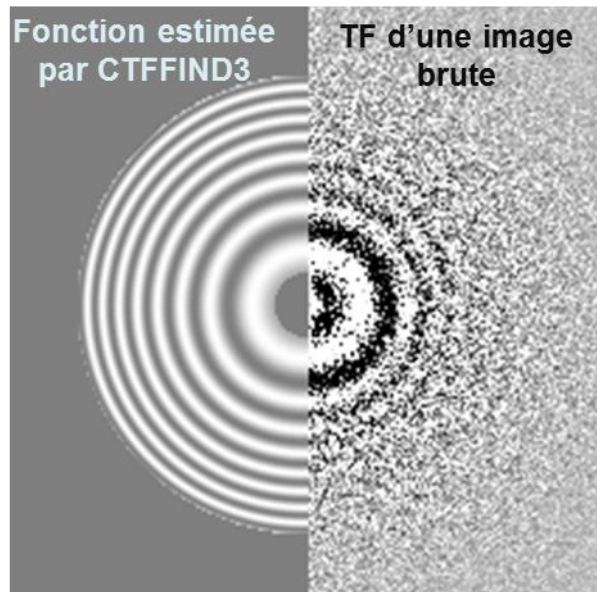


Figure 30: Représentation de la CTF estimée par CTFFIND3 pour l'image et transformée de Fourier (TF) de cette image brute

Les particules ont été sélectionnées de deux façons différentes : soit manuellement, grâce au programme `e2boxer.py` de la suite du logiciel d'analyse d'images EMAN2 (Ludtke *et al.*, 1999). Cette méthode a été utilisée pour sélectionner les particules purifiées en utilisant le co-facteur LTV1. Par la suite, nous avons employé, pour les particules pré-40S tardives purifiées par le co-facteur RIO1(KD), le programme de sélection automatique de RELION 1.3. Ce programme utilise une approche de corrélation croisée, inspirée de FindEM (Roseman, 2004). Pour une recherche optimale des particules dans les images, les références sont générées à partir du jeu de donnée lui-même. Pour cela, environ 1000 particules sont sélectionnées manuellement dans quelques images, puis groupées et moyennées lors d'une étape de classification 2D. Les meilleures classes 2D sont alors utilisées comme références pour la sélection automatique de particules dans tout le jeu de données d'images. La recherche des particules est optimisée en variant deux paramètres : le seuil de sélection (correspondant à un coefficient de corrélation entre la référence et la zone à sélectionner), qui varie de 0 à 1, et la distance minimale entre les particules. Plus le seuil de sélection sera proche de 1, moins grand sera le nombre de particules sélectionnées. L'optimisation de ces deux paramètres est réalisée sur deux ou trois images représentatives du jeu de données. Ensuite, ces valeurs sont utilisées pour sélectionner les particules de tout le jeu de données. Pour la sélection des particules purifiées via RIO1(KD), un seuil de sélection de 0.8 et une distance de 200 Å ont été utilisés.

La procédure de sélection semi-automatique des particules peut être à l'origine de sélection d'artefacts ou de zones vides. Il est donc nécessaire d'inspecter visuellement les particules sélectionnées afin d'éliminer « ces mauvaises particules » du jeu de donnée.

Pour chacun des jeux de données, un fichier texte au format STAR résume les paramètres cités ci-dessus et les coordonnées de chacune des particules sélectionnées. Celles-ci sont par la suite extraites des images dans des boites individuelles de 384 x 384 pixels. La taille de la boite est choisie pour qu'elle soit à la fois assez grande pour accueillir la particule entière, mais pas trop grande afin de minimiser les coûts de calcul dans les étapes ultérieures de l'analyse d'images.

II.2- Classification 2D

Cette étape permet d'éliminer les particules aberrantes (agrégats, taches, bouts de carbone...) afin d'améliorer le jeu de données. Dans cette étape, l'alignement et la classification des particules sont simultanément réalisés. Les classes sont obtenues de manière non supervisée, c'est-à-dire sans l'utilisation de références externes au jeu de données (Scheres *et al.*, 2005). L'utilisateur choisit le nombre (K) de classe 2D qu'il veut générer. En pratique, pour des images acquises en cryo-MET, le nombre de particules par classes est d'au moins 100. La première étape consiste à séparer le jeu de donnée en K sous-groupes d'images, de façon aléatoire. La moyenne de chacune de ces classes est calculée. Ces moyennes serviront de référence dans l'itération suivante, où chacune des particules seront comparées à ces moyennes. En fonction de leur degré de ressemblance et d'alignement à ces références, mais aussi en fonction de leur rapport signal/bruit, une probabilité maximale d'appartenance de la particule considérée à la classe K_i la plus ressemblante sera définie. La particule sera alors attribuée cette classe. La somme de chacune des nouvelles classes sera calculée, en vue d'une nouvelle itération de comparaison particule/somme de classe. Au fil des itérations, les images représentant une même vue de l'objet d'intérêt seront regroupées dans une même classe. Au sein d'une même classe, les images seront alignées, puis sommées, ce qui augmente le rapport signal sur bruit de la classe 2D générée. Les images correspondant à des artefacts ne pourront pas s'aligner et attribuées à des classes dont la somme sera une image très bruitée ; ces images seront supprimées par visualisation des sommes de classe « aberrantes ». Le nombre d'itérations utilisé était de 25 pour les jeux de donnée analysés.

II.3- Classification 3D

Comme pour la classification 2D, la classification 3D combine une approche de projection matching au principe de maximum de vraisemblance. Cependant cette étape nécessite d'avoir un modèle 3D initial de la structure d'intérêt, filtré à basse résolution, afin de réduire au maximum d'éventuels biais de référence. Dans la première itération de ce programme, des reprojections 2D de ce modèle 3D sont générées : leurs orientations sont connues. Les particules sont comparées à ces références, et l'orientation de chacune des particules sera donnée à la reprojction à laquelle est la plus similaire. Une fois les particules « orientées », elles seront divisées aléatoirement en K classes (K étant le nombre de classes 3D déterminées par l'utilisateur), et K reconstructions 3D seront calculées. Ensuite, les reprojections 2D des K reconstructions 3D seront générées, et serviront de références dans une nouvelle itération de détermination de l'orientation et de l'appartenance de classe de chacune des particules. Comme pour la classification 2D, il s'agit d'un processus itératif fixe, pour lequel l'utilisateur doit définir le nombre d'itérations voulues, et vérifier la convergence du résultat obtenu. Selon les jeux de données analysés, ce nombre d'itérations peut varier de 25 à 60.

II.4- Raffinement 3D

Cette opération permet d'améliorer (raffiner) des reconstructions 3D. Comme la classification 3D, cette étape repose sur la comparaison des particules aux reprojections 2D d'une structure 3D pré-existante. Elle peut permettre d'affiner la structure de chacune des classes 3D définies dans l'étape ci-dessus, ou bien de calculer une structure 3D « consensus », à partir d'un jeu de données entier, à la plus haute résolution possible. Le raffinement permet d'améliorer la précision de la détermination des orientations, et donc la qualité la carte de densité électronique résultante.

Ce processus est itératif, mais, à l'inverse des étapes de classification, le nombre d'itérations est auto-régulé par le programme, qui stoppera quand il sera arrivé à convergence. En outre, après une étape initiale où la précision de reprojections de la structure 3D de référence est déterminée par l'utilisateur, le programme décidera seul d'incrémenter les angles de reprojction des références 2D, pour améliorer la finesse d'orientation des particules. Ces principes permettent d'éviter d'éventuels biais induits par l'utilisateur. De plus, afin de minimiser les biais de référence et éviter le sur-alignement de bruits, ce programme est basé

sur deux grands principes, définis comme « règles d'or » (Gold Standard) dans (Chen et al., 2013).

- au début du processus, le jeu de données est séparé aléatoirement en deux moitiés, et ces deux demi jeux de données sont analysés indépendamment tout au long du raffinement. Ainsi, à chaque itération on calcule deux structures 3D, et la résolution maximale à cette itération sera calculée par la comparaison des transformées de Fourier de ces deux structures (Fourier Shell Correlation).

- Pour déterminer l'orientation des particules de ces deux demi jeux de données, on compare la transformée de Fourier de ces particules à la transformée de Fourier des références. La recherche de corrélation ne se fera que sur les basses à moyennes fréquences spatiales (typiquement, autour de 17 à 20 Å de résolution).

Lorsque le raffinement 3D arrive à convergence, ie, la résolution n'augmente plus et l'assignement des orientations des particules est stable, la structure 3D des deux demi jeux de données est calculée ; en outre, les deux demi jeux de données sont également joints, afin de calculer une reconstruction 3D à partir du jeu de données complet (structure 3D « complète », cf ci-dessous). Ceci permet d'augmenter le rapport signal/bruit de la structure 3D, et ainsi parfois d'améliorer sa résolution.

II.5- Post-traitement

Lors du raffinement 3D, le programme utilise des reconstructions 3D non masquées pour identifier la limite de résolution. Ceci est à l'origine d'une sous-estimation de la résolution dû à la présence de bruit autour de la particule.

L'étape de post-traitement consiste à générer un masque binaire large pour éliminer le bruit entourant les particules, puis à l'appliquer aux deux reconstructions obtenues durant la dernière étape de raffinement 3D, calculées à partir des deux demi jeux de données. La résolution de la structure 3D issue du raffinement est estimée par corrélation des transformées de Fourier des deux structures 3D masquées. Afin d'éviter la surestimation de la résolution due à l'utilisation de ce masque binaire, du bruit est aléatoirement ajouté aux deux transformées de Fourier dans les moyennes à hautes fréquences spatiales. Ces deux opérations font également partie de la procédure dite de « Gold Standard FSC », qui vise à ne pas sur-

interpréter les cartes de densités électroniques obtenues par l'analyse d'images de particules isolées.

Une fois que la résolution de la structure est déterminée par ce procédé, un filtre passe-bande adéquat est appliqué à la structure 3D complète. Ce filtre coupera et diminuera l'information à basses fréquences spatiales, et amplifiera le signal correspondant aux hautes fréquences jusqu'à la résolution estimée de la reconstruction. Au-delà de cette valeur, le signal sera supprimé, pour ne pas sur-interpréter des bruits résiduels.

III- Les ressources informatiques

L'utilisation de RELION 1.3 implique de posséder de grandes capacités de calcul, son exécution est donc réalisée sur des supercalculateurs (appelés aussi clusters de calcul).

Pour cette étude, RELION 1.3 a été installé sur le cluster local du laboratoire de biologie moléculaire eucaryote et sur Eos, le nouveau supercalculateur du mésocentre régional de calcul de Midi-Pyrénées (CALMIP). Le cluster local est formé de 6 nœuds composés de 16 cœurs et ayant chacun une mémoire de 11 Gb, et de 5 nœuds possédant 12 cœurs physiques avec 128 Gb de ram. Eos est composé de 612 nœuds ayant une mémoire centrale de 64 Gb et d'un nombre total 12240 cœurs.

IV- La visualisation des reconstructions 3D : utilisation de CHIMERA

Les reconstructions 3D calculées ont été visualisées à l'aide du logiciel CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004). Ce logiciel permet aussi d'ajuster des structures pdb filtrée ou non, dans les reconstructions 3D calculées, à l'aide de la commande « Fit in map » par ajustement en corps rigide (rigid body docking). Les structure pdb sont filtrées via la commande « molmap ».

Afin d'interpréter les structures 3D calculées, des cartes de densité ont été générées soit à l'aide de la commande « vop subtract » de CHIMERA soit avec le programme DIFFMAP développé par l'équipe de Niko Grigorieff.

Résultats

A- Mise en place des outils requis pour l'étude

I- Choix des particules pré-40S humaines

L'équipe du Pr. Ulrike Kutay dispose d'outils pour purifier des particules pré-40S à différentes étapes de leur maturation. Afin de déterminer quelles particules étaient les plus adaptées à une étude structurale par cryo-MET 3D, nous avons dans un premier temps observé cinq types de particules purifiées grâce à l'étiquetage des co-facteurs de maturation suivants : C21ORF70, ENP1, DIM2, LTV1 et RIO1(KD) (catalytiquement inactif). Le co-facteur C21ORF70 est associé uniquement aux particules pré-40S nucléaires ; ainsi, la purification d'affinité par cette protéine ne devrait permettre d'obtenir que des particules pré-40S nucléaires (**Figure 31**). La protéine ENP1 s'associe à la particule pré-40S dans le nucléole, s'en dissocie dans le cytoplasme après l'étape dite intermédiaire. Cet appât de purification devrait donc générer un mélange de particules pré-40S nucléaires et cytoplasmiques (**Figure 31**). De même, DIM2 s'associe aux précurseurs de petite sous-unité dans le nucléole, et serait l'un des derniers co-facteurs de maturation à s'en dissocier dans le cytoplasme. LTV1 est retrouvé majoritairement associé aux particules pré-40S dans le cytoplasme, mais est également présent dans le noyau (**Figure 31**). L'utilisation de ce co-facteur comme appât de maturation devrait donc générer un mélange de particules nucléaires et cytoplasmiques, avec une majorité de ces dernières. Enfin, si l'on utilise comme appât de purification une forme mutante de RIO1, dont l'activité kinase est supprimée, on obtient des particules pré-40S bloquées à l'étape dite tardive de leur maturation. (**Figure 31**).

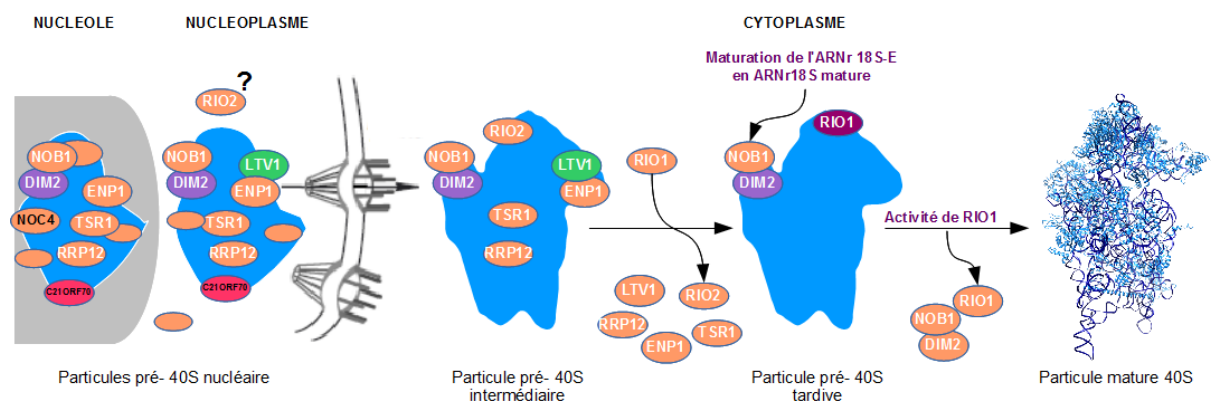


Figure 31: Modèle de la maturation de la petite sous-unité chez l'Homme.

Les protéines utilisées comme appât pour la purification d'affinité des particules pré-40S sont indiqués en rose pour les co-facteurs C21ORF70, en violet DIM2, en vert LTV1, et en magenta RIO1(KD).

La composition protéique des précurseurs de la petite sous-unité purifiés a été déterminée dans des études précédentes par l'équipe du Pr. Ulrike Kutay, par western blot et spectrométrie de masse (Wyler *et al.*, 2011 ; Widmann *et al.*, 2012 ; Zemp *et al.*, 2014). Les résultats publiés de ces études sont rappelés dans les **Figures 32** et **33** ci-dessous.

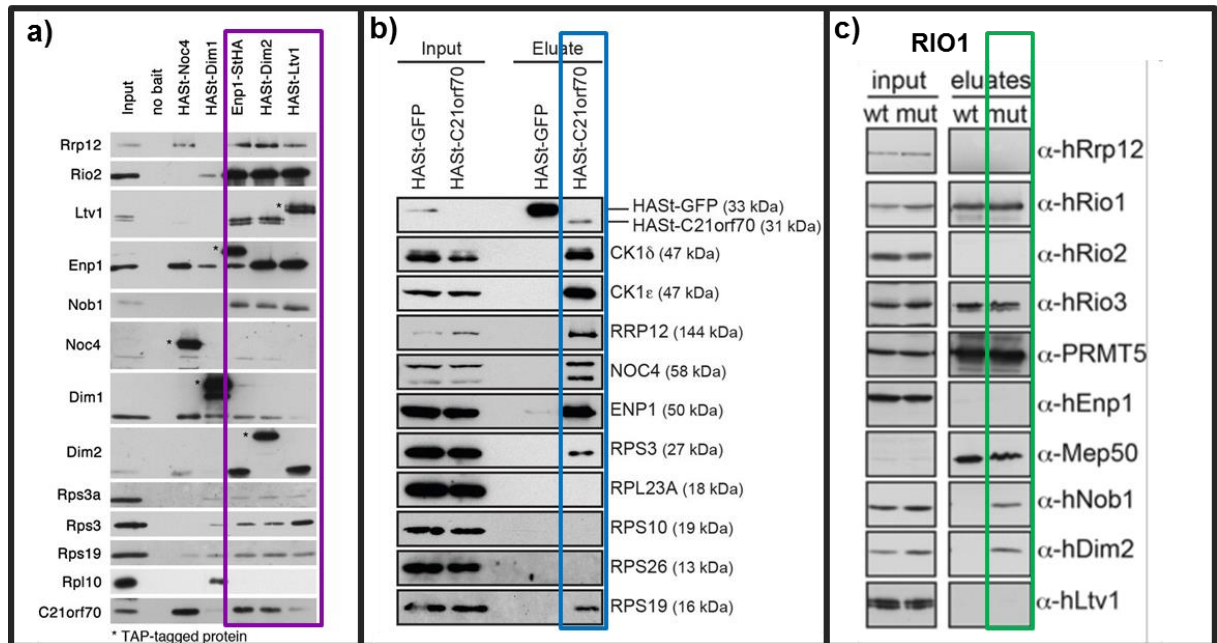


Figure 32: Etude de la composition protéique des particules pré-40S disponibles par western blot. a) Analyse par western blot des particules purifiées en utilisant comme appât DIM2, ENP1, LTV1 (encadré en violet) (D'après Wyler *et al.*, 2011). b) Analyse par western blot des particules pré-40S en étiquetant C21ORF70 (encadré en bleu) (D'après Zemp *et al.*, 2014). c) Analyse par western blot des particules purifiées en utilisant comme appât RIO1(KD) (encadré en vert) (D'après Widmann *et al.*, 2012).

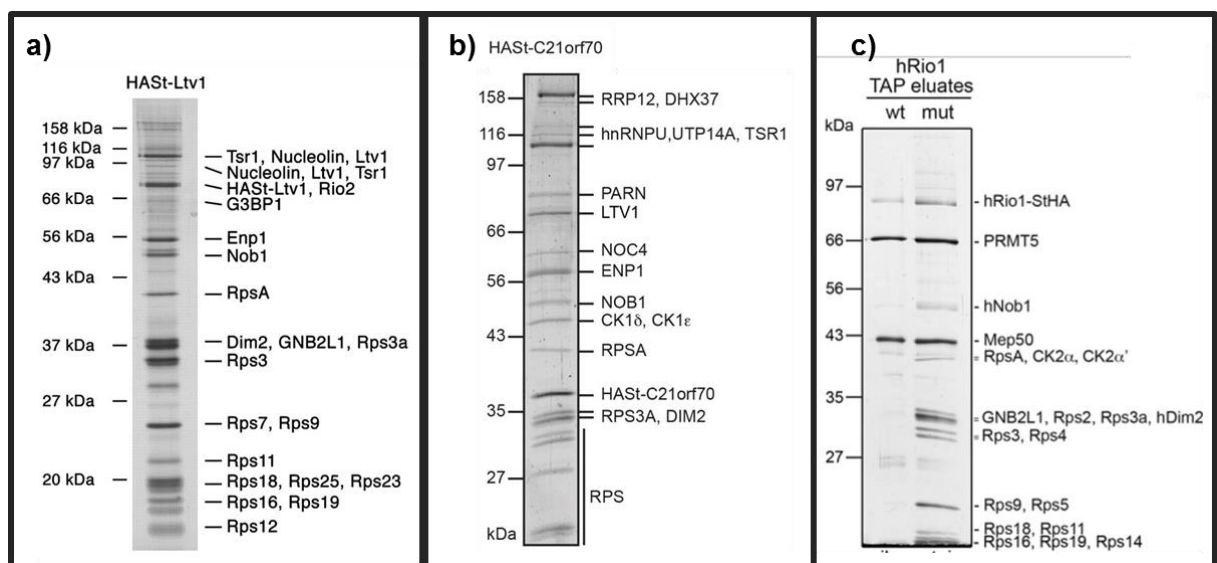


Figure 33: Détermination de la composition des particules pré-40S purifiées en utilisant comme appât LTV1 (a) (D'après Wyler *et al.*, 2011) ; **C21ORF70 (b)** (D'après Zemp *et al.*, 2014) et **RIO1(KD) (c)** (D'après Widmann *et al.*, 2012)

La composition en ARNr de particules pré-40S a aussi été déterminée par northern blot et 3'RACE par Marie-Françoise O'Donohue (**Figure 34**). Ces résultats indiquent que ces particules contiennent exclusivement du pré-ARN 18S-E dont l'extrémité 3' a été maturée par une exonucléase, comme attendu des particules principalement cytoplasmiques (Preti *et al.*, 2013). Les particules LTV1 sont constituées du pré-ARNr 18S-E dont l'extrémité comprend 5 à 35 nucléotides.

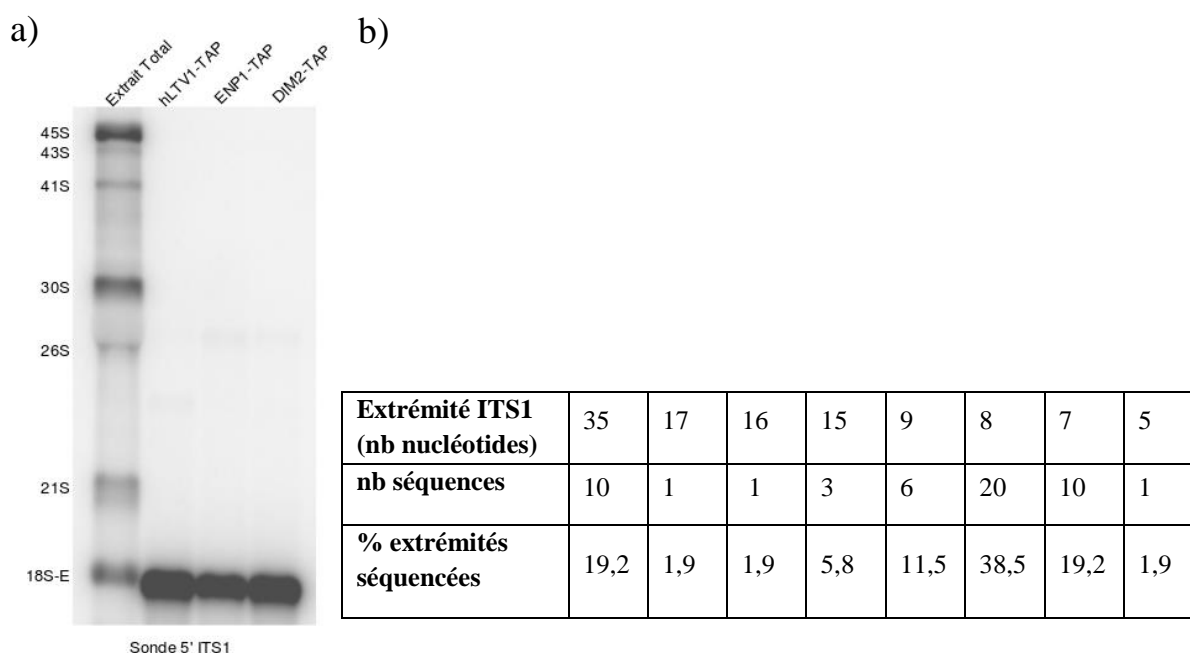


Figure 34 : Composition en ARNr des particules pré-40S purifiées en étiquetant soit LTV1, ENP1 ou DIM2. a) Analyse des ARNr contenus dans les particules LTV1, ENP1 et DIM2 par northern blot. Ces précurseurs de la petite sous-unité sont constitués du pré-ARNr 18 S-E (Marie Françoise O'Donohue). b) Etude de l'extrémité 3' du pré-ARNr constituant les particules LTV1 par des expériences de 3'RACE. Les particules LTV1 présentent pré-ARNr dont l'extrémité 3' comprend entre 5 et 35 nucléotides de l'ITS1. Des extrémités plus courtes ne peuvent pas être détectées dans cette expérience

A l'issue de leur purification, la concentration en ARN des solutions contenant les différentes particules pré-40S est mesurée grâce à un nanodrop. Celle-ci varie typiquement entre 25 ng. μl^{-1} et 70 ng. μl^{-1} (**Tableau 3**). Le rendement de purification des particules RIO1(KD) est plus faible que les autres. Ceci s'explique notamment par la stratégie de purification employée : on isole ici des particules pré-40S associées à une protéine mutante, bloquées à un stade tardif de maturation (cf matériel et méthode).

	ENP1	C21ORF70	DIM2	LTV1	RIO1(KD)
Concentration initiale en ng. μl^{-1}	60	40	60 ; 70	55 ; 70	25
Nombre de populations visible à l'œil	3	2	2	1	1

Tableau 3: Concentration et nombre populations distinguables après coloration négative des différentes particules pré-40S.

Nous avons vérifié si ces différentes particules étaient utilisables pour une analyse structurale en cryo-MET. Pour cela, les différents complexes ont été observés par MET après coloration négative, à une concentration de 10 ng. μl^{-1} . Pour chacune de ces particules pré-40S, la morphologie des complexes et la monodispersité des échantillons ont été inspectées. Des images typiques en coloration négative sont présentées dans la **Figure 35**. En général, toutes les solutions observées révèlent des particules « isolées » sur les grilles, mais également une forte propension à former des agrégats. Dans l'ensemble, ces préparations présentent un degré de monodispersité en adéquation avec une étude structurale par cryo-MET 3D.

Une analyse visuelle montre que les préparations purifiées en utilisant C21ORF70, ENP1 et DIM2 comme appât présentent des particules ayant plusieurs types de morphologies. Pour les particules purifiées par DIM2 et par C21ORF70, on peut distinguer deux types de particules, l'une ayant une forme globulaire, avec des dimensions similaires à celle d'une particule 80S mature (30 nm de diamètre), et l'autre ayant une forme allongée, similaire à la petite sous-unité mature en terme de taille et de morphologie. Pour les particules ENP1, on trouve ces deux types de morphologies, mais également un troisième type de particules, avec une forme en « collier de perles ».

Les précurseurs de la petite sous-unité purifiés en utilisant LTV1 ou RIO1(KD) comme appât ne présentent qu'un seul type de particules, dont les dimensions et la forme allongée est très proche de celle des petites sous-unités ribosomiques matures.

Ces derniers échantillons paraissent les plus simples à caractériser d'un point de vue structural. Nous avons donc focalisé nos travaux sur l'analyse des particules purifiées par LTV1 et RIO1(KD) étiquetés. Les particules purifiées en étiquetant HAST-LTV1 et RIO1(KD)-StHA seront nommées particules LTV1 et RIO1(KD) respectivement dans la suite du manuscrit.

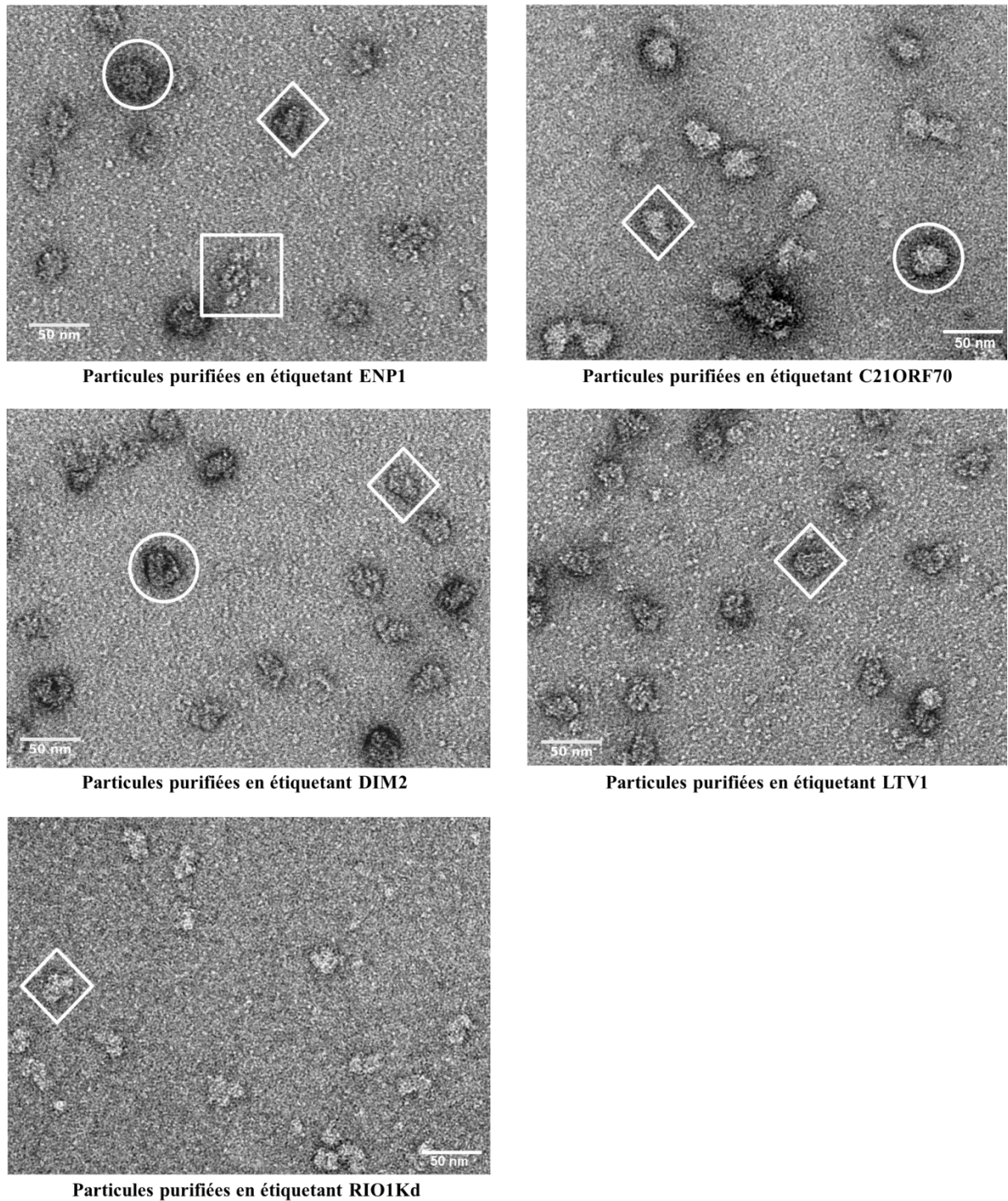


Figure 35: Observation des différentes particules pré-40S après coloration négative.

Les particules encadrées dans des losanges ont des morphologies similaires à celle de la petite sous-unité ribosomique. Les particules présentes dans des cercles et des rectangles sont des exemples de complexes dont la forme est globulaire et en collier de perle respectivement. Les particules pré-40S, purifiées en utilisant RIO1(KD) comme appât, sont traitées avec de la glutaraldéhyde (0.1%).

II- Mise en place des conditions de congélation

Après cette étape de choix des particules, la mise en place et l'optimisation des conditions de congélation des échantillons pour la cryo-MET a représenté une part importante de mes travaux.

J'ai tout d'abord testé différentes dilutions, et déterminé que la concentration optimale pour l'observation en cryo-MET est de $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Au-delà de cette concentration, l'agrégation des particules est trop importante pour pouvoir les distinguer les unes des autres sur les images. Les premiers essais de congélation indiquaient que la répartition des particules dans la glace vitreuse n'était pas homogène. Suivant les différentes grilles, les particules pouvaient soit être agrégées au centre des trous, soit présenter une meilleure affinité pour le carbone et être donc totalement absentes des trous.

J'ai testé différents types de grilles (Lacey, Cflat, Quantifoil avec différents diamètres de trous et espace entre ces trous). Malgré l'obtention d'une répartition correcte des particules dans la glace, les grilles Lacey ont été éliminées de l'étude du fait de la nécessité d'avoir des grilles à trous réguliers pour l'automatisation de l'acquisition d'images. Même en essayant divers temps de blot, les grilles C-Flat ont toujours présenté une épaisseur de glace trop importante pour pouvoir voir les particules pré-40S. Enfin, parmi les différentes grilles Quantifoil testées, la meilleure répartition des particules a été obtenue pour des grilles R2/1 et R2/2. Ces grilles sont constituées de trous de $2 \mu\text{m}$ de diamètre, et la distance des trous est respectivement de 1 ou $2 \mu\text{m}$.

Sur ces deux types de grille, la répartition des particules dans la glace n'était pas très reproductible, ni très homogène. J'ai alors testé différents traitements pour les rendre soit hydrophobes (par des traitements au chloroforme pendant 30 min ou à l'éthyle d'acétate durant 2min) soit hydrophiles (ionisation pendant différents temps avec ou sans traitement à l'acétate de magnésium à une concentration de 2mM). De plus, le traitement à l'éthyle d'acétate ou au chloroforme permet d'éliminer les résidus présents sur les grilles dus à leur production et ainsi de réduire leur épaisseur. Ainsi les grilles traitées possèdent une épaisseur de 10-12 nm au lieu de 20 nm pour les non traitées. J'ai également testé plusieurs temps d'ionisation. Des différents essais sont résumés dans le **Tableau 4** ci-dessous.

Traitement des grilles	Condition d'ionisation	Etat de la grille	Temps de blot	Conclusion
Ethyle Acétate 2min/ MgCl ₂ 2mM 60s	2min/face	Hydrophile, chargée positivement	3.6s	Répartition hétérogène : tendance à agréger, glace légèrement épaisse
Ethyle Acétate 2min	2min/face	Hydrophile, chargée négativement	3.6s	Majorité des trous vides (trop sec), peu d'agrégats
Ethyle Acétate 2min	Aucune	Hydrophobe	2s	Majorité des trous vides (trop sec), la glace au centre des carreaux est trop épaisse = trous difficiles à voir
Chloroforme 30 min	Aucune	Hydrophobe	2s	Glace trop épaisse
Chloroforme 30 min	2min/face	Hydrophile, chargée négativement	4.2s	Répartition hétérogène des particules: tendance à agréger, glace trop épaisse
Aucun	2min/face	Hydrophile, chargée négativement	4s	Glace trop épaisse
Aucun	1min/face	Hydrophile, chargée négativement	2.3s	Présence d'un grand nombre d'agrégats

Tableau 4 : Exemple de tests effectués lors de la mise en place des conditions de congélation des particules pré-40S.

Ces essais m'ont permis d'optimiser différents paramètres pour pouvoir observer des particules pré-40S isolées dans la glace vitreuse (**Tableau 5**).

Type de grilles	Traitement des grilles	Durée d'ionisation des grilles	Durée de blot	Dépôt de l'échantillon	Temps extérieur
Q R2/1 ou R2/2	Aucun	30 secondes	1,8s à 2,1s	3,5µl	Humide

Tableau 5: Paramètres utilisés pour des conditions de congélations optimales des particules pré-40S.

Si ces conditions finales apparaissent relativement classiques, la reproductibilité des grilles, malgré l'utilisation d'un automate de congélation, était cependant faible. Ces essais m'ont permis d'observer que l'étape capitale pour obtenir des grilles utilisables pour l'analyse d'images est de déposer l'échantillon sur la grille extemporanément après l'ionisation. D'autre part, une autre observation empirique est que les meilleures grilles ont été systématiquement été obtenues lorsque le temps extérieur était humide.

En outre, la répartition des particules n'a jamais été homogène sur l'ensemble de la surface des grilles. Les particules pré-ribosomiques se sont donc révélées être des échantillons difficiles à manipuler. Le rendement de la production des grilles de cryo-MET pour l'acquisition des images des particules pré-40S est donc très faible. Environ une grille sur huit était exploitable.

III- Cryo-MET « haute résolution »

L'objectif de ma thèse était de déterminer la structure 3D des particules pré-40S purifiées en étiquetant LTV1 et RIO1(KD), et ce à la meilleure résolution possible. Il était donc essentiel d'acquérir des images sur des cryo-microscopes les plus performants possibles, non localisés à Toulouse. Pour cela, nous avons mis en place une stratégie « haute résolution » illustrée dans la **Figure 36**.

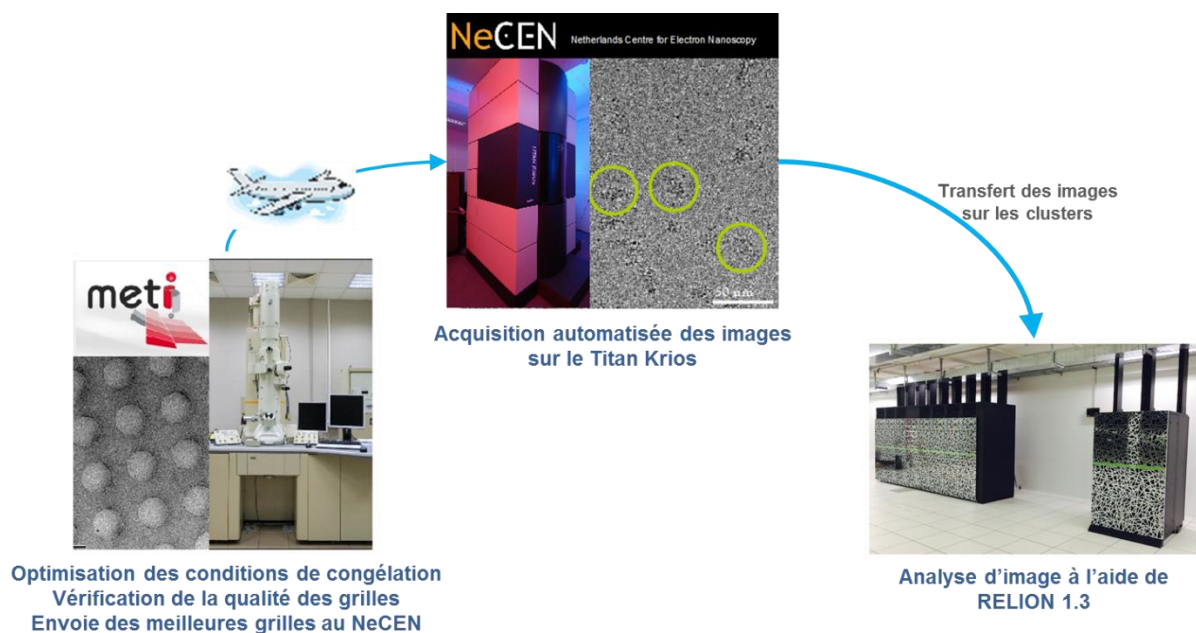


Figure 36: Stratégie mise en place pour une analyse structurale haute performance.

Les grilles sont préparées sur la plateforme de microscopie électronique locale (METI) et leurs qualités sont vérifiées par observation avec le MET JEOL JEM 2100.

Pour cela, la grille était d'abord visualisée à faible grossissement (en search en mode low dose) afin d'avoir une idée globale de l'épaisseur de la glace. Ensuite, trois à quatre zones de chaque grille étaient observées à plus fort grossissement, afin d'inspecter l'épaisseur de la

glace et la répartition des particules dans celle-ci. Les conditions de congélation étant peu reproductibles, il était nécessaire de vérifier chacune des grilles produites. Ce temps de vérification est donc loin d'être négligeable.

A l'issue de cette vérification systématique, les meilleures grilles étaient ensuite récupérées et stockées dans de l'azote liquide. La récupération est une étape difficile, et les grilles peuvent être facilement tordues du fait de leur manipulation avec les pinces. D'autre part, les transferts successifs entre les divers conteneurs peuvent être source de contamination des grilles.

Un inconvénient de cette approche est la durée entre la production des grilles et l'obtention du temps de faisceau pour la prise d'image au NeCEN. Cette durée est variable et peut être de quelque mois. Les grilles stockées dans le tank d'azote liquide peuvent subir de la contamination. Cette contamination est à l'origine d'une forte suppression d'images acquises automatiquement (**Figure 37**).

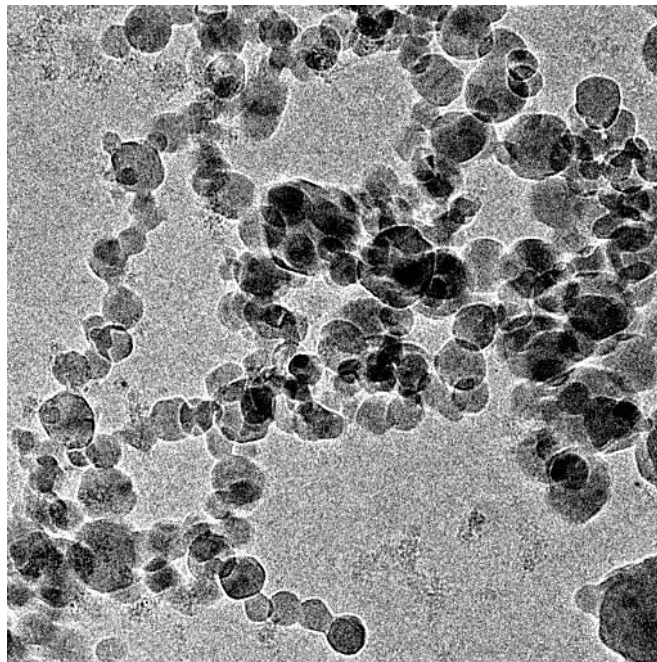


Figure 37: Exemple de contamination présente sur les images.

L'image sera éliminée lors de la visualisation des micrographes.

Pour leur expédition, les grilles sont envoyées au NeCEN à l'aide d'un dry shipper préalablement refroidi par de l'azote liquide. Au total, quinze grilles de particules LTV1 et quatre grilles de particules RIO1(KD) ont été expédiées au NeCEN par cette méthode.

Après leur acquisition, les images sont transférées sur un disque dur externe, qui est expédié au laboratoire. Le jeu de données est alors copié (au cours de la nuit) sur le cluster local et sur le supercalculateur Eos pour l'analyse d'images. Un temps de calcul de 100 000 heures pour l'année 2014 et de 300 000 pour l'année 2015 nous a été accordé sur Eos. Sur ce cluster, la consommation des ressources correspond au nombre de nœuds multiplié par le nombre de cœurs par nœuds (20) et par le temps effectif du calcul. L'avantage d'Eos comparé au cluster local est sa rapidité et sa puissance, cependant le temps d'utilisation est décompté. Il a donc été nécessaire d'optimiser l'utilisation relative des deux clusters. Le pré-traitement a été effectué sur le cluster local, alors que les calculs nécessitant un grand nombre de nœud, notamment la classification 3D, ont été réalisés sur EOS. Afin d'optimiser l'utilisation des nœuds d'Eos, et de diminuer le temps de calcul, j'ai testé chacun des programmes utilisés pour l'analyse d'images en faisant varier différents paramètres (nombre de nœuds notamment). Les paramètres optimaux pour chacun de ces programmes sont résumés dans le **Tableau 6**.

	Pré-traitement (ex : Estimation de la CTF)	Classification 2D	Classification 3D	Raffinement 3D
Type de cluster	LOCAL	EOS	EOS	EOS
Nombre de nœuds	6	10	12	10
Nombre de taches par nœuds	16	10	4	4

Tableau 6: Paramètres utilisés pour l'analyse d'images des particules RIO1(KD).

B- Analyse structurale de particules pré-40S intermédiaires LTV1

En janvier 2014, nous avons obtenu 96h de temps de faisceau sur le Titan Krios I du NeCEN. Ceci nous a permis d'acquérir un jeu de données de 10 422 images de champs de particules (ou frames) de LTV1. Ce jeu de données, représentant environ 400 Go, a été transféré sur les clusters de calculs afin de pouvoir être analysé.

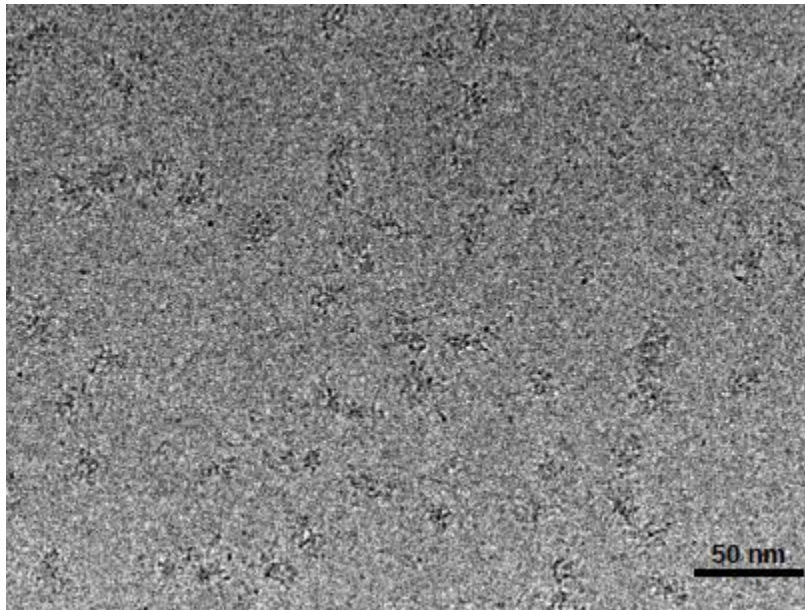


Figure 38 : Champs de particule pré-40S LTV1 observés par cryo-MET (sur le Titan Krios I du NeCEN)

I- Pré-traitement

Un premier tri visuel nous a permis d'éliminer les frames non utilisables (trous vides, zones de contamination majoritaires). A la suite de cette étape, la CTF des frames restants a été estimée grâce au logiciel CTFFIND3. Un deuxième tri visuel, basé sur la qualité des CTF des frames, a sélectionné 3812 frames. Sur ces frames, les coordonnées des particules à extraire ont été sélectionnées manuellement avec le programme e2boxer de la suite EMAN2. Grâce à cette approche, un total de 103 247 particules pré-40S a été obtenu. Ces particules ont ensuite été extraites dans des boîtes de 384 x 384 pixels, réduites d'un facteur 2 (binning de 2) et normalisées grâce à la suite de programmes RELION1.3.

II- Classification 2D : stratégie « non restrictive »

Afin d'éliminer les particules aberrantes sélectionnées à l'étape ci-dessus, une classification 2D a été réalisée par RELION1.3 afin de générer 500 classes de particules. Les images correspondant à la moyenne de chacune des classes ont ensuite été visualisées, ce qui a permis de ne retenir que les images n'appartenant qu'aux « meilleures classes » 2D, c'est à dire celles qui présentent une taille et une forme globalement similaires aux particules pré-40S observées dans la glace, et un niveau de détail relativement élevé. En première instance, nous avons effectué un seuillage assez large. Dans cette stratégie « non restrictive », nous

n'avons éliminé que les particules comprises dans les classes aberrantes, et avons conservé celles appartenant à des classes 2D bruitées mais présentant une forme globalement similaire à une petite sous-unité ribosomique. Ainsi, nous avons retenu 318 classes (**Figure 38**), ce qui représente un total de 84 813 particules.



Figure 39: Classification 2D des particules en 500 classes : stratégie dite non restrictive.

Les moyennes de chacune des classes sont affichées par ordre décroissant de cohérence entre les particules comprises dans la classe et leur moyenne. Les particules appartenant aux classes entourées en rouge sont conservées pour l'analyse d'images. Un total de 84 813 particules a été retenu par cette approche.

II.1-Calcul d'une structure 3D consensus

Avec le programme Relion_refine, nous avons ensuite calculé une reconstruction 3D incluant les 84 813 particules sélectionnées ci-avant. Nous avons, pour cela, utilisé comme modèle initial la structure 3D de la petite sous-unité ribosomique humaine (Anger *et al.*, 2013, pdb accession code : 4V6X), à laquelle nous avons appliqué un filtre passe-bas à 50 Å de résolution, afin de limiter les biais de référence. La structure 3D consensus que nous obtenons est présentée **Figure 39**.

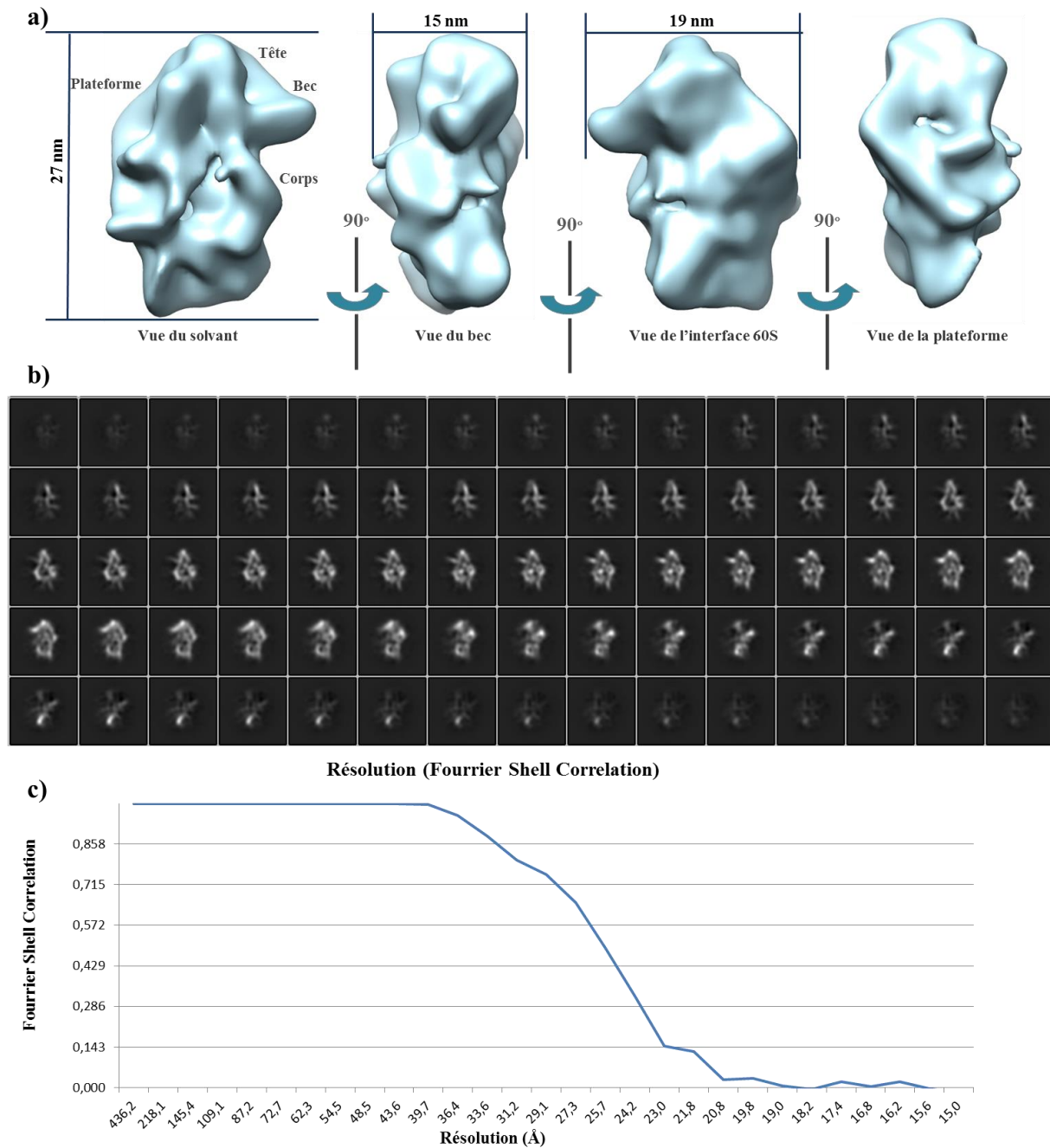


Figure 40: Structure 3D consensus de la particule pré-40S LTV1 (Stratégie non restrictive).

a) Les vues de surface de la reconstruction 3D sont représentées et tournées de 90° et les domaines caractéristiques de la particule pré-40S : bec, tête, plateforme, corps sont indiqués. b) les sections de la structure 3D de la particule pré-40S LTV1. c) Estimation de la résolution à environ 22.9 Å.

Cette structure présente une morphologie et des dimensions globalement similaires à celle de la structure de la sous-unité 40S mature. On peut y distinguer une tête, terminée par un bec, et un corps, mais les pieds gauche et droit ne sont cependant pas définis. La résolution de cette structure, annoncée en fin de programme Relion_refine, est de 22.9 Å. La visualisation des sections de cette structure 3D (**Figure 39**) montre en effet peu de détails. En

particulier, le pré-ARNr, qui forme l'ossature de cette structure, et qui est plus dense aux électrons que les protéines, devrait, s'il présentait une conformation stable, former des structures nettement visibles et détaillées. Ceci ne semble pas être le cas dans cette structure de particule pré-ribosomique.

Cette structure de particule pré-40S intermédiaire devrait présenter des densités supplémentaires par rapport à la structure mature, du fait de la présence des co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S. Or, la comparaison de cette structure de particule pré-40S intermédiaire avec celle de la petite sous-unité ribosomique mature, filtrée à une résolution équivalente, est peu concluante. Le sillon de l'ARNm, entre la tête et le corps, apparaît plus rempli que pour la particule 40S mature. D'autre part, il semble y avoir une densité supplémentaire du côté de l'interface avec le solvant, aux environs des sites de liaison de l'ARNt, pouvant refléter la présence d'un co-facteur de maturation. De fait dans la structure 3D de la particule pré-40S de levure, les co-facteurs de maturation Tsr1 et Rio2 ont été localisés à cet emplacement (Strunk *et al.*, 2011), et ces données de MET ont par ailleurs été confirmées par des expériences de CRAC (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014).

Dans le cas de notre structure 3D, cette zone de densité supplémentaire a un volume trop petit pour pouvoir accommoder une protéine de 27 à 135 kDa, gamme de poids moléculaire des co-facteurs associés à la particule pré-40S intermédiaire. De plus, nous avons effectué des essais de rigid body docking des structures atomiques de Tsr1 (emdb accession code : 1922) et Rio2 (pdb accession code : 4GYI) dans cette zone de densité supplémentaire, avec le logiciel CHIMERA. Le positionnement manuel initial que nous avons effectué confirme qu'aucune de ces protéines ne peut rentrer entièrement dans cette zone. Ceci suggérerait que les zones de densité supplémentaires sont partielles, et pourrait refléter 1) une association sous-stoechiométrique des co-facteurs de maturation, et/ou 2) une grande flexibilité des co-facteurs de maturation autour d'un point d'ancrage « fixe », visualisé par cette zone de densité supplémentaire partielle.

L'ensemble de ces observations (résolution moyenne, ossature et densité supplémentaires) semble indiquer que la structure consensus que nous avons calculée

regroupe des particules dont la structure est très hétérogène. Afin d'estimer le degré d'hétérogénéité de ces particules, nous avons ensuite réalisé des expériences de classification 3D.

II.2- Classifications 3D

Toutes les molécules biologiques observables en cryo-MET présentent de l'hétérogénéité structurale. Ce phénomène peut être causé soit par 1), un certain degré de flexibilité de leurs structures, et/ou 2), par des différences de composition biochimique (par exemple, une association sous-stoechiométrique de certains composés) entraînant des différences conformationnelles. Dans le premier cas, la structure des molécules oscille entre plusieurs états correspondant à des minima d'énergie, l'hétérogénéité structurale est dite continue, et on ne pourra pas distinguer de conformères distincts par classification 3D des particules. Au contraire, dans le deuxième cas, la population de particules observées est un ensemble de structures avec ou sans le composé associé de manière sous-stœchiométrique, il est donc possible de distinguer des conformères structuraux dans cette population. Dans ce cas, on parle d'hétérogénéité discrète. C'est par exemple le cas de population de ribosomes matures associés ou non au complexe d'élongation de la traduction EF-G (Scheres *et al.*, 2007). Enfin, bien souvent, les structures des macromolécules d'intérêt observées en cryo-MET présentent les deux types d'hétérogénéité, à des degrés variables.

Afin d'appréhender le degré d'hétérogénéité structurale des 84 813 particules cytoplasmiques intermédiaires LTV1, nous avons donc mené différentes expériences de classification tridimensionnelle.

II.2.1- Estimation du nombre possible de conformères structuraux

Nous avons tout d'abord tenté d'estimer le nombre possible de conformères structuraux présents dans la population de particules LTV1 imagées. Pour cela, nous avons utilisé le programme Relion_Refine, en utilisant comme modèle initial la structure consensus obtenue ci-avant, filtrée à 40 Å de résolution. Nous avons décidé d'imposer un nombre croissant de classes 3D générées par ce programme, K allant de 4 à 15. Ce dernier chiffre a été choisi afin de pouvoir distinguer, le cas échéant, 15 conformères différents, tout en conservant un

nombre raisonnable de particules par classe (ie., ≥ 5000) si la répartition des particules dans les classes était homogène.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le **Tableau 7**, et illustrés dans la Figure 40.

Nombre de classes	Répartition des particules dans les classes	% de particules non stablement associées à un modèle	Résolution max (A)	Nb de classes redondantes
4	Homogène (25 % \pm 2%)	26	22,9	0
5	Homogène (20 % \pm 2%)	22	22,7	0
6	Homogène (16.7 % \pm 1,3%)	15	19,2	0
8	Homogène (12 % \pm 1,1%)	37	25	0
15	Homogène (6.67 % \pm 0,6%)	30	27,2	0

Tableau 7: Essais de classifications 3D pour estimer le nombre de conformères structuraux présents dans le jeu de données analysé. Le pourcentage de particules non stablement associées à un modèle représente le critère « *_rlnChangesOptimalClasses* » à la dernière itération de la classification 3D.

En aucun cas nous n'avons pu trouver, parmi les classes 3D générées, de structures 3D redondantes, ce qui suggère que l'hétérogénéité structurale des particules LTV1, si elle est discrète, est très élevée. Ces particules pourraient en effet adopter plus de 15 conformations différentes. En outre, la répartition des particules dans les classes est toujours homogène, et le nombre de particules changeant de classe d'une itération à la suivante reste élevé en fin de processus (**Tableau 7**). Ceci suggère que quelque soit le nombre de classes 3D demandées, le programme ne parvient pas à générer de conformères distincts. Ainsi, le jeu de données de particules pré-40S LTV1 analysé ici semble présenter une hétérogénéité structurale continue.

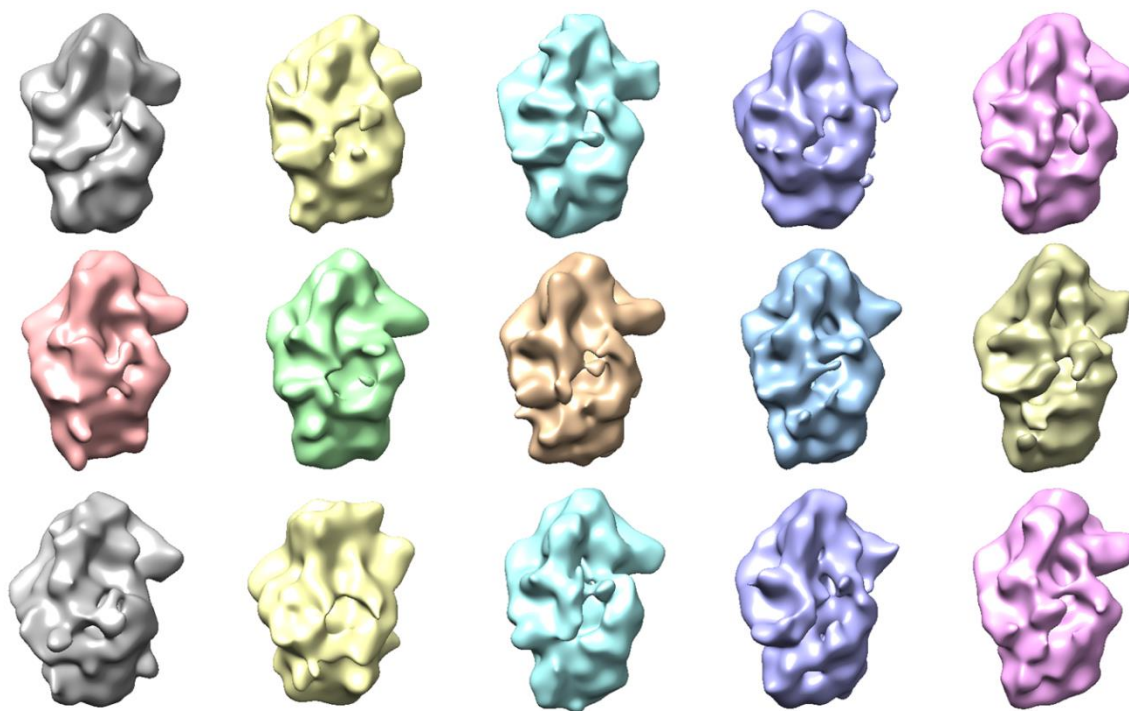


Figure 41: Exemple de classification 3D des 84 813 particules LTVI, avec un nombre de classes $K=15$.
 Les vues de surface des 15 variants structuraux générés sont représentées selon une vue du solvant. Comme dans les autres expériences de classification 3D, nous n'avons pas pu regrouper ces structures en classes 3D similaires.

II.2.2- Réplication de classifications 3D

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite répliqué une expérience de classification 3D.

Le programme de classification 3D, dans l'itération initiale, détermine l'orientation de toutes les particules grâce à un modèle 3D grossier, puis sépare les particules « orientées » en K classes, et ce de manière aléatoire. Les K structures 3D ainsi générées vont servir de référence pour déterminer l'orientation de toutes les particules dans l'itération de calcul suivante. Ainsi, les K structures se verront être raffinées, et la répartition des particules en K classes sera proportionnelle au poids relatif du conformère dans la population totale (cf. Matériel et Méthodes).

Dans le cas d'une population présentant une hétérogénéité structurale discrète, par exemple, une population de particules présentant 75 % de conformations « A » et 25 % de conformations « B », une classification 3D en 4 classes structurales va générer 3 classes de

structures 3D similaires, représentant la conformation A, et 1 classe représentant la conformation B. Si l'on réplique cette expérience, on retrouvera des résultats identiques.

Dans le cas d'une population présentant une hétérogénéité structurale continue, une classification 3D en 4 classes structurales va générer 4 classes présentant des différences morphologiques. Cependant, la répétition de cette expérience, du fait de l'étape initiale de répartition aléatoire des particules, générera 4 classes structurales différentes du premier réplikat.

Nous avons donc effectué deux expériences identiques (appelées Réplicats a et b) de classification 3D. Nous avons utilisé comme modèle initial la structure consensus de la particule pré-40S LTV1, filtrée à 40 Å de résolution, afin de générer 4 classes tridimensionnelles de particules. Les structures 3D obtenues dans les deux réplicats sont présentées dans la **Figure 41**. La comparaison des structures obtenues montre qu'elles ne sont pas similaires d'un réplikat à l'autre. Dans les deux cas, la répartition des images dans les classes reste homogène (autour de 25% par classe), et le nombre d'images n'appartenant pas clairement à une classe reste élevé tout au long des itérations (autour de 20 % d'images changeant de classe lors de la dernière itération).

Ces résultats confirment donc notre hypothèse selon laquelle les particules incluses dans ce jeu de données présentent une forte hétérogénéité structurale, qui semble provenir en grande partie de la flexibilité intrinsèque de ces molécules.

D'autre part, la comparaison des classes 3D entre elles et entre réplicats montre que si les diverses structures 3D générées ont des détails structuraux très variables, on peut cependant distinguer quatre zones de variation constante. Ces zones sont situées autour du bec, de la région du corps autour de l'extrémité 5' de l'ARNr, de la plateforme et de l'interface avec la 60S au niveau du site A de liaison de l'ARNt (**Figure 41**). Ceci suggère que ces zones pourraient subir des réarrangements structuraux plus fréquents ou plus amples que les autres parties de la structure 3D de la particule pré-40S LTV1.

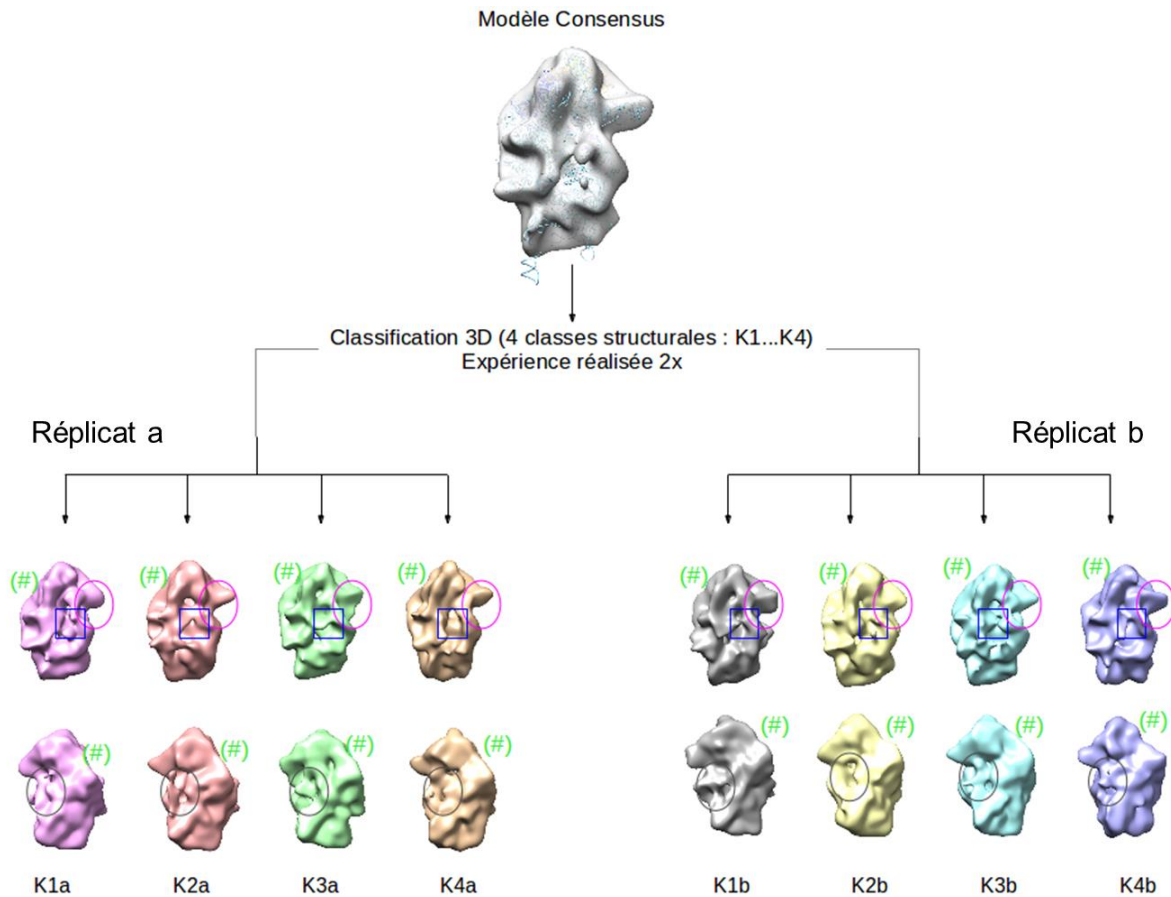


Figure 42: Les particules LTV1 présentent un fort degré d'hétérogénéité structurale continue.

Les vues de surface des structures 3D sont présentées selon une vue du solvant (panel du haut) ou de l'interface avec la sous-unité 60S (panel du bas). On distingue des zones de variabilité constante entre les différentes structures obtenues, localisées au niveau du bec (ovale magenta), de l'extrémité 5' de l'ARNr (carré bleu), de la plateforme (# vert) et du site A de liaison de l'ARNt (ovale gris).

III- Classification 2D : stratégie «restrictive»

Afin de tenter de réduire l'hétérogénéité, nous avons repris les résultats de la classification 2D, et avons effectué une sélection plus restrictive des classes conservées pour l'analyse d'images : nous n'avons conservé que les 137 meilleures classes parmi les 500 générées, soit un total de 54 436 particules (**Figure 42**).

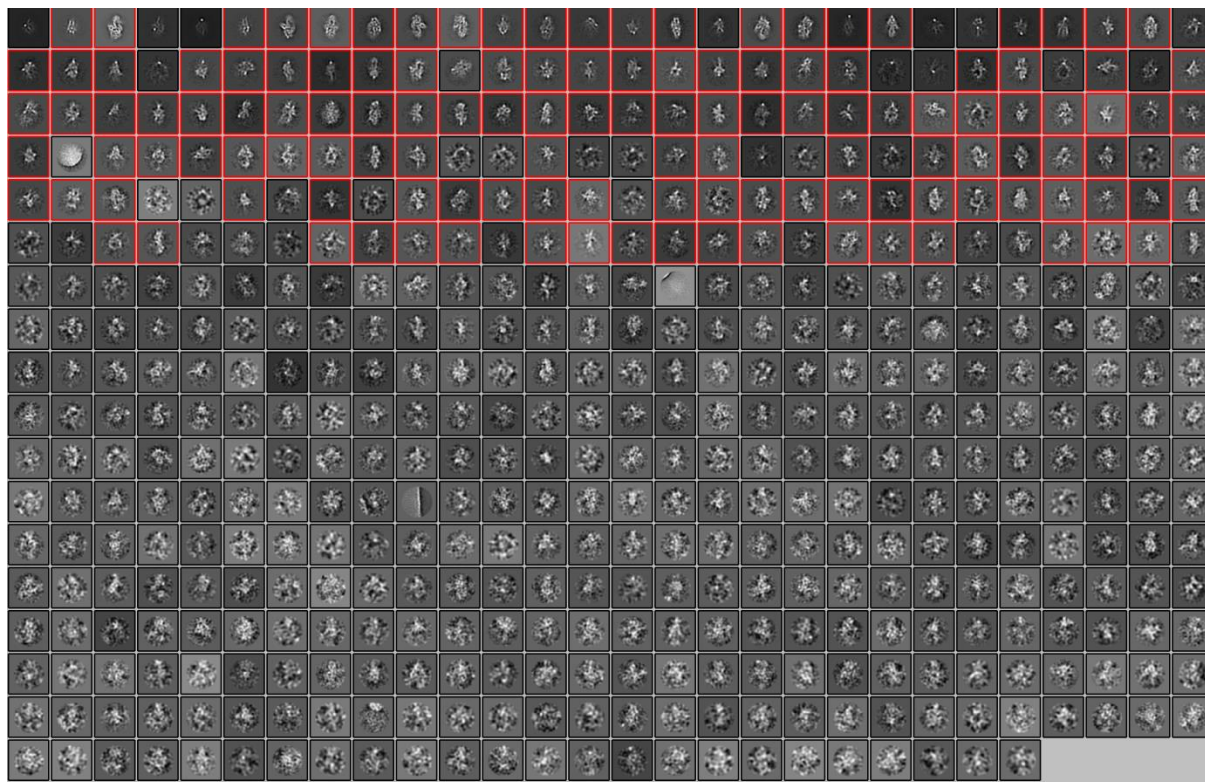


Figure 43: Classification 2D des particules en 500 classes.

Les particules appartenant aux 137 classes entourées en rouge ont été conservées pour cette deuxième tentative d'analyse d'images. Un total de 54 436 particules a été retenu par cette approche dite « restrictive ».

III.1- Calcul d'une structure 3D consensus

Grâce au programme Relion_refine, nous avons ensuite calculé une reconstruction 3D incluant les 54 436 particules sélectionnées ci-dessus. Comme dans la stratégie non restrictive, nous avons utilisé comme modèle initial la structure 3D de la petite sous-unité ribosomique humaine (Anger *et al.*, 2013, pdb accession code : 4V6X), à laquelle nous avons appliqué un filtre passe-bas à 50 Å de résolution. La structure 3D consensus que nous obtenons est présentée **Figure 43**.

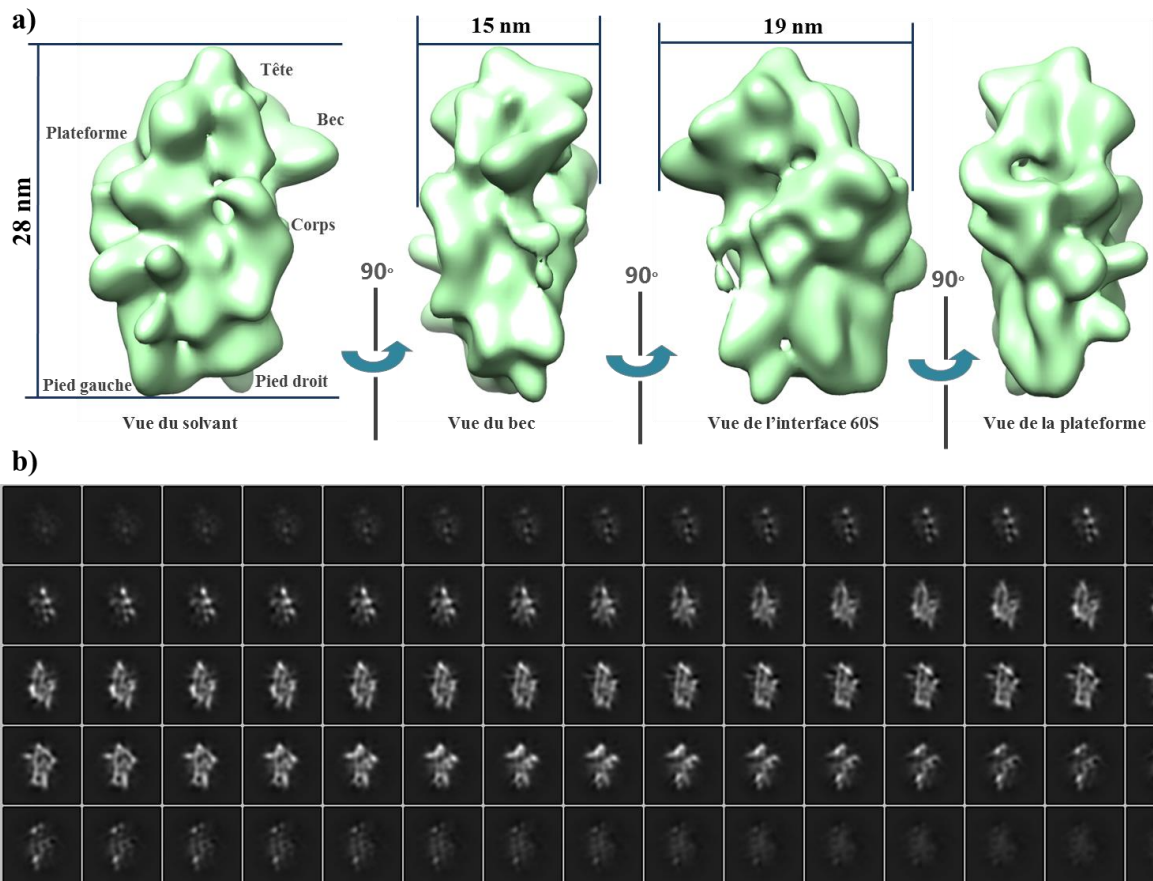


Figure 44: Structure 3D de la particule pré-40S LTV1. a) vues de surface. b) Sections de la structure 3D.

Comme dans la stratégie non restrictive, cette structure 3D présente une morphologie et des dimensions globalement similaires à celle de la structure de la sous-unité 40S mature. Sa résolution « brute », annoncée en fin de programme Relion_refine, est de 22.9 Å, comme la structure obtenue par la stratégie non restrictive (**Figure 43a**). Cependant, la visualisation des sections de la nouvelle structure 3D (**Figure 43b** et **44**) semble révéler un peu plus de détails que la structure obtenue par la stratégie non restrictive. Le corps et la région de la plateforme notamment semblent être mieux définis dans cette nouvelle structure (**Figure 44**).

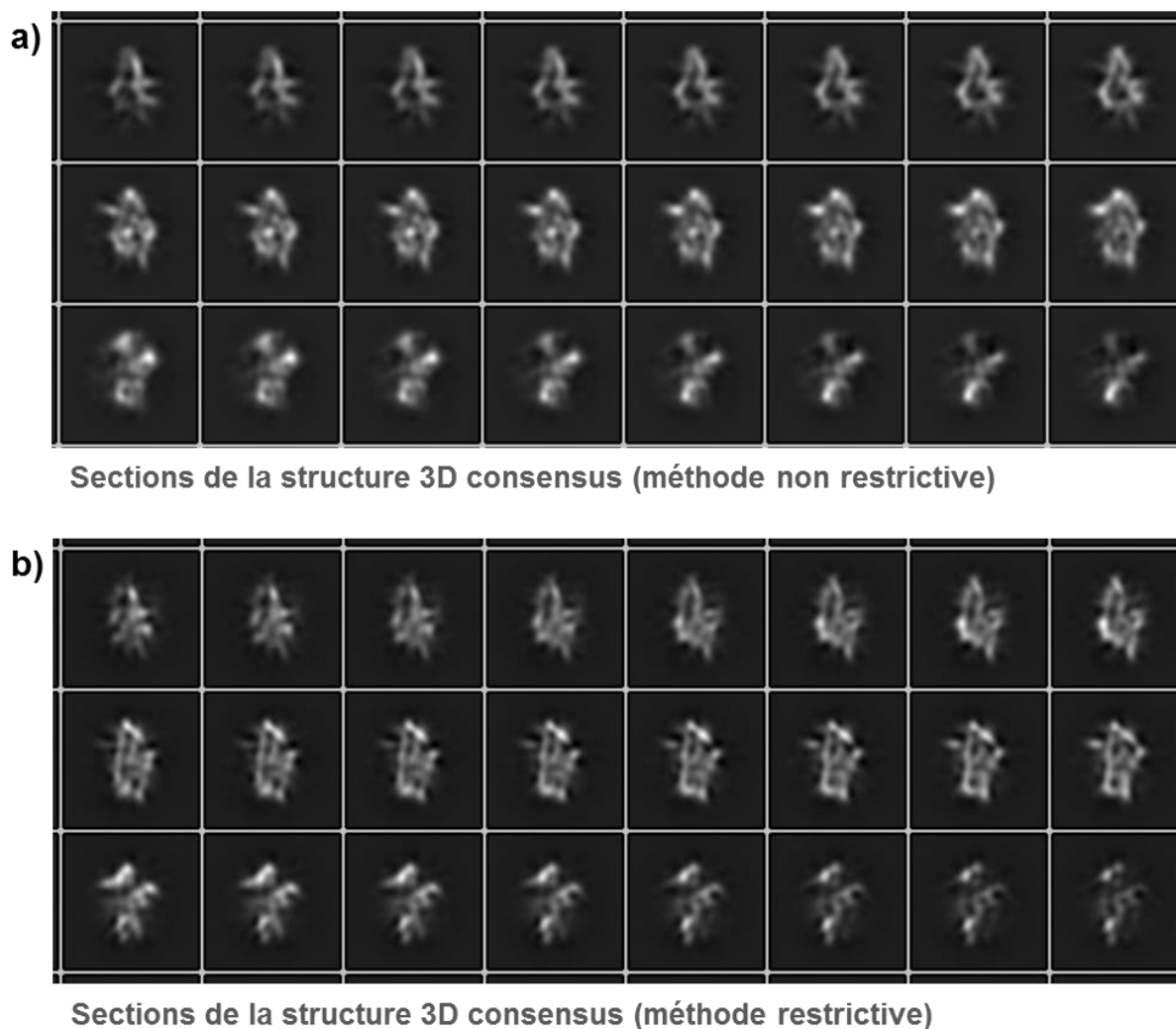


Figure 45: Section identiques des structures 3D consensus de la particule pré-40S LTV1 obtenue par la méthode dite non restrictive en a) et restrictive en b).

Afin d'essayer d'affiner les détails cette structure, nous l'avons alors soumise à une étape de post-traitement. Par cette opération, un masque binaire est tout d'abord appliqué à la structure 3D. La résolution de cette structure masquée est à nouveau calculée, puis un filtre passe-bande *ad hoc* est imposé à la structure 3D (cf. matériel et méthodes). La structure affinée est présentée **Figure 45** ; sa résolution est de 18 Å.

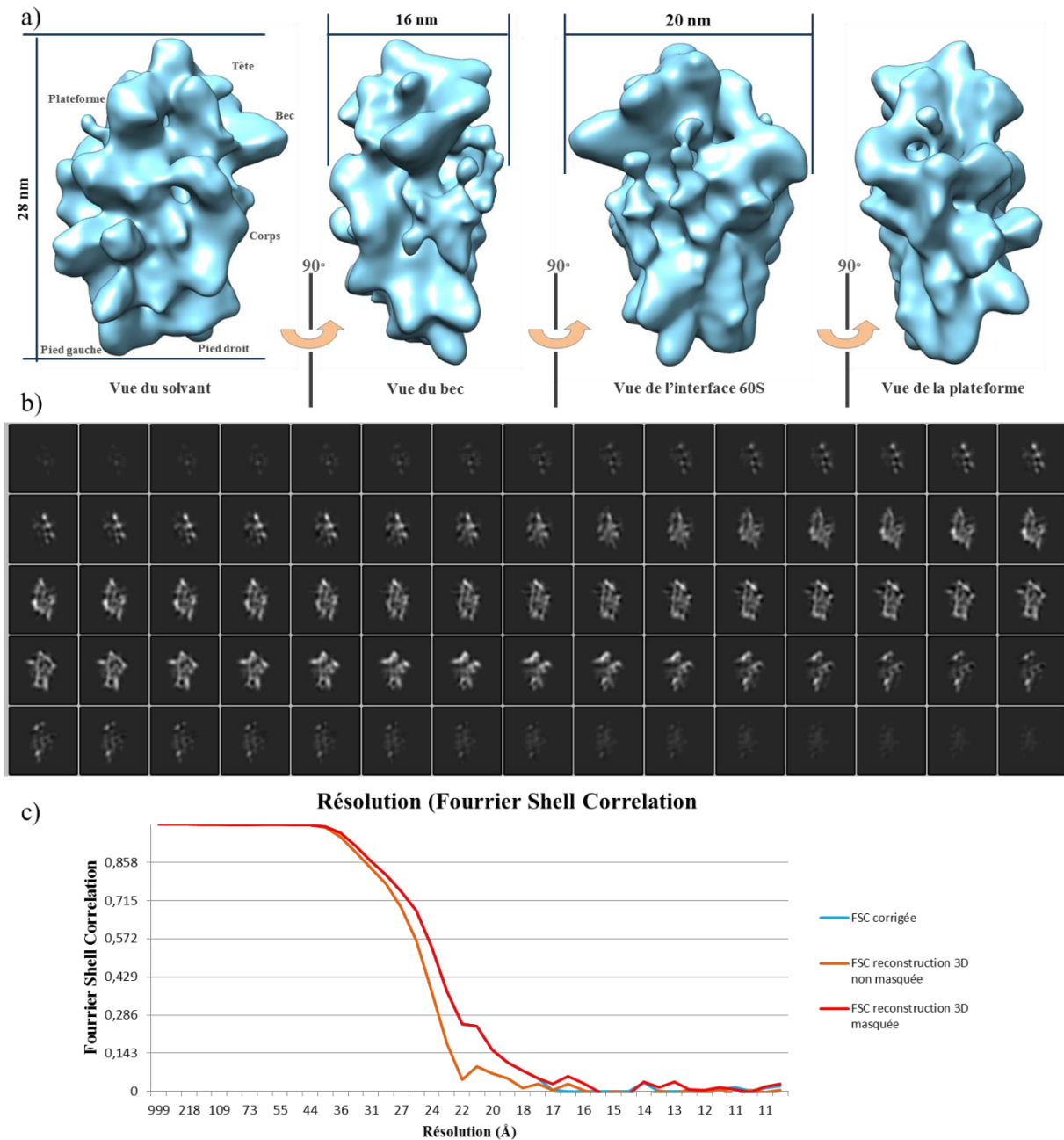


Figure 46: Structure 3D de la particule pré-40S LTV1. a) vues de surface. b) Sections de la structure 3D. c) Estimation de la résolution de la structure avant et après post-traitement (Résolution estimée à 19Å par le critère de gold standard FSC).

III.2- Analyse de la structure obtenue

Afin d'analyser la structure 3D de la particule pré-40S intermédiaire cytoplasmique présentée ci-dessus, nous l'avons comparée à deux autres structures 3D connues : celle de la petite sous-unité ribosomique humaine mature (Anger *et al.*, 2013) (code d'accession pdb :

4V6X), et celle de la particule pré-ribosomique de levure purifiée à un stade équivalent de maturation et déterminée par cryo-MET à 18 Å de résolution (Strunk *et al.*, 2011) (code d'accès EMDB : EMD_1927.map).

III.2.1- Comparaison à la structure de la sous-unité 40S mature humaine

Les particules pré-40S purifiées par LTV1 étiqueté contiennent 6 co-facteurs de maturation (Wylter *et al.*, 2011), stablement associés à un pré-ARNr 18S-E et toutes les RPS, à l'exception de RPS 10 et RPS 26 (**Figure 48** ; ces analyses par western blot ont été réalisées par Christian Montellose dans l'équipe du Pr. Ulrike Kutay). Afin de comparer les structures entre elles, nous avons tout d'abord enlevé ces deux RPS de la structure humaine mature. Nous avons ensuite ajusté cette nouvelle structure, filtrée à 21 Å de résolution, dans la carte de densité électronique de la particule pré-40S, par rigid body docking. Nous avons pour cela employé le logiciel CHIMERA. Cette opération nous a permis de mieux visualiser les similarités et les différences entre les deux modèles (**Figure 46**).

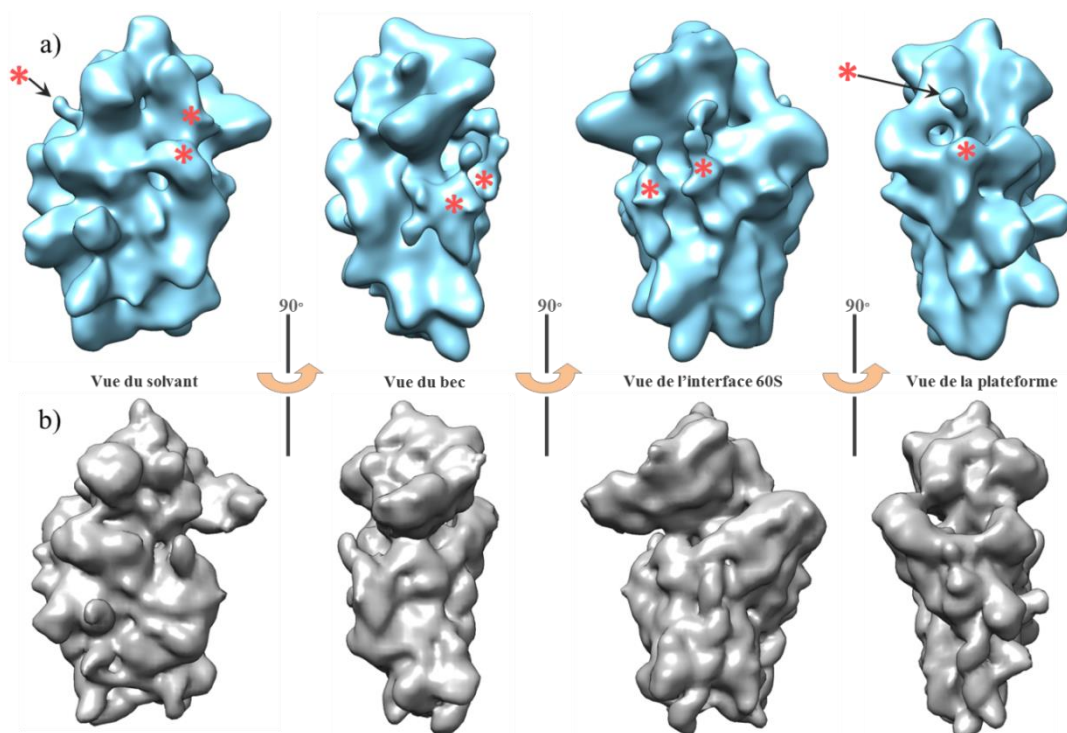


Figure 47: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S intermédiaires LTV1 et de la particule mature. En a). Les vues de surface de la structure 3D de la particule pré-40S LTV1 sont représentées en bleu, les densités supplémentaires sont indiquées par des astérisques et en b) les vues correspondantes de la petite sous-unité ribosomique sont représentées en gris foncé.

En général, on ne constate pas de changement conformationel majeur entre les deux structures, et le précurseur possède une morphologie globalement identique à la particule mature. Cependant, on peut noter des différences locales, principalement des densités supplémentaires sur la particule pré-40S par rapport à la particule mature.

Afin de mieux caractériser ces modifications, nous avons ensuite calculé une carte de différence entre la structure de particule pré-40S et celle de la petite sous-unité ribosomique, grâce à la commande `vop subtract` du logiciel CHIMERA (**Figure 47**).

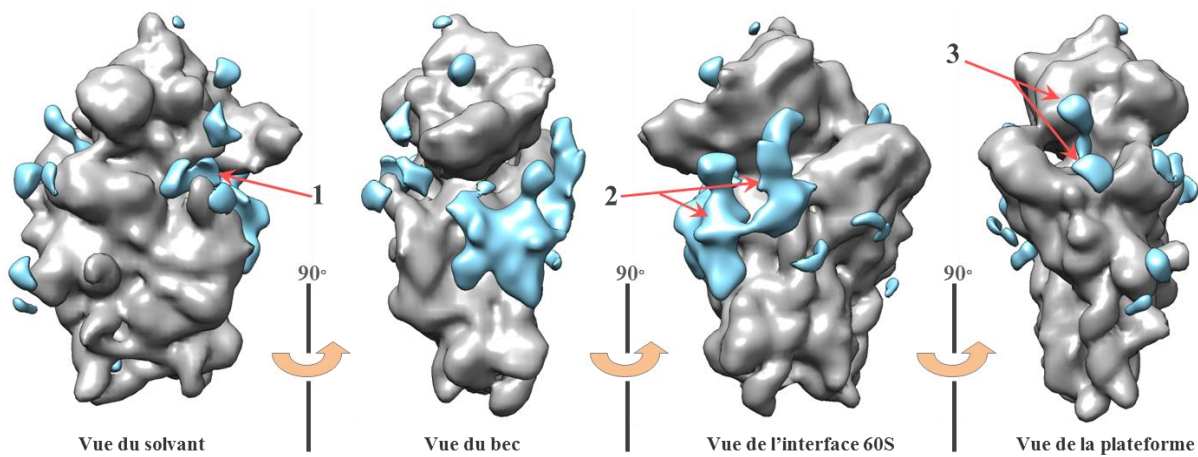


Figure 48: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S LTV1 et de la petite sous-unité. Les vues de surface de structures 3D de la petite sous-unité filtrée à 21 Å de résolution sont indiquées en gris foncé et la carte de différence entre les structures 3D est représentée en bleu. Les zones de densités additionnelles de la particule pré-40S comparée à la petite sous-unité sont indiquées par des fléchés.

Trois zones de densités supplémentaires de la particule pré-40S par rapport à la structure mature sont visibles (**Figure 46 et 47**), et sont localisées comme suit :

(1) Côté solvant, la région de la tête juste sous le bec présente une densité supplémentaire de forme allongée. (2) Des zones volumineuses est clairement distinguable dans la région de l'interface avec la 60S. (3) Enfin, la plateforme présente également deux densités supplémentaires, qui apparaissent reliées entre elles si l'on diminue le seuil d'affichage de la carte.

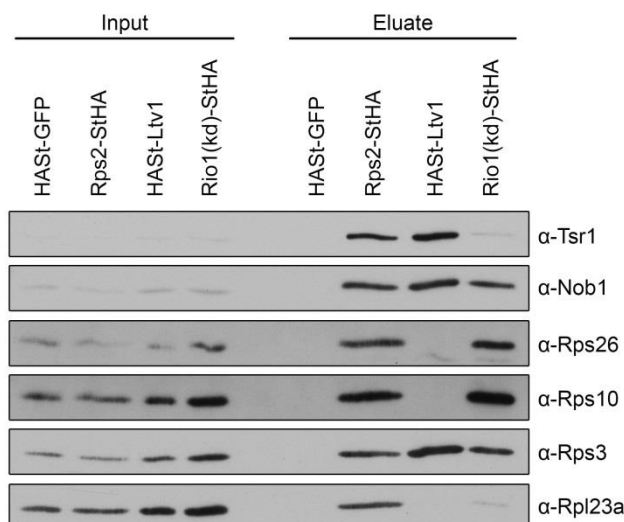


Figure 49: Chronologie d'association de RPS10 et RPS26 aux particules pré-40S.

Expériences de Western blot réalisées à l'aide des anticorps décrits à droite, sur des extraits cellulaires clarifiés (Input) et après purification des particules pré-40S de ces extraits (Eluate). Les particules intermédiaires cytoplasmiques sont purifiées grâce à l'étiquetage de LTV1 (TAP-Ltv1), et les particules pré-40S tardives grâce à celui du mutant catalytiquement inactif de RIO1 (RIO1(KD)). (Figure réalisée par C. Montellese).

III.2.2- Comparaison à la structure de la particule pré-40S de levure

Ces densités supplémentaires peuvent être attribuées à la présence des co-facteurs de maturation associés à la particule pré-40S LTV1. La position de ces co-facteurs a été déterminée chez la levure par des études de CRAC (Tableau 8) (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014) et par cryo-MET 3D (Strunk *et al.*, 2011). Afin de proposer une attribution de localisation de ces co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S, nous avons comparé nos données avec celles établies chez la levure (Figure 49).

Co-facteurs de maturation	Hélices de l'ARNr 18S/Régions sur la particule 40S
Nob1	Hélice 40 (nt 1396-1398), H28 (nt 1625-1627), H26 (1050-1073) et H45 (1765-1800) et domaine 5' de l'ITS1 (cou, plateforme de la particule)
Rio2	Hélice 31 (nt 1194-1196) localisés au niveau du site P de l'ARNt
Tsr1	Hélice 45 (1765-1771) localisés au niveau du site A de l'ARNt et H19-H26-H27 (domaine centrale de l'ARNr 18S)

Enp1	Hélice 33 (nt 1256-1259) (région du bec de la particule)
Ltv1	Hélice 16 (nt 453-454) et H 41/41A (nt 1490-1491) (H16 localisé à proximité de l'épaule et H41A proche du bec de la particule)
Dim2	Hélice 24 (nt 1001-1024), H28 (nt 1617-1634) H45 (1767-1800) et le domaine 5' de l'ITS1 (cou, plateforme de la particule)
Rio1	Hélice 44 (nt 1633-1647) et H18 (nt 554-583) (localisés au niveau du site A de l'ARNt), H19/27 (nt1096-1116)

Tableau 8 : Sites d'interaction de co-facteurs de maturation avec l'ARNr 18S chez la levure déterminés par CRAC (Turowski et al., 2014 ; Graneman et al., 2010)

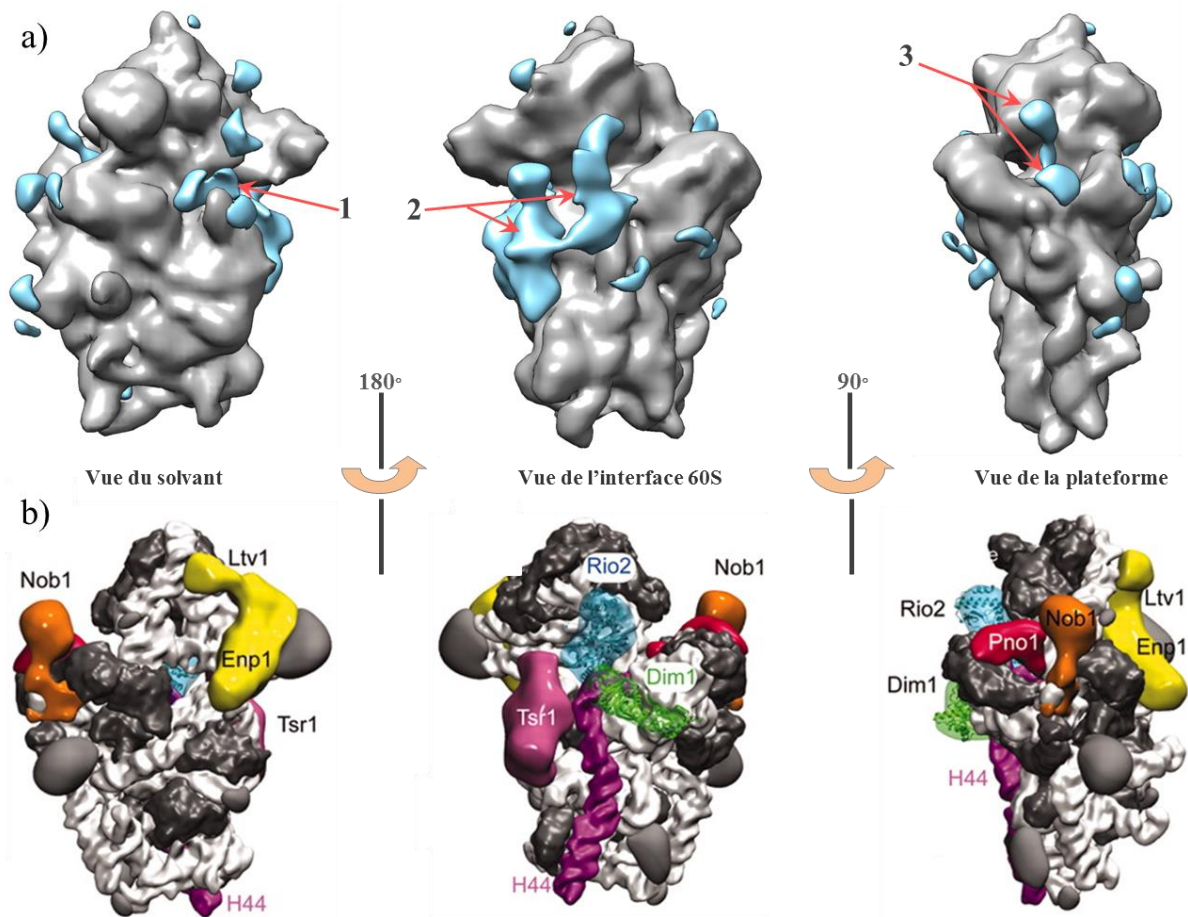


Figure 50: Comparaison de la structure 3D de la particule pré-40S LTV1 humaine et de la structure 3D de la particule pré-40S de levure. a) Les vues de surface de structures 3D de la petite sous-unité filtrée à 21 Å de résolution sont indiquées en gris foncé et la carte de différence entre les structures 3D est représentée en bleu. Les zones de densités additionnelles de la particule pré-40S comparée à la petite sous-unité sont indiquées par des flèches. b) Localisation des co-facteurs sur la particule pré-40S de levure (Strunk et al., 2011).

La zone de densité supplémentaire (1), au niveau de la jonction de la tête et du bec, correspond chez la levure à la présence du complexe Ltv1/Enp1. La zone (2), à l'interface avec la sous-unité 60S, représente la zone d'interaction des co-facteurs Tsr1 et Rio2 sur la particule pré-40S de levure. Enfin, la zone 3, au niveau de la plateforme, correspond à la zone où sont localisés les co-facteurs Nob1 et Dim2 chez la levure (**Figure 49**).

Enfin, afin d'explorer plus avant ces propositions de positionnement de co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S humaine, nous avons utilisé les structures 3D disponibles de co-facteurs de maturation (**Tableau 9**), que nous avons ajustées, par rigid body docking, dans les zones de densité supplémentaires qui leur ont été attribuées par homologie avec le modèle de levure. Nous avons pour cela utilisé la commande « fit in map » du programme CHIMERA. Les résultats de ces essais sont présentés **Figure 50**. Pour toutes les structures, l'ajustement paraît réaliste, mais est incomplet, ce qui rend cette expérience peu concluante. D'autre part, nous n'avons pas pu réaliser cette expérience d'ajustement pour la structure de DIM2, puisque la carte de différence utilisée ne révèle pas de densité à laquelle attribuer cette protéine.

Co-facteur de maturation	Espèce	Technique	Code d'accès PDB (EMDB)
Nob1	<i>P. horikoshii</i>	RMN	2LCQ
Dim2	<i>P. horikoshii</i>	X Ray	3AEV
Rio1	<i>H. sapiens</i>	X Ray	4OTP
Rio2	<i>C. thermophilum</i>	X ray	4GYI
Tsr1	<i>S. cerevisiae</i>	3D EM	emd_1922

Tableau 9 : Liste des structures de co-facteurs de maturation de la particule pré-40S disponibles dans diverses banques de données. Seuls les co-facteurs utilisés dans ce travail sont indiqués dans ce tableau.

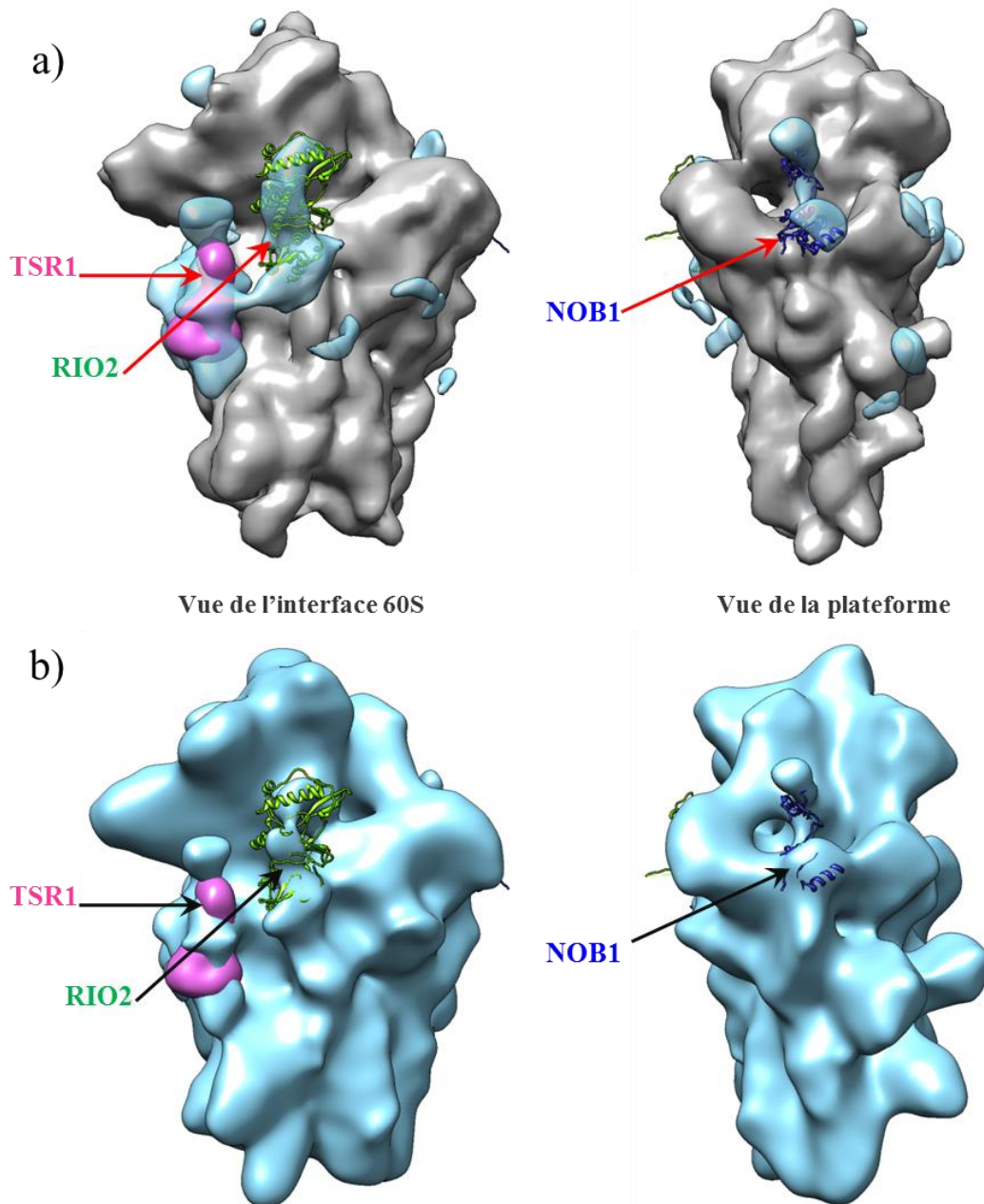


Figure 51: Localisation hypothétique des co-facteurs sur la particule pré-40S LTV1.

La structure des co-facteurs TSR1, RIO2 et NOB1 sont indiquées en rose, vert et bleu foncé respectivement. En a) la structure 3D de la petite sous-unité filtrée à 21 Å de résolution est représentée en gris foncé, la carte de différence entre la structure 3D de la particule pré-40S LTV1 et la particule mature en bleu transparent. En b) la structure 3D de la particule pré-40S LTV1 est indiquée en bleu.

III.2.3- Localisation des co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S LTV1 par des expériences d'immuno-localisation en MET

Afin de déterminer la position des co-facteurs sur la particule pré-40S LTV1, des essais de localisation par « immno-EM » ont été effectués. Pour cela, dans un premier temps, nous avons souhaité localiser ENP1 sur ce complexe. Cette approche consiste à incuber les particules pré-40S LTV1 avec l'anticorps dirigé contre ENP1, puis à les observer en MET après coloration négative. Nous avons pu visualiser trois particules décorées, sur lesquelles l'anticorps semble se fixer au-dessus du bec (**Figure 51**). Ceci suggère qu'ENP1 serait localisé au-dessus du bec de la particule pré-40S humaine. Chez le levure, le complexe Ltv1-Enp1 est présent au niveau du bec, cependant la position de ces protéines reste à définir (cf intro ; Strunk et al., 2011 ; Ghalei et al., 2015). Cependant, il est nécessaire d'améliorer les conditions de l'expérience dans le but de diminuer le bruit de fond et d'augmenter le nombre de particules décorées. De même, les essais dans le but d'identifier la région d'interaction d'autres co-facteurs sur cette particule sont pour l'instant non concluants (**Tableau 10**).

Anticorps utilisés	Conclusion
Anticorps α RACK1	Bruit de fond important, présence d'agrégats, pas de particules décorées observées
Anticorps α ENP1	Bruit de fond important, 3 particules décorées visibles sur 623 au totale observées
Anticorps α RRP12	Bruit de fond important, présence d'agrégats, pas de particules décorées observées
Anticorps α PARN	Bruit de fond important, présence d'agrégats, pas de particules décorées observées

Tableau 10 : Essais d'immuno-localisation en MET de RACK1, ENP1, RRP12 et PARN sur la particule pré-40S LTV1. (Résultats préliminaires).

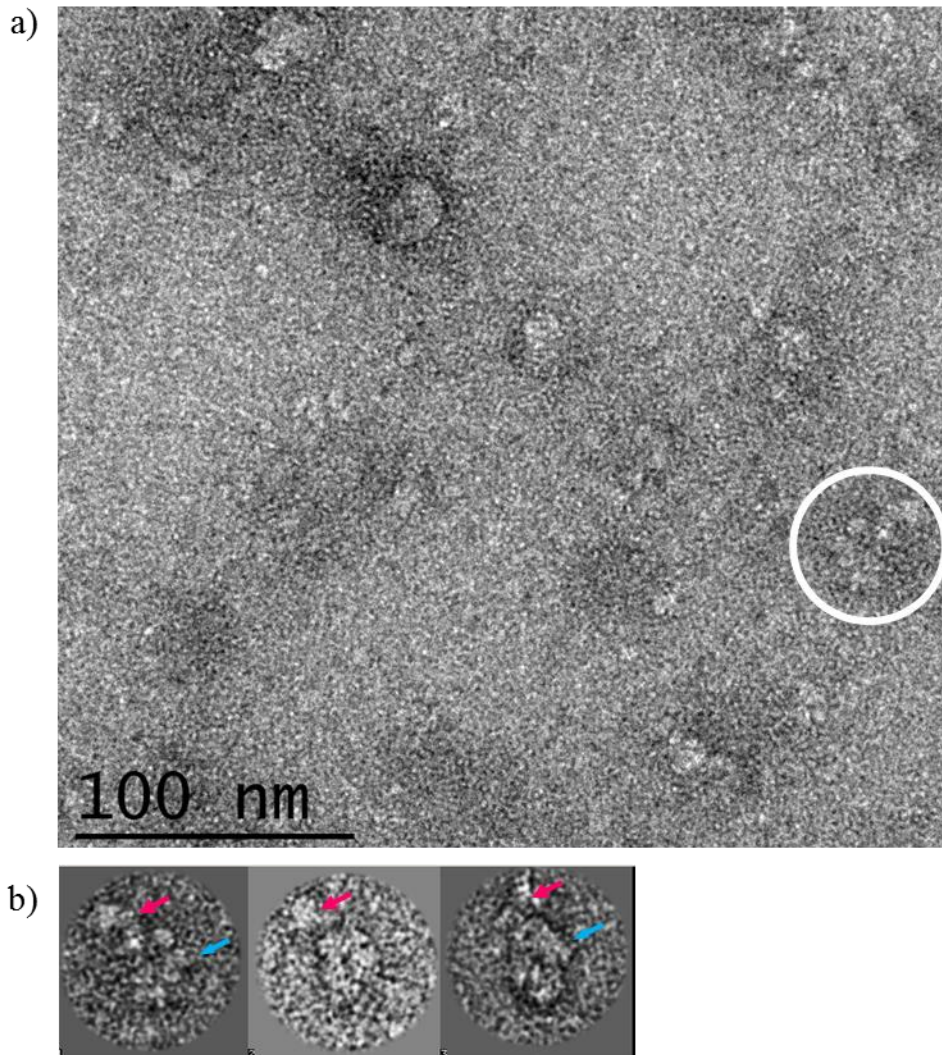


Figure 52: Immunolocalisation en MET d'ENP1 sur la particule pré-40S LTV1. (Technique décrite dans le matériel et méthode) En a) Observation après coloration négative des particules pré-40S LTV1 incubées avec les anticorps dirigés contre ENP1. En b) Trois particule pré-40S décorées avec l'anticorps ENP1 indiqué par une flèche rose, dans la région du bec, la plateforme de la particule pré-40S est indiquée par une flèche bleue

III.2.4- RACK1 est présent sur les particules pré-40S humaines

La comparaison de la structure de la particule pré-40S LTV1 avec le structure publiée chez la levure (Strunk *et al.*, 2011) nous a permis de noter que, à l'inverse de son homologue chez la levure, la particule pré-40S humaine présente une densité localisée sur sa tête et formant une « oreille », caractéristique de la présence de la protéine RACK1. Cette protéine a également été identifiée par spectrométrie de masse comme étant associée à différentes particules pré-40S humaines. Elle est en effet présente dans des particules nucléolaires, purifiées grâce à l'étiquetage de la protéine NOC4, aussi bien que dans des particules pré-40S

cytoplasmiques intermédiaires (purifiées par LTV1) (Wylter *et al.*, 2011), et tardives (purifiées par la protéine mutée RIO1(KD)) (Widmann *et al.*, 2012). D'autre part, des expériences de criblage systématique ont identifié RACK1 comme étant impliquée dans la biogenèse des sous-unités ribosomiques humaines (Wild *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats nous a conduits à essayer de préciser le rôle de RACK1 dans la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine (cf chapitre 4 ci-dessous). Ces données font l'objet d'un manuscrit qui sera prochainement soumis pour publication.

III.3- Classification 3D

Afin d'estimer le degré et la nature de l'hétérogénéité des particules utilisées pour la reconstruction 3D ci-dessus, nous avons ensuite effectué un essai de classification 3D. Pour cela, nous avons utilisé la structure consensus, filtrée à 50 Å de résolution, comme modèle initial, afin de générer 8 classes 3D. Les classes obtenues sont présentées **Figure 52**.

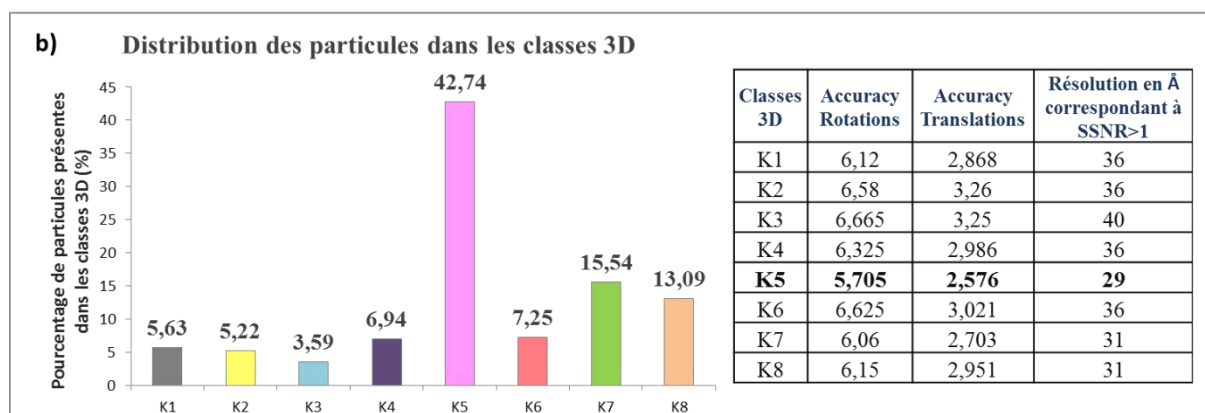
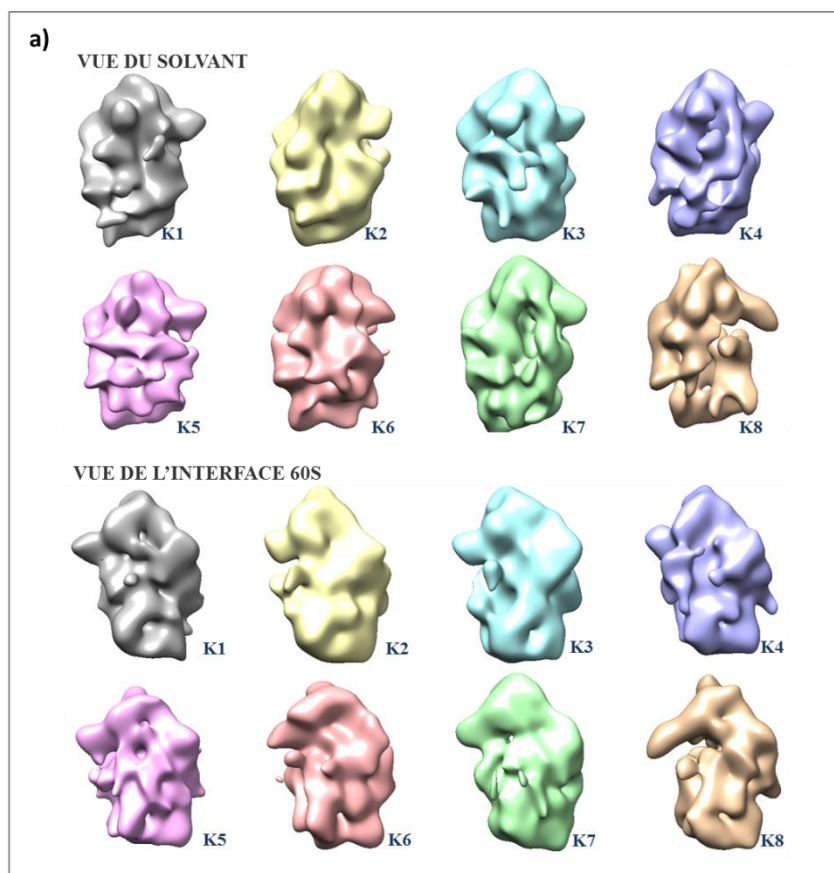


Figure 53 : Classification 3D des 54 436 particules conservées pour l'analyse d'images avec un nombre de classes K=8. En a) les vues de surface des 8 variants structuraux générés sont représentées selon une vue du solvant et une vue de l'interface avec la grande sous-unité ribosomique. En b) l'histogramme représente la distribution des particules dans les classes 3D générées et le tableau indique les critères « *_rlnAccuracyRotations* » et « *_rlnAccuracyTranslations* », la troisième colonne du tableau correspond à la résolution pour un rapport signal sur bruit supérieur à 1.

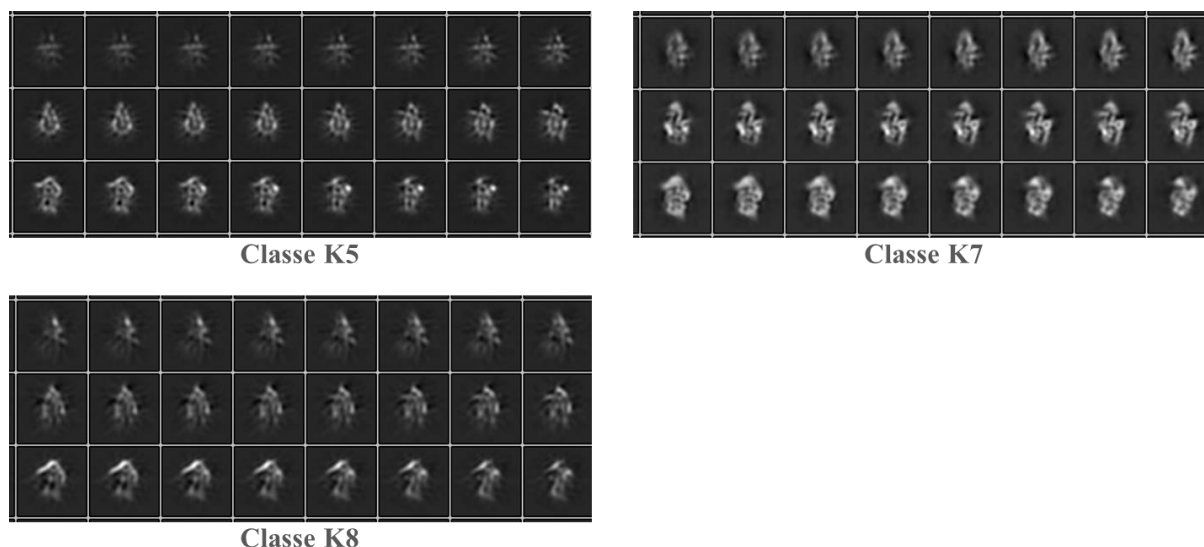


Figure 54: Visualisation des sections des variants K5, K7 et K8 générés lors de la classification 3D des 54 436 particules avec un nombre de classe $K=8$.

Contrairement aux essais de classification 3D réalisés sur les particules sélectionnées de manière non restrictive (cf. paragraphe B.II.2.1), les particules ne sont pas réparties de manière homogène dans les classes. La classe K5 regroupe 43 % de la population de particules, et la précision d'orientation de celles-ci est la plus élevée. Cette structure, d'allure plutôt compacte, a les dimensions suivantes : hauteur : 24,8 nm ; largeur 18,3 nm ; épaisseur : 13,3 nm. D'autre part, la classe K7, à laquelle 15 % des particules ont été attribuées, possède le deuxième meilleur degré de précision d'orientation des particules. En outre, les sections de ces deux modèles semblent présenter un niveau de détail plus élevé que les autres classes 3D (**Figure 53**). Cette structure est plus haute et volumineuse que la classe K7, puisque ses dimensions sont les suivantes : hauteur : 29,1 nm ; largeur 18,8 nm ; épaisseur : 18,2 nm. La classe K8 est constituée par 13 % des particules. Sa vue de surface montre une structure présentant un bec très allongé, et des manques de densité au niveau du corps. Cette classe est constituée par une majorité de particules aberrantes résiduelles, comme l'a confirmé l'inspection visuelle de ce groupe de particules. Les cinq autres classes apparaissent comme des mélanges en proportions variables entre la conformation de la classe K5 et celle de la classe K7.

Ces résultats renforcent l'idée que les particules pré-40S LTV1 sont très hétérogènes d'un point de vue structural. Nous avons répliqué cette classification 3D, et obtenu des résultats similaires : une classe regroupe 35 % des particules et a une morphologie très semblable à celle de la classe K5 du réplicat 1. Une deuxième classe renferme 14 % des

particules et est très semblable à la classe K8. Une troisième classe est majoritairement constituée de particules aberrantes et regroupe 10 % de la population totale de particules. Enfin, comme dans le premier répliat, les 5 autres classes apparaissent comme un mélange entre les deux conformations « maxima » K5 et K7.

Par ailleurs, les classes 3D générées présentent plus ou moins des densités manquantes selon les classes, dans la zone au centre du corps de la particule (**Figure 52**). Cette région est située à proximité de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S. Ceci suggère qu'il existerait des étapes de maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S qui se produiraient dans le cytoplasme. Chez la levure, l'extrémité 5' de l'ARNr 18S est clivée précocement par une endonucléase dans le noyau (Venema and Tollervey, 1995). A la différence de la levure, deux études *in vitro* ont montré que la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S serait effectuée en deux étapes (Hannon *et al.*, 1989; Yu *et Nilsen*, 1992). En premier lieu, une endonucléase cliverait le pré-ARNr, trois bases avant l'extrémité 5' mature de l'ARNr 18S dans le nucléole. Puis l'extrémité 5' du pré-ARNr serait alors maturée dans le cytoplasme (Yu and Nilsen, 1992). Cette région, au centre du corps de la particule pourrait subir un réarrangement structural lors de la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S.

Ces expériences répliquées de classification 3D confirment le fort degré d'hétérogénéité structurale des particules pré-40S purifiées par LTV1, et suggèrent que cette hétérogénéité est le résultat de flexibilité et d'hétérogénéité compositionnelle.

Lors de cette étude, nous avons déterminé la première structure 3D de particule pré-40S intermédiaire chez l'Homme à 19Å de résolution. La position des co-facteurs sur cette particule est globalement conservée chez la levure. Cependant, la présence de RACK1 sur les précurseurs intermédiaires de la petite sous-unité humaine souligne une nouvelle différence chez l'Homme comparé à la levure.

IV- Rôle de RACK1 dans la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine

La détermination de la structure 3D des particules LTV1 à 19 Å de résolution nous a permis de confirmer la présence de RACK1 sur ces particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires. Ces données structurales nous ont incités à analyser plus avant le rôle de

RACK1 dans l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique humaine. Pour cela, un ensemble d'expériences fonctionnelles a été réalisé dans l'équipe, par Lola Deveaux et Nathalie Montel-Lehry, sous la direction de Marie-Françoise O'Donohue. Les résultats de ces analyses sont résumés ci-après.

IV.1- RACK1 est associée aux particules pré-40S dans le noyau

RACK1 est présent dans des particules pré-40S purifiées en utilisant la protéine NOC4, protéine uniquement nucléaire, comme appât (Wylter *et al.*, 2011), ce qui suggère que RACK1 est associée aux particules pré-40S nucléaires. La présence de RACK1 dans le noyau a été mise en évidence par plusieurs travaux, principalement basés sur des données fonctionnelles et sur des données de localisation. Les expériences d'immunofluorescence que nous avons menées indiquent que RACK1 ne s'accumule pas dans le nucléole, et que cette protéine est majoritairement localisée dans le cytoplasme, comme attendu pour une protéine ribosomique (**Figure 54**).

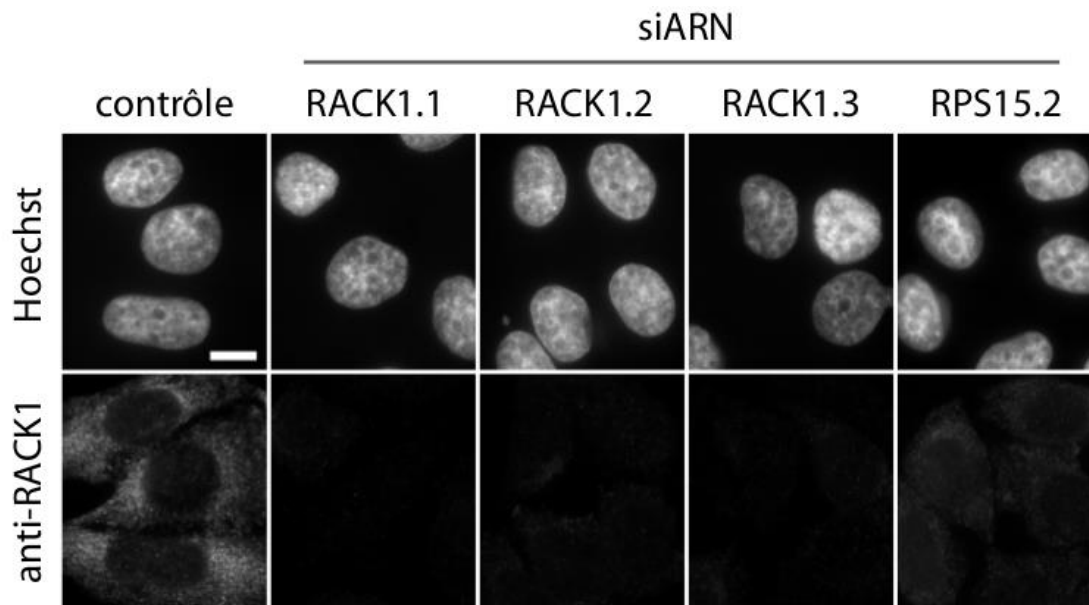


Figure 55 : Localisation intracellulaire de RACK1 visualisé par immunofluorescence.

Les cellules contrôle ou traité pendant 48h avec chacun des siARN ont été fixées puis la protéine RACK1 a été immunolocalisée. La barre d'échelle correspond à 10µm

IV.2- RACK1 est requise pour une maturation efficace du pré-ARNr 18S-E

Afin de caractériser l'implication de RACK1 dans la maturation de l'ARNr 18S, le patron des pré-ARNr a été analysé après la perte d'expression de RACK1 induite avec 3 siRNA différents. Nous avons vérifié par qRT_PCR que le niveau d'ARNm de RACK1 était réduit à 5-15% du niveau normal par ces siRNA. Les précurseurs des ARNr produits après 48h de traitement avec les siRNA ont été révélés par northern blot avec des sondes dirigés contre les espaceurs transcrits du pré-ARNr (**Figure 55**).

Ces analyses montrent que la perte d'expression de RACK1 entraîne une accumulation du pré-ARNr 18S-E, ce qui traduit un défaut ou un retard de la formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S. Les niveaux de précurseurs des ARNr de la grande sous-unité ne semblent pas affectés par la déplétion de RACK1 (**FigureNB**). Ces résultats indiquent que RACK1 est nécessaire pour une maturation optimale de l'ARNr 18S.

Pour distinguer si l'accumulation du précurseur 18S-E était liée à un défaut de maturation ou à un retard d'export, des expériences de fractionnement noyau / cytoplasme menées après la perte d'expression de RACK1 et les ARN ont été analysés dans chacune des fractions (**Figure 56a**). Le pré-ARNr 18S-E s'accumule fortement dans le cytoplasme, ce qui indique un défaut dans la conversion du pré-ARNr 18S-E en ARNr 18S mature. Il semble être plus abondant dans le noyau par comparaison aux cellules contrôles, ce qui pourrait traduire également un retard dans l'export de ce pré-rRNA. Cependant, ce phénotype est moins prononcé que dans le cas de cellules n'exprimant plus RPS15, qui est nécessaire pour rendre les particules pré-40S compétentes pour leur export nucléaire (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). Ces données ont été complétées par la détection des ARN précurseurs de l'ARNr 18S par FISH en utilisant une sonde contre l'extrémité 5' de l'ITS1 (**Figure 56b**). Le signal de fluorescence augmente fortement dans le cytoplasme après la perte d'expression de RACK1, ce qui confirme les données de fractionnement subcellulaire.

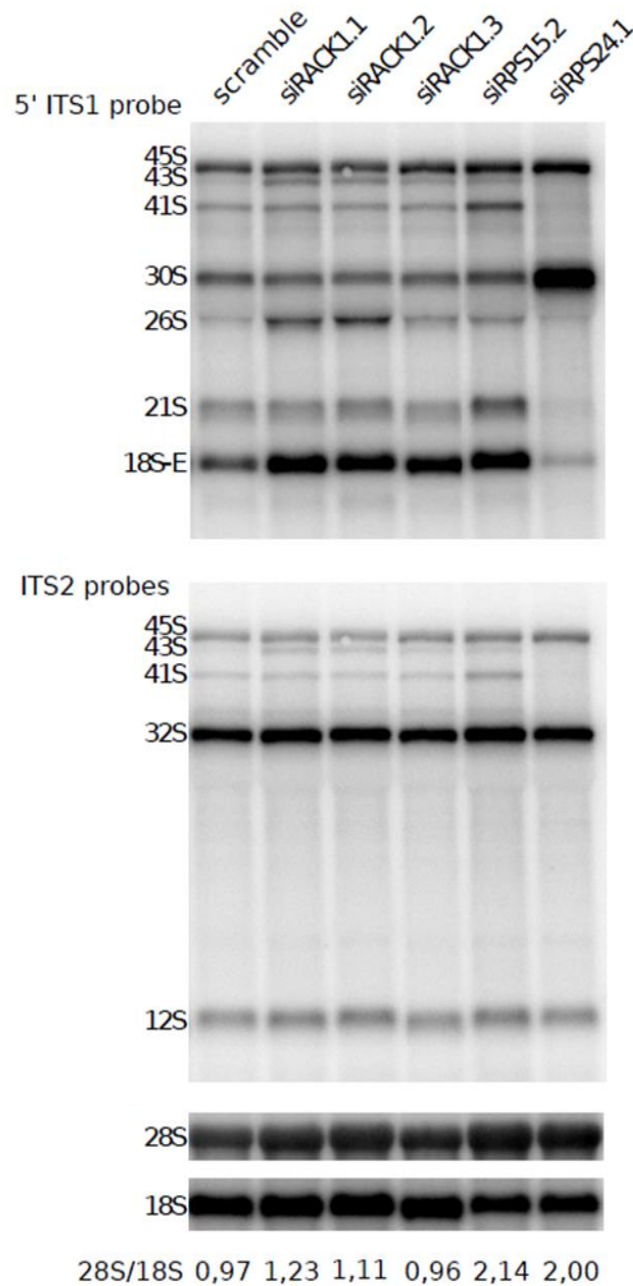


Figure 56 Analyse par nothern blot des précurseurs de l'ARNr après 48h de traitement avec des siRNA contre l'ARNm RACK1

Les ARN extraits de cellules traitées avec des siRNA contre RACK1, RPS15 et RPS24 ont été analysés avec des sondes s'hybridant à l'ITS1 ou à l'ITS2. Les cellules traitées avec les 3 siRNA contre RACK1 présentent principalement une accumulation de l'ARN 18S-E. Une augmentation de la quantité d'ARN 26S et 43S est également observées, mais n'est pas observées de manière reproductible (non montré). La perte d'expression de RPS15 et de RPS24 se traduisent respectivement par l'accumulation des pre-ARNr18S-E et 30S, comme déjà observé précédemment (Rouquette et al., 2005; Choemmel et al., 2008).

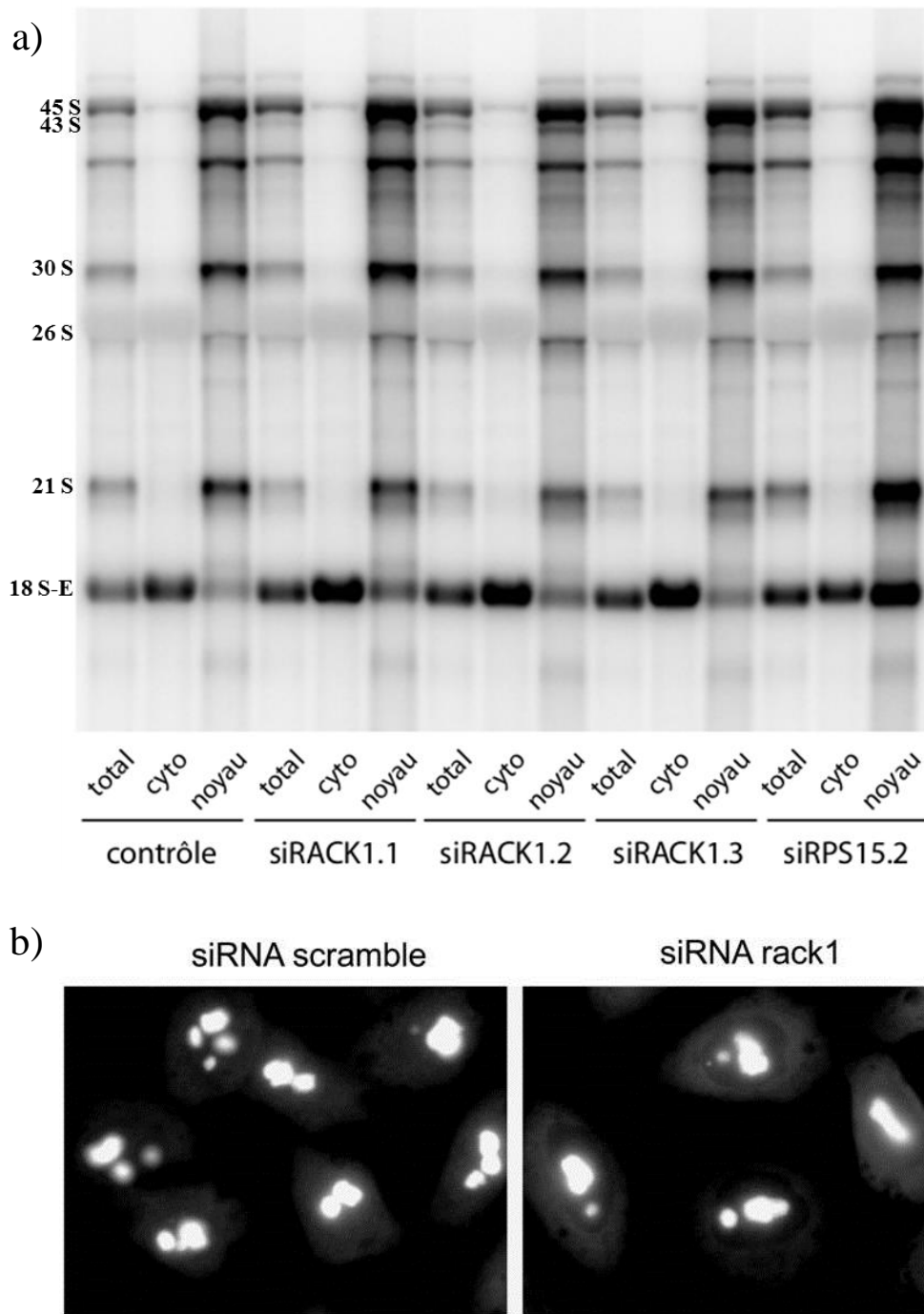


Figure 57: Localisation intracellulaire des précurseurs de l'ARNr 18S : fractionnement subcellulaire et hybridation in situ. (a) Les fractions cytoplasmique et nucléaire de cellules témoins ou traitées à l'aide de différents siARN pendant 48h ont été isolées et les ARNs en ont été extraits. Après séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,2 %, transfert sur une membrane de nylon puis révélation avec une sonde 5'ITS radiomarquée, les précurseurs de l'ARNr 18S ont été identifiés dans chacune des fractions. Total : ARN totaux avant fractionnement; cyto : ARNs totaux de la fraction cytoplasmique ; noyau : ARNs totaux de la fraction nucléaire. (b) En parallèle, les précurseurs de l'ARNr 18S ont été localisés in situ grâce à la même sonde couplée à une molécule fluorescente (5'ITS-Cy3). Les noyaux ont été colorés au Hoechst 33342. Les images ont été prises avec le même temps de pause et ont été traitées pour l'affichage de manière identique.

IV.3- RACK1 n'est pas strictement requis pour l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique

Afin d'évaluer l'impact du retard de maturation du pré-ARNr 18S-E observé après traitement avec des siRNA RACK1 sur l'accumulation de la sous-unité 40S, nous avons analysé sur gradient de saccharose les ribosomes des extraits cellulaires cytoplasmiques après 48h de déplétion de RACK1 (**Figure 57**). Nous n'observons pas de déséquilibre majeur entre la grande et la petite sous-unité ribosomique. En comparaison, la perte d'expression de RPS26 entraîne une accumulation de sous-unités 60S libres par rapport aux sous-unités 40S libres et une baisse drastique de ribosomes 80S matures, ce qui est caractéristique d'un défaut de synthèse de la petite sous-unité ribosomique.

Cependant, la perte d'expression de RACK1 entraîne une baisse de la quantité des sous-unités 40S et 60S libres, une augmentation significative du nombre de monosomes 80S et une diminution de la fraction des polysomes, ce qui suggère que RACK1 est requise globalement pour la traduction (**Figure 57**). Ce phénotype est à rapprocher de la perte d'expression de RPS25. La perte d'expression de toutes les autres protéines RPS entraînent un défaut drastique de production de l'ARN 18S (O'Donohue, 2010).

L'ensemble de ces résultats indiquent que RACK1 est requise pour la maturation normale de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S. Elle pourrait en outre être impliquée dans un mécanisme global de régulation de la traduction.

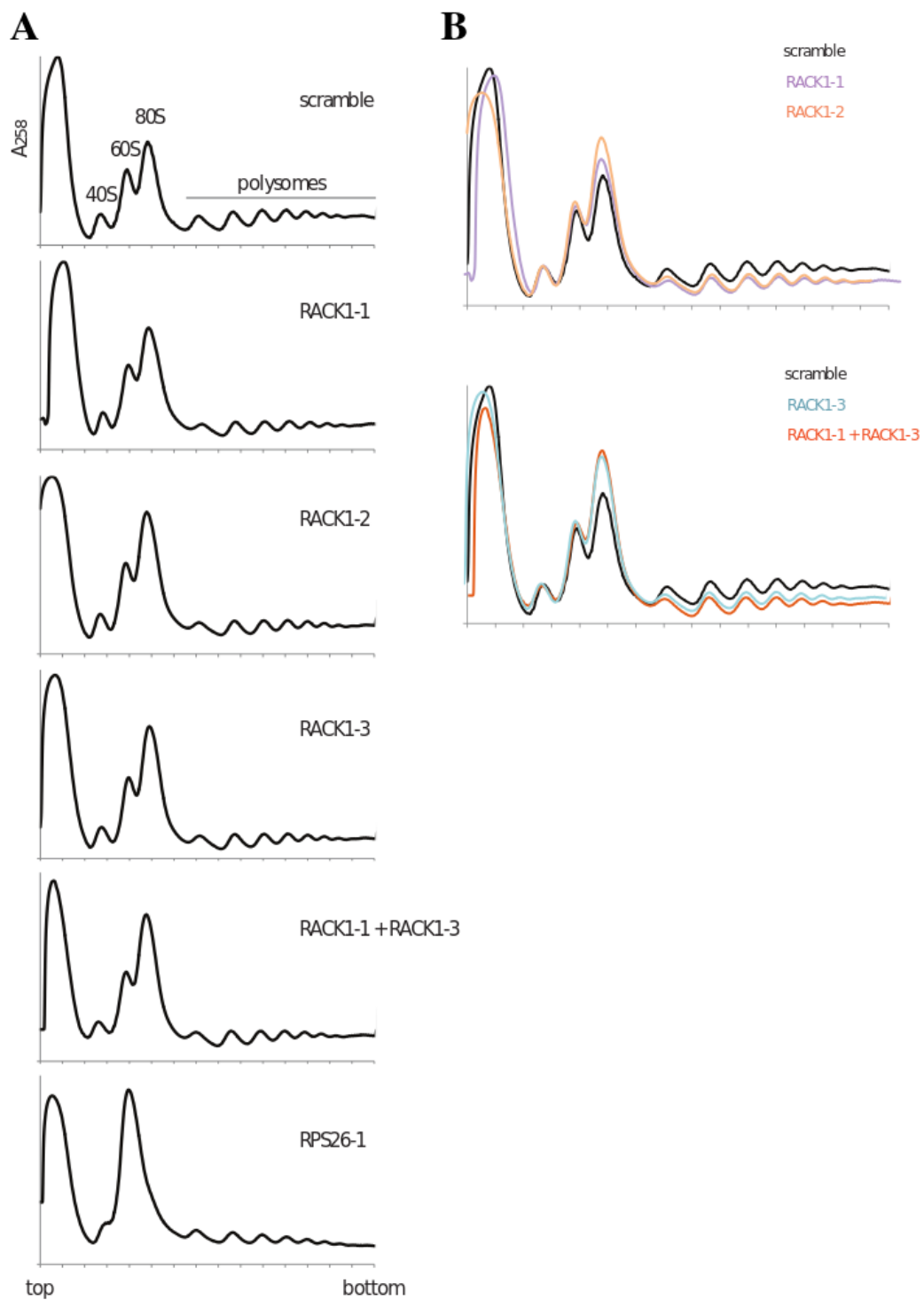


Figure 58: Analyse des ribosomes sur gradient de saccharose après déplétion de RACK1.

Après 48h de traitement avec les siRNA dirigés contre RACK1 ou RPS26, les fractions cytoplasmiques des cellules ont été extraites et ultracentrifugées sur un gradient de saccharose 10-50 %. (A). Les profils obtenus ont été comparés afin de déterminer l'effet de la perte d'expression des protéines (RACK1 ou RPS26) sur la formation des sous-unités 40S et 60S, de la particule 80S et des polysomes. (B) Les profils polysomiques ont été superposés afin de mieux voir l'effet de la déplétion de RACK1 sur la formation des particules ribosomiques.

C- Analyse structurale de particules pré-40S tardive RIO1(KD)

Dans un second temps, nous avons déterminé la structure 3D de particules pré-40S cytoplasmiques tardives, purifiées par l'étiquetage du co-facteur RIO1 muté : son activité kinase a été supprimée (RIO1(KD)). La composition de ces complexes est plus simple que celle des particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires; en effet ces particules contiennent la totalité des RPS, le pré-ARNr 18S-E, auxquels trois co-facteurs de maturation (DIM2, NOB1 et RIO1(KD)) sont stablement associés (Widmann *et al.*, 2012). Afin de réduire leur flexibilité intrinsèque et améliorer la résolution, les particules recueillies à la fin de la purification d'affinité ont subi un pontage chimique léger par une solution de glutaraldéhyde dont la concentration finale est de 0.1 % (cf. Matériel et Méthodes).

En mars 2015, nous avons obtenu 48h de temps de faisceau sur le Titan Krios I du NeCEN (Leiden, Pays-Bas). Nous l'avons utilisé pour acquérir un jeu de données de 1265 champ de particules (ou frames) RIO1(KD). Ceci correspond à environ 340 Go de données. Malgré un nombre 10 fois moindre de frames, la quantité de données informatique totale est quasi-équivalente à celle obtenue en 96h de faisceau pour les particules LTV1. Ceci est dû au fait que dans le cas des particules pré-40S tardives, les frames ont été acquis à la fois en mode « classique » (une seconde d'acquisition donne une image d'un même champ) et en mode « movie » (une seconde d'acquisition génère 7 images d'un même champ. Pour prévenir les effets de la dérive de l'échantillon sous le faisceau d'électron, ces 7 images sont alignées entre elles, et la somme des images est calculée, ce qui améliore la résolution de la nouvelle somme d'images.

Comme pour les particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires, l'analyse présentée ci-après a été réalisée sur les images acquises en mode « classique ». Par ailleurs, les conditions d'observation (grossissement, défocus) sont similaires à celles employées pour l'acquisition d'images de particules LTV1.

I- Pré-traitement

Après une étape de vérification visuelle rapide, 1024 frames sont conservées, et leur CTF a été estimée par le programme CTFFIND3. Suite à l'inspection de leurs spectres de puissance, seulement 950 champs de particules ont été gardés pour l'analyse ultérieure. A partir de ces frames, les particules ont été sélectionnées de manière semi-automatique à l'aide de RELION 1.3. Les particules sélectionnées ont alors été extraites dans des boites de 384×384 pixels puis leur taille a été réduite par un facteur 2. Ces opérations ont généré un jeu de 43 252 particules.

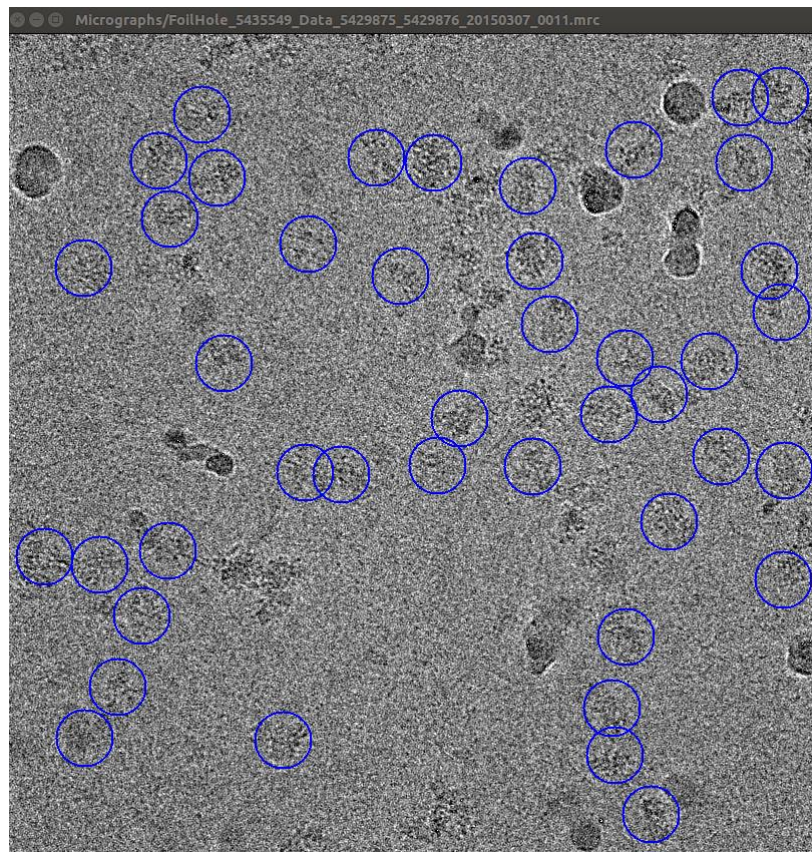


Figure 59 : Image d'un champ de particule pré-40S RIO1(KD) observé par cryo-MET (sur le Titan Krios I du NeCEN), où les particules entourées en bleu ont été sélectionnées de manière semi-automatique

II- Classification 2D

Ensuite une étape de classification 2D a été réalisée par RELION 1.3, afin d'éliminer les particules aberrantes sélectionnées. Nous avons défini le nombre de classes 2D à 430, afin d'avoir en moyenne 100 images. Les résultats de la classification 2D sont présentés **Figure**

58a. La stratégie de sélection des classes 2D dite « restrictive » mise en place pour le jeu de données des particules LTV1 a été employée. Seules les meilleures classes 2D, représentant des vues « caractéristiques » de la particule (**Figure 58b**) ont été conservées pour l'analyse d'images ultérieures. Les particules composant les classes 2D très bruitées, vides ou correspondant à des agrégats, ont été éliminées (exemple **Figure 58c**). Au total, 85 classes 2D ont été conservées, ce qui représente un jeu de données de 32 864 particules.

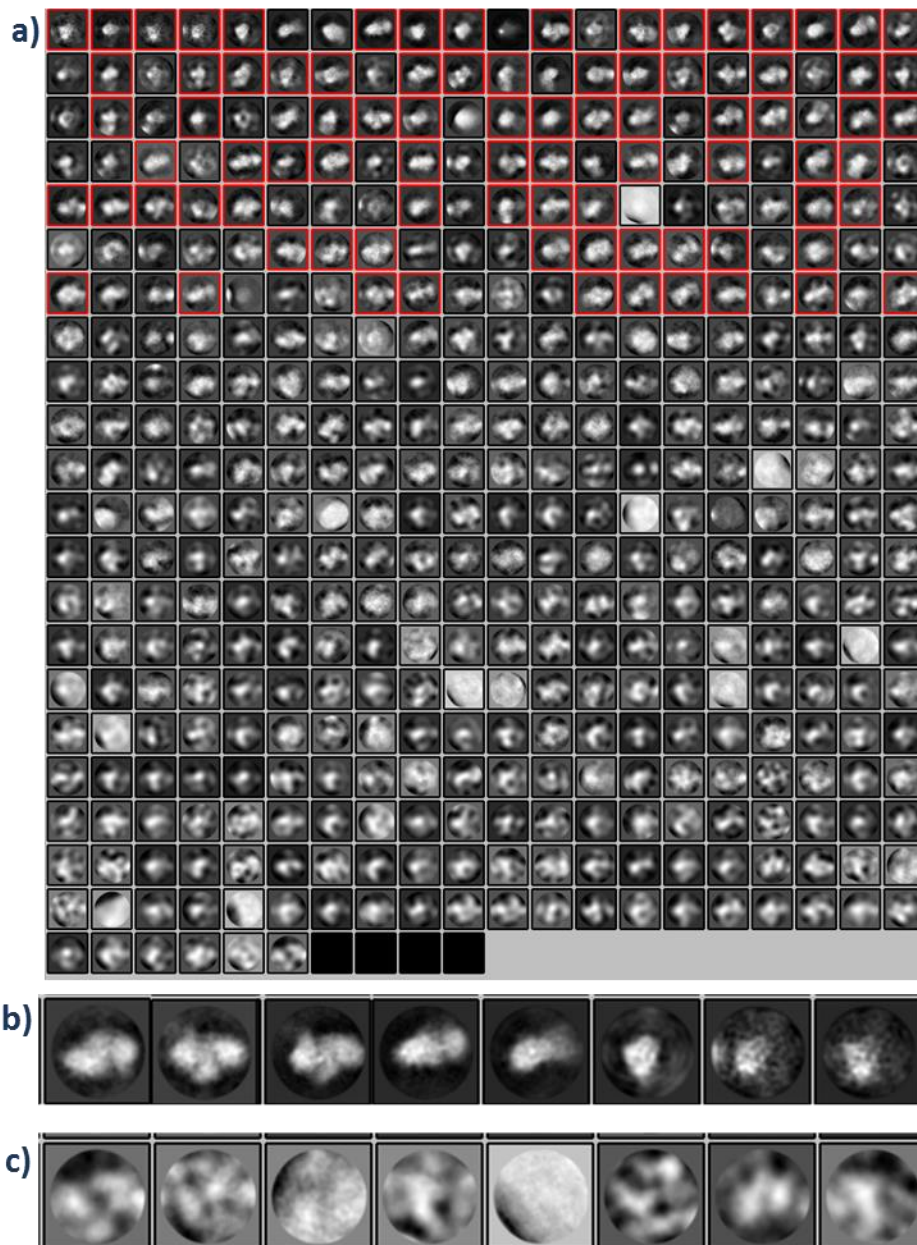


Figure 60: Résultats de la classification 2D. a) Représentation des 430 sommes de classes 2D générées. Les images appartenant aux classes entourées en rouge sont conservées pour l'analyse ultérieure. b) Détail de classes 2D dont les particules ont été gardées pour la suite de l'analyse d'images. c) Détail de classes 2D bruitées, non conservées pour l'analyse d'images.

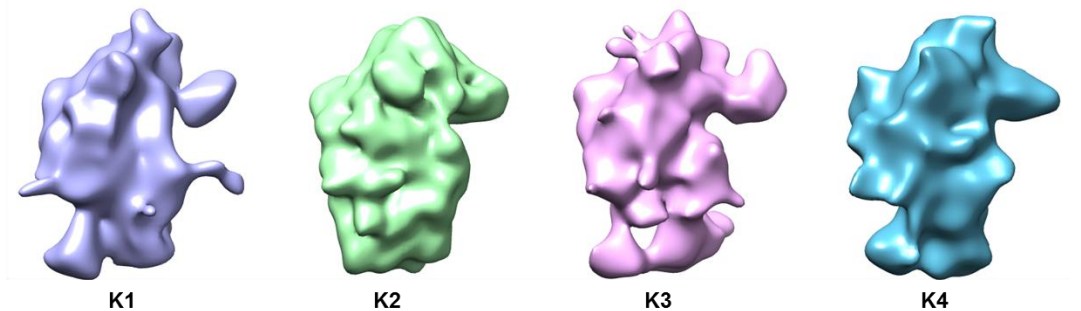
III- Classification 3D

Suite à cette étape de tri bidimensionnel, contrairement au jeu de données des LTV1, nous avons réalisé une classification 3D de ce jeu de données de 32 864 particules avant l'étape de raffinement 3D. Cette classification 3D a été réalisée afin de pouvoir trier l'hétérogénéité structurale de l'échantillon, et de vérifier que la sélection des particules opérée ci-avant est optimale.

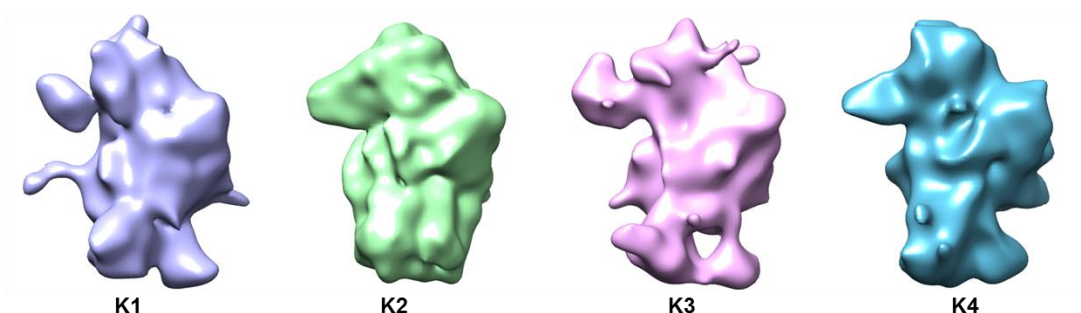
Pour cela, nous avons employé comme modèle initial la structure 3D de la petite sous-unité ribosomique humaine mature (Anger *et al.*, 2013, pdb accession code : 4V6X), filtrée à 50 Å de résolution. Nous avons choisi de générer quatre classes 3D. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 59**. Cette classification 3D, réalisée en 29 itérations, semble être arrivée à une solution stable, puisqu'au cours des dernières itérations, seulement 4.5% des particules changent de classes (**Figure 59b**). La distribution des particules entre les classes n'est pas homogène (**Figure 59b**). En effet, leur répartition varie de 17,3% pour la classe K4, qui regroupe le plus faible nombre de particules, à 30% pour la classe la plus peuplée (classe K2).

Parmi les 4 classes générées, seule la classe K2, qui regroupe 10 028 particules, a une morphologie très similaire à celle de la petite sous-unité ribosomique (**Figure 59a**). Elle possède en outre la meilleure précision concernant l'alignement des images qui la composent. La structure 3D correspondant à cette classe K2 possède les dimensions suivantes : hauteur de 28.0 nm ; largeur de 19.8 nm et épaisseur de 14.9 nm. La classe K4 est la deuxième meilleure classe concernant la précision de l'alignement des images. Elle présente un bec allongé, et manque de densités au niveau du corps et de la tête comparé à la classe K2. Elle a une hauteur de 28,5 nm, une largeur de 22.9 nm et une épaisseur de 15.1 nm. La visualisation des images composant cette classe indique qu'elle est composée d'une majorité de particules aberrantes. De même, les classes 3D K1 et K3 ont des structures 3D peu ressemblantes à une petite sous-unité ribosomique ; les particules qui les composent semblent être une combinaison de particules mal alignées et/ou ne correspondant à des complexes pré-40S.

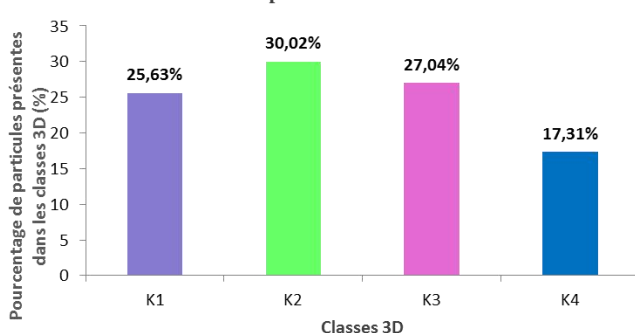
a) VUE DU SOLVANT



VUE DE L'INTERFACE 60S



b) Distribution des particules dans les classes 3D



Classes 3D	Accuracy Rotations	Accuracy Translations	Résolution en Å correspondant à SSNR>1
K1	3,84	2,25	28-30
K2	2,89	1,47	23-25
K3	3,97	2,31	28-30
K4	3,78	2,19	30-33

Figure 61: Classification 3D des 32 864 particules conservées avec un nombre de classes K=4.

En a) les vues de surface des 4 variants structuraux générés sont représentés selon une vue du solvant et une vue de l'interface avec la grande sous-unité ribosomique. En b) l'histogramme représente la distribution des particules dans les classes 3D générées et le tableau indique les critères de précision d'alignement « *_rlnAccuracyRotations* » et « *_rlnAccuracyTranslations* ». La troisième colonne du tableau correspond à la résolution pour un rapport signal sur bruit supérieur à 1.

IV- Raffinement de la classe 3D « K2 »

Par la suite, nous avons raffiné la structure 3D des 10 028 particules appartenant à la classe 3D K2. Pour cela, ces particules ont été extraites du jeu de données total de 32 864 particules. Pour cette étape de raffinement, nous avons utilisé comme référence initiale la structure de la classe 3D K2 générée lors de l'étape précédente, que nous avons filtrée à 50 Å de résolution. Cette étape de raffinement nous a permis d'obtenir une structure 3D particule pré-40S tardive ; la résolution de cette structure a été estimée à 22,6 Å par le programme de raffinement. Nous avons alors soumis cette structure à une étape de post-traitement, ce qui a généré une structure 3D améliorée (ie. masque binaire, filtre passe-bande de fréquences spatiales, « sharpening », cf Matériel et Méthodes) et filtrée à 15,4 Å de résolution.

Cette structure est présentée dans la **Figure 60**. Elle possède une forme générale et des dimensions similaires à celle de la petite sous-unité ribosomique humaine mature, et les domaines caractéristiques (tête, bec, corps et plateforme) de la particule mature y sont bien définis (**Figure 60a**). La visualisation des sections de cette reconstruction 3D montre que le corps présente un fort niveau de détail, et les structures formées par le pré-ARNr semblent visibles dans cette région. A l'inverse, le bec et l'arrière de la tête ainsi que la plateforme semblent être constitués de densités moins bien définies, plus floues (**Figure 60b et c**). Ceci pourrait traduire des zones moins bien résolues, présentant une plus forte variabilité structurale.

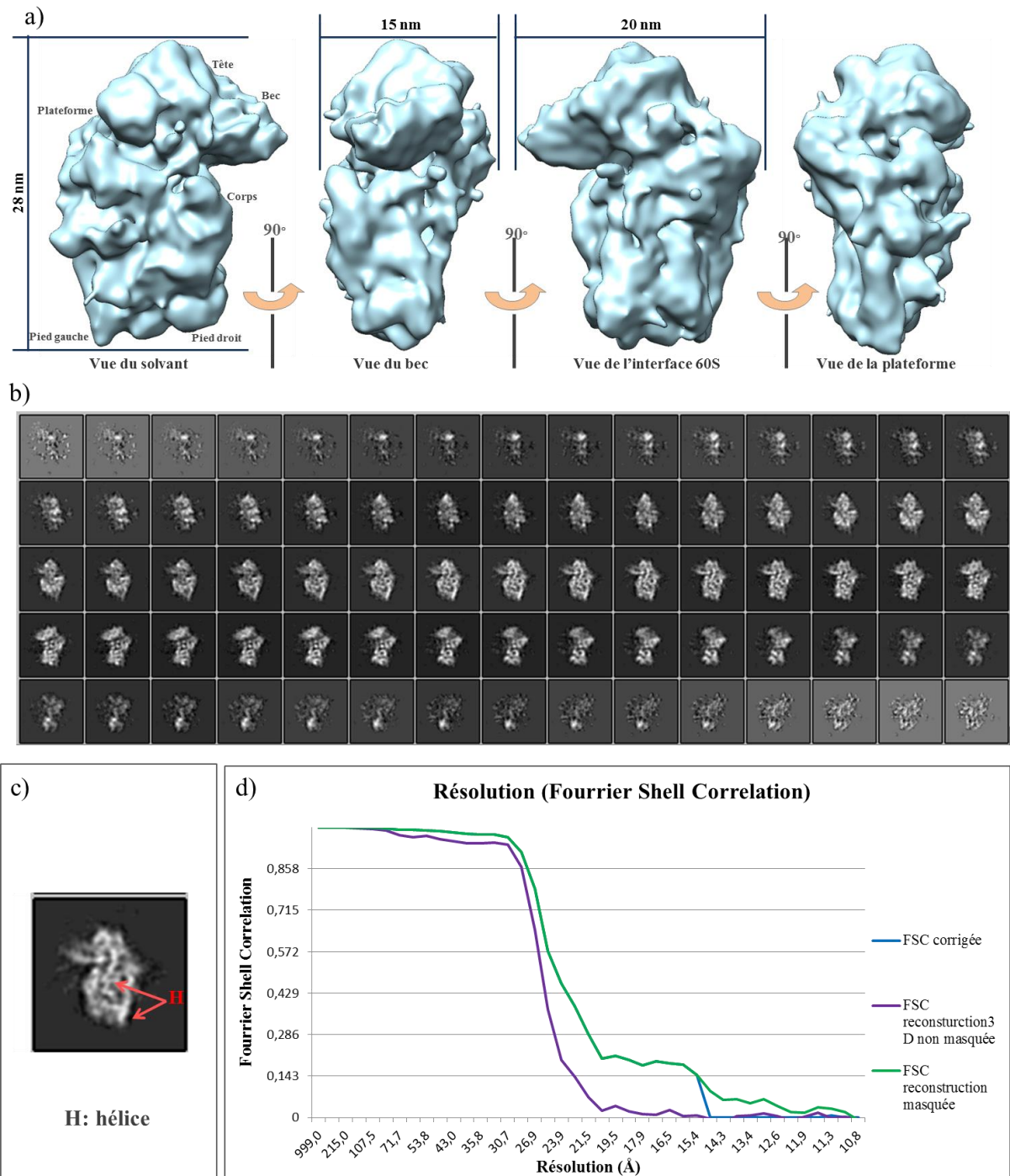


Figure 62: Structure 3D de la particule pré-40S RIO1(KD).

a) vues de surface. b) Sections de la structure 3D. c) Zoom sur une section de la reconstruction 3D avec des hélices de l'ARNr visibles. d) Estimation de la résolution de la structure avant et après post-traitement.

V- Analyse de la structure obtenue

Afin d'analyser la structure 3D de particules pré-40S tardives obtenue ci-dessus, comme pour la structure des particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires, nous l'avons comparée à celle de la petite sous-unité ribosomique mature humaine (Anger *et al.*, 2013, pdb accession code : 4V6X) (**Figure 61a et b**).

Pour ce faire, la structure 3D de la petite sous-unité mature a été filtrée à 19 Å de résolution et ajustée dans la carte de densité électronique de la particule pré-40S tardive par rigid body docking à l'aide de la commande « fit in map » du logiciel CHIMERA.

Cette comparaison a permis de confirmer que toutes les RPS présentes à ce stade de maturation peuvent être accommodées dans la carte de densité électronique de la particule pré-40S tardive sans réarrangement majeur. En particulier, la densité formant l'oreille de la tête de la particule, et correspondant à la présence de RACK1 est présente sur ces particules pré-40S tardives. Elle est mieux définie que pour les particules pré-40S intermédiaires. Ceci semble indiquer que la position de RACK1 se stabilise au cours de la maturation de la petite sous-unité ribosomique.

Cette première comparaison visuelle montre que si la structure de la particule pré-40S tardive est très similaire à celle de la petite sous-unité ribosomique mature, on peut distinguer des zones de densité supplémentaire sur la particule pré-40S. L'une d'entre elles est localisée entre le bas de la tête et le sillon de l'ARNm, au voisinage du site E de liaison de l'ARNt (côté plateforme). Une autre zone de densité supplémentaire est située sur le haut de l'hélice 44, à proximité du site P de liaison à l'ARNt (**Figure 61a et b**).

Afin de mieux mettre en évidence les zones de densité supplémentaires de la structure de la pré-40S tardive par rapport à celle de la petite sous-unité mature, nous avons ensuite calculé une carte de différence entre ces deux structures, grâce à la commande « vop subtract » du logiciel CHIMERA. La visualisation de cette carte de différence, présentée dans la **Figure 61c** ci-après, permet de regrouper les densités supplémentaires en trois grands groupes, selon leur localisation et leur volume :

(1) Du côté de l'interface avec le solvant, au niveau du milieu de la tête, on distingue des densités supplémentaires éparses. Cette observation pourrait indiquer que la tête ne posséderait pas encore sa position finale dans la particule pré-40S. D'autre part, ceci peut être

le reflet, sur la particule pré-40S tardive, d'un réarrangement structural des constituants de la particule 40S mature, ou bien de la présence de co-facteurs de maturation très flexibles associés à la particule RIO1(KD). De plus, un petit volume est retrouvé au niveau de la plateforme. Pour mémoire, le co-facteur de maturation Nob1 a été localisé sur la plateforme dans la structure de pré-40S de levure purifiée avec Rio2-TAP (Strunk *et al.*, 2011), mais également dans la structure de pré-40S intermédiaire humaine présentée en B. Cette différence de densité, au niveau de la plateforme suggère un réarrangement de la structure de la plateforme entre les étapes de maturation cytoplasmiques intermédiaire et tardive.

(2) Au niveau du bas du corps, des zones de densité supplémentaires de taille moyenne sont retrouvées, l'une entre le pied gauche et le pied droit, et l'autre au niveau du bas de l'hélice ES3S formant le pied gauche de la structure. Il est difficile d'interpréter ce changement structural, qui pourrait, comme pour les phénomènes décrits en (1), correspondre à un réarrangement conformationnel et/ ou à la présence de co-facteurs de maturation. Cependant, à ce jour, aucun co-facteur de maturation n'ayant été localisé dans cette partie de la structure de la sous-unité ribosomique, le changement conformationnel de molécules intrinsèques à la particule 40S mature, semble être l'hypothèse la plus réaliste.

(3) Enfin, la carte de différence présente une masse principale, située du côté de l'interface avec la 60S, au niveau du haut de l'hélice 44, se prolongeant dans le sillon de l'ARNm et se terminant entre la plateforme et la tête de la particule. Les données de CRAC établies chez la levure indiquent que la zone de liaison de Rio1 sur le pré-ARNr 20S est située en haut de l'hélice 44. De la même façon, la zone d'interaction de Dim2 sur le pré-ARNr 20S a été attribuée, chez la levure, à des nucléotides des hélices 24, 28 et 45, situées sur le haut de la plateforme et le bas de l'arrière de la tête, côté interface avec la sous-unité 60S. Ces données indiquent que cette zone de densité supplémentaire pourrait être attribuée à la présence des co-facteurs RIO1 et DIM2.

Afin d'explorer plus avant cette hypothèse, nous avons ajusté dans cette zone de densité supplémentaire les structures atomiques de RIO1 et DIM2 (code d'accèsion pdb respectifs : 4OTP et 3AEV) par rigid body docking. Nous avons pour cela utilisé la commande « fit in map » du programme CHIMERA. Les résultats de ces essais sont présentés **Figure 61d**. L'ajustement de ces deux structures au vu de la taille des densités supplémentaires paraît correct ; cependant les structures utilisées sont plus petites que les protéines humaines correspondantes. En outre, nous n'avons pas effectué cette expérience d'ajustement (avec la commande « fit in map ») pour la structure de NOB1, qui est le troisième co-facteur de

maturation présent sur cette particule tardive. En effet la carte de différence employée révèle une petite densité supplémentaire au niveau de la plateforme, à laquelle on ne peut pas attribuer cette protéine avec confiance.

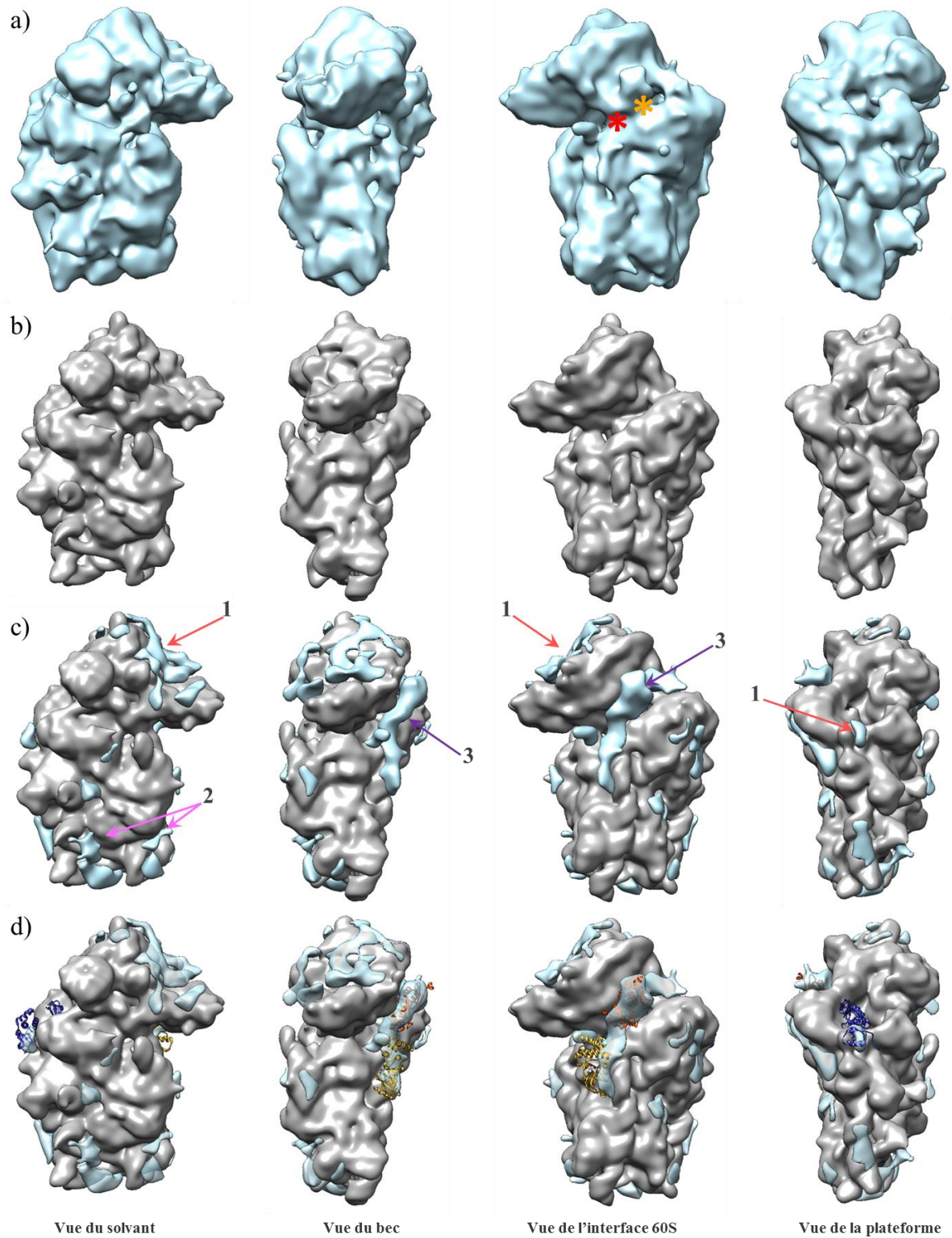


Figure 63: Comparaison des structures 3D de la particule pré-40S intermédiaires RIO1(KD) et de la sous-unité 40S. En a). Les vues de surface de la structure 3D de la particule pré-40S RIO1(KD) sont représentées en bleu clair, les astérisques jaune et orange correspondent à des densités supplémentaires sur la particule pré-40S

RIO1(KD) comparé à la petite sous-unité. En b) les vues correspondantes de la structure 3D de la petite sous-unité ribosomique, filtrée à 19Å sont indiquées en gris. En c) La carte de différence entre les deux structures 3D (particule pré-40S et petite sous-unité filtré à 19Å) est représentée en bleu. Les densités supplémentaires sont indiquées par des flèches (la flèche rouge correspondant à la zone 1, la rose à la zone 2 et la violet la zone 3). En d) Localisation hypothétique des co-facteurs sur la particule pré-40S RIO1(KD). La structure des co-facteurs DIM2, RIO1 sont indiquées en orange, jaune respectivement et ont été ajustées via la commande « fit in map ». Concernant NOB1 en bleu foncé, elle a été placée dans la carte de différence manuellement. La structure 3D de la petite sous-unité filtrée à 19Å de résolution est représentée en gris, les densités supplémentaires apparaissent sont en bleu transparent.

En conclusion, la structure 3D de la particule pré-40S humaine RIO1(KD) a été déterminée à 15Å de résolution. Il s'agit de la meilleure résolution obtenue, jusqu'à présent, pour une reconstruction 3D d'un précurseur de la petite sous-unité particule pré-40S eucaryote. Nous avons pu proposer un modèle de position des co-facteurs sur cette particule en nous basant sur les données de CRAC obtenues chez la levure.

Discussion

L'objectif de ma thèse était d'étudier l'assemblage cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique humaine. Ces travaux ont permis d'implémenter au laboratoire une approche d'analyse structurale à grande échelle basée sur la cryo-MET et à l'analyse d'images. J'ai ainsi pu déterminer la première structure 3D d'une particule pré-40S humaine. Ceci a permis d'une part de proposer un modèle de positionnement des co-facteurs de maturation sur la particule pré-40S étudiée, d'autre part de souligner une nouvelle divergence dans la formation de la petite sous-unité ribosomique humaine comparé à la levure, au vu de la présence de RACK1 sur les particules pré-40S humaines. Ensuite, j'ai également obtenu la structure tridimensionnelle d'une particule pré-40S à un stade de maturation plus tardif. La comparaison des structures de particules pré-40S obtenues a permis de mettre en évidence la présence de changements conformationnels des précurseurs de la petite sous-unité lors de leur passage d'un état intermédiaire à un état tardif de leur maturation.

A- Mise en place de l'analyse structurale

I- Les particules pré-40S observées présentent des morphologies différentes suivant l'appât de purification employé.

Au cours de cette étude, nous avons observé plusieurs types de particule pré-40S, purifiées en étiquetant les co-facteurs C21ORF70, ENP1, DIM2, LTV1 ou RIO1(KD). Nous avons ainsi purifié des précurseurs de la petite sous-unité ribosomiques à différentes étapes de leur maturation. Leur observation en coloration négative a révélé un seul type de particule si l'on utilise LTV1 ou RIO1(KD) comme appât, alors que les précurseurs isolés en étiquetant C21ORF70, ENP1 ou DIM2 présentaient plusieurs types de morphologie.

En effet, outre des particules de dimensions et de morphologie très semblables à une petite sous-unité ribosomique mature, nous avons observé dans ces trois dernières purifications des particules globulaires, d'environ 30nm de diamètre, semblables à des particules 80S (**Figure 35**). Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations. D'une part, ces particules pourraient correspondre à des particules 90S formées lors des étapes très précoces de la maturation de la petite sous-unité. D'autre part, ces complexes pourraient également représenter des particules pseudo-80S, issues de l'association de la particule pré-40S avec une

grande sous-unité, comme décrit lors des étapes finale de la maturation de la petite sous-unité chez la levure.

C21ORF70, ENP1 et DIM2 s'associent de façon très précoce avec les précurseurs de la petite sous-unité. Chez l'Homme, C21ORF70 n'interagit qu'avec des particules pré-40S nucléaires (Wyler *et al.*, 2011). Ceci suggère donc que les particules globulaires purifiées via C21ORF70 seraient des particules 90S.

L'identification des particules globulaires dans les purifications par DIM2 et ENP1 est plus ambiguë. Chez la levure, les co-facteurs Dim2 ou Enp1 co-sédimentent avec les particules pseudo-80S dans un gradient de sucrose (Strunk *et al.*, 2012). De plus, Dim2 serait le dernier des co-facteurs à se dissocier de la particule pré-40S (Strunk *et al.*, 2012). La composition en ARNr des particules DIM2 a été analysée par northern blot. Ces données indiquent que ces particules sont composées du pré-ARNr 18 S-E, et ne contiennent pas de précurseur plus précoce de l'ARNr 18S (**Figure 34**). Ceci suggère donc que les particules globulaires observées seraient des particules cytoplasmiques tardives. De plus, lors de son stage M2 dans notre équipe, Ramtin Shayan a déterminé la structure 3D des particules pré-40S purifiées via DIM2. Ces résultats préliminaires montrent que la morphologie des particules globulaires très semblable à celle des particules 80S. La présence de densités supplémentaires sur la particule 40S suggère que les particules globulaires pourraient correspondre à une association de la particule pré-40S avec une grande sous-unité. Nos observations pourraient donc représenter la première preuve de l'existence de particules pseudo-80S chez l'Homme.

Nous avons choisi de focaliser notre étude structurale sur les particules pré-40S intermédiaires et tardives purifiées en étiquetant LTV1 et RIO1(KD). Ces particules présentent un seul type de morphologie, proche de celui de la petite sous-unité ribosomique mature, et sont donc plus simples à caractériser.

II- Préparation des échantillons et acquisition d'images

Au cours de ma thèse, la difficulté technique la plus importante à laquelle j'ai été confrontée a été la détermination des conditions optimales de congélation des particules pré-40S. En effet, ces échantillons sont difficiles à manipuler. La répartition des particules sur la grille n'est pas homogène. En outre, ces particules, peu stables, forment de plus en plus d'agrégats avec le temps, et ce malgré leur conservation en aliquots à -80°C . Nous devons produire les grilles assez rapidement après décongélation d'un aliquot, puisque les particules perdaient leur intégrité structurale au bout de 12 heures à 4°C ; d'autre part, une fois décongelé, nous étions dans l'obligation d'utiliser l'aliquot dans son entier, ou bien de le jeter, car les particules ne supportaient pas d'être recongelées. Malgré tout, après un grand nombre d'essais, nous avons pu trouver des conditions de vitrification où la concentration et le degré de monodispersité des particules étaient en adéquation avec l'observation en cryo-MET et l'analyse d'images (**Tableau 5**).

Dans le but d'obtenir des structures 3D à la plus haute résolution possible, il était essentiel d'acquérir des images des particules pré-40S sur des microscopes haute résolution de dernière génération. Pour cela, les grilles produites à Toulouse ont été envoyées à un centre de microscopie électronique haute résolution, le NeCEN (Leiden, Pays-Bas), équipé d'un Titan Krios avec une caméra à détecteur direct d'électrons (**Figure 36**). La difficulté de cette stratégie réside dans la coordination de toutes les étapes : réception de l'échantillon, congélation et vérification systématique des grilles, envoi rapide au NeCEN pour l'acquisition des images, afin de limiter la contamination des grilles due à leur stockage.

III- Analyse d'images

Lors de cette étude, l'analyse d'images a été effectuée avec le logiciel RELION 1.3 qui permet, en plus de déterminer la structure 3D des particules étudiées, d'accéder à l'hétérogénéité structurale de ces particules. Cette suite de programmes a été conçue pour notamment minimiser l'intervention de l'utilisateur. Le raffinement de la structure 3D est par exemple autorégulé, ce qui permet d'éviter le biais dû à l'influence de l'expérimentateur lors de l'analyse d'images. La résolution des structures 3D des particules pré-40S intermédiaire (LTV1) et tardive (RIO1(KD)) est estimée à environ 19\AA et 15\AA respectivement (**Figure 45**).

et 60). Ainsi, la résolution de la structure des particules LTV1 est équivalente aux résolutions estimées pour les structures 3D des particules pré-40S de levure (Strunk *et al.*, 2011 ; Ghalei *et al.*, 2015). En revanche, la structure 3D de la particule pré-40S RIO1(KD) a été obtenue à une résolution jamais encore atteinte pour des précurseurs de la petite sous-unité eucaryote. Chez les procaryotes, des structures de pré-30S ont été déterminées avec des résolutions allant de 11Å à 18Å (Jomaa *et al.*, 2011 ; Leong *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2013).

La petite sous-unité mature est connue pour subir plusieurs types de mouvement lors de la traduction. Par exemple, le mouvement pivotant de la tête par rapport au corps de cette particule est nécessaire pour la translocation de l'ARNt lors de l'élongation de la traduction (Ben Shem *et al.*, 2011). Une rotation du corps de la particule 40S est également observée chez la petite sous-unité ribosomique eucaryote (Budkevich *et al.*, 2014, Khatter *et al.*, 2015). Ainsi, la flexibilité de ces particules est un facteur limitant la résolution de leurs structures 3D.

Malgré cette flexibilité intrinsèque, l'obtention de structures de la sous-unité 40S à des résolutions subnanométriques est possible, mais nécessite une fixation chimique légère des particules, et/ou une sélection drastique des images employées dans la reconstruction 3D:

- La structure 3D d'un complexe (reconstitué) de pré-initiation 43S de mammifère a été obtenue par l'équipe de J. Franck, à une résolution de 11.6 Å, à partir de 29 000 particules sur un total de 650 000 particules extraites (soit 2,4 % du jeu de données initial) (Hashem *et al.*, 2013). Cette équipe a aussi déterminé deux reconstructions 3D de ce complexe 43S en interaction avec l'IRES présent sur l'ARNm du virus de la peste porcine à des résolutions de 8,5 Å et 9,5 Å à partir de 72 900 et 18 000 particules respectivement, sur un total d'environ 630 000 particules extraites (Hashem *et al.*, 2013). Très récemment, la structure 3D du complexe de pré-initiation 43S a été déterminée par cryo-MET à une résolution moyenne de 6Å. Pour cela, 13% des particules extraites ont été incluses dans la structure 3D présentée (des Georges *et al.*, 2015).

- Dans l'équipe de Nenad Ban, un traitement au disuccinimidyl suberate, un agent pontant bi-fonctionnel, a été utilisé pour former des complexes 43S stables (cf perspectives). Leurs structures a ainsi pu être déterminée à 6.47Å de résolution. Pour cela, deux jeux de données de 712 716 et 721 652 particules ont été acquis. La reconstruction 3D a été calculée à partir de 27 354 particules de ces deux jeux de données combinés (Aylett *et al.*, 2015). Ceci signifie que seulement 1,9 % des particules extraites sont incluses dans la reconstruction 3D calculée.

- Enfin, des structures 3D de la petite sous-unité ont déjà été déterminées à une résolution quasi-atomique (Khatter *et al.*, 2015 ; Quade *et al.*, 2015), mais seulement lorsque celle-ci est associée à la grande sous-unité formant le ribosome. En effet, l'interaction avec la particule 60S permet de stabiliser la particule 40S.

Dans notre étude, la structure 3D des particules pré-40S LTV1 a été déterminée à partir de 54 436 particules, sur un total de 103 247 extraites. Environ 53 % ont donc été utilisées pour le calcul des reconstructions 3D de ces précurseurs intermédiaires de la petite sous-unité. La structure 3D des particules RIO1(KD) a été déterminée à partir de 10 028 particules sur un total de 43 252 particules extraites. Ainsi 23 % des particules extraites ont été incluses dans cette reconstruction 3D. Une des solutions pour obtenir des structures 3D à meilleure résolution sera notamment d'acquérir un plus grand nombre d'image des particules étudiées pour augmenter les jeux de données (cf Perspectives).

B- Analyse des structures des particules pré-40S humaines obtenues

L'analyse structurale mise en place durant ma thèse a permis de calculer les premières structures 3D de particules pré-40S humaines intermédiaires et tardives. Jusqu'à présent, seule la structure 3D d'un précurseur intermédiaire de la petite sous-unité chez la levure a été déterminé par cryo-MET (Strunk *et al.*, 2011).

I- Composition des différentes particules étudiées

Il a été montré précédemment par l'équipe d'Ulrike Kutay que la particule pré-40S intermédiaire, purifiée en utilisant LTV1 comme appât, est composée des co-facteurs de maturation qui sont ENP1, LTV1, RIO2, TSR1, NOB1 et DIM2 (Wylter *et al.*, 2011). Il est à noter que, à la différence de la levure, le co-facteur DIMT1L, homologue de Dim1 chez l'Homme, est une protéine exerçant sa fonction dans la biogenèse du ribosome dans le nucléole (Zorbas *et al.*, 2015). De fait, cette protéine, qui entre dans la composition des particules pré-40S Rio2-TAP de levure (voir ci-dessous), n'a pas été retrouvée lors de l'analyse de la composition des particules pré-40S cytoplasmiques humaines par spectrométrie

de masse et western blot (Wyler *et al.*, 2011 ; Widman *et al.*, 2012). La particule pré-40S RIO1(KD), purifiée à un stade de maturation plus tardif, est de composition plus simple. En effet, elle est associée à seulement trois co-facteurs : RIO1(KD), DIM2 et NOB1 (Widmann *et al.*, 2012).

Chez la levure, les données protéomiques indiquent que la particule pré-40S intermédiaire purifiée via Rio2-TAP est constituée des co-facteurs Ltv1, Enp1, Tsr1, Dim2, Nob1, Dim1 et ne contient pas Rack1, Rps10 et Rps26 (Schafer *et al.*, 2003 ; Strunk *et al.*, 2011).

Le complexe Ltv1-Enp1 est situé à proximité du site de fixation de Rps10. Cette protéine ne pourrait donc être recrutée que lorsque le complexe Ltv1-Enp1 est libéré de la particule pré-40S (Strunk *et al.*, 2011). De même, la zone d'interaction de Rps26 est située au voisinage du site de fixation de Dim2 sur la particule pré-40S de levure. Ainsi, les auteurs de l'étude proposent qu'en présence de Dim2, Rps26 ne pourrait pas être associé à la particule pré-40S (Strunk *et al.*, 2011). Dim2 étant le dernier des co-facteurs à être libéré des particules pré-40S, l'association de Rps26 avec la particule pré-40S aurait donc lieu lors d'une étape très tardive de sa maturation. Cependant, des données de la littérature vont à l'encontre de cette conclusion. En effet, une étude montre, par western blot, la présence de Rps26 dans des particules purifiées en utilisant Noc4 comme appât (Schutz *et al.*, 2014). Noc4 est un co-facteur de maturation qui n'est associé aux particules pré-40S que dans le nucléole (Grandi *et al.*, 2002). Rps26 pourrait donc s'associer précocement à la particule pré-40S, dès le nucléole.

Ainsi, la chronologie d'association de Rps26 avec les précurseurs de la petite sous-unité reste à éclaircir. Afin de concilier ces conclusions contradictoires, une hypothèse est que Rps26 pourrait être associée précocement aux particules pré-40S, mais de façon labile, et son interaction avec le précurseur de la petite sous-unité purifiée via Rio2-TAP serait perdue au cours de la purification.

Nous avons étudié la présence de RPS10 et RPS26 chez les particules pré-40S humaines purifiées à un stade de maturation intermédiaire et tardif. Christian Montellese, doctorant dans l'équipe de Ulrike Kutay, a mis en évidence par western blot que la particule pré-40S LTV1 ne contenait ni RPS10 ni RPS26. En revanche, ces deux protéines sont présentes dans la particule RIO1(KD) (**Figure 48**). Ces résultats sont en bon accord avec les travaux menés précédemment par notre équipe, qui ont permis de classer RPS10 et RPS26 dans les pRPS (« progression RPS ») : ces pRPS sont requises pour les étapes tardives de la maturation de la particule pré-40S (O'Donohue *et al.*, 2010).

Comme pour la levure, la présence du module formé par LTV1 et ENP1 au niveau du bec de la particule empêche l'association de RPS10 aux pré-40S LTV1. Dans les particules pré-40S RIO1(KD), plus tardives, ce module a été relargué, permettant ainsi l'incorporation de RPS10 à la petite sous-unité. Concernant RPS26, on peut envisager que cette protéine soit associée de manière labile avec la particule pré-40S intermédiaire. Ainsi RPS26 se décrocherait de la particule pré-40S LTV1 au cours de la purification, comme cela pourrait être le cas chez la levure. Au cours de la maturation de la petite sous-unité, l'interaction de RPS26 avec la particule pré-40S se stabiliserait (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007). Ainsi son association avec la particule pré-40S RIO1(KD) n'est pas perdue lors de la purification. Une deuxième hypothèse est que, comme RPS10, RPS26 s'associe avec la particule pré-40S lors d'une étape tardive de sa maturation. En effet, chez l'Homme, la protéine RPS26 n'est pas présente dans les précurseurs précoces de la petite sous-unité purifiés en étiquetant notamment C21ORF70 ou NOC4. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de clarifier l'étape à laquelle RPS26 s'associe avec le précurseur de la petite sous-unité. Dans tous les cas, nos résultats montrent que dans la particule RIO1(KD), la présence de DIM2 n'empêche pas l'association de RPS26 à la petite sous-unité ribosomique (cf p171).

II- La particule pré-40S intermédiaire LTV1

Les particules pré-40S intermédiaires présentent la forme globale d'hippocampe caractéristique de la petite sous-unité mature avec les domaines du bec, de la tête, du corps et de la plateforme. La reconstruction 3D de cette particule a été estimée à 19 Å de résolution (pour un coefficient FSC de 0,143).

L'observation des sections de la structure 3D consensus de la particule pré-40S LTV1 révèle peu de détails. Cette particule paraît en général mal définie, et ce phénomène est accentué pour les domaines du bec et de la plateforme. Ceci témoigne de l'hétérogénéité continue, autrement dit de la grande flexibilité de ces particules intermédiaires et en particulier des régions citées ci-dessus.

Les particules intermédiaires ont été purifiées en étiquetant le co-facteur LTV1 dans des conditions sauvages, c'est à dire non bloquées à un stade de maturation. Ce co-facteur est connu pour s'associer majoritairement aux particules pré-40S dans le cytoplasme mais aussi dans le nucléoplasme chez l'Homme (Zemp *et al.*, 2009 ; Carron *et al.*, 2012). La solution de

particules purifiées par cet appât contient donc des particules pré-40S à des états de maturation différents. Ces particules, en cours de formation, très flexibles (voir ci-dessus), pourraient également présenter une certaine hétérogénéité compositionnelle (hétérogénéité discontinue). Ces différentes formes d'hétérogénéité peuvent être la cause de la résolution moyenne obtenue.

Un ensemble de données dans la littérature peut expliquer la flexibilité du bec et de la plateforme de la particule pré-40S. En effet, l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique est séquentiel. Le domaine 3' de l'ARNr 18S correspondant à la tête et au bec de la particule pré-40S se forme en dernier, suite à l'interaction des pRPS (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007 ; O'Donohue *et al.*, 2010). Chez la levure, il a été suggéré que l'assemblage des co-facteurs Rio2, Tsr1, Ltv1 et Enp1 permet de maintenir la conformation flexible du domaine 3' du pré-ARNr 20S (Hector *et al.*, 2014). De plus, une étude montre qu'un changement de conformation du bec interviendrait pour le passage du précurseur de la petite sous-unité au travers du CPN chez la levure (Schafer *et al.*, 2006).

La région du pré-ARNr 20S contenant le site D chez la levure est connue pour être flexible (Granneman *et al.*, 2010). De plus, l'une des dernières étapes connues de la formation de la petite sous-unité correspond au clivage de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S-E par NOB1 pour donner l'ARNr 18S mature (Fatica *et al.*, 2003 ; Fatica *et al.*, 2004). L'endonucléase et l'extrémité 3' du pré-ARNr se situe au niveau de la plateforme de la particule pré-40S. La maturation de cette région n'est donc pas complète dans les particules pré-40S ce qui peut contribuer à la flexibilité de cette région.

De même, la flexibilité présente au niveau du centre du corps des particules pourrait être expliquée par la maturation incomplète de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S. Cette hypothèse a été formulée suite à l'observation des variants générés lors des essais de classification 3D (cf paragraphe B.III.3).

La particule intermédiaire LTV1 présente une forme globale semblable à la petite sous-unité ribosomique mature. La comparaison de leurs deux structures tridimensionnelles a mis en évidence de densités supplémentaires sur la particule LTV1, qui correspondent à la présence des co-facteurs de maturation. En nous basant sur les données existantes pour la levure, expériences de CRAC (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014) et structure 3D de la particule pré-40S obtenue en cryo-MET (Strunk *et al.*, 2011), nous proposons un modèle de positionnement des co-facteurs sur cette particule pré-40S LTV1 .

Chez la levure, le co-facteur Tsr1 interagit avec ce précurseur de la petite sous-unité, coté interface avec la grande sous-unité, à proximité du site de liaison A de l'ARNt sur la petite sous-unité (Strunk *et al.*, 2011). La densité supplémentaire présente au niveau de cette même zone chez la particule pré-40S humaine a donc été attribuée à TSR1. Il est à noter que, pour TSR1, les données de cryo-EM (concernant les particules humaines et de levure) et de CRAC ne sont pas en parfait accord. En effet, la position de Tsr1 sur la structure 3D des particules pré-40S ne correspond pas avec les sites principaux d'interaction de ce co-facteur avec l'ARNr 18S déterminés par les expériences de CRAC.

Chez la levure, l'endonucléase Nob1 est située sur la plateforme de la particule pré-40S Rio2-TAP (Strunk *et al.*, 2011). De plus, ses sites d'interaction sont localisés au niveau de l'hélice 40 (nucléotides 1390-1398) et de la région 5' de l'ITS1, c'est-à-dire au niveau de la tête et de la plateforme de la particule (Granneman *et al.*, 2010 ; Turowski *et al.*, 2014). Par conséquent, la densité additionnelle située au niveau de la plateforme de la particule LTV1 a été attribué à NOB1.

Concernant, les co-facteurs ENP1 et LTV1, les données de CRAC indiquent que Enp1 interagit avec l'hélice 33 (nucléotides 1256-1259) situé au niveau du bec de la particule et Ltv1 avec les hélices 16 (nucléotides 453-454) et h41/41A (nucléotides 1490-1491) présentes respectivement à proximité de l'épaule et du bec de la particule (Granneman *et al.*, 2010). Si toutes les données s'accordent à montrer que le module Ltv1/Enp1 est situé à la jonction entre le bec et l'épaule de la pré-40S, le positionnement de Ltv1 par rapport à Enp1 sur la structure 3D de la particule pré-40S Rio2-TAP est contradictoire. La première structure publiée propose que Ltv1 soit localisé sur le bec, et qu'Enp1 soit en dessous, à proximité du corps (Strunk *et al.*, 2011). Néanmoins, une deuxième étude, menée par la même équipe, montre un positionnement inverse de Ltv1 et Enp1 (Ghalei *et al.*, 2015). Afin de déterminer la position d'ENP1 sur la particule pré-40S LTV1, nous avons réalisé des expériences de localisation par immuno-EM. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'ENP1 serait localisé dans la partie haute du bec ; LTV1 assurerait donc la jonction entre la tête et le corps de la particule. Ce résultat reste à confirmer, mais il est en bonne adéquation avec les données de CRAC et le deuxième modèle de positionnement proposé grâce à la cryo-MET.

Chez la levure, Rio2 est présent au niveau de la tête de la particule, aux alentours du site de fixation P de l'ARNt (Strunk *et al.*, 2011). De plus, les données de CRAC indiquent que ce co-facteur interagit avec l'hélice 31 (nucléotides 1194-1196) dans la région du site

d'interaction P de l'ARNt (Grannman *et al.*, 2010). Chez l'Homme, la densité supplémentaire localisée du côté de l'interface avec la particule 60S à proximité du site d'interaction P de l'ARNt sur la particule pré 40S, correspondrait donc à la présence de RIO2.

Ces observations soulignent que la position des co-facteurs est globalement conservée entre l'Homme et la levure (**Figure 62**). Cependant, la comparaison des structures 3D de la particule pré-40S humaine et de levure montre que la forme des densités supplémentaires et l'orientation des co-facteurs peuvent présenter des différences entre ces deux organismes (**Figure 62**). En effet, chez la levure, la densité supplémentaire correspondant à la présence de Rio2 est orientée vers le sillon de l'ARNm. En revanche, chez l'Homme, cette densité a une forme allongé qui parcourt l'hélice 44 de l'ARNr 18S. De plus, la densité additionnelle attribuée à Tsr1 est orientée vers le corps de la particule pré-40S chez la levure, alors qu'elle est dirigée vers l'extérieur et le bec de la particule chez l'Homme.

La comparaison de notre structure de particule pré-40S LTV1 humaine avec son équivalent chez la levure (particules Rio2-TAP) nous a permis de noter deux différences majeures (**Figure 62**). Tout d'abord, nous n'avons pas pu positionner DIM2 sur la structure de la particule LTV1 (cf ci-dessous). Mais, sur cette structure, nous voyons une densité formant « l'oreille », à l'arrière de la tête de la particule, qui correspond à la présence de RACK1. Cette protéine n'appartient pas à la particule pré-40S de levure Rio2-TAP (cf. II.3)

Chez la levure, la position de Dim2 se trouve au niveau du bas de la tête et du haut de la plateforme du côté de l'interface avec la grande sous-unité, sur la structure de la particule pré-40S déterminée par cryo-MET (Strunk *et al.*, 2011). De plus, le co-facteur Dim2 interagit avec les régions 5' de l'ITS1, avec les hélices 45, 24 et 28 de l'ARNr 18S, situées au niveau du cou et de la plateforme de la particule pré-40S (Turowski *et al.*, 2014). Pour la particule humaine, nous n'avons pas observé de densité supplémentaire correspondant à la présence de DIM2 sur la structure 3D consensus des particules pré-40S intermédiaires humaines, ni sur les variants structuraux générés. Or, l'étude de la composition de la particule LTV1 par western blot et spectrométrie de masse a mis en évidence la présence de DIM2 dans ces particules. Une première hypothèse pour expliquer ce phénomène est que DIM2 serait enfoui dans la plateforme de la particule LTV1, ce qui expliquerait l'absence de densité supplémentaire visible malgré sa présence dans les particules pré-40S LTV1. D'autre part, une deuxième hypothèse est que DIM2 serait très flexible et/ou associée de façon très dynamique à la

particule pré-40S donc non détectable sur la structure 3D du précurseur intermédiaire de la petite sous-unité.

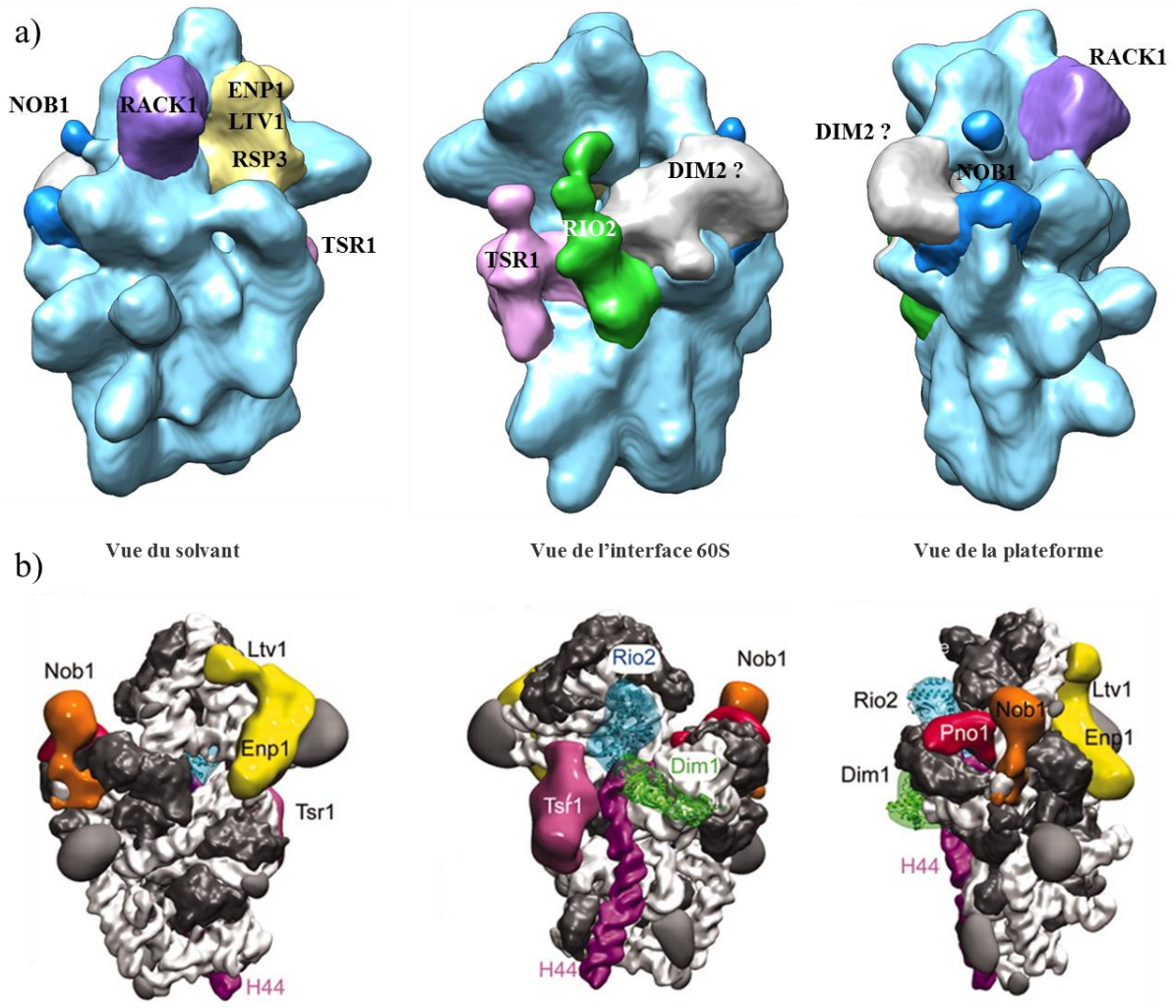


Figure 64: Modèle de positionnement des co-facteurs pour la particule pré-40S LTV1 purifiée à un stade de sa maturation dit intermédiaire en a) chez l'Homme et en b) chez la levure (d'après Strunk et al., 2011). La position des co-facteurs sur les précurseurs intermédiaires de la petite sous-unité est globalement conservée entre la levure et l'Homme

III- RACK1, acteur du couplage correct de la maturation de la petite sous-unité ribosomique et de l'initiation de la traduction?

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) est une protéine de 36kDa. Elle possède une structure formée de 7 répétitions aspartate-tryptophane (WD repeats) et présente une homologie avec la sous-unité β de protéine G trimérique. RACK1 a été identifiée comme une protéine d'ancrage pour la forme active de la kinase C β II (PKC β II). Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus des eucaryotes supérieurs (McCahill, *et al.*, 2002). Plus de 100 protéines sont connues pour interagir avec RACK1 et parmi elles, 72 ont leurs fonctions modulées par RACK1 (Gandin *et al.*, 2013). Cette protéine est impliquée dans divers processus fondamentaux de la cellule comme le contrôle de la migration et de l'adhérence cellulaire, et la régulation de la traduction (McCahill *et al.*, 2002 ; Nilsson *et al.*, 2004 ; Gandin *et al.*, 2013). En outre, RACK1 est un constituant de la petite sous-unité eucaryote mature (Sengupta *et al.*, 2004).

Les structures 3D que j'ai obtenues au cours de ma thèse révèlent la présence de RACK1, tant sur les particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires (LTV1) que tardives (RIO1(KD)). La présence de RACK1 dans les particules pré-40S LTV1 a aussi été mise en évidence par l'analyse protéomique (Wyler *et al.*, 2011). Ceci représente une nouvelle différence dans la biogenèse des ribosomes chez l'Homme comparé à la levure. Nous avons donc décidé de caractériser le rôle de RACK1 dans la formation de la petite sous-unité chez l'Homme.

RACK1 est associée aux particules pré-40S cytoplasmiques. De plus, cette protéine a été retrouvée dans des particules pré-ribosomiques nucléaires, purifiées par l'étiquetage des co-facteurs de maturation NOC4 (Wyler *et al.*, 2010) et C21ORF70 (C. Montellese, données personnelles). Ceci suggère que, chez l'Homme, RACK1 puisse être associé à des particules pré-40S nucléaires ou nucléolaires. Chez la levure, l'association de RACK1 aux particules pré-40S n'est pas aussi évidente. En effet, Asc1, l'orthologue de RACK1 chez la levure, est co-précipitée dans des particules pré-ribosomiques purifiées par Enp1-TAP (Schäfer *et al.*, 2003); ce co-facteur s'associe aux particules 90S dans le nucléole, mais a été également classé parmi les co-facteurs les plus tardifs de la maturation des pré-40S de levure (Strunk *et al.*, 2012 ; Hector *et al.*, 2014). Au vu de cette observation, cette protéine pourrait s'associer avec la particule pré-40S soit de façon précoce dans le noyau, soit lors des étapes très tardives de maturation. De la même façon, en conditions de pontage chimique, Asc1 est associée au co-

facteur de maturation étiqueté Fap7-TAP (Strunk *et al.*, 2012). Mais ce co-facteur apparaît comme associé de manière très dynamique aux particules pré-ribosomiques (Hellmich *et al.*, 2013 ; Loc'h *et al.*, 2014), et la méthode de purification en conditions de cross-link n'exclut pas d'éventuels artefacts d'association.

Cependant, Asc1 n'a pas été trouvé dans la structure de particules pré-40S cytoplasmiques intermédiaires (Strunk *et al.*, 2011). A ce jour, aucune structure 3D de précurseur cytoplasmique tardif de la sous-unité 40S de levure n'a été résolue ; ceci pourrait permettre de statuer sur la présence d'Asc1 à cette étape de la maturation de la particule 40S de levure. De plus, la purification d'affinité par Asc1-TAP révèle l'association de l'ARNr 18S et de protéines ribosomiques à cette protéine-appât (Li *et al.*, 2009 ; Schütz *et al.*, 2014). En revanche, Asc1-TAP ne permet pas de co-précipiter de pré-ARNr 20S, ni de co-facteurs de maturation de la petite sous-unité ribosomique (Schütz *et al.*, 2014). Ces données suggèrent qu'Asc1 est associé à la petite sous-unité mature et non aux particules pré-40S chez la levure. L'étape de maturation à laquelle Asc1 s'associe à la particule pré-40S est donc peu clair à ce jour.

Asc1 n'est pas strictement requis pour la viabilité cellulaire. Néanmoins, l'interruption du gène *Asc1* entraîne un phénotype de croissance lente (Kouba *et al.*, 2012). Chez la souris, l'interruption du gène *RACK1* entraîne la mort de l'embryon. Cependant, la déplétion de la protéine RACK1 par des outils de type siRNA ou shRNA semble peu influencer sur la viabilité de lignées cellulaires humaines stabilisées, utilisées pour des expériences *in cellulo* (HeLa, HEK293...) (Majzoub *et al.*, 2014 ; nos données). Ces données pourraient notamment s'expliquer par le fait que chez les mammifères, RACK1 serait requis dans les tissus nécessitant une forte production de ribosomes afin d'assurer leur développement. Par ailleurs, RACK1 est impliqué dans divers processus de migration cellulaire (pour revue, Gandin *et al.*, 2013), phénomène capital pour la formation de l'embryon.

Chez l'Homme, un crible systématique a permis de détecter RACK1 parmi les protéines impliquées dans la maturation de la petite sous-unité. En effet, sa déplétion entraîne une accumulation cytoplasmique du cofacteur de maturation ENP1. Ce phénomène a permis aux auteurs de ce travail de classer RACK1 parmi les acteurs contribuant à la maturation cytoplasmique de la particule pré-40S humaine (Wild *et al.*, 2010). La présence de RACK1 sur les particules pré-40S cytoplasmiques que nous avons étudiées dans ce travail de thèse, ainsi que les données de la littérature, divergentes entre la levure et l'Homme, nous ont

conduits à essayer de préciser le rôle de RACK1 dans la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique humaine. Les expériences de perte de fonction que nous avons réalisées dans l'équipe ont permis de montrer que l'absence de RACK1 retarde la maturation du pré-ARNr 18S-E, le dernier précurseur de l'ARNr 18S mature. L'accumulation de 18S-E lors de la déplétion de RACK1 est un comportement typique d'une pRPS, le sous-groupe de RPS requises pour les étapes tardives de la maturation de la petite sous-unité ribosomique (O'Donohue *et al.*, 2010). Les expériences de fractionnement subcellulaire que nous avons réalisées ont permis de préciser que RACK1 est requis pour la conversion du pré-ARNr 18S-E cytoplasmique en ARN 18S mature, et ne semble pas être requis pour l'export nucléaire de la particule pré-40S. Ces données sont en accord avec les observations réalisées dans le crible systématique mentionné ci-dessus.

De manière surprenante, la déplétion de RACK1 ne semble pas entraîner de défaut de formation de la petite sous-unité ribosomique humaine. En effet, lors de cette déplétion, on observe, sur gradient de sucrose, que les pics correspondant aux sous-unités 40S et 60S restent inchangés. En revanche cette déplétion entraîne une augmentation du pic correspondant aux particules 80S appelées « monosomes » et une diminution du nombre de polysomes. Ce phénomène semble propre à RACK1; en effet, la déplétion de toutes les autres RPS (à l'exception de RPS25) entraîne une diminution des pics correspondant aux sous-unités 40S libres et à la particule 80S dite « monosome », couplée à l'augmentation du pic de sous-unités 60S libres. L'augmentation du rapport monosome/polysomes, ainsi que la stabilité des pics de fractions 40S et 60S libres sur un gradient de sucrose est un marqueur de défauts de l'initiation de la traduction (Valasek *et al.*, 2002 ; Deloche *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2009 ; Kouba *et al.*, 2012 ; Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). Cette analyse sur gradient suggère que RACK1 est impliqué dans une ou plusieurs étapes de l'initiation de la traduction. De fait, cette hypothèse est étayée par un nombre croissant de données de la littérature reliant directement RACK1 à l'initiation de la traduction eucaryote :

- chez la levure, il a été démontré qu'Asc1 est requis pour l'initiation de la traduction : Asc1 interagirait directement avec le domaine C-terminal de NIP1/eIF3c, et favoriserait ainsi l'assemblage du complexe multimodal eIF3 à la particule 40S (Kouba *et al.*, 2012). Cette association n'a à ce jour pas été confirmée dans les structures 3D de complexes de pré-initiation résolues chez la levure, (Erzberger *et al.*, 2014 ; Aylett *et al.*, 2015). Cependant, la structure du complexe de pré-initiation 43S de mammifère publiée récemment montre que eIF3c, bien que situé au niveau de la plateforme et établissant des contacts directs avec

Rps27, Rps13 et le segment ES7 et l'hélice 22 de l'ARNr 18S, n'interagit pas avec RACK1. En outre, cette structure révèle que c'est la sous-unité eIF3d du complexe eIF3 qui est en contact direct avec RACK1 (des Georges *et al.*, 2015).

- chez l'humain, plusieurs travaux indépendants ont attribué à RACK1 un rôle dans l'initiation de la traduction :

(1) L'équipe de Stefano Biffo a montré comment RACK1 recrute la forme active de la PKC β II (isoforme β II de la Protéine Kinase C) sur le ribosome. Celle-ci pourrait alors phosphoryler plusieurs facteurs d'initiation de la traduction, dont eIF6, un facteur d'anti-association de la grande et de la petite sous-unité ribosomiques (Ceci *et al.*, 2003 ; Grosso *et al.*, 2008). Ainsi, RACK1 recruterait la forme active de la PKC β II, qui phosphorylerait eIF6. Ceci entraînerait le départ d'eIF6 de la sous-unité 60S, qui pourrait alors s'associer au complexe de pré-initiation 48S et démarrer la traduction. Mais l'inhibition de la dissociation d'eIF6 entraîne une augmentation des pics de sous unités ribosomiques libres et une diminution des pics de 80S et de polysomes (Ceci *et al.*, 2003), ce qui n'est pas ce que nous observons lorsque nous déplaçons RACK1. De plus, eIF6 est situé sur la grande sous-unité du côté de l'interface avec la petite sous-unité, en interaction avec Rpl23 (Gartmann *et al.*, 2010). Au vu de la position d'eIF6 et Rack1 sur le ribosome 80S, leur interaction via la PKC β II semble difficile.

(2) Un autre facteur d'initiation dont la phosphorylation serait assurée par le recrutement, via RACK1, de la PKC β II sur le ribosome, est eIF4E (Ruan *et al.*, 2012). Le facteur d'initiation eIF4E fait partie du complexe eIF4F qui s'associe à la coiffe de l'ARNm et active celui-ci en le déroulant. Cet ARNm activé va se lier au complexe de pré-initiation 43S et former le complexe 48S, qui pourra ensuite entrer en traduction. Il a été démontré que par cette action indirecte, la surexpression de RACK1 peut entraîner la fibrogènes de cellules hépatique quiescentes (Liu *et al.*, 2015)

(3) Récemment, des travaux ont montré que RACK1 est essentiel pour l'initiation de la traduction IRES-dépendante du virus de l'hépatite C (HCV) dans des cellules hépatiques en culture ; c'est aussi le cas pour la traduction IRES-dépendante du Virus de la paralysie du criquet (CrPV) chez la drosophile (Majzoub *et al.*, 2014). Le rôle précis de RACK1 dans ces initiations non canoniques reste à élucider. L'une des hypothèses proposées par Majzoub *et al.* est que RACK1 et eIF3j auraient une action synergique dans ce processus. Il est à noter que chez la levure, la délétion de HCR1 (l'orthologue d'eIF3j) entraînait non seulement un

blocage de la traduction, mais aussi une accumulation du pré-ARNr 20S, révélant pour la première fois une protéine assurant un rétrocontrôle entre la fin de la maturation de la 40S et l'initiation de la traduction (Valasek *et al.*, 2001). Cependant, nous avons essayé de reproduire ces résultats sur des cellules humaines HeLa, et n'avons pas observé de phénomène similaire (M.F. O'Donohue, données personnelles).

Bien qu'un lien direct soit encore à établir, l'ensemble de ces données nous permet de proposer, pour la protéine RACK1 humaine, un rôle de capteur surveillant le déroulement correct de deux mécanismes: la fin de la maturation cytoplasmique de la particule 40S et l'initiation de la traduction. La proximité physique de cette protéine avec la plateforme de la petite sous-unité ribosomique, où ont lieu les dernières étapes de la maturation du 18S-E, et où s'associent également les acteurs du complexe de pré-initiation 43S et de la traduction IRES-dépendante, font potentiellement de RACK1 une protéine « sentinelle », stratégiquement localisée pour surveiller le couplage correct de ces mécanismes.

IV- La particule pré-40S tardive RIO1(KD)

IV.1- L'analyse de la particule tardive RIO1(KD) révèle de nouvelles différences de maturation de la petite sous-unité 40S entre l'Homme et la levure

Le co-facteur RIO1 est une ATPase qui possède dans son site catalytique un acide aspartique, correspondant à l'acide aminé 244 chez la levure et 324 chez l'Homme. Lorsqu'on remplace cet acide aminé par une alanine, la protéine est alors incapable d'hydrolyser l'ATP (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014 ; Widmann *et al.*, 2012). Chez la levure, le co-facteur Rio1 ainsi muté est majoritairement associé à des particules pseudo-80S (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). La particule pseudo-80S correspond à l'association de la particule pré-40S avec la grande sous-unité et représente une étape tardive dans la maturation de la petite sous-unité (cf introduction). En parallèle, des travaux ont montré que la forme native de la protéine Rio1 interagit avec des particules pré-40S mais aussi avec des particules pseudo-80S (Turowski *et al.*, 2014 ; Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). Dans ce cas, environ 55 % des particules associées au co-facteur Rio1 sont des particules pseudo-80S (Turowski *et al.*, 2014).

Chez l'Homme, si la forme native de RIO1 s'associe de façon très dynamique avec la particule pré-40S, elle est stablement associée au complexe formé par les protéines PRMT5 (Protein Arginin MethylTransferase 5) et MEP50/WD45, aussi appelé méthylosome. Associé au méthylosome, RIO1 jouerait un rôle d'adaptateur et permettrait le recrutement de la nucléoline pour sa méthylation par PRMT5 (Guderian *et al.*, 2011 ; Widmann *et al.*, 2012). En revanche, lorsque son activité enzymatique est inactivée, Rio1(KD) est alors stablement associé à des particules pré-40S tardives. Ces précurseurs tardifs, purifiés en utilisant RIO1(KD) comme appât, sont composés du pré-ARNr 18S-E, de toutes les RPS et de trois co-facteurs de maturation qui sont RIO1(KD), DIM2 et NOB1. L'activité enzymatique de RIO1 étant essentielle au clivage du pré-ARNr 18S-E et au relargage de DIM2 et NOB1, les particules RIO1(KD) sont bloquées à un stade de maturation juste avant le clivage au site 3 du pré-ARNr. (Widmann *et al.*, 2012).

L'ensemble de nos données révèle une différence massive dans la maturation de la particule pré-40S humaine par rapport à la levure. En effet, chez l'Homme, aucune RPL n'a été détectée dans les particules RIO1(KD) par spectrométrie de masse. Dans cette même étude, l'analyse de l'extrait total sur gradient de sucrose démontre que la protéine RIO1(KD) est seulement présente dans la fraction correspondant aux particules pré-40S (Widmann *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'observation par cryo-MET montre que les particules RIO1(KD) présentent un seul type de morphologie dont la forme et les dimensions sont similaires à la petite sous-unité mature. Ainsi chez l'Homme, la protéine RIO1 mutée est associée uniquement à des particules pré-40S, et non à des particules pseudo-80S comme cela a été montré chez la levure. Seule l'observation de particules globulaires purifiées grâce à l'étiquetage de DIM2 suggère l'existence des particules pseudo-80S chez l'Homme. Si ce résultat se confirme, nos données montreraient que la cinétique de formation des particules pseudo-80S est différente chez l'Homme et la levure, et que RIO1 n'interviendrait pas dans la maturation de la petite sous-unité de la même façon ou au même moment.

IV.2- Structure de la particule pré-40S tardive

La structure 3D des particules pré-40S RIO1(KD) représente la première reconstruction 3D de précurseur de la petite sous-unité ribosomique à un stade tardif de maturation. L'observation des sections de la structure 3D des particules pré-40S tardives RIO1(KD) montre que, de même que la particule intermédiaire LTV1, les domaines du bec et de la plateforme présentent de la flexibilité. Cependant, le corps des particules RIO1(KD) est mieux défini que celui des particules LTV1. Ceci peut s'expliquer soit par le fait qu'il y aurait une stabilisation de la structure des particules pré-40S aux cours de leurs maturation ; soit par le traitement à la glutaraldéhyde qu'ont subi les particules pré-40S tardives dans le but de diminuer leur flexibilité. La comparaison de la structure 3D des particules RIO1(KD) avec celle de la petite sous-unité mature, par le calcul d'une carte de différences, a permis de souligner des densités supplémentaires chez la particule pré-40S, témoins de la présence des co-facteurs de maturation RIO1(KD), NOB1 et DIM2. En outre, la carte de différence révèle des densités additionnelles clairsemées sur la tête et le bec des particules RIO1(KD). Ceci pourrait suggérer que la tête de la particule n'aurait pas encore adopté sa position finale dans les particules pré-40S.

L'attribution des densités correspondant aux co-facteurs sur les particules RIO1(KD) a été effectuée en se basant sur les données de CRAC obtenues chez la levure (**Figure 63**). En effet, celles-ci ont permis de déterminer le site d'interaction de Rio1 avec l'ARNr 18S, qui se situe en haut de l'hélice 44 (Turowski *et al.*, 2014). La présence d'une densité additionnelle au niveau du haut de l'hélice 44 sur la structure 3D des particules humaines RIO1(KD) semble bien correspondre à la présence de RIO1. De même, le co-facteur Dim2 possède des sites d'interaction avec l'ARNr 18S présents sur les hélices 24, 28 et 45 qui sont localisés au niveau du haut de la plateforme et de l'arrière de la tête de la particule pré-40S (Turowski *et al.*, 2014). Au vu de ces sites de fixation avec l'ARNr 18S de Dim2, la densité supplémentaire localisée dans le sillon de l'ARNm pourrait correspondre à la présence de cette protéine. De plus, cette densité additionnelle présente dans le sillon de l'ARNm a aussi été observée sur les structures des particules purifiées en étiquetant DIM2 (déterminées par Ramtin Shayan lors de son stage M2 dans notre équipe). Une petite densité supplémentaire est présente au niveau de la plateforme et pourraient correspondre à la présence de NOB1. Cependant, la structure de ce co-facteur n'a pu être ajustée de façon réaliste dans ces densités supplémentaires.

La taille des densités supplémentaire assignées aux cofacteurs RIO1 et DIM2 permet un ajustement correct des structures de ces co-facteurs par rigid body docking à l'aide de CHIMERA. Cependant, toutes les structures existantes correspondent à des protéines plus petites que les protéines humaines pleine taille.

- pour RIO1, la structure, déterminée par cristallographie, est celle d'un fragment de RIO1 humain comprenant les acides aminés 143-494, incluant le domaine RIO kinase et les 106 acides aminés de l'extrémité C-terminale. La boucle correspondant aux acides aminés 212-243 n'a pas été observée, du fait de sa flexibilité (Ferreira-Cerca *et al.*, 2014). Ainsi, ce fragment de RIO1 contient 320 acides aminés alors que la protéine entière en contient 568.

- La structure 3D de DIM2 a été résolue chez l'archéobactérie *P. horikoshii*, elle inclut uniquement 219 acides aminés (Jia *et al.*, 2007). Chez l'Homme, ce co-facteur est formé de 252 acides aminés.

- De même, la structure 3D de NOB1 a été déterminée chez *P. horikoshii*. Cette protéine contient seulement 147 acides aminés correspondant au cœur fonctionnel de cette endonucléase. La protéine humaine est composée de 412 acides aminés.

Nos résultats de rigid body docking sont donc à prendre en considération avec précaution. Cette conclusion s'applique aussi pour les résultats de rigid body fitting obtenus chez la particule LTV1.

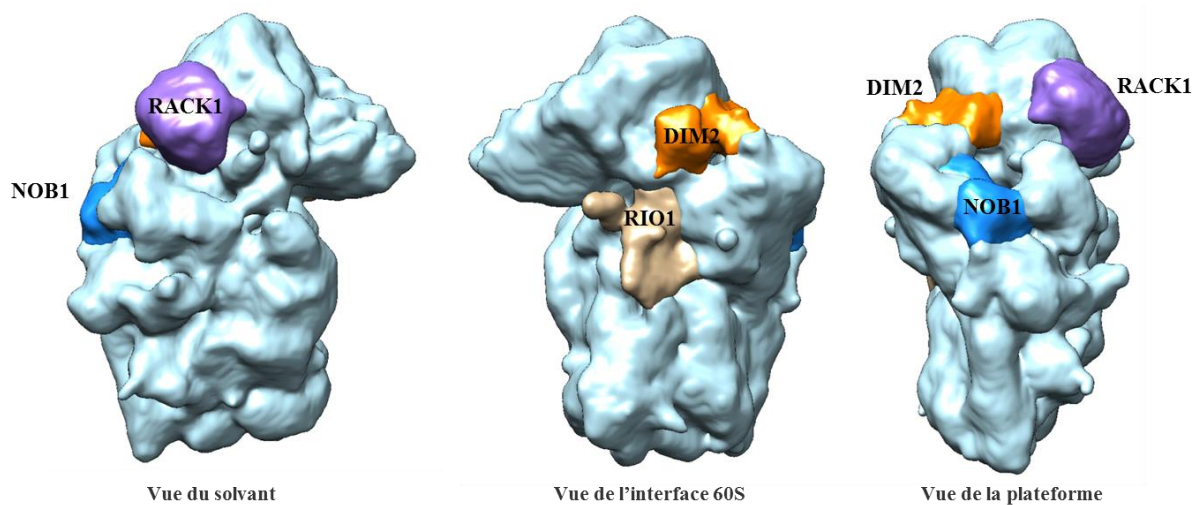


Figure 65: Modèle de positionnement des co-facteurs pour la particule pré-40S RIO1(KD) purifiée à un stade de sa maturation tardif chez l'Homme

C- Comparaison des structures obtenues : modèle de transition structurale entre les particules intermédiaires et tardives.

La comparaison des sections des deux structures obtenues montre que la particule pré-40S RIO1(KD) est moins flexible que celle des particules pré-40S LTV1. Cette différence de flexibilité suggère que le précurseur de la petite sous-unité se stabilise au cours de sa maturation. La rigidification de la structure de la particule pré-40S lors de sa formation a déjà été démontrée chez la levure. En effet, les particules pré-40S intermédiaires associées aux co-facteurs Rio2, Tsr1, Enp1 et Ltv1 sont plus flexibles que les particules pré-40S tardives, n'interagissant plus avec les co-facteurs cités ci-dessus (Ferreira-Cerca *et al.*, 2007 ; Hector *et al.*, 2014). Cependant, on ne peut pas exclure que le traitement à la glutaraldéhyde des particules pré-40S tardives joue un rôle important dans la diminution de flexibilité de ces complexes.

La comparaison de la structure des particules pré-40S et intermédiaires et tardives obtenues lors de cette étude nous permet de proposer un modèle structural de transition entre les deux particules (**Figure 64**). Chez la levure, une étude montre que les particules pré-40S purifiées en étiquetant Rio2 ne contiennent pas Rio1. Il est proposé dans cette étude que la kinase Rio2 se dissocierait de la particule pré-40S, puis que Rio1 interagirait à son tour avec le précurseur de la petite sous-unité. De plus, cette étude suggère que le co-facteur Rio1 interagirait avec la particule pré-40S suite à la dissociation d'Enp1 et Ltv1, une fois que la formation de la tête est achevée (Hector *et al.*, 2014).

Chez l'Homme, les données de spectrométrie de masse et western blot ont montré l'absence de LTV1, ENP1, TSR1 et RIO2 sur la particule pré-40S RIO1(KD) (Widmann *et al.*, 2012). Ainsi à l'exception de DIM2 et NOB1, les co-facteurs présents sur la particule pré-40S LTV1 (LTV1, ENP1, TSR1 et RIO2) se dissocieraient avant le recrutement de RIO1. De même que chez la levure, les co-facteurs RIO2 et RIO1 ne peuvent pas être présents ensemble sur la particule pré-40 humaine. Nos données structurales montrent que les zones de localisation des kinases RIO1 et RIO2 sont similaires sur la particule pré-40S humaine. Notre hypothèse est donc que le co-facteur RIO1 remplacerait RIO2 sur la particule pré-40S, chez l'Homme. Il pourrait favoriser le départ de RIO2 de la particule pré-40S. RIO2 étant requis pour le relargage de LTV1 et ENP1, et LTV1 pour le recyclage de TSR1, nous proposons que

l'association de RIO1 à la particule pré-40S déclenche le relargage en cascade de RIO2, ENP1, LTV1 et TSR1.

En outre, l'association de RIO1 avec le précurseur de la petite sous-unité semble entraîner un réarrangement structural de la plateforme de la particule pré-40S. Nous n'avons pas pu localiser DIM2 sur la particule pré-40S intermédiaire LTV1, mais elle semble clairement distinguable sur la particule tardive RIO1(KD). Nous proposons donc que :

- le co-facteur DIM2, enfoui dans la plateforme des particules intermédiaires LTV1 puisse, lors de l'échange entre RIO2 et RIO1, être « expulsé » de la plateforme, pour se localiser à l'extérieur de celle-ci, au niveau du sillon de l'ARNm. Alternativement, il est possible que l'interaction de DIM2 avec les particules pré-40S LTV1 soit très labile. Dans les particules RIO1(KD), cette interaction est stabilisée, et clairement détectable. Nous proposons également que l'association de RPS26 se stabilise suite au réarrangement de la plateforme. Ainsi cette protéine ne se dissocierait pas de la particule pré-40S tardive au cours de sa purification.

- Ce changement conformationnel de la plateforme serait alors à l'origine d'une rotation de NOB1. En effet, les densités supplémentaires que nous avons attribuées à cette endonucléase, d'abord parallèles à l'axe du corps de la 40S sur les particules LTV1, elles sont, dans les particules tardives RIO1(KD), perpendiculaire à celui-ci, « couchées » dans le sillon de la plateforme et très proches de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S. Ceci pourrait être le reflet du changement de conformation de NOB1 nécessaire pour son rôle dans la maturation de la petite sous-unité. Les densités additionnelles que nous avons attribuées à la présence de NOB1 représentent un plus petit volume pour la particule pré-40S tardive RIO1(KD) que pour la particule intermédiaire LTV1. Ceci pourrait traduire le fait que les interactions de NOB1 avec la particule RIO1(KD), dans cette conformation « couchée », probablement prête à effectuer le clivage du pré-ARNr 18S-E soient plus labiles que dans les particules pré-40S LTV1.

Des expériences d'immuno-précipitation *in vitro* ont montré que le co-facteur Dim2 interagit directement avec Nob1 (Woolls *et al.*, 2011). Cette interaction entre les deux protéines avait également détectée par une expérience de double hybride (Tone and Toh, 2002). Ainsi, la libération de RIO2 pourrait être à l'origine du changement de conformation de DIM2 entraînant par la suite un changement de conformation de NOB1, par une réaction en cascade. La libération de RIO2 peut aussi être à l'origine d'un remodelage de la plateforme de la

particule pré-40S, ayant pour conséquence un changement de conformation de DIM2 et NOB1. Chez la levure, un changement de conformation du pré ARNr permettant le positionnement adéquat de Nob1 pour qu'il puisse cliver le pré-ARNr 18S a été proposé (Lamanna et Karbstein, 2009). Des analyses phylogénétiques suggèrent que ce changement de conformation est conservé chez les eucaryotes (Lamanna et Karbstein, 2011).

A partir de nos données structurales, nous proposons donc que les co-facteurs DIM2 et NOB1 nécessitent un remodelage structural de la plateforme pour exercer leurs fonctions.

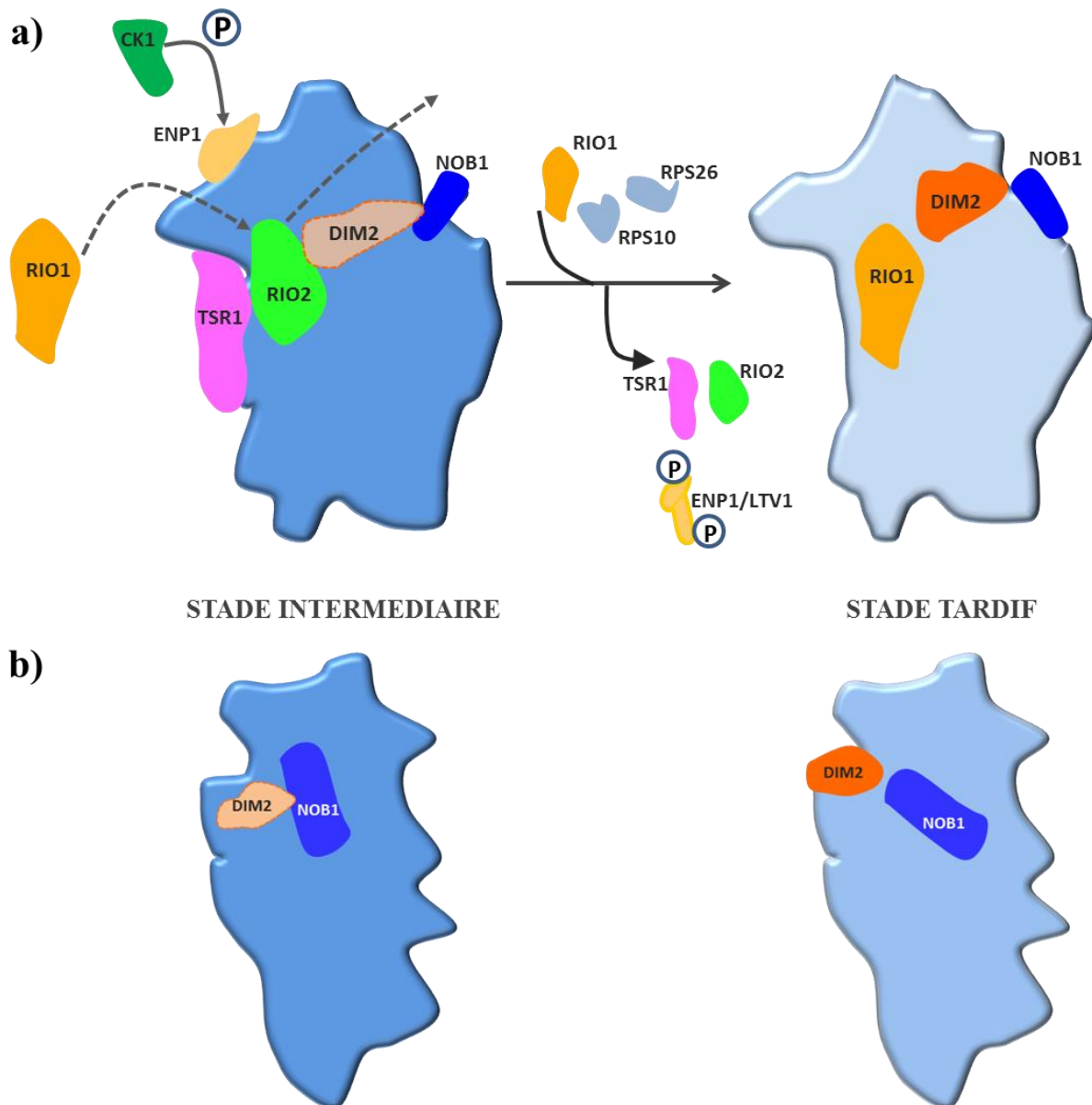


Figure 66: Modèle de transition entre le stade de maturation intermédiaire et tardif des particules pré-40S chez l'Homme. Nous avons schématisé en a) les vues de l'interface des particules pré-40S aux stades intermédiaire (silhouette bleu foncé) et tardif (silhouette bleu clair) de leur maturation ; en b) vues de la plateforme de ces particules, afin de visualiser le changement de conformation de NOB1 lors du passage d'un stade intermédiaire à tardif de la maturation de la petite sous-unité.

Au stade intermédiaire, DIM2 est indiqué en pointillés car il n'est pas visible sur la structure de la particule pré-40S LTV1. La libération de RIO2 serait à l'origine d'un réarrangement structural de la plateforme de la particule pré-40S et/ou d'un changement de conformation de DIM2. Ceci aurait pour conséquence un changement de conformation de NOB1, le rendant compétent pour son activité d'endonucléase du pré-ARNr 18S-E.

Perspectives

A- Caractérisation structurale des particules pré-40S intermédiaires et tardives

Dans cette étude, nous avons proposé un premier modèle de positionnement des co-facteurs sur les particules pré-40S humaines purifiées à un stade de maturation intermédiaire et tardif. Afin de confirmer et affiner la localisation de ces protéines sur les précurseurs de la petite sous-unité, il est nécessaire d'obtenir des structures 3D à de meilleures résolutions. Pour cela, différentes méthodes seront employées.

I.- Diminution de l'hétérogénéité compositionnelle des particules pré-40S intermédiaires

Le co-facteur LTV1 s'associe dans le noyau et reste lié à la particule pré-40S dans le cytoplasme. Par conséquent, les particules pré-40S intermédiaires purifiées en étiquetant LTV1 correspondent à différentes étapes de maturation. Ces particules présentent donc des différences dans leurs compositions. Il est primordial de diminuer cette hétérogénéité compositionnelle dans le but de calculer une structure 3D des particules pré-40S intermédiaires à une plus haute résolution. Pour cela, l'approche utilisée pour déterminer la structure des particules pré-40S tardive sera employée. Elle consiste à purifier des particules pré-40S bloquées à un stade de maturation. Pour cela, les particules pré-40S seraient purifiées en étiquetant un co-facteur dont l'activité enzymatique nécessaire pour la maturation serait inactivée. Ceci permettra d'isoler une population plus homogène des précurseurs de la petite sous-unité dont la composition en co-facteurs de maturation reste inchangée.

II- Fixation légère afin de diminuer la flexibilité des particules pré-40S

Suite à la purification en tandem, la méthode de Grafix sera effectuée dans le but de réduire l'hétérogénéité des particules étudiées. Ceci consiste à séparer les particules isolées par centrifugation sur gradient de sucrose au quel est ajouté 0.1% de glutaraldéhyde afin de fixer les complexes. Cette approche a été utilisée pour étudier les structures des précurseurs de

la grande sous-unité et permet notamment de diminuer la flexibilité des particules étudiées (Weis *et al.*, in press). Dans le même but, comme cela a été effectué pour calculer le complexe d'initiation 43S à 6,74Å de résolution (Aylett *et al.*, 2015), des essais de traitement avec l'agent pontant disuccinimidyl suberate seront effectués.

III- Amélioration de la résolution : acquisition et analyse d'images

L'acquisition des images sur camera à détecteur direct d'électrons se fera en utilisant le mode « movie » afin d'améliorer la résolution de la structure 3D calculée. Cette méthode consiste à acquérir plusieurs images d'un même champ durant un temps t , (différemment de la méthode conventionnelle pour laquelle une seule image est acquise au cours du même temps t .) Pour compenser la dérive de l'objet au cours de ce temps t , les images sont alors alignées puis re-sommées. La reconstruction 3D est calculée à partir de ces images sommées. Ceci permet de supprimer le mouvement de l'échantillon sous le faisceau d'électron ce qui permet d'améliorer fortement la résolution. Pour les particules tardives, dans un premier temps, les images issues du « mode movie » disponibles seront analysées et la structure 3D des particules pré-40S RIO1(KD) à partir de ces images sera à nouveau calculée. Cette reconstruction 3D devrait avoir une meilleure résolution que la structure 3D des précurseurs tardifs de la petite sous-unité présentée dans cette étude.

Par la suite, il sera nécessaire d'acquérir de nouvelles images de ces particules pré-40S RIO1(KD) afin d'augmenter fortement le jeu de donnée. En plus d'augmenter la résolution, ceci permettra de faire des essais des classifications 3D pour accéder à l'hétérogénéité structurale de cet échantillon.

B- Vérification des modèles de positionnement des co-facteurs sur les particules pré-40S intermédiaires et tardives.

Afin confirmer la localisation des co-facteurs sur les précurseurs intermédiaires ou tardifs de la petite sous-unité et étudier leurs interaction avec les RP et l'ARNr, des approches de flexible fitting seront employées. Pour cela, le logiciel MDFF (pour molecular dynamics flexible fitting) pourrait notamment être utilisé.

D'autre part, on pourrait étudier la structure de particules pré-40S dont un co-facteur est manquant. Pour cela, les cellules HEK293 seront traitées avec des sh ARN dans le but de dépleter un cofacteur. La comparaison de la structure de ces particules pré-40S avec celle purifiées en condition sauvage permettra de localiser la zone d'interaction des co-facteurs sur le précurseur de la petite sous-unité. Cette approche a été utilisée pour déterminer la position de co-facteurs sur la particule pré-40S de levure (Strunk *et al.*, 2011). Cependant, le problème auquel on risque d'être confronté dans cette approche est la quantité de particules purifiées dans les conditions où un co-facteur sera déplété. En effet, la déplétion d'un co-facteur de maturation aura pour conséquence une diminution de la production de particule pré-40S. Il sera important de bien choisir la protéine appât afin de purifier les précurseurs de la petite sous-unité en concentration adéquate pour la cryo-MET et l'analyse d'images. Les co-facteurs LTV1 et DIM2 représentent de bons candidats. En effet, en condition sauvage, ces co-facteurs permettent de purifier des particules pré-40S en grande quantité.

Une autre méthode pour confirmer ou infirmer la localisation des co-facteurs serait de produire des particules pré-40S reconstituée. Pour cela, les particules 40S matures purifiées sur gradient de sucrose seraient incubées avec le co-facteur recombinant étudié. La structure de cette particule reconstituée serait déterminée et comparée à la petite sous-unité afin de localiser le co-facteur sur la particule pré-40S. Cette approche a permis de déterminer la zone d'interaction de co-facteurs sur la particule pré-60S (Greber *et al.*, 2012) et chez la particule pré-40S de levure (Ghalei *et al.*, 2015). Cependant, l'inconvénient de cette approche est que les particules sont reconstituées à partir de la petite sous-unité mature. Cette méthode ne prend pas en considération des remodelages structuraux présents chez la particule pré-40S comparé à la particule 40S mature.

C- Etudes des autres particules pré-40S disponibles

A plus long terme, une fois la structure 3D des particules pré-40S cytoplasmiques déterminée et caractérisée, il serait intéressant d'étudier la structure 3D des précurseurs de la petite sous-unité nucléaire. De telles particules, purifiées en utilisant C21ORF70 comme appât, sont disponibles.

Les particules pré-40S étudiées seront ordonnées selon la chronologie de la maturation de la petite sous-unité. Leur comparaison permettra de visualiser d'éventuels remodelages structuraux nécessaires à la formation de la particule 40S mature. Nos données suggèrent que des réarrangements structuraux semblent exister lorsque la particule pré-40S humaine passe d'un stade intermédiaire à un stade tardif de sa maturation. De nouvelles hypothèses sur le mécanisme de production de la petite sous-unité et l'action des co-facteurs seront alors peut-être proposées. Par exemple, le mode d'action de DIM2 comme régulateur de NOB1 pourrait être décrit, d'un point de vue structural. Les hypothèses émises grâce à ce travail seront alors vérifiées par des expériences fonctionnelles.

Bibliographie

- Anger, A. M., J. P. Armache, et al. (2013). "Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome." *Nature* 497(7447): 80-85.
- Antoine, M., K. Reimers, et al. (2005). "Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2." *Biochem Biophys Res Commun* 335(1): 146-153.
- Arcus, V. L., K. Backbro, et al. (2004). "Distant structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease." *J Biol Chem* 279(16): 16471-16478.
- Armache, J. P., A. Jarasch, et al. (2010). "Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(46): 19748-19753.
- Aylett, C. H., D. Boehringer, et al. (2015). "Structure of a yeast 40S-eIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex." *Nat Struct Mol Biol* 22(3): 269-271.
- Bai, X. C., I. S. Fernandez, et al. (2013). "Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles." *Elife* 2: e00461.
- Ban, N., B. Freeborn, et al. (1998). "A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit." *Cell* 93(7): 1105-1115.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (1999). "Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit." *Nature* 400(6747): 841-847.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." *Science* 289(5481): 905-920.
- Bange, G., G. Murat, et al. (2013). "New twist to nuclear import: When two travel together." *Commun Integr Biol* 6(4): e24792.
- Baumas, K., J. Soudet, et al. (2012). "Human RioK3 is a novel component of cytoplasmic pre-40S pre-ribosomal particles." *RNA Biol* 9(2): 162-174.
- Ben-Shem, A., N. Garreau de Loubresse, et al. (2011). "The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution." *Science* 334(6062): 1524-1529.
- Ben-Shem, A., N. Garreau de Loubresse, et al. (2011). "The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution." *Science* 334(6062): 1524-1529.
- Ben-Shem, A., L. Jenner, et al. (2010). "Crystal structure of the eukaryotic ribosome." *Science* 330(6008): 1203-1209.
- Bohnsack, M. T., R. Martin, et al. (2009). "Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis." *Mol Cell* 36(4): 583-592.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, et al. (2007). "The multifunctional nucleolus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 574-585.
- Borovjagin, A. V. and S. A. Gerbi (2004). "Xenopus U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction." *RNA* 10(6): 942-953.
- Bradatsch, B., C. Leidig, et al. (2012). "Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel." *Nat Struct Mol Biol* 19(12): 1234-1241.

- Brand, R. C., J. Klootwijk, et al. (1977). "Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA." *Eur J Biochem* 75(1): 311-318.
- Brilot, A. F., J. Z. Chen, et al. (2012). "Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film." *J Struct Biol* 177(3): 630-637.
- Brown, A., A. Amunts, et al. (2014). "Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria." *Science* 346(6210): 718-722.
- Budkevich, T. V., J. Giesebrecht, et al. (2014). "Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement." *Cell* 158(1): 121-131.
- Calvino, F. R., S. Kharde, et al. (2015). "Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site." *Nat Commun* 6: 6510.
- Campbell, M. G., A. Cheng, et al. (2012). "Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy." *Structure* 20(11): 1823-1828.
- Campbell, M. G. and K. Karbstein (2011). "Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes." *PLoS One* 6(1): e16194.
- Carron, C., S. Balor, et al. (2012). "Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing." *J Cell Sci* 125(Pt 19): 4532-4542.
- Carron, C., M. F. O'Donohue, et al. (2011). "Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals." *Nucleic Acids Res* 39(1): 280-291.
- Ceci, M., C. Gaviraghi, et al. (2003). "Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly." *Nature* 426(6966): 579-584.
- Chandramouli, P., M. Topf, et al. (2008). "Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution." *Structure* 16(4): 535-548.
- Chen, S., G. McMullan, et al. (2013). "High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy." *Ultramicroscopy* 135: 24-35.
- Chen, S. S. and J. R. Williamson (2013). "Characterization of the ribosome biogenesis landscape in *E. coli* using quantitative mass spectrometry." *J Mol Biol* 425(4): 767-779.
- Chen, W., J. Bucaria, et al. (2003). "Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis." *Nucleic Acids Res* 31(2): 690-699.
- Cheng, Y., J. E. Dahlberg, et al. (1995). "Diverse effects of the guanine nucleotide exchange factor RCC1 on RNA transport." *Science* 267(5205): 1807-1810.
- de la Cruz, J., K. Karbstein, et al. (2015). "Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo." *Annu Rev Biochem*.
- Decatur, W. A. and M. J. Fournier (2002). "rRNA modifications and ribosome function." *Trends Biochem Sci* 27(7): 344-351.

- Decatur, W. A., X. H. Liang, et al. (2007). "Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome." *Methods Enzymol* 425: 283-316.
- Deloche, O., J. de la Cruz, et al. (2004). "A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell* 13(3): 357-366.
- Delprato, A., Y. Al Kadri, et al. (2014). "Crucial role of the Rcl1p-Bms1p interaction for yeast pre-ribosomal RNA processing." *Nucleic Acids Res* 42(15): 10161-10172.
- des Georges, A., V. Dhote, et al. (2015). "Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex." *Nature*.
- Dragon, F., J. E. Gallagher, et al. (2002). "A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis." *Nature* 417(6892): 967-970.
- Dragon, F., J. E. Gallagher, et al. (2002). "A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis." *Nature* 417(6892): 967-970.
- Dubochet, J., M. Adrian, et al. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." *Q Rev Biophys* 21(2): 129-228.
- Erzberger, J. P., F. Stengel, et al. (2014). "Molecular architecture of the 40SeIF1eIF3 translation initiation complex." *Cell* 158(5): 1123-1135.
- Eschrich, D., M. Buchhaupt, et al. (2002). "Nep1p (Emg1p), a novel protein conserved in eukaryotes and archaea, is involved in ribosome biogenesis." *Curr Genet* 40(5): 326-338.
- Faruqi, A. R. and G. McMullan (2011). "Electronic detectors for electron microscopy." *Q Rev Biophys* 44(3): 357-390.
- Fassio, C. A., B. J. Schofield, et al. (2010). "Dominant mutations in the late 40S biogenesis factor Ltv1 affect cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 185(1): 199-209.
- Fath, S., P. Milkereit, et al. (2000). "Association of yeast RNA polymerase I with a nucleolar substructure active in rRNA synthesis and processing." *J Cell Biol* 149(3): 575-590.
- Fatica, A., M. Oeffinger, et al. (2003). "Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA." *Mol Cell Biol* 23(5): 1798-1807.
- Fatica, A., D. Tollervey, et al. (2004). "PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA." *RNA* 10(11): 1698-1701.
- Faza, M. B., Y. Chang, et al. (2012). "Role of Mex67-Mtr2 in the nuclear export of 40S pre-ribosomes." *PLoS Genet* 8(8): e1002915.
- Fernandez, I. S., X. C. Bai, et al. (2013). "Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex." *Science* 342(6160): 1240585.
- Ferreira-Cerca, S., I. Kiburu, et al. (2014). "Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes." *Nucleic Acids Res* 42(13): 8635-8647.

- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, et al. (2005). "Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function." *Mol Cell* 20(2): 263-275.
- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, et al. (2007). "Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins." *Mol Cell* 28(3): 446-457.
- Frank, J., P. Penczek, et al. (1991). "Three-dimensional reconstruction of the 70S Escherichia coli ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA." *J Cell Biol* 115(3): 597-605.
- Gabashvili, I. S., R. K. Agrawal, et al. (2000). "Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution." *Cell* 100(5): 537-549.
- Gadal, O., D. Strauss, et al. (2001). "Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p." *Mol Cell Biol* 21(10): 3405-3415.
- Gamalinda, M., U. Ohmayer, et al. (2014). "A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains." *Genes Dev* 28(2): 198-210.
- Gandin, V., D. Senft, et al. (2013). "RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis." *Genes Cancer* 4(9-10): 369-377.
- Ganot, P., M. Caizergues-Ferrer, et al. (1997). "The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation." *Genes Dev* 11(7): 941-956.
- Garcia-Gomez, J. J., A. Fernandez-Pevada, et al. (2014). "Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3." *PLoS Genet* 10(3): e1004205.
- Gartmann, M., M. Blau, et al. (2010). "Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining." *J Biol Chem* 285(20): 14848-14851.
- Geerlings, T. H., A. W. Faber, et al. (2003). "Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 278(25): 22537-22545.
- Gelperin, D., L. Horton, et al. (2001). "Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast." *RNA* 7(9): 1268-1283.
- Gerczei, T., B. N. Shah, et al. (2009). "RNA chaperones stimulate formation and yield of the U3 snoRNA-Pre-rRNA duplexes needed for eukaryotic ribosome biogenesis." *J Mol Biol* 390(5): 991-1006.
- Ghalei, H., F. X. Schaub, et al. (2015). "Hrr25/CK1delta-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth." *J Cell Biol* 208(6): 745-759.
- Gleizes, P. E., J. Noaillac-Depeyre, et al. (2001). "Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex." *J Cell Biol* 155(6): 923-936.
- Gonzalez, I. L., C. Chambers, et al. (1990). "Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers." *J Mol Biol* 212(1): 27-35.

- Grandi, P., V. Rybin, et al. (2002). "90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors." *Mol Cell* 10(1): 105-115.
- Granneman, S. and S. J. Baserga (2003). "Probing the yeast proteome for RNA-processing factors." *Genome Biol* 4(10): 229.
- Granneman, S., M. R. Nandineni, et al. (2005). "The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14." *Mol Cell Biol* 25(23): 10352-10364.
- Granneman, S., E. Petfalski, et al. (2010). "Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA-protein cross-linking." *EMBO J* 29(12): 2026-2036.
- Greber, B. J., D. Boehringer, et al. (2012). "Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit." *Nat Struct Mol Biol* 19(12): 1228-1233.
- Grosso, S., V. Volta, et al. (2008). "PKCbetaII modulates translation independently from mTOR and through RACK1." *Biochem J* 415(1): 77-85.
- Guderian, G., C. Peter, et al. (2011). "RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity." *J Biol Chem* 286(3): 1976-1986.
- Guo, Q., S. Goto, et al. (2013). "Dissecting the in vivo assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process." *Nucleic Acids Res* 41(4): 2609-2620.
- Hannon, G. J., P. A. Maroney, et al. (1989). "Accurate processing of human pre-rRNA in vitro." *Mol Cell Biol* 9(10): 4422-4431.
- Harms, J., F. Schluenzen, et al. (2001). "High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium." *Cell* 107(5): 679-688.
- Hashem, Y., A. des Georges, et al. (2013). "Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29." *Cell* 153(5): 1108-1119.
- Hashem, Y., A. des Georges, et al. (2013). "Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit." *Nature* 503(7477): 539-543.
- Hector, R. D., E. Burlacu, et al. (2014). "Snapshots of pre-rRNA structural flexibility reveal eukaryotic 40S assembly dynamics at nucleotide resolution." *Nucleic Acids Res* 42(19): 12138-12154.
- Hellmich, U. A., B. L. Weis, et al. (2013). "Essential ribosome assembly factor Fap7 regulates a hierarchy of RNA-protein interactions during small ribosomal subunit biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(38): 15253-15258.
- Henras, A. K., C. Plisson-Chastang, et al. (2015). "An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6(2): 225-242.
- Henras, A. K., J. Soudet, et al. (2008). "The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis." *Cell Mol Life Sci* 65(15): 2334-2359.
- Horn, D. M., S. L. Mason, et al. (2011). "Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production." *J Biol Chem* 286(39): 34082-34087.

- Hurt, E., S. Hannus, et al. (1999). "A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants." *J Cell Biol* 144(3): 389-401.
- Jakel, S. and D. Gorlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." *EMBO J* 17(15): 4491-4502.
- Jia, M. Z., J. Ohtsuka, et al. (2007). "Crystal structure of Dim2p: a preribosomal RNA processing factor, from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 2.30 Å." *Proteins* 69(2): 428-432.
- Jomaa, A., G. Stewart, et al. (2011). "Understanding ribosome assembly: the structure of in vivo assembled immature 30S subunits revealed by cryo-electron microscopy." *RNA* 17(4): 697-709.
- Karbstein, K. (2013). "Quality control mechanisms during ribosome maturation." *Trends Cell Biol* 23(5): 242-250.
- Karbstein, K., S. Jonas, et al. (2005). "An essential GTPase promotes assembly of preribosomal RNA processing complexes." *Mol Cell* 20(4): 633-643.
- Kent, T., Y. R. Lapik, et al. (2009). "The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites." *RNA* 15(1): 14-20.
- Khatter, H., A. G. Myasnikov, et al. (2014). "Purification, characterization and crystallization of the human 80S ribosome." *Nucleic Acids Res* 42(6): e49.
- Khatter, H., A. G. Myasnikov, et al. (2015). "Structure of the human 80S ribosome." *Nature* 520(7549): 640-645.
- Kiss, T., E. Fayet, et al. (2006). "Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 407-417.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, et al. (1998). "Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA." *EMBO J* 17(3): 797-807.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, et al. (2012). "Atomic structures of the eukaryotic ribosome." *Trends Biochem Sci* 37(5): 189-198.
- Klootwijk, J. and R. J. Planta (1989). "Isolation and characterization of yeast ribosomal RNA precursors and preribosomes." *Methods Enzymol* 180: 96-109.
- Kouba, T., E. Rutkai, et al. (2012). "The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes." *Nucleic Acids Res* 40(6): 2683-2699.
- Kressler, D., G. Bange, et al. (2012). "Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly." *Science* 338(6107): 666-671.
- Kressler, D., E. Hurt, et al. (2010). "Driving ribosome assembly." *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 673-683.
- Lafontaine, D., J. Vandenhoute, et al. (1995). "The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast." *Genes Dev* 9(20): 2470-2481.

- Lafontaine, D. L., T. Preiss, et al. (1998). "Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis?" *Mol Cell Biol* 18(4): 2360-2370.
- Lake, J. A. and L. Kahan (1975). "Ribosomal proteins S5, S11, S13 and S19 localized by electron microscopy of antibody-labeled subunits." *J Mol Biol* 99(4): 631-644.
- Lake, J. A., M. Pendergast, et al. (1974). "Ribosome structure: three-dimensional distribution of proteins S14 and S4." *J Supramol Struct* 2(2-4): 189-195.
- Lamanna, A. C. and K. Karbstein (2009). "Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14259-14264.
- Lamanna, A. C. and K. Karbstein (2011). "An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage." *J Mol Biol* 405(1): 3-17.
- LaRonde-LeBlanc, N., T. Guszczynski, et al. (2005). "Autophosphorylation of *Archaeoglobus fulgidus* Rio2 and crystal structures of its nucleotide-metal ion complexes." *FEBS J* 272(11): 2800-2810.
- Laronde-Leblanc, N., T. Guszczynski, et al. (2005). "Structure and activity of the atypical serine kinase Rio1." *FEBS J* 272(14): 3698-3713.
- LaRonde-LeBlanc, N. and A. Wlodawer (2004). "Crystal structure of *A. fulgidus* Rio2 defines a new family of serine protein kinases." *Structure* 12(9): 1585-1594.
- LaRonde-LeBlanc, N. and A. Wlodawer (2005). "A family portrait of the RIO kinases." *J Biol Chem* 280(45): 37297-37300.
- Lazdins, I. B., M. Delannoy, et al. (1997). "Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization." *Chromosoma* 105(7-8): 481-495.
- Lebaron, S., C. Froment, et al. (2005). "The splicing ATPase prp43p is a component of multiple preribosomal particles." *Mol Cell Biol* 25(21): 9269-9282.
- Lebaron, S., C. Schneider, et al. (2012). "Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits." *Nat Struct Mol Biol* 19(8): 744-753.
- Leger-Silvestre, I., P. Milkereit, et al. (2004). "The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast." *EMBO J* 23(12): 2336-2347.
- Leidig, C., M. Thoms, et al. (2014). "60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle." *Nat Commun* 5: 3491.
- Leong, V., M. Kent, et al. (2013). "*Escherichia coli* rimM and yjeQ null strains accumulate immature 30S subunits of similar structure and protein complement." *RNA* 19(6): 789-802.
- Leulliot, N., M. T. Bohnsack, et al. (2008). "The yeast ribosome synthesis factor Emg1 is a novel member of the superfamily of alpha/beta knot fold methyltransferases." *Nucleic Acids Res* 36(2): 629-639.
- Li, Z., I. Lee, et al. (2009). "Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics." *PLoS Biol* 7(10): e1000213.

- Liang, X. H., Q. Liu, et al. (2009). "Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing." *RNA* 15(9): 1716-1728.
- Liu, M., P. Peng, et al. (2015). "RACK1-mediated translation control promotes liver fibrogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 463(3): 255-261.
- Loch, J., M. Blaud, et al. (2014). "RNA mimicry by the fap7 adenylate kinase in ribosome biogenesis." *PLoS Biol* 12(5): e1001860.
- Ludtke, S. J., P. R. Baldwin, et al. (1999). "EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions." *J Struct Biol* 128(1): 82-97.
- Madru, C., S. Lebaron, et al. (2015). "Chaperoning 5S RNA assembly." *Genes Dev* 29(13): 1432-1446.
- Majzoub, K., M. L. Hafirassou, et al. (2014). "RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses." *Cell* 159(5): 1086-1095.
- Malhotra, A., P. Penczek, et al. (1998). "Escherichia coli 70 S ribosome at 15 Å resolution by cryo-electron microscopy: localization of fMet-tRNA^{fMet} and fitting of L1 protein." *J Mol Biol* 280(1): 103-116.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* 298(5600): 1912-1934.
- McCahill, A., J. Warwicker, et al. (2002). "The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms." *Mol Pharmacol* 62(6): 1261-1273.
- Meier, U. T. (2005). "The many facets of H/ACA ribonucleoproteins." *Chromosoma* 114(1): 1-14.
- Melnikov, S., A. Ben-Shem, et al. (2012). "One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes." *Nat Struct Mol Biol* 19(6): 560-567.
- Merwin, J. R., L. B. Bogar, et al. (2014). "Genetic analysis of the ribosome biogenesis factor Ltv1 of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 198(3): 1071-1085.
- Michot, B. and J. P. Bachellerie (1991). "Secondary structure of the 5' external transcribed spacer of vertebrate pre-rRNA. Presence of phylogenetically conserved features." *Eur J Biochem* 195(3): 601-609.
- Milazzo, A. C., P. Leblanc, et al. (2005). "Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy." *Ultramicroscopy* 104(2): 152-159.
- Miller, O. L., Jr. and B. R. Beatty (1969). "Visualization of nucleolar genes." *Science* 164(3882): 955-957.
- Mindell, J. A. and N. Grigorieff (2003). "Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy." *J Struct Biol* 142(3): 334-347.
- Moriggi, G., B. Nieto, et al. (2014). "Rrp12 and the Exportin Crm1 participate in late assembly events in the nucleolus during 40S ribosomal subunit biogenesis." *PLoS Genet* 10(12): e1004836.

- Mougey, E. B., M. O'Reilly, et al. (1993). "The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes." *Genes Dev* 7(8): 1609-1619.
- Mulder, A. M., C. Yoshioka, et al. (2010). "Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for the 30S subunit." *Science* 330(6004): 673-677.
- Mullineux, S. T. and D. L. Lafontaine (2012). "Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand?" *Biochimie* 94(7): 1521-1532.
- Natterer, F. (1986). "The Mathematics of Computerized Tomography". Wiley and B G Teubner, Stuttgart.
- Neueder, A., S. Jakob, et al. (2010). "A local role for the small ribosomal subunit primary binder rpS5 in final 18S rRNA processing in yeast." *PLoS One* 5(4): e10194.
- Nierhaus, K. H. (1991). "The assembly of prokaryotic ribosomes." *Biochimie* 73(6): 739-755.
- Nilsson, J., J. Sengupta, et al. (2004). "Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome." *EMBO Rep* 5(12): 1137-1141.
- Nomura, M. (1970). "Bacterial ribosome." *Bacteriol Rev* 34(3): 228-277.
- O'Donohue, M. F., V. Choesmel, et al. (2010). "Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits." *J Cell Biol* 190(5): 853-866.
- Oeffinger, M., M. Dlakic, et al. (2004). "A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits." *Genes Dev* 18(2): 196-209.
- O'Farrell, H. C., Z. Xu, et al. (2008). "Sequence and structural evolution of the KsgA/Dim1 methyltransferase family." *BMC Res Notes* 1: 108.
- Orlova, E. V. and H. R. Saibil (2011). "Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy." *Chem Rev* 111(12): 7710-7748.
- Osheim, Y. N., S. L. French, et al. (2004). "Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell* 16(6): 943-954.
- Pang, Y., X. C. Bai, et al. (2015). "Structure of the apoptosome: mechanistic insights into activation of an initiator caspase from *Drosophila*." *Genes Dev* 29(3): 277-287.
- Pausch, P., U. Singh, et al. (2015). "Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones." *Nat Commun* 6: 7494.
- Perez-Fernandez, J., P. Martin-Marcos, et al. (2011). "Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes." *Nucleic Acids Res* 39(18): 8105-8121.
- Perez-Fernandez, J., A. Roman, et al. (2007). "The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism." *Mol Cell Biol* 27(15): 5414-5429.

- Pertschy, B., C. Schneider, et al. (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(50): 35079-35091.
- Pestova, T. V., I. B. Lomakin, et al. (2000). "The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B." *Nature* 403(6767): 332-335.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." *J Comput Chem* 25(13): 1605-1612.
- Phipps, K. R., J. Charette, et al. (2011). "The small subunit processome in ribosome biogenesis--progress and prospects." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(1): 1-21.
- Pisareva, V. P., M. A. Skabkin, et al. (2011). "Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes." *EMBO J* 30(9): 1804-1817.
- Preti, M., M. F. O'Donohue, et al. (2013). "Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA." *Nucleic Acids Res* 41(8): 4709-4723.
- Quade, N., D. Boehringer, et al. (2015). "Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution." *Nat Commun* 6: 7646.
- Reichow, S. L., T. Hamma, et al. (2007). "The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins." *Nucleic Acids Res* 35(5): 1452-1464.
- Renalier, M. H., S. Mazan, et al. (1989). "Structure of the 5'-external transcribed spacer of the human ribosomal RNA gene." *FEBS Lett* 249(2): 279-284.
- Roseman, A. M. (2004). "FindEM--a fast, efficient program for automatic selection of particles from electron micrographs." *J Struct Biol* 145(1-2): 91-99.
- Rouquette, J., V. Choismel, et al. (2005). "Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells." *EMBO J* 24(16): 2862-2872.
- Rout, M. P., G. Blobel, et al. (1997). "A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins." *Cell* 89(5): 715-725.
- Ruan, Y., L. Sun, et al. (2012). "Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma." *J Clin Invest* 122(7): 2554-2566.
- Saez-Vasquez, J., D. Caparros-Ruiz, et al. (2004). "A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro." *Mol Cell Biol* 24(16): 7284-7297.
- Saveanu, C., D. Bienvenu, et al. (2001). "Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps." *EMBO J* 20(22): 6475-6484.
- Saveanu, C., A. Namane, et al. (2003). "Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles." *Mol Cell Biol* 23(13): 4449-4460.
- Schafer, T., B. Maco, et al. (2006). "Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit." *Nature* 441(7093): 651-655.

- Schafer, T., D. Strauss, et al. (2003). "The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes." *EMBO J* 22(6): 1370-1380.
- Scheres, S. H. (2012). "A Bayesian view on cryo-EM structure determination." *J Mol Biol* 415(2): 406-418.
- Scheres, S. H. (2012). "RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination." *J Struct Biol* 180(3): 519-530.
- Scheres, S. H., H. Gao, et al. (2007). "Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization." *Nat Methods* 4(1): 27-29.
- Scheres, S. H., M. Valle, et al. (2005). "Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images." *J Mol Biol* 348(1): 139-149.
- Schossere, M., N. Minois, et al. (2015). "Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan." *Nat Commun* 6: 6158.
- Schlutzen, F., A. Tocilj, et al. (2000). "Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution." *Cell* 102(5): 615-623.
- Schutz, S., U. Fischer, et al. (2014). "A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly." *Elife* 3: e03473.
- Seiser, R. M., A. E. Sundberg, et al. (2006). "Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 174(2): 679-691.
- Sengupta, J., J. Nilsson, et al. (2004). "Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM." *Nat Struct Mol Biol* 11(10): 957-962.
- Shoemaker, C. J. and R. Green (2011). "Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): E1392-1398.
- Sloan, K. E., S. Mattijssen, et al. (2013). "Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing." *J Cell Biol* 200(5): 577-588.
- Soudet, J., J. P. Gelugne, et al. (2010). "Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 29(1): 80-92.
- Spahn, C. M., R. Beckmann, et al. (2001). "Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions." *Cell* 107(3): 373-386.
- Srivastava, L., Y. R. Lapik, et al. (2010). "Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA." *Mol Cell Biol* 30(12): 2947-2956.
- Stark, H., F. Mueller, et al. (1995). "The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA." *Structure* 3(8): 815-821.
- Stoykova, A. S., M. D. Dabeva, et al. (1985). "Ribosome biogenesis and nucleolar ultrastructure in neuronal and oligodendroglial rat brain cells." *J Neurochem* 45(6): 1667-1676.
- Strunk, B. S. and K. Karbstein (2009). "Powering through ribosome assembly." *RNA* 15(12): 2083-2104.

- Strunk, B. S., C. R. Loucks, et al. (2011). "Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates." *Science* 333(6048): 1449-1453.
- Strunk, B. S., M. N. Novak, et al. (2012). "A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits." *Cell* 150(1): 111-121.
- Sydorsky, Y., D. J. Dilworth, et al. (2003). "Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways." *Mol Cell Biol* 23(6): 2042-2054.
- Tafforeau, L., C. Zorbas, et al. (2013). "The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors." *Mol Cell* 51(4): 539-551.
- Thiry, M., T. Cheutin, et al. (2000). "Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus." *RNA* 6(12): 1750-1761.
- Thiry, M. and D. L. Lafontaine (2005). "Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments." *Trends Cell Biol* 15(4): 194-199.
- Thomas, F. and U. Kutay (2003). "Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway." *J Cell Sci* 116(Pt 12): 2409-2419.
- Timney, B. L., J. Tetenbaum-Novatt, et al. (2006). "Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo." *J Cell Biol* 175(4): 579-593.
- Tone, Y. and E. A. Toh (2002). "Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* 16(24): 3142-3157.
- Trakhanov, S., M. Yusupov, et al. (1989). "Preliminary X-ray investigation of 70 S ribosome crystals from *Thermus thermophilus*." *J Mol Biol* 209(2): 327-328.
- Trakhanov S.D., Yusupov M. et al. (1987). "Crystallization of 70S ribosome and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophiles*", *FEBS Lett.*, 220, p. 319.
- Turner, A. J., A. A. Knox, et al. (2009). "A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4." *Mol Cell Biol* 29(11): 3007-3017.
- Turowski, T. W., S. Lebaron, et al. (2014). "Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits." *Nucleic Acids Res* 42(19): 12189-12199.
- Valasek, L., J. Hasek, et al. (2001). "Dual function of eIF3j/Hcr1p in processing 20 S pre-rRNA and translation initiation." *J Biol Chem* 276(46): 43351-43360.
- Valasek, L., K. H. Nielsen, et al. (2002). "Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo." *EMBO J* 21(21): 5886-5898.
- Vanrobays, E., J. P. Gelugne, et al. (2004). "Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis." *RNA* 10(4): 645-656.
- Vanrobays, E., J. P. Gelugne, et al. (2003). "Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 23(6): 2083-2095.

- Vanrobays, E., A. Leplus, et al. (2008). "TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export." *RNA* 14(10): 2061-2073.
- Vasiliev, V. D. (1974). "Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data." *Acta Biol Med Ger* 33(5-6): 779-793.
- Veith, T., R. Martin, et al. (2012). "Structural and functional analysis of the archaeal endonuclease Nob1." *Nucleic Acids Res* 40(7): 3259-3274.
- Venema, J. and D. Tollervey (1995). "Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 11(16): 1629-1650.
- Voorhees, R. M., I. S. Fernandez, et al. (2014). "Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution." *Cell* 157(7): 1632-1643.
- Wabl, M. R. (1974). "Electron microscopic localization of two proteins on the surface of the 50 S ribosomal subunit of *Escherichia coli* using specific antibody markers." *J Mol Biol* 84(2): 241-247.
- Warner, J. R. (1999). "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." *Trends Biochem Sci* 24(11): 437-440.
- Watkins, N. J. and M. T. Bohnsack (2012). "The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(3): 397-414.
- Wegierski, T., E. Billy, et al. (2001). "Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast." *RNA* 7(9): 1254-1267.
- White, J., Z. Li, et al. (2008). "Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits." *Mol Cell Biol* 28(10): 3151-3161.
- Widmann, B., F. Wandrey, et al. (2012). "The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits." *Mol Biol Cell* 23(1): 22-35.
- Wild, T., P. Horvath, et al. (2010). "A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export." *PLoS Biol* 8(10): e1000522.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* 407(6802): 327-339.
- Woolls, H. A., A. C. Lamanna, et al. (2011). "Roles of Dim2 in ribosome assembly." *J Biol Chem* 286(4): 2578-2586.
- Wyler, E., M. Zimmermann, et al. (2011). "Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies." *RNA* 17(1): 189-200.
- Yan, Z., X. C. Bai, et al. (2015). "Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution." *Nature* 517(7532): 50-55.
- Yao, W., D. Roser, et al. (2007). "Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2." *Mol Cell* 26(1): 51-62.

- Yonath A., Muessig J et al. (1980). "Crystallization of the large ribosomal subunit from *B. stearothermophilus*", *Biochem. Int.*, 1, p. 315.
- Yonath, A., J. Mussig, et al. (1982). "Parameters for crystal growth of ribosomal subunits." *J Cell Biochem* 19(2): 145-155.
- Yu, Y. T. and T. W. Nilsen (1992). "Sequence requirements for maturation of the 5' terminus of human 18 S rRNA in vitro." *J Biol Chem* 267(13): 9264-9268.
- Yusupova, G., M. Yusupov, et al. (1991). "Formation and crystallization of *Thermus thermophilus* 70S ribosome/tRNA complexes." *FEBS Lett* 290(1-2): 69-72.
- Zemp, I., F. Wandrey, et al. (2014). "CK1delta and CK1epsilon are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation." *J Cell Sci* 127(Pt 6): 1242-1253.
- Zemp, I., T. Wild, et al. (2009). "Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2." *J Cell Biol* 185(7): 1167-1180.
- Zorbas, C., E. Nicolas, et al. (2015). "The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis." *Mol Biol Cell* 26(11): 2080-2095.