

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÔLE DES PROTÉINES DE LA PETITE SOUS-UNITÉ DU RIBOSOME DANS LA  
DÉFENSE CHEZ LA PLANTE

THÈSE PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU  
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
ZAINAB FAKIH

Décembre 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES  
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

**Direction de recherche :**

---

Hugo Germain

Directeur de recherche

**Jury d'évaluation**

---

Hugo Germain

Directeur de recherche

---

Emmanuel Milot

Président de jury

---

Tagnon Missihoun

Évaluateur interne

---

Zoé Joly-Lopez

Évaluateur externe

*« La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte »*  
*Marie Curie*

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Emmanuel Milot, Dr Tagnon Missihoun, ainsi que Dr Zoé Joly-Lopez d'avoir accepté de lire mon manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèses.

J'exprime ma gratitude et mes vifs remerciements à Hugo Germain, mon directeur de thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance. Merci aussi pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, pour avoir écouté et pris en compte mes arguments et requêtes. Vous avez su être à l'écoute et m'avez toujours donné de bons conseils. Merci pour toutes les opportunités que vous m'avez offertes. Merci de m'avoir accompagnée, soutenue, encadrée pendant mes recherches. Et merci de m'avoir aidée à surmonter toutes ces épreuves, qui m'ont permis d'évoluer. J'ai particulièrement apprécié sa disponibilité, son sens de la convivialité et son souci permanent de voir ses étudiants s'épanouir.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe de Dr Hugo Germain et Dr Isabel Desgagné-Penix. Merci à tous pour les échanges plus ou moins formels et les différents conseils qui ont contribué à l'avancée de ma thèse. Je remercie également tous les gens du Bâtiment Pierre-boucher. J'ai véritablement apprécié vivre ces cinq dernières années à vos côtés. Je voulais vous remercier séparément pour l'amabilité dont vous avez fait preuve à mon endroit et je me suis aperçu que, en fait, je veux tous vous remercier, donc, pour éviter une liste longue et fastidieuse et pour être sûr de n'oublier personne surtout ceux qui ont déjà quitté (ce que je ne me pardonnerais pas) je veux vous dire un grand MERCI collectif et chaleureux. Je vous prie de trouver, tous, ici, un remerciement qui vous est personnellement adressé.

Je souhaite aussi remercier mes amis, plus particulièrement Dr Fatima Awwad et ma belle-sœur, Dr Salma Sleiman. Votre amitié, nos discussions, nos cafés ensemble ont sûrement joué un rôle positif dans mes études. Merci de me faire sentir entourée par une famille. Merci pour toutes ces conversations du matin, du soir et de la nuit.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de la plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU de Québec: Victor Fourcassié, Sylvie Bourassa, ainsi qu'Arnaud Droit d'avoir traité mes protéines, je serai très reconnaissante envers eux.

Khalil, mon amour de vie, je souhaiterais te remercier du fond du coeur, car tu as toujours été là pour me soutenir et m'encourager durant chacun des moments de la thèse. Merci pour ta patience, car il en a fallu pour me supporter durant les périodes de la thèse les plus difficiles, comme la rédaction... Merci pour les promenades dans la nature, à la plage, les bons cafés... pour m'enlever le stress. Merci de me faire une ambiance relaxante quand tu sens que j'ai besoin. Merci pour ton soutien, ton aide, les sacrifices que tu as faits, ta bonne humeur et ta présence. Tes encouragements ont été pour moi la source de ma persévérance. Ces 5 années de thèse n'ont pas toujours été simples, mais on les a surmontés ensemble avec notre belle famille. Je souhaiterais donc te remercier d'avoir été et d'être toujours là à mes côtés !

Je voudrais aussi remercier mes enfants d'avoir eu la patience durant mes études. Merci de me rendre heureuse et fière d'être votre maman! Ali, la première bougie de notre maison

et l'héritier de nos gènes scientifiques, je te remercie pour m'obliger à faire quelque chose pour mon propre bien quand j'ai besoin. Sarah, ma main droite à la maison et la deuxième maman, merci pour ta responsabilité, ta sympathie, ton visage souriant, ton aide au moment parfait et que j'ai beaucoup appréciée. Sans toi, je ne les aurais peut-être pas surmontés, je te dois beaucoup. Hadi, merci de toujours me démontrer l'amour que tu me portes. Tes câlins sont cruciaux dans les moments difficiles. Fatima, merci pour rendre les dates importantes toujours spéciales, d'une façon ou d'une autre. J'adore tes bricolages et tes dessins. Joud, mon beau bébé (made in PhD), merci d'avoir illuminé ma vie avec tes sourires et tes câlins, qui ont rendu la vie belle pendant les moments difficiles. Merci de m'avoir donné les plus beaux souvenirs de ma vie. Merci d'être comme vous êtes. J'ai l'honneur de dédier mon doctorat à vous, parce que vous le méritiez.

Enfin, je tiens à remercier ma famille : ma mère Samira, mon père Mohammad et mes 2 frères Youssef et Ali, qui sont toujours derrière moi et qui me poussent à aller de l'avant. Ils ont toujours été présents pour me soutenir dans chacun des moments de ma vie, et surtout durant cette étape éprouvante qu'est la thèse. Merci à vous d'être toujours là pour m'aiguiller et m'encourager dans chacun de mes choix et merci de croire en moi. Merci d'être fière de moi. *شكرا جزي؟ وببي فضلكم لي*

De plus, je voudrais dire merci à mes beaux-parents, que j'apprécie beaucoup. Merci pour l'intérêt que vous me portez et votre aide dans plusieurs aspects de la vie.

Vous n'imaginez pas à quel point je suis heureuse d'écrire enfin ces pages de remerciements. En effet, elles sont les preuves de l'achèvement d'un travail long et fastidieux, mais passionnant qu'il me tardait quand même de finir...

Enfin, Je dédie cette thèse à mon très cher mari Khalil dont j'ai trouvé en toi l'homme de ma vie, et mes enfants, la lumière de mon chemin, ainsi qu'à mes 2 parents qui n'ont pas eu l'opportunité de finir leurs études, mais ils m'ont inculqué les rudiments de l'approche scientifique comme la curiosité, le goût d'apprendre et de communiquer, des atouts essentiels pour un chercheur.

## RÉSUMÉ

Êtres sessiles, les plantes sont sujettes à des stress importants tels que les fluctuations de température, les précipitations, le rayonnement solaire ainsi que les agressions par des agents phytopathogènes. Ces facteurs représentent une menace importante pour la production agricole mondiale. Pour lutter contre ces périls, les plantes, ne pouvant fuir face au danger, ont dû développer des stratégies de défense efficaces. Dans ce contexte, les plantes régulent la synthèse de leurs protéines afin de produire une réponse adéquate à ces stress en modulant le mécanisme de la transcription et de la traduction. En effet, ce dernier est régulé pour optimiser la consommation d'énergie et pour sélectionner la production des protéines impliquées dans la défense ainsi que des protéines nécessaires à la survie des plantes. De nouvelles études ont montré que les ribosomes, siège de la traduction, se remodelent pour s'adapter au stress. Chez *Arabidopsis thaliana*, les ribosomes sont constitués d'environ 81 protéines ribosomales distinctes, chacune étant codée par deux à sept gènes paralogues. La composition des ribosomes a été examinée par plusieurs études de spectrométrie de masse. Différents paralogues des protéines ribosomales ont été identifiés dans les ribosomes en réponse à différents stimulus, montrant une hétérogénéité dans leur composition. Cette hétérogénéité peut constituer des ribosomes spécialisés qui régulent la traduction de certains ARNm et contrôlent la synthèse des protéines. Dans ce contexte, déterminer la fonction des différents paralogues des protéines ribosomales et leur implication dans la synthèse des protéines dans le contexte de la défense semble être essentiel pour comprendre les mécanismes de défense et améliorer notre capacité à protéger les cultures des maladies.

Des études protéomiques des noyaux des cellules végétales sous différents stress abiotiques et biotiques ont révélé un répertoire d'au moins 15 protéines de la petite sous-unité de ribosome (RPS) dont l'accumulation a augmenté dans les noyaux des plantes stressées (site de la biogenèse des ribosomes) comparés aux contrôles (plantes non stressées). La fonction de ces RPS dans les mécanismes de défense des plantes n'est pas toujours claire. C'est pour contribuer à cette connaissance que nous avons choisi d'étudier le rôle des protéines ribosomales de la petite sous-unité (RPS) dans l'élucidation des mécanismes de défenses et surtout dans la traduction des protéines de défense. Pour atteindre notre objectif, nous

avons étudié l'expression de ces 15 RPS dans les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana* sous 3 différents stress. Nous avons sélectionné cinq candidats parmi les 15 RPS dont l'expression a montré une augmentation sous les trois types de stress choisis chez la plante modèle *Nicotiana benthamiana*. Afin de déterminer si ces cinq RPS jouent un rôle dans la traduction des protéines de défense, nous avons développé une nouvelle approche pour visualiser l'effet de répression de ces RPS dans la traduction des ARNm du gène rapporteur (GFP) contenant différents 5'UTR des gènes de contrôle et de défense chez *Nicotiana benthamiana*. La répression des gènes codants pour NbRPSaA, NbRPS5A et NbRPS24A a montré une réduction de la traduction des gènes de défense. Les plantes réprimées pour NbRACK1A ont montré une réduction de la traduction d'enzymes antioxydantes spécifiques. Cependant, les plantes réprimées pour NbRPS27D ont montré une réduction de la traduction de tous les gènes testés.

Ensuite, nous avons utilisé une approche protéomique précédée de l'immunoprécipitation pour vérifier si ces RPS sont impliquées dans le ribosome actif dans la traduction durant la défense. L'immunoprécipitation de RPL18, un constituant de la grande sous unité, nous a permis d'immunoprécipiter la petite sous-unité de ribosomes assemblés (80S). Les résultats de la spectrométrie de masse obtenus ont démontré que parmi nos 5 candidats des RPS, l'accumulation de 4 RPS (RPSaA, RPS5A, RPS24A et RPS27D) a augmenté d'une manière significative dans les ribosomes assemblés durant la réponse induite par l'INA, un analogue de l'acide salicylique, comparé au contrôle non traité.

La présente étude suggère que certaines RPS sont impliquées dans la régulation de la traduction de nombreux gènes importants pour la défense. Par conséquent, nos résultats ont établi une nouvelle stratégie qui ouvre des voies intéressantes pour la recherche sur le rôle des protéines ribosomales lors du stress abiotique et biotique chez *Nicotiana benthamiana*.

**Mots-clés:** *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, régulation de la traduction, protéine ribosomale de la petite sous-unité (RPS), 5'UTR, protéomique, VIGS, expression transitoire, immunité des plantes, stress biotique et abiotique.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....</b>	<b>xiii</b>
 <b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. Maladies des plantes : Menaces majeurs pour la sécurité alimentaire mondiale....	1
1.2. Les mécanismes de défense chez la plante.....	3
1.3. Signalisation hormonale dans la défense des plantes.....	7
1.3.1 Acide Salicylique.....	8
1.3.2 Acide Abscissique .....	9
1.3.3 Acide jasmonique et Éthylène.....	9
1.4. Adaptation cellulaire par régulation de l'expression génétique.....	10
1.5. Modulation de la traduction sous le stress.....	13
1.6. Ribosome.....	19
1.6.1. Structure et fonction des ribosomes.....	20
1.6.2. Biogenèse de ribosome.....	25
1.6.3. Hétérogénéité des ribosomes.....	28
1.6.4. Les protéines ribosomales.....	31
1.6.5. Régulation des protéines ribosomales.....	37
1.6.6. Les fonctions extraribosomales des protéines ribosomales.....	42
1.6.7. Mutants des protéines ribosomales.....	45
1.7. Objectifs de recherche.....	48
 <b>CHAPITRE II</b>	
<b>Differential participation of ribosomal protein of small subunit (RPS) in protein translation under stress in plants.....</b>	<b>52</b>

2.1 Contributions des auteurs.....	52
2.2 Résumé de l'article (français).....	52
2.3 Article complet (anglais): Differential participation of ribosomal protein of small subunit (RPS) in protein translation under stress in plants.....	53
Abstract.....	53
Introduction.....	54
Materials and Methods.....	57
Plant growth and stress treatments.....	57
Differential gene expression analysis.....	57
VIGS.....	59
Quantitative RT-PCR (RT-qPCR).....	60
5'UTR Constructs and Plasmid construction.....	60
Leaf infiltration methods.....	61
Detection of GFP Fluorescence.....	61
Protein Extraction.....	62
Results.....	62
Small ribosomal proteins are deregulated by different stresses in Arabidopsis and <i>N. benthamiana</i> .....	62
RPSaA, RPS5A and RPS24A proteins have a role in the translation of mRNAs encoding defense proteins.....	64
RPS27D is required for efficient translation in <i>N. benthamiana</i> .....	67
RACK1A is required for efficient translation of several antioxidant enzymes... ..	69
Discussion.....	70
Acknowledgments.....	76
References.....	77
Supplementary data.....	85

### CHAPITRE III

<b>Specific alterations in riboproteomes composition of isonicotinic acid treated arabidopsis seedlings.....</b>	<b>91</b>
2.1 Contributions des auteurs.....	91

2.2 Résumé de l'article (français).....	92
2.3 Article complet (anglais): Specific alterations in riboproteomes composition of isonicotinic acid treated arabidopsis seedlings.....	93
Abstract.....	93
Introduction.....	93
Materials and Methods.....	95
Plant growth conditions and INA treatment.....	95
Gene expression analysis.....	95
Ribosome immunopurification.....	96
Sample preparation for mass spectrometry.....	97
Protein identification and data analysis.....	98
Visualization of RP localization.....	99
5' upstream region analysis.....	99
Results.....	99
Ribosome enrichment following immunity activation.....	99
The riboproteome is deregulated by INA treatment.....	101
Small subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatment..	103
Large subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatment..	107
5' upstream analysis of deregulated RPs.....	110
Discussion.....	111
References.....	116
Supplementary data.....	123
<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>125</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>139</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
1.1 Fonctions des protéines ribosomales chez la plante.....	45
1.2 Phénotypes des mutants des gènes des protéines ribosomales chez <i>Arabidopsis</i> ....	47

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
1.1 Les stress biotiques et abiotiques chez les plantes.....	2
1.2 Modèle en zigzag qui représente la co-évolution de la relation de susceptibilité et de résistance entre la plante et l'agent pathogène.....	5
1.3 Types de molécules induites chez la plante lors de la défense .....	7
1.4 Rôle des phytohormones dans la défense des plantes : signalisation et «crosstalk»... 10	
1.5 Nombre des publications sur le transcriptome et le traductome à partir des bases des données PubMed à travers les années.....	11
1.6 Les différentes étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique à partir des ARN jusqu'aux protéines.....	13
1.7 Principaux éléments structuraux de l'ARNm régulateurs de la traduction.....	15
1.8 Le mécanisme d'initiation de la traduction canonique « coiffe-dépendant » chez les eucaryotes.....	17
1.9 Comparaison des sous-unités ribosomales bactériennes, eucaryotes, et eucaryotes supérieures .....	21
1.10 La structure des sous-unités ribosomales chez les eucaryotes.....	24
1.11 Organisation fonctionnelle des ribosomes.....	25
1.12 La biogénèse des ribosomes.....	27
1.13 Des publications scientifiques sur « l'hétérogénéité des ribosomes » depuis 1969.....	29
1.14 Sources de différences structurales chez les ribosomes eucaryotes.....	30
1.15 Schéma simplifié de la biogenèse des ribosomes cytosoliques des plantes mettant en évidence les étapes potentielles auxquelles l'hétérogénéité structurelle peut se produire et se contrôler.....	30
1.16 Le nombre des gènes des protéines ribosomales dans les principaux règnes de la vie.....	33

1.17 Localisation des protéines ribosomales dans le ribosome 80S du blé <i>Triticum aestivum</i> visualisé par PYMOL.....	35
1.18 La signalisation TOR-5'TOP régule la biogenèse des ribosomes dans les conditions du stress.....	41
1.19 Fonctions extraribosomales potentielles des protéines ribosomales cytosoliques chez les plantes et des méthodes et des approches pertinentes pour analyser leur fonctions extraribosomales.....	45

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABA	Acide Abscissique
ABRE	Abscisic acid responsive Element
<i>ACT 1</i>	Actine 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNr	ADN ribosomale
AF	Assembly Factor
APX	Ascorbat peroxidase
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomale
ARNt	ARN de transfert
ARN pol Pol I, II & III	ARN Polymerase I, II & III
ATP	Adénosine-Triphosphate
AJ	Acide Jasmonique
AS	Acide Salicylique
BS	Brassinostéroïdes
BIG	Calossin-like protein required for polar auxin transport
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CAT	Catalase
CCT2	Phosphorylcholine Cytidylyl Transferase 2
CDPK	Calcium-Dependant Protein Kinase
CPT	Centre Peptidyl-Transférase
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9
cryo-ME	cryo- Microscopie électronique
CSP1	Cold Shock Protein 1

DAMP	Damage-associated molecular patterns
DC	Decoding Center
dNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate
Dpi	Day post infiltration, jour post-infiltration
DSRE	Defence/Stress-Responsive Elements
4E-BP	4E-Binding Protein
<i>EFl<math>\alpha</math></i>	Elongation factor 1- $\alpha$
eIFs	eukaryotic Initiation Factors
EST	Expressed Sequence Tag
ET	Éthylène
EtHAn	Effector-to-Host Analyzer
ETI	Effector-Triggered Immunity, Immunité spécifique aux effecteurs
ETS	Effector-Triggered Susceptibilité, Susceptibilité aux effecteurs
EV	Empty Vector
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
GA	Gibberellic Acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GARE	Gibberellic acid responsive element
GDP	Guanosine Diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen Peroxide
HSP90	Heat Shock Protein 90
Hpi	Hour post-infiltration, heure post infiltration
HRGP	Hydroxyproline-Rich Glycoproteins
HRE	Hormone-Responsive Elements
HSE	Heat Stress Elements
IAA	Indole Acetic cid



IMP- $\alpha$	Importin- $\alpha$
INA	2,6-dichloroisonicotinic acid
IRES	Internal Ribosome Entry Site
iSAT	Integrated Synthesis, Assembly, and Translation
kDa	kiloDalton
LC/MS/MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectroscopy
LFQ	Label-Free Quantitation
LSU	Large Subunit
LTR	Low-Temperature Response
MAMP	Microbes Associated Molecular pattern
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3
MBS	Myb Binding Site
MeJa	Methyl jasmonate
MDa	Mégadalton
mORF	Main ORF
NPR1	NONEXPRESSOR OF PR1
OD <sub>600</sub>	Densité optique à 600nm
ORF	Open Reading Frame
P35S	Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter
PAGE	PolyAcylamide Gel Electrophoresis
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
48S PIC	48S Pre-Initiation Complex
PKC	Protein Kinase C
Poly A	Polyadénylation
POX	Peroxidase
<i>PP2A</i>	Protein Phosphatase 2A

PR	Pathogenesis Related
PR	Pattern Recognition Receptor
PTI	PAMP-Triggered Immunity
PTM	post-transcriptional /translational modifications
PTA	Potato Virus A
RACK1	Receptor For Activated C Kinase 1
RAP	Ribosome-associated Protein
RH	Réponse hypersensitive
RiBi	Ribosome biogenesis
RISE	Ribosome Synthesis and Evolution
RNP	Particules Ribonuléo-Protéiques
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RP	Ribosomal protein
RPG	Ribosomal protein gene
RPL	Ribosomal Protein of the Large Subunit
RPS	Ribosomal Protein of the Small Subunit
RSA	Résistance systémique acquise
RT-qPCR	Reverse Transcriptase-Qpcr
S6K	S6 Kinase
Site A	Amino-acyl tRNA binding site
Site E	tRNA Exit Site
Site P	Peptidyl tRNA binding site
SnoRNA	Small Nucleolar RiboNucleoprotein Acid
SSU	Small subunit
TBP	TATA-binding protein
TFs	Transcription Factors
TOP	Terminal OligoPyrimidine Tract, Séquence polypyrimidine
TOR	Target Of Rapamycin
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
TuMV	<i>Turnip Mosaic Virus</i> , Virus de la mosaïque du navet

UBQ1	Polyubiquitin 1
uORF	Upstream Open Reading Frame
UTR	Untranslated Region, Région non traduite
UV	Ultraviolet
VIGS	Virus-induced gene silencing

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

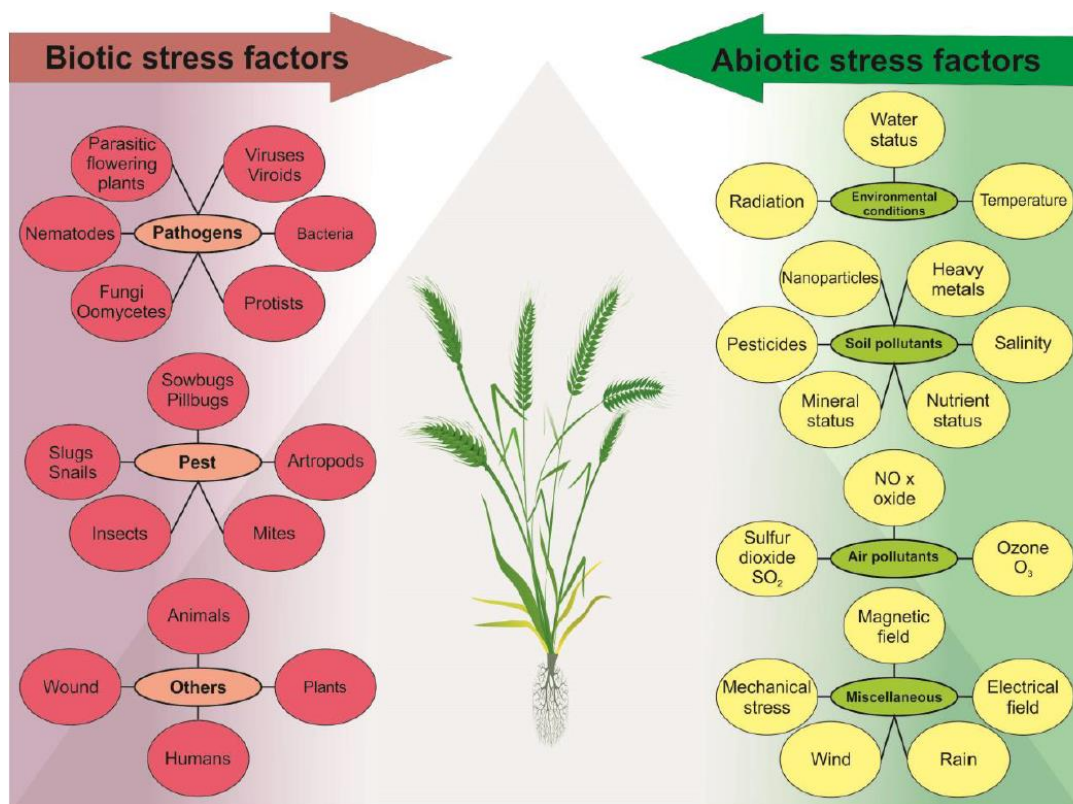
#### 1.1 Maladies des plantes : menaces majeures pour la sécurité alimentaire mondiale.

Les végétaux sont à la base de l'alimentation humaine et leur culture est un acteur économique important dans toutes les sociétés actuelles. Ils représentent 80% des aliments que nous consommons et produisent l'oxygène que nous respirons. Cependant, ils sont confrontés à la menace constante et croissante des ravageurs et des maladies. Chaque année, jusqu'à 40% des cultures mondiales de maïs, de pommes de terre, de riz, de soja et de blé sont détruites à cause des ravageurs et/ou des maladies. Cela entraîne des pertes de plus de 220 milliards de dollars, engendre la famine pour des millions de personnes et nuit à l'agriculture – principale source de revenus des communautés rurales pauvres (FAO, 2019, Focus : Développement durable).

Les plantes ne peuvent se déplacer et sont donc particulièrement exposées aux fluctuations de l'environnement et aux attaques extérieures. Les contraintes environnementales comprennent les stress biotiques liés à l'action d'organismes vivants tels que les bactéries, les virus, les oomycètes, les champignons, les nématodes, et les insectes, *etc...* De l'autre côté, les stress abiotiques sont induits par des conditions environnementales tels que la chaleur, le froid, la grêle, le gel, le vent, le manque d'eau, la salinité, les carences nutritives, les métaux lourds, le rayonnement solaire, *etc...* (Karmous et al., 2017; Roeber et al., 2021; Zhu, 2016) (Fig. 1.1). La contrainte abiotique la plus incriminée est la sécheresse (Dietz et al., 2021), même si des baisses de productivité sont aussi imputées à la présence de polluants atmosphériques (Ainsworth et al., 2012).

Donc, l'impact des changements globaux sur les plantes cultivées et sur leurs capacités à produire des fibres, des graines, des légumes, et des fruits, est un sujet de préoccupation majeure pour la sécurité alimentaire de l'humanité. Ces facteurs pouvant nuire à la croissance et affecter la productivité des récoltes d'une grande importance économique comme le blé, le maïs et le soja (Kopecká et al., 2023). L'effet défavorable des stress sur

les rendements des cultures est connu depuis presque un demi-siècle. Un bon exemple est la perte de la récolte de l'orge brassicole québécois de l'année 2014 causée par des conditions propices au développement de la fusariose de l'orge (Nielsen et al., 2014). Ainsi que les taches et les brûlures des céréales causées par les bactéries *Pseudomonas* et *Xanthomonas*, ou encore la gale commune de la pomme de terre causée par la bactérie *Streptomyces scabies* sont d'autres exemples des maladies ayant de graves conséquences sur la culture et qui représentent un problème économique mondial.



**Figure 1.1** Les stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Georgieva & Vassileva, 2023).

Les dommages aux champs sont de réels enjeux pour les agriculteurs qui, pour éviter d'avoir des pertes de production agricole face aux agents biotrophes et donc des pertes économiques, vont utiliser des pesticides, fongicides, *etc.* L'utilisation de ceux-ci est de plus en plus remise en question; ce choix met un poids économique supplémentaire sur la production et ne se fait pas sans risques pour la santé. En même temps, avec la demande

croissante de la population, il semble pertinent de trouver des solutions alternatives plus efficaces et moins nocives pour l'environnement et la santé humaine. Dans cette optique, comprendre les mécanismes naturels de défense des plantes et identifier les molécules de signalisation impliquées dans la résistance des plantes sont indispensables pour lutter contre les agents phytopathogènes et prévenir d'autres crises épidémiques végétales afin de protéger notre approvisionnement alimentaire et développer des espèces végétales plus résistantes aux maladies (Trémousaygue & Deslandes, 2020).

## **1.2 Les mécanismes de défense chez la plante.**

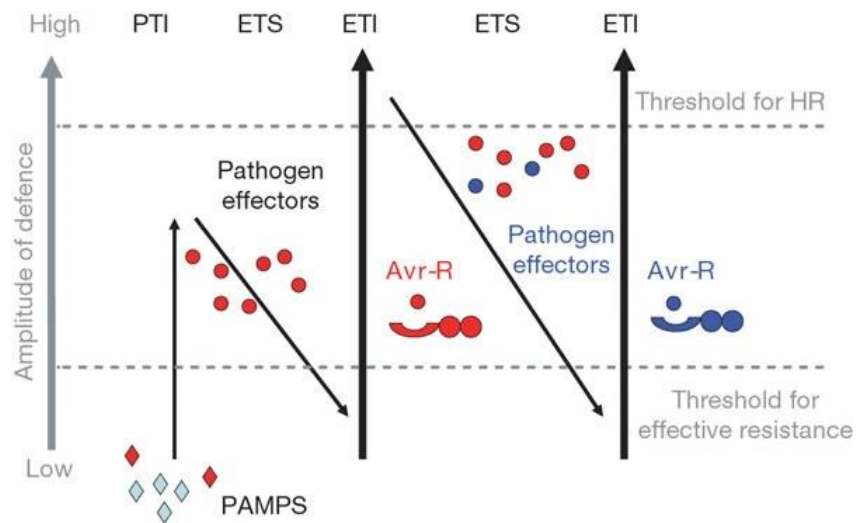
Au cours de leur évolution, les plantes ont élaboré un véritable système immunitaire capable de déceler un danger, que ce dernier soit de nature biotique ou abiotique. En l'absence des lymphocytes et des anticorps que l'on retrouve dans le système immunitaire humain, le système immunitaire des plantes se distingue par la variété des molécules de défense qu'il produit en réponse à un stress. Cette stratégie défensive, activée par l'agression, conduit à des modifications considérables de l'activité métabolique des cellules végétales, se traduisant par une cascade d'événements destinés à restreindre la progression des agents infectieux et à réduire les dommages causés par des blessures (Divekar et al., 2022; Freeman & Beattie, 2008; Khare et al., 2020).

Au fil du temps, les plantes, les maladies et les ravageurs (bioagresseurs) ont co-évolué : Les plantes qui développent des stratégies de protection pour se défendre et les bioagresseurs qui tentent, de leur côté, de les contourner (J. D. G. Jones & J. L. Dangl, 2006). Les plantes ne sont pas toujours des hôtes potentiels. Les maladies chez les plantes ne sont pas la norme. La plupart du temps, la plante demeure saine puisqu'elle réussit à se protéger efficacement des différentes agressions. La plante ne subira pas des dommages, ou alors ceux-ci seront minimes, si la réponse qu'elle aura mise en place est adéquate. Cependant, si la réponse de défense est inefficace ou si l'agent pathogène réussit à la contourner, il y aura l'apparition des symptômes qui peuvent potentiellement conduire à la mort de la plante.

Ainsi, les plantes ont développé des mécanismes de défense variées qui visent à détruire, inhiber ou stopper la progression des agents pathogènes. Ces mécanismes peuvent être

constitutifs, que la plante a acquis suite à une adaptation climatique, ou induits impliquant des barrières nouvellement formées en réponse au stress (Kaplan et al., 2008). En effet, la première étape de défense limite l'entrée des agents pathogènes grâce à la présence des barrières préformées telles que les parois cellulaires, les cuticules épidermiques cireuses, l'écorce et les stomates (Ham et al., 2007; Melotto et al., 2006). La deuxième étape se produit après que l'agent pathogène pénètre dans la région apoplastique des cellules du mésophylle et implique des molécules chimiques produites par les plantes telles que les métabolites secondaires comme les phytoanticipines qui regroupent des composés phénoliques, des alcaloïdes et des glycosides cyanogéniques qui ont des propriétés antimicrobiennes et inhibent la croissance des agents pathogènes envahissants (Dixon et al., 2002; Hann & Rathjen, 2007). La troisième étape se produit lorsque des agents particulièrement agressifs parviennent à surmonter l'immunité constitutive, et impliquent des réponses de défense induites déclenchées dans la paroi cellulaire, la membrane plasmique, le cytosol, et le noyau de la plante et ayant pour objectif la destruction de l'agresseur ou, à tout le moins, son confinement sur le site de pénétration potentielle (Yang et al., 1997). La résistance basale, également appelée immunité innée, est la première ligne de défense inductible déclenchée par des éliciteurs généraux, composants de la paroi cellulaire, ou composés d'origine microbienne (Damage/Pathogen/Microbe/Herbivore-Associated Molecular Patterns (D/P/M/HAMPs)), tels que le  $\beta$ -glucane, la chitine ou la flagelline (Cohn et al., 2001). Ces motifs sont reconnus par des récepteurs de motifs positionnés à la surface des cellules que l'on nomme les PRR (Pattern Recognition Receptor) (de Wit, 2007). L'activation de ces PRR induira la réponse de défense basale ou l'immunité induite par les motifs moléculaires (ci-après PTI) (PAMP-triggered Immunity) (Nicaise et al., 2009). Cette réponse est de faible intensité bien que généralement suffisante à contrer la grande majorité des pathogènes (J. D. Jones & J. L. Dangl, 2006). La seconde ligne de défense induite est intracellulaire et est constituée des protéines de résistance qui sont en fait des récepteurs reconnaissant spécifiquement les protéines effectrices produites par l'agent pathogène qui vont lui permettre de passer outre la réponse PTI (Adachi & Kamoun, 2022). Cette reconnaissance induit une forte réponse de défense qui va éliminer l'organisme indésirable. C'est ce que l'on nomme l'immunité induite par les effecteurs ou l'ETI (Effector-triggered Immunity) (J. D. Jones & J. L. Dangl, 2006). La PTI et l'ETI ont

souvent été envisagées comme étant deux mécanismes distincts et unidirectionnels. Cependant, la récente littérature s'accorde aujourd'hui sur une association plus intime entre la PTI et l'ETI (Bjornson & Zipfel, 2021; Chang et al., 2022). En effet, l'accumulation de nouveaux mécanismes évoque une convergence des cascades de signalisation vers l'expression de gènes de résistances communs et une potentiation de l'ETI par la PTI (Ngou et al., 2022). La relation entre les agents pathogènes et les plantes est schématisée dans le modèle zigzag qui résume la course aux armements entre les plantes et leurs agresseurs (Fig. 1.2).

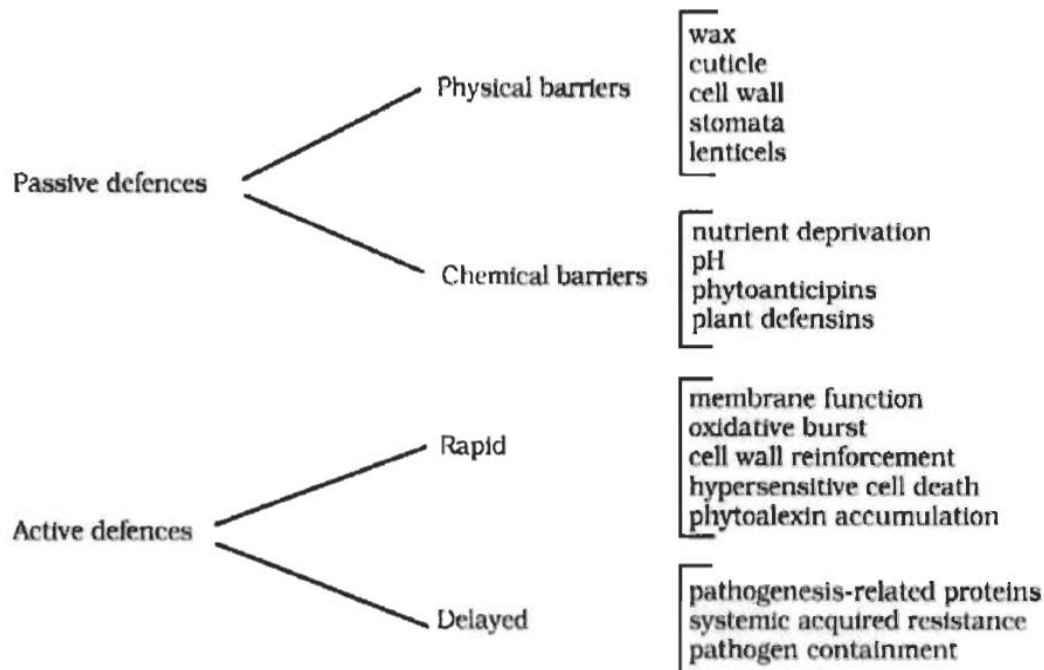


**Figure 1.2 : Modèle en zigzag qui représente la coévolution de la relation de susceptibilité et de résistance entre la plante et l'agent pathogène.** Dans la phase 1, il y aura une reconnaissance de l'agent pathogène via un PAMP. Cette reconnaissance induira la PTI et pourrait débarrasser la plante de l'agresseur. Cet agresseur peut déployer des effecteurs qui lui permettront d'outrepasser la PTI. Ainsi, nous obtiendrons une susceptibilité induite par un effecteur (ETS). La plante peut détenir une protéine de résistance afin de reconnaître l'un de ces effecteurs et mettre en place l'ETI. La plante deviendra donc résistante. À son tour, le pathogène peut faire évoluer cet effecteur, ce qui rendra la plante sensible à nouveau. Le cycle continuera ainsi indéfiniment dans ce que l'on décrit comme étant une course aux armements entre plantes et pathogènes. Tiré de (J. D. G. Jones & J. L. Dangl, 2006).

La réponse de défense induite contribue à freiner la progression des pathogènes par le renforcement des parois des cellules végétales par la déposition des glycoprotéines



(*hydroxyproline-rich glycoproteins* ou HRGP) et d'autres polymères, tels que la callose, la lignine, et la subérine (Underwood, 2012). Outre les barrières physiques induites, plusieurs métabolites secondaires, tels que les phytoalexines (petites molécules ayant un pouvoir antibiotique) et des protéines PR (pathogenesis-related) sont synthétisées *de novo* lors des réponses de défense induites (Freeman & Beattie, 2008). Parmi les PR, on cite des chitinases et des glucanases dont les activités enzymatiques ont pour rôle de dégrader les polymères structuraux des pathogènes en les hydrolysant (Balasubramanian et al., 2012; Collinge et al., 1993). De plus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont connues pour s'accumuler dans les tissus infectés et ceux-ci peuvent être toxiques pour les pathogènes (Freeman & Beattie, 2008; O'Brien et al., 2012). Durant la PTI les transductions des signaux de reconnaissance vont induire une relocalisation cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation des cascades de signalisation à l'aide des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et des kinases dépendantes à l'influx calcique Calcium Dependant Protein Kinase (CDPK) (Boudsocq et al., 2010; Meng & Zhang, 2013; Mizoguchi et al., 1997). Les MAPK et les CDPK modulent l'intensité et la persistance de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la phosphorylation de TFs (facteurs de transcription) (Jalali et al., 2006). Par exemple, le couple MPK3/MPK6 phosphoryle les TFs ERF6, WRK22 et WRK29 qui participent à la résistance de certains stress environnementaux et contre les pathogènes fongiques chez *Arabidopsis* (Asai et al., 2002; Chen et al., 2002; Meng & Zhang, 2013). La translocation de TFs au noyau conduira finalement à l'expression de gènes de résistance (Bol et al., 1996), la libération de phytohormones, comme l'éthylène, l'acide jasmonique (AJ) ou l'acide salicylique (AS) (Bari & Jones, 2009), la rigidification des parois cellulaires par l'accumulation de callose (Ying Wang et al., 2021), mais aussi l'accumulation de protéines Pathogenesis-Related (PR) à la membrane et dans l'apoplaste (Saboki, 2011). En dernier recours, l'ETI peut mener à l'induction de la réponse hypersensible (HR) (Kombrink & Schmelzer, 2001) et le déclenchement de la mort cellulaire dépendamment de la libération cytoplasmique de ROS (Overmyer et al., 2003). Les réponses de défense induites sont plus efficaces que l'immunité constitutive, d'où il est important de les comprendre pour développer des cultures durables et résistantes aux maladies (Agrawal & Karban, 1999). Les mécanismes de défense constitutive et induite sont résumés dans la figure 1.3.



**Figure 1.3 : Types de molécules induites chez la plante lors de la défense** (Guest et al., 1997). Les défenses dites constitutives (ou passives) sont présentes avant toute agression (toujours présente chez la plante), à l’opposé des défenses induites produites en réaction au dommage ou en réponse au stress.

### 1.3 Signalisation hormonale dans la défense des plantes.

Dans le milieu naturel, les plantes sont souvent sujettes à des contraintes abiotique et biotique simultanément. Pour assurer leur survie face aux attaques multiples, les plantes utilisent des réseaux hormonaux complexes pour adapter leurs réponses et reprogrammer leur métabolisme de croissance vers des fonctions défensives (Muthamilarasan & Prasad, 2013). Généralement, l’acide salicylique (AS), l’acide jasmonique (AJ) et l’éthylène (ET) sont associés à la défense des plantes (Knogge et al., 2009), tandis que les gibbérellines (GA), les auxines (IAA), les brassinostéroïdes (BR) et les cytokinines sont associées à la croissance des plantes (Smith et al., 2017). L’acide abscissique (ABA) est la principale hormone qui régule les réponses au stress abiotique (Tuteja, 2007). Cependant, des études récentes ont montré que toutes les hormones végétales ont un effet direct et/ou indirect sur des multiples fonctions végétales. Par exemple, l’AS, l’AJ et l’ET sont également

impliqués dans le développement et la tolérance au stress abiotique (Horváth et al., 2007; Kazan, 2015; J. Wang et al., 2020), tandis que les IAA et les GA jouent un rôle dans la résistance au stress abiotique et biotique (Ghanashyam & Jain, 2009; Murcia et al., 2017; Zhang et al., 2021). Chez la plante, ces hormones, naturelles et non toxiques, jouent le rôle de molécules signal, ou messagers, en régulant l'activité cellulaire à la suite de l'intégration dans la cellule d'une information extracellulaire afin de déclencher un mécanisme des défenses. L'interconnexion et la coordination de ces voies de signalisation sont des éléments clés pour réguler l'équilibre entre la croissance des plantes et la résistance aux maladies.

### 1.3.1. Acide Salicylique

Dans le cadre de ma thèse, on s'est servi de l'INA, qui est un analogue fonctionnel de l'AS, pour induire la défense chez la plante. L'acide salicylique, est devenu l'objet de recherches récentes en raison de son rôle comme une molécule de signalisation endogène et dans la réponse de défense systémique des plantes sous le stress biotique et abiotique (Fragnière et al., 2011). Il est utilisé comme « éliciteur » qui stimule la défense naturelle de la plante pour la protéger (Bektas & Eulgem, 2015). L'acide salicylique (AS) est généralement impliqué dans l'activation de la réponse de défense contre les pathogènes biotrophiques (nécessitant une cellule vivante) (Yang et al., 2015) et hémibiotrophiques (courte phase biotrophe suivie d'une phase nécrotrophe) (Mencia et al., 2020). Des études ont montré un rôle de l'AS dans la résistance au stress abiotique comme régulateur de rédox (Horváth et al., 2007). L'AS est aussi impliqué dans la mise en place de la résistance systémique acquise (RSA) (Durrant & Dong, 2004). La RSA est une réponse de défense qui se propage dans la totalité de la plante. Elle est donc activée pour préparer la plante à une seconde vague d'agression dans le but de protéger les tissus d'attaques ultérieures quel que soit l'agent pathogène (Delaney et al., 1995; Delannoy et al., 2005; Fu & Dong, 2013).

Les mécanismes de la transduction du signal de la voie de l'AS impliquent le choc oxydatif, l'activation de cascades des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases, la phosphorylation des facteurs de transcription et l'induction de gènes de défense. Les premiers travaux sur l'acide salicylique ont montré que l'application de l'AS aux plantes du tabac induit l'expression des gènes de protéines liées à la pathogenèse (PR) et améliore la résistance aux pathogènes (Yalpani et al., 1991).

### 1.3.2 Acide abscissique

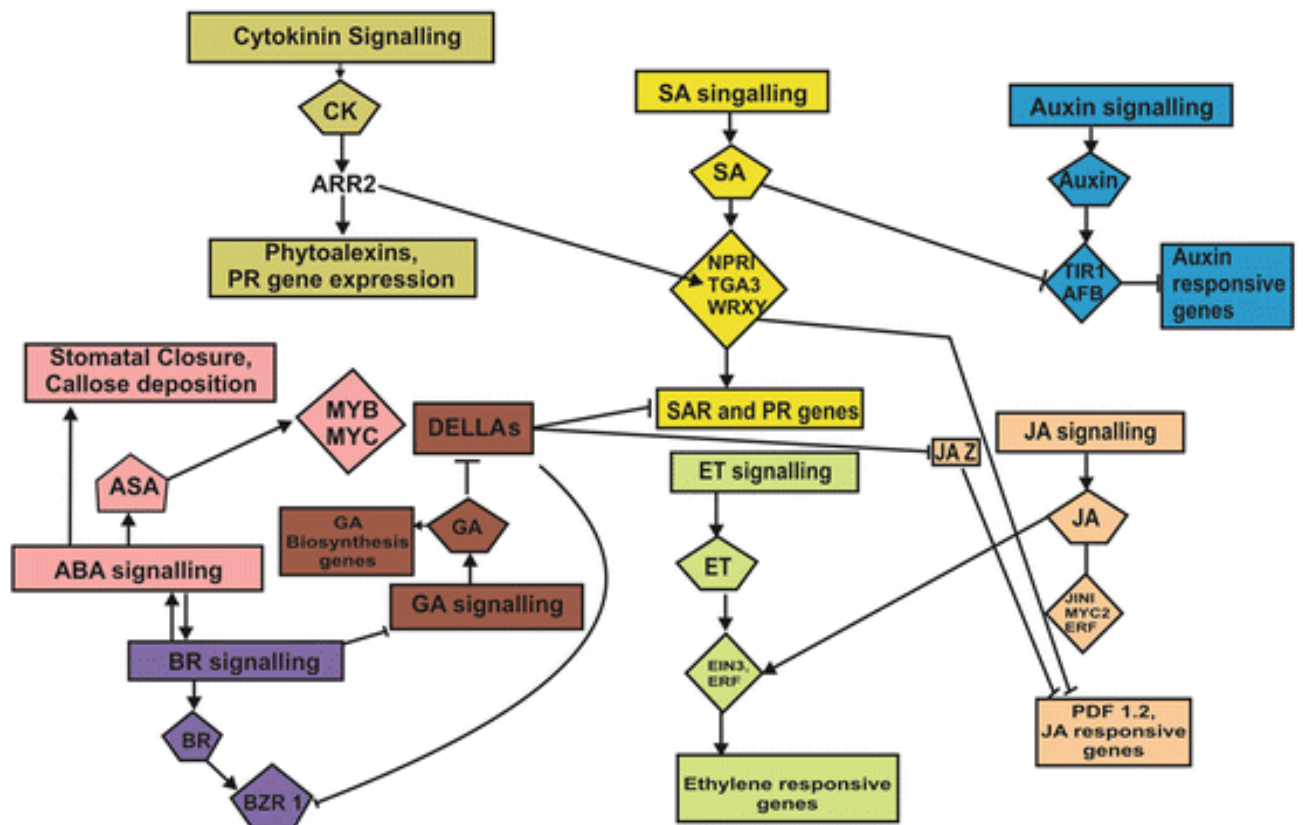
À part l'acide salicylique, l'acide abscissique (ABA), un sesquiterpène étroitement lié au développement de la plante, est impliqué dans la gestion des stress abiotiques et biotiques (Chan, 2012). Des études récentes ont montré un rôle de l'ABA dans la régulation de l'ouverture des stomates pour contrôler la perte d'eau par transpiration et l'invasion bactérienne (Lim et al., 2015). Son implication dans la synthèse de callose a de même été associée à une augmentation de la résistance à plusieurs parasites en participant au renforcement des parois (Flors et al., 2005; Ton & Mauch-Mani, 2004). L'ABA peut également favoriser l'accumulation des polyamines, des sphingolipides et même des prolines qui favorisent la tolérance à la sécheresse. De même, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et de la concentration intracellulaire de calcium déclenchée par l'ABA peut favoriser des événements supplémentaires impliqués dans la résistance, y compris l'expression génique, la réponse hypersensible (RH) et la mort cellulaire programmée (Bharath et al., 2021).

### 1.3.3 Acide jasmonique et Éthylène

Finalemment, l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (ET) sont souvent décrits comme des régulateurs de défense des plantes. La signalisation AJ/ET est activée dans la résistance aux maladies contre les agents pathogènes nécrotrophes (nécessitant des tissus morts), certains champignons et le stade nécrotrophe des pathogènes hémibiotrophes (Ghozlan et al., 2020). L'accumulation de l'AJ se fait à la suite de stress biotiques ou abiotiques, comme les blessures physiques, le broutage et les agents phytopathogènes (Yun Wang et al., 2021). Son accumulation permet l'expression de gènes de défensine, de thionine et de gènes de défense (Glazebrook et al., 2003). L'ET est quant à elle impliqué dans des processus physiologiques divers, comme la maturation des fruits, la germination, la sénescence de feuilles et de fleurs. Dans la réponse de défense, l'ET serait impliqué dans la mise en place de barrières physiques, de métabolites secondaires et la production de protéines PR (Adie et al., 2007).

Il existe donc une relation complexe entre ces différentes phytohormones qui peuvent s'accumuler de diverses manières en fonction des pathogènes rencontrés et de la plante hôte à laquelle fait face l'agent pathogène. L'utilisation des différents mutants a révélé la

multiplicité des interconnexions entre les voies de transduction du signal, traduisant les capacités adaptatives puissantes de la plante à un environnement hostile. Ces interactions peuvent avoir des effets régulateurs antagonistes ou synergiques (Leon-Reyes et al., 2010). Des études ont été réalisées pour montrer l'action négative de l'AS, de l'AJ et de l'ET sur l'expression des superoxydes dismutases dans le but de réguler le burst oxydatif (une réaction rapide produisant des formes réactives de l'oxygène) au cours de la réponse hypersensible (RH) (Myers Jr et al., 2023).



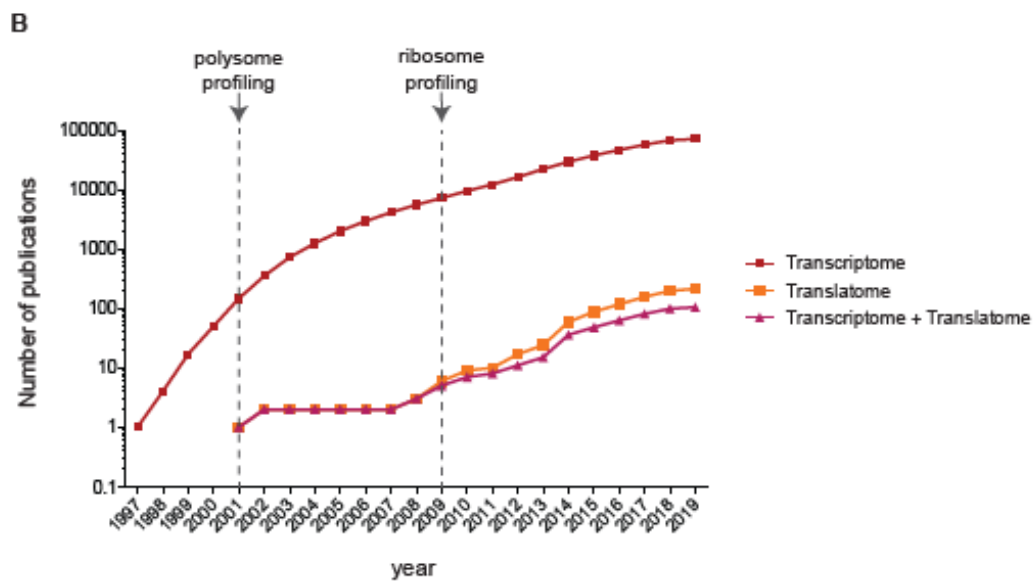
**Figure 1.4 : Rôle des phytohormones dans la défense des plantes : signalisation et «crosstalk» (Checker et al., 2018).**

#### 1.4 Adaptation cellulaire par régulation de l'expression génétique.

L'ADN (le support de l'hérédité) contrôle tous les processus vitaux de la cellule grâce à des molécules d'ARN intermédiaires qui dictent les types et les niveaux des protéines (les acteurs de la machinerie cellulaire) fabriquées dans la cellule. Des modifications rapides de l'expression génique sont parfois nécessaires pour changer la programmation cellulaire

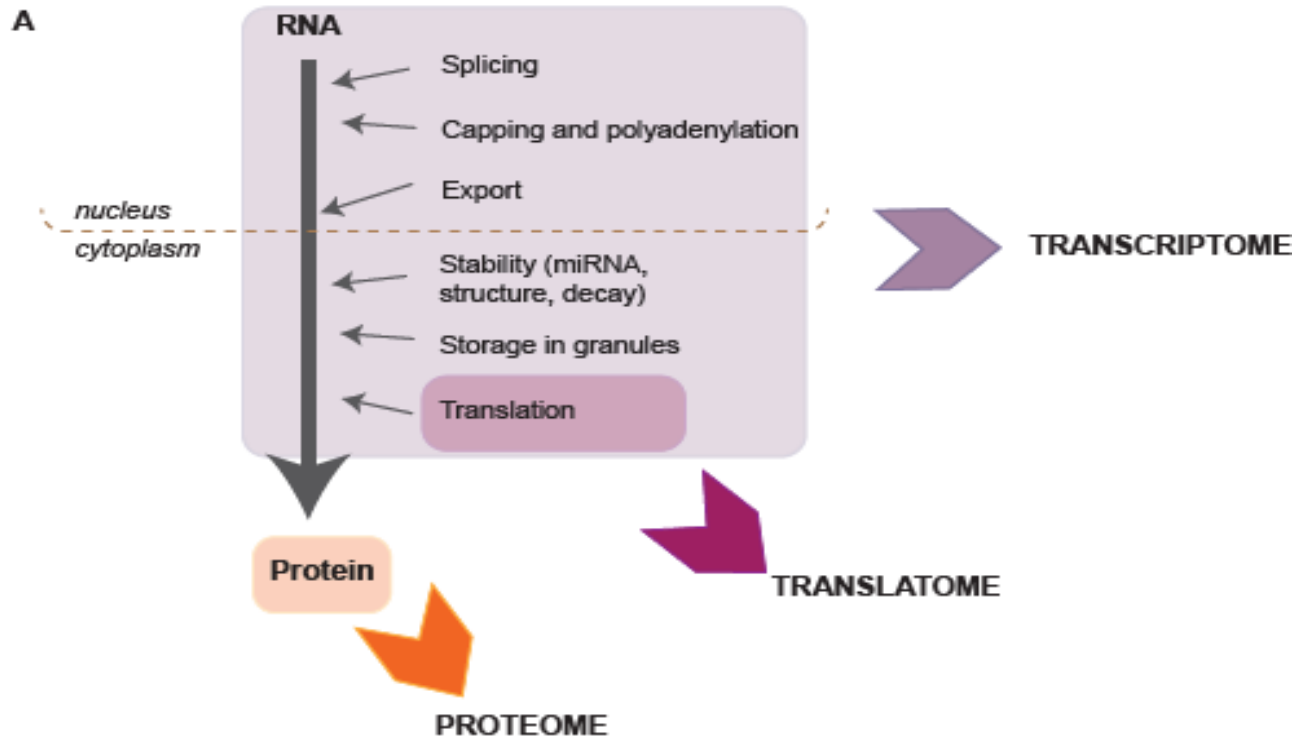
en réponse à des stimuli endogènes ou à des stress environnementaux. La régulation de l'expression des gènes est un mécanisme essentiel au bon fonctionnement d'un organisme vivant. Elle sert à exprimer les gènes au bon moment, permettant le développement, la différenciation et la croissance des cellules. Cette régulation permet aussi aux organismes d'ajuster leur machinerie enzymatique pour réagir face aux changements de l'environnement (Heintzman & Ren, 2007).

La régulation de l'expression des gènes peut impliquer divers mécanismes et étapes, parmi lesquels la transcription et la traduction sont les plus importantes. L'expression des gènes a généralement été mesurée par les niveaux d'ARNm, comme le montre l'augmentation exponentielle du nombre d'études transcriptomiques publiées depuis 1997. Cependant, les études du traductome n'ont été publiées qu'au début de 2000 et les études couplant les transcriptomes et les traductomes n'ont pas vu le jour avant 2001. Ces études ont permis d'analyser la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes (Figure 1.4).



**Figure 1.5 : Nombre des publications sur le transcriptome et le traductome à partir des bases des données PubMed à travers les années (Einhorn, 2019).**

À la suite de sa transcription, l'ARNm va subir différentes modifications post transcriptionnelles qui vont affecter son destin dans la cellule. Parmi ces modifications, on note l'ajout de la coiffe de 7-méthylguanosine sur le premier nucléotide de l'ARNm, l'épissage des introns par le spliceosome, le clivage de l'extrémité 3' et enfin la polyadénylation en 3' d'environ 200 résidus d'adénine. Une fois que l'ARNm mature est produit, il est exporté vers le cytoplasme via les pores nucléaires pour être soit traduit en protéines, soit stocké dans des vésicules cytoplasmiques, ou soit soumis à la dégradation (Fig. 1.5). Il a été noté que la dynamique de la production des ARNm et des protéines est différente. Par ailleurs, les molécules d'ARNm ont une demi-vie plus courte et sont moins nombreuses que les protéines, ces dernières étant en moyenne 5 fois plus stables et 2800 fois plus abondantes (Raghavan et al., 2002; Schwanhäusser et al., 2011). La moyenne de demi-vie des ARNm est de 2,6 à 7 heures alors que celle des protéines est d'environ 46 heures. Ainsi, des nombreux travaux ont montré que la corrélation entre l'abondance des ARNm et celle des protéines dans la cellule de la plupart des organismes est généralement considérée comme positive quoique de grandes variations existent (de Sousa Abreu et al., 2009; Maier et al., 2011; Plotkin, 2010; Vogel et al., 2010; Vogel & Marcotte, 2012). Elle peut varier selon le type et le statut de la cellule ainsi qu'entre les organismes. La corrélation ARNm-protéines est souvent plus faible pendant le stress aigu et les changements du développement, impliquant ainsi un remodelage important du protéome. De nombreux facteurs ont été proposés pour influencer cette corrélation, notamment les UTR et la longueur de l'ARNm, les fonctions des protéines (régulateurs de la réponse versus enzymes de la voie métabolique) ainsi que la dégradation de l'ARNm et/ou des protéines (Olivares-Hernández et al., 2011; Vogel et al., 2010). Dans l'ensemble, comme la réponse au stress est un effet conjugué de la transcription et de la traduction, le protéome, qui est le produit final de l'expression génique, fournit des informations plus directes sur les mécanismes moléculaires lors de l'infection, nous allons maintenant approfondir nos connaissances sur la régulation de traduction en réponse au stress dans la section suivante.



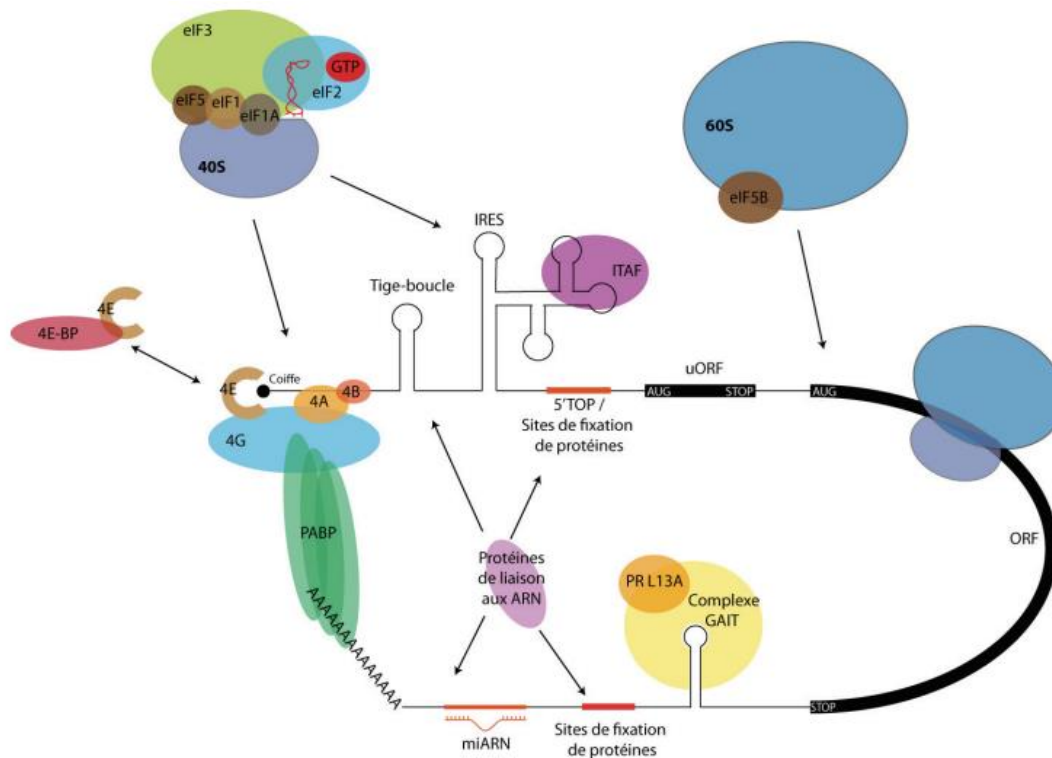
**Figure 1.6 : Les différentes étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique à partir des ARN jusqu'aux protéines (Einhorn, 2019).**

### 1.5 Modulation de la traduction pendant le stress

Une grande partie de la recherche en biologie a été orientée vers la compréhension des flux d'informations qui donne naissance aux différents phénotypes observés face au stress, ce qui aboutit à l'identification de plusieurs processus régulateurs qui modulent la traduction de l'ARNm en protéines en réponse à des facteurs environnementaux externes. Toujours dans le but de maintenir l'homéostasie dans la cellule, les organismes régulent l'expression des gènes pour produire les protéines essentielles dans de nombreux processus biologiques allant de la croissance et du développement jusqu'aux réponses au stress. Les progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance du mécanisme de la traduction des ARN messagers chez les eucaryotes révèlent l'importance de ce processus dans la modulation de l'expression des gènes et le rôle clé qu'y joue l'étape d'initiation (Son & Park, 2023). La traduction est un processus énergivore qui nécessite d'être modulé en réponse au stress (Echevarría-Zomeño et al., 2013; Spriggs et al., 2010; Zlotorynski, 2022). La synthèse des



protéines consomme plus de 90 % de l'énergie alors que moins de 10 % sont nécessaires à la transcription (Schwanhäusser et al., 2011). Le contrôle traductionnel répond à plusieurs voies de signalisation qui permettent d'adapter le protéome en fonction des conditions environnementales (disponibilité en nutriments, oxygène, hormones, stress, *etc.*), du type cellulaire ou encore de la phase du cycle de division cellulaire. En général, la traduction des protéines est considérablement réduite dans des conditions stressantes, tandis que la traduction des protéines associées au stress est augmentée (Merchante et al., 2017; Muench et al., 2012). Il a été montré que différents stress environnementaux induisent la synthèse de nouvelles protéines qui permettent aux plantes de survivre dans des conditions défavorables. De plus, plusieurs recherches ont expliqué comment les plantes utilisent le contrôle traductionnel pour se défendre contre les agents pathogènes et en réponse à une grande variété des changements environnementaux (Hahn & Walbot, 1989; Heikkila et al., 1984; Kosová et al., 2021; Ohashi & Matsuoka, 1985). Ces études suggèrent que tous les ARNm n'ont pas la même affinité pour les facteurs qui influencent la traduction, et donc le niveau de traduction de chaque ARNm est régulé à la fois par la disponibilité, par l'activité des facteurs généraux de traduction et par les éléments spécifiques agissant en cis et en trans de ces ARNm (Fig. 1.6). De très nombreux éléments portés par les ARNm eux-mêmes rentrent en compte dans la régulation traductionnelle. Pour un ARNm donné, la longueur des séquences 5'UTR et 3'UTR et de la queue poly-A influence fortement l'efficacité de la traduction. De nombreux éléments de séquences et de structures, tels que les IRES, les uORF (« upstream ORF »), les séquences 5'TOP (« 5' Terminal OligoPyrimidine tract »), les sites de fixation des protéines de liaison aux ARN et aux micro-ARN, jouent un rôle important dans la régulation traductionnelle spécifique des ARNm possédant ces éléments (Hinnebusch et al., 2016; Merchante et al., 2017).



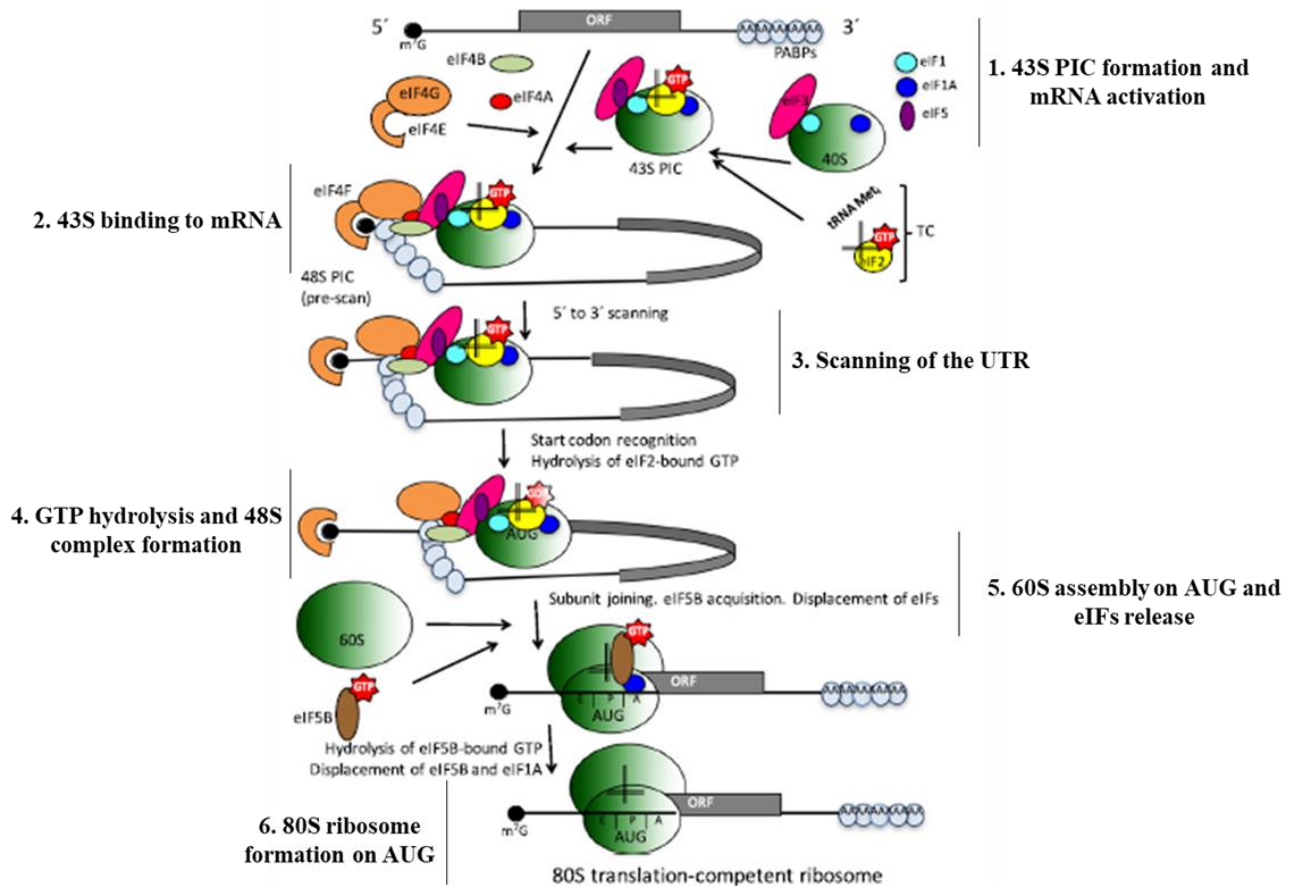
**Figure 1.7 : Principaux éléments structuraux de l'ARNm régulateur de traduction.**

La traduction d'un ARNm particulier peut être influencée par des éléments structuraux contenus dans la même molécule agissant en cis et trans. La coiffe en 5' ( $m^7GpppN$ ) et la queue poly-A en 3'améliorent fortement la traduction. Les sites d'entrée interne de ribosome (IRESs) favorisent la traduction indépendante de la coiffe; les structures tige-boucles et les cadres de lecture ouverts en amont (uORF) réduisent généralement la traduction du cadre de lecture principal (mORF). Le complexe GAIT est un groupe de protéines qui agit ensemble pour inhiber de façon sélective la traduction. De nombreuses protéines de liaison aux ARN régulent le recrutement du complexe de pré-initiation sur l'ARNm : Le motif 5'TOP joue un rôle dans la stimulation d'expression des protéines de la machinerie de traduction dans la croissance cellulaire, le site de liaison pour microARN qui joue un rôle dans la stabilité de l'ARNm (Merchante et al., 2017).

Chez les plantes, le mécanisme de la traduction des protéines est hautement conservé, et ses composants ont été décrits dans plusieurs revues (Browning & Bailey-Serres, 2015; Merchante et al., 2017; Muench et al., 2012; Roy & von Arnim, 2013). Ce mécanisme comprend 4 étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes.

L'initiation est certainement celle qui joue le rôle le plus déterminant (Echevarría-Zomeño et al., 2013; Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002). Cette étape permet de positionner la petite sous-unité du ribosome ainsi que l'ARNt initiateur chargé de méthionine (Met-ARNt<sub>i</sub> Met) au codon d'initiation d'un ARNm. Le modèle mécanistique représentant les principales étapes d'initiation de la traduction et leurs modalités de régulation dite « coiffe-dépendante » prend place pour la synthèse de la grande majorité des protéines. Ce type d'initiation implique la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm suivi du balayage (scanning) de la région 5'UTR dans le but de rencontrer l'AUG initiateur. Il dépend de la présence d'une structure dite coiffe, aussi appelée cap, à l'extrémité 5' des ARNm.

La coiffe est caractérisée par la présence d'un résidu guanine méthylée en position N7 et relié par une liaison caractéristique 5'-5' sur le premier nucléotide de l'ARNm (<sup>m</sup>7GpppN). La coiffe est liée par un complexe de facteurs d'initiation, appelé aussi le trimère eIF4F. Les trois facteurs qui composent ce complexe sont eIF4E, liant la coiffe, eIF4A, une hélicase à ARN à boîte DEAD (Acide aspartique-Glutamate-Alanine-Acide aspartique) permettant de défaire les structures secondaires de l'ARNm, et eIF4G, servant de pont entre eIF4E et eIF4A. Dans le même contexte, la queue 3'- poly (A) de l'ARNm interagit avec la protéine de liaison poly (A) (PABP). Par la suite, eIF4F interagit avec eIF4B, le cofacteur eIF4A et la protéine PABP via eIF4G, entraînant ainsi le déroulement et la circularisation de l'ARNm. De son côté, la petite sous-unité du ribosome 40S va former le complexe 43S en liant eIF3 ainsi que le complexe ternaire à l'aide des facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A. Le complexe ternaire est composé d'eIF2, de GTP et d'ARNt initiateur chargé de méthionine. Par ailleurs, eIF5 est probablement recruté par la petite sous-unité 40S à l'aide des facteurs eIF2 et eIF3. Le complexe 43S va interagir avec le complexe eIF4F pour former le complexe de pré-initiation (48S PIC), qui va ensuite balayer le 5'UTR des ARNm jusqu'à la rencontre d'un codon AUG initiateur complémentaire à celui de Met-ARNt<sub>i</sub> dans un contexte approprié. Après la détection du codon, on observe l'hydrolyse du GTP, la libération de GDP-eIF2, et le recrutement de la grande sous-unité ribosomale 60S pour former le complexe d'initiation 80S (Browning & Bailey-Serres, 2015; Merchante et al., 2017) (Fig. 1.7).



**Figure 1.8 : Le mécanisme d'initiation de la traduction canonique « coiffe-dépendant » chez les eucaryotes.** Le mécanisme d'initiation canonique dépendant de la coiffe peut être divisé en 6 étapes (étapes 1-6). (1) Le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt<sup>Met</sup> est assemblé dans le complexe de pré-initiation (PIC) 43S. L'ARNm est au même moment activé grâce à la liaison du complexe eIF4F à la coiffe, l'interaction de ce dernier avec les PABP en 3' induit une circularisation de l'ARNm. (2) Le complexe 43S est alors recruté au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm et (3) va procéder au processus de balayage de 5'UTR. (4) L'interaction de l'ARNt<sup>Met</sup><sub>i</sub> avec l'AUG initiateur induit l'hydrolyse du GTP associé à eIF2 et la formation du complexe 48S. (5) L'assemblage de la grosse sous-unité 60S sur le complexe 48S provoque le relargage de la majorité des facteurs d'initiation. (6) Le ribosome 80S est alors prêt à entrer en phase d'élongation (Jackson et al., 2010).

Comme décrit précédemment, la grande majorité des ARNm cellulaires sont traduits selon le mécanisme conventionnel coiffe-dépendant qui nécessite la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' et fait appel à une douzaine de facteurs d'initiation. Cependant, en situation de stress, la traduction canonique dépendante de la coiffe est bloquée, et des mécanismes alternatifs d'initiation de traduction prévalent pour produire des protéines nécessaires pour faire face au stress (Son & Park, 2023). La traduction sélective de l'ARNm est induite soit par une traduction non canonique dépendante de la coiffe, ou soit par une traduction indépendante de la coiffe (Holcik & Sonenberg, 2005; Liu & Qian, 2014). Ces mécanismes alternatifs peuvent faire appel à des éléments structuraux présents dans la région non traduite de l'ARNm (Fig. 1.6) qui recrutent directement les ribosomes (ou les facteurs d'initiation) et nécessitent un nombre variable et réduit de ces facteurs. Souvent le 5'UTR a la propriété d'attirer directement le complexe ribosomal indépendamment de la présence d'une coiffe en 5', grâce à la présence des codons d'initiation non canoniques (différents du codon AUG), de petits cadres de lecture ouverts dans les régions non traduites en 5' des ARNm, connus sous le nom de upstream open reading frames ou uORFs, ou encore de cadres de lecture alternatifs dans les ARNm (Brar & Weissman, 2015; Merchante et al., 2017).

De plus, les Sites d'Entrée Interne des Ribosomes (IRES, internal ribosome entry site) correspondent à des séquences portées par les ARNm capable de recruter la petite sous unité 40S du ribosome indépendamment de la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' du transcrit (Spriggs et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que 15% des ARNm des mammifères contiendraient des IRES, notamment les ARNm des facteurs de transcription, facteurs de croissance et de transporteurs. Ces ARNm particuliers utilisent leur IRES pour permettre la traduction dans des conditions de stress cellulaire où l'initiation canonique dépendante de coiffe à l'extrémité 5' est inactivée (Lacerda et al., 2017).

De nombreux arguments font aujourd'hui émerger la notion que le ribosome pourrait être actif dans la régulation traductionnelle et notamment que sa composition peut varier en fonction des cellules pour favoriser la traduction de certains ARNm. L'hétérogénéité dans la composition des ribosomes observée entre différentes espèces et au sein d'une même espèce est à l'origine des hypothèses du « code ribosomique » et de « ribosomes spécialisés » ou « filtre ribosomique ». Ces hypothèses peuvent être expliquées par la présence d'une

sélectivité envers des populations des ARNm à traduire. De plus, le rôle joué par les nombreuses interactions entre la petite sous unité du ribosome 40S et les ARNm tout au long du site de passage de l'ARNm pourraient être particulièrement important dans la sélection du site d'initiation et par la suite dans la régulation de la traduction. Dans la partie ci-dessous, nous allons décrire en détails un composant essentiel de la machinerie de traduction, **le ribosome**, ce complexe indispensable à la traduction, et qui a été au cœur de mes travaux au doctorat. Nous verrons également les éléments qui montrent que la composition des ribosomes peut varier dans certaines conditions et nous discuterons de la possible existence de « ribosomes spécialisés ».

## 1.6 Ribosome

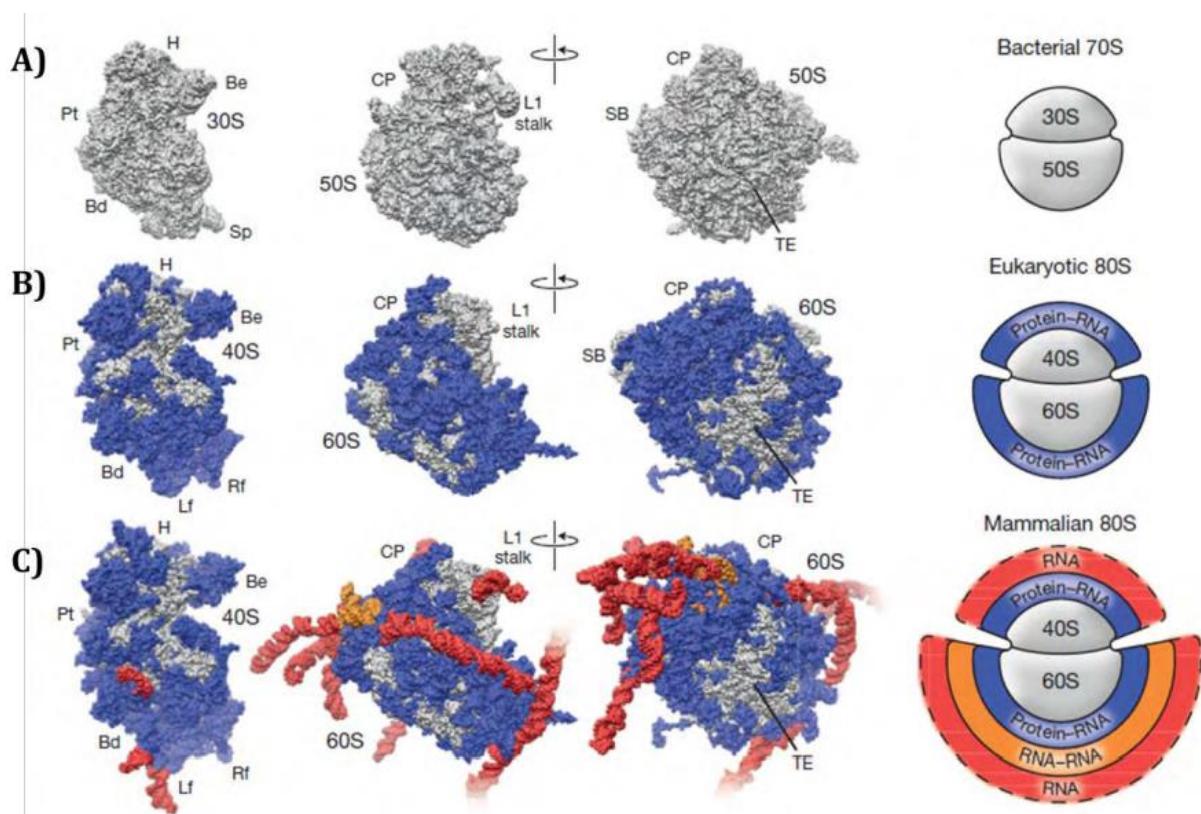
Descendants d'un ancien monde d'ARN, les ribosomes ont été observés pour la première fois en 1938 par le biologiste belge Albert Claude. En étudiant le virus du sarcome de Rous, il détecte sous son microscope, en plus des virus, des petites particules présentes dans les différents tissus : il les nomme « Microsomes ». Près de 20 ans plus tard, grâce à des microscopes électroniques, le biologiste américain George Palade obtient une image plus claire de ces particules dont il estime la taille à environ 20 nanomètres. À la même époque, le biologiste américain Paul Zamecnik et ses collègues ont utilisé des acides aminés radioactifs, et montrent que ces microsomes ont un rôle dans la synthèse des protéines (Kirsch et al., 1960; McQuillen et al., 1959). Leur composition riche en acide ribonucléique (ARN) et protéines a été établie en 1958 et a conduit le biochimiste américain Richard Roberts à les nommer ribosomes. Depuis ces années, une multitude d'études décrivant la composition et la fonction des ribosomes ont permis de mettre à jour le caractère universel des ribosomes dans l'ensemble des domaines du monde vivant. Ces recherches ont permis d'affirmer que le ribosome est un des complexes ribonucléoprotéiques les plus importants dans la cellule, tant par sa fonction, sa conservation que son nombre dans la cellule. La détermination de la structure tridimensionnelle des ribosomes a monopolisé les efforts des biologistes pendant plusieurs décennies. En 2000, la structure complète à l'échelle atomique semblait encore un « rêve » inaccessible, mais, aujourd'hui, on connaît celle du ribosome de quatre organismes différents. En effet, le cœur structural et la fonction du

ribosome sont très bien conservés à travers l'évolution des bactéries aux eucaryotes supérieurs (Anger et al., 2013; Petrov et al., 2014). Les recherches sur le ribosome ont été principalement concentrées sur le procaryote (*E. coli*) et des systèmes eucaryotiques connus (les humains et la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Cependant ces organismes diffèrent des ribosomes des plantes qui ont des spécificités au niveau de leur ribosomes tel que nous le verrons dans les sections suivantes.

### 1.6.1 Structure et fonction des ribosomes

Vers la fin des années 1990, le développement et l'optimisation des méthodes de cristallographie couplée à la spectrométrie aux rayons X et de cryo-microscopie électronique (cryo-ME) adaptées à l'étude de gros complexes moléculaires, ont permis d'élucider la structure des ribosomes des cellules procaryotes, la bactérie *Thermus thermophilus* et l'archée *Haloarcula marismortui*, avec une résolution atomique (Ban et al., 2000; Yusupov et al., 2001). Ce sont principalement les ARNr, par l'appariement des bases complémentaires et la formation de tiges-boucles, qui confèrent sa structure au ribosome. Les protéines ribosomales jouent un rôle essentiel pour le maintien de la structure puisqu'elles assurent le repliement adéquat des ARNr et stabilisent leur conformation (Petrov et al., 2014). La résolution de la structure des ribosomes eucaryotes a été plus tardive étant donné leur plus grande taille et leur plus grande complexité. C'est en 2010 que le ribosome de la levure a été cristallisé et analysé par spectrométrie aux rayons X, fournissant ainsi la première structure à haute résolution (3,00 Å) du ribosome eucaryote (Ben-Shem et al., 2011) et seulement quelques mois après, l'obtention de la structure des ribosomes du blé par cryo-ME avec une résolution d'environ 6 Å (Armache et al., 2010). Dans toutes les cellules, les ribosomes sont responsables de la synthèse protéique. Malgré cette extrême conservation de la nature physico-chimique et de la fonction des ribosomes, on constate que leur composition est nettement différente entre les ribosomes appartenant aux différents domaines du monde vivant. Ses composants (ARNr et protéines ribosomales (PR)) s'organisent de manière asymétrique en deux sous-unités : la grande sous-unité (LSU, pour « large subunit ») d'un coefficient de sédimentation de 60S (50S chez les procaryotes) et la petite sous-unité (SSU, pour « small subunit ») d'un coefficient de sédimentation 40S (30S chez les procaryotes), dont l'assemblage donne le ribosome 80S

(70S chez les procaryotes). La structure générale du ribosome est conservée dans les ribosomes bactériens et eucaryotes. Cependant, les ribosomes des eucaryotes présentent une plus grande complexité structurale, reflétant la plus grande complexité des mécanismes moléculaires observés dans la traduction chez les eucaryotes (Kapp & Lorsch, 2004). La composition des ribosomes s'est complexifiée au cours de l'évolution avec, d'une part des additions de protéines ribosomales et d'autre part, des extensions polypeptidiques sur des protéines ribosomales conservées. En conséquence, la masse des ribosomes est d'environ 2,5 MDa pour le 70S, 3,2 MDa pour les 80S d'eucaryotes unicellulaires et environ 4,3 MDa pour le ribosome des mammifères (Fig. 1.8).



**Figure 1.9. Comparaison des sous-unités ribosomales bactériennes (A), eucaryotes (B), eucaryotes supérieures (C).** (A), (B), (C) Représentation moléculaire et schématique des deux sous-unités ribosomiques. En (A) du ribosome bactérien 70S de *Thermus thermophilus*, en (B) du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae* et en (C) du ribosome 80S d'*Homo sapiens*. En gris est représenté le cœur conservé du ribosome bactérien, en bleu les éléments protéiques et nucléotidiques supplémentaires chez la levure, en rouge et orange la couche supplémentaire chez les eucaryotes supérieurs (Anger et al., 2013).



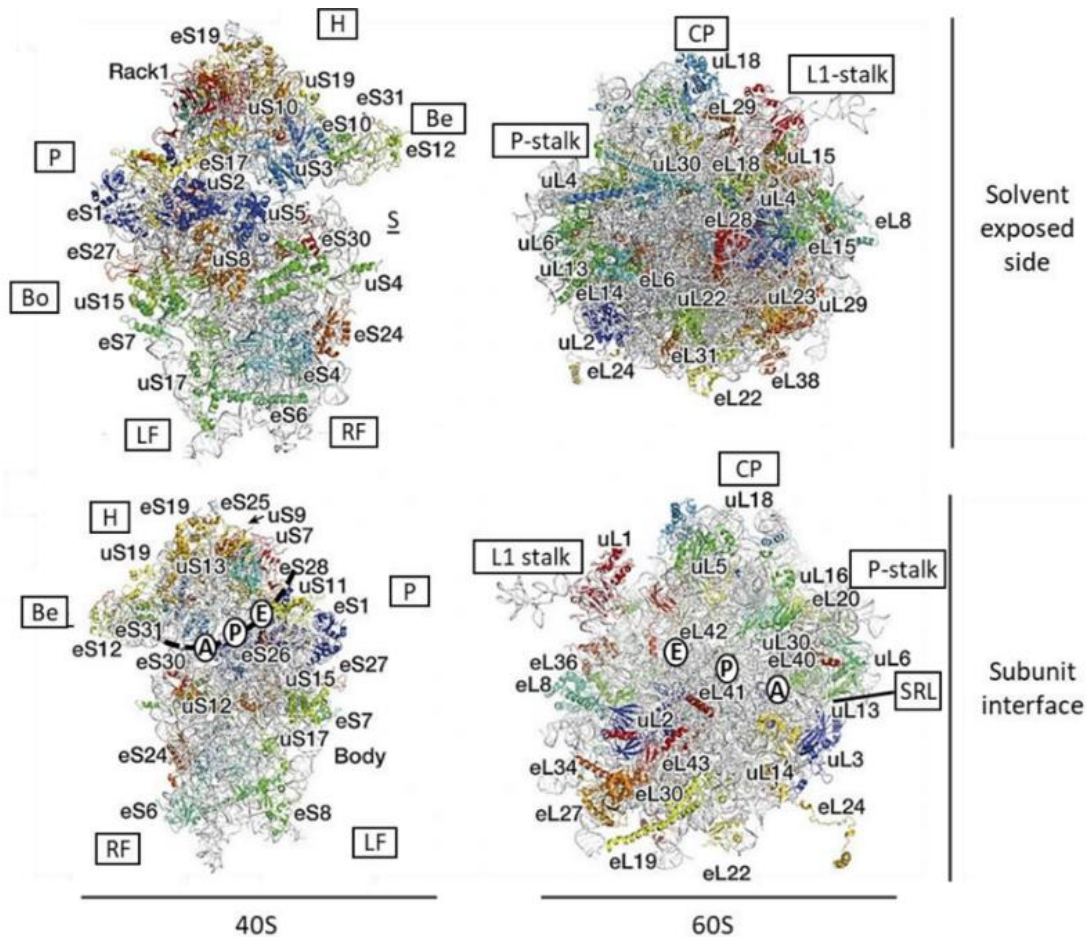
Chez les eucaryotes, chaque ribosome est composé d'une petite sous-unité 40S (30S chez les procaryotes) qui contient un seul ARNr 18S et jusqu'à 33 différentes protéines ribosomales (ARNr 16S et 21 RPS chez les procaryotes) et une grande sous-unité 60S (50S chez les procaryotes) qui contient 3 molécules des ARN ribosomales, le 5S, le 5,8S et le 23S (ARNr 5S et 23S et 31 RPL chez les procaryotes) et jusqu'à 47 différentes protéines ribosomales (RPL). Le nombre de protéines ribosomales cytoplasmiques varie selon les espèces ; la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a 78 protéines, alors que le ribosome du rat (*Rattus norvegicus*) contient 80 protéines environ comme le ribosome humain (*Homo sapiens*). Chez les plantes, ce nombre varie entre 75 et 92 protéines selon les espèces (Julia Bailey-Serres, 1999; Petibon et al., 2021).

Chaque sous-unité possède deux côtés : le côté solvant, exposé au cytoplasme, et l'interface pour les interactions entre la grande sous-unité et la petite sous-unité. Les domaines importants de la structure quaternaire de la grande sous-unité 60S sont, du côté du solvant : la protubérance centrale, la tige L1, la région associée à la GTPase, les tiges P, la boucle de la sarcine et de la ricine et le tunnel de sortie du peptide. A l'interface se trouvent le site aminoacyl, le site peptidyle, le site de sortie qui sont partagés avec la petite sous-unité 40S et le centre de peptidyl transférase. (Fig. 1.9) (Anger et al., 2013). D'autre part, la petite sous-unité est divisée en deux lobes par le tunnel d'ARNm formant la tête et le corps. La tête a une saillie appelée le bec en raison de sa ressemblance avec le bec d'un oiseau. Le corps est lui-même composée d'une plateforme, d'une épaule, d'un pied gauche et d'un pied droit. Ces deux régions sont reliées par la région du cou où se trouve le tunnel d'ARNm. (Anger et al., 2013; Rabl et al., 2011). L'ARNm entre au ribosome par la cavité située entre la tête et l'épaule et ressort par le tunnel formé par la tête et la plateforme, entourant ainsi le cou de la petite sous-unité 40S. La majorité des protéines ribosomales de la petite sous-unité se retrouvent sur sa face exposée au solvant alors que le centre de décodage est situé à l'interface (Fig. 1.9) (Behrmann et al., 2015). Les expansions ribonucléiques et les protéines ribosomales spécifiques des eucaryotes forment des couches externes autour du cœur de la grande sous-unité du ribosome, qui représentent une région du ribosome qui a été extrêmement conservée au cours de l'évolution (Anger et al., 2013; Melnikov et al., 2012). Ce cœur commun à tous les ribosomes comprend 34 protéines

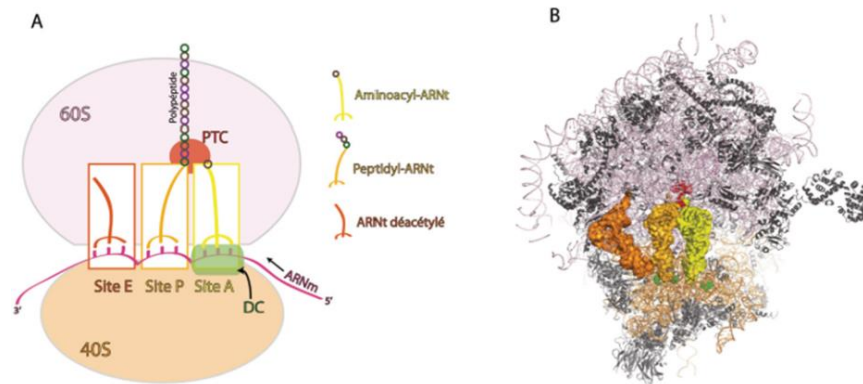
ribosomales (19 RPL et 15 RPS) et contient les principaux sites fonctionnels permettant le décodage de l'ARNm et la formation de la liaison peptidique, dont le centre de transfert de la liaison peptidique (CPT) et le tunnel de sortie dans lequel progressent les peptides naissants pour émerger du côté du solvant.

Le rôle des composants du ribosome, protéiques et nucléiques, est resté pendant longtemps une question débattue au sein d'une partie de la communauté scientifique. Vers la fin des années 1960, des efforts considérables ont été effectués pour isoler les PR et ARNr, reconstituer les activités enzymatiques des ribosomes et définir leurs sites fonctionnels. Cependant aucune activité enzymatique n'a été mise à jour sur les composants isolés, démontrant le rôle essentiel de la structure du ribosome dans son activité. Dès les années 1970, un certain nombre d'études ont suggéré que l'ARNr lui-même pouvait jouer un rôle fonctionnel dans la traduction, notamment dans l'activité peptidyl-transférase, mais cette idée est restée longtemps controversée (Batra et al., 1984). Grâce au développement de la cristallographie couplée à l'analyse par spectrométrie aux rayons X et la possibilité d'atteindre une haute résolution (échelle atomique), il a été possible enfin de décrire la structure moléculaire des ribosomes, permettant ainsi de répondre à plusieurs questions et d'analyser les relations structures-fonctions qui régissent l'activité des ribosomes (Cech, 2000). Une vision simplifiée du mécanisme de traduction montre l'importance de trois processus fondamentaux : la reconnaissance du codon de l'ARNm par l'anticodon de l'ARNt, la formation de la liaison peptidique et le mouvement des ARNt et de l'ARNm au sein du ribosome. Le ribosome possède trois sites de liaison des ARN de transfert (ARNt) : les sites A (aminoacyl-ARNt), P (peptidyl-ARNt) et E (exit) se situent tout près du CPT, du côté de l'interface de la sous-unité dans lequel se place l'ARNt déchargé prêt à quitter le ribosome (Fig. 1.10) (Melnikov et al., 2012). Les ARNt sont stabilisés dans le ribosome par de nombreux contacts avec les PR et les ARNr, assurant ainsi leur positionnement correct vis-à-vis de l'ARNm au niveau de la petite sous-unité et du centre de catalyse de la liaison peptidique dans la grande sous-unité. Chaque sous-unité a une fonction spécifique dans la traduction. La petite sous-unité 40S contient le centre de décodage de l'ARNm, permettant la reconnaissance codon (ARNm)/ anti-codon (ARNt). De même, la grande sous-unité 60S est le centre de la synthèse protéique contenant le centre peptidyl transférase qui permet la formation des liaisons peptidiques et la polymérisation de la chaîne

peptidique. Ensuite, la protéine naissante quitte le ribosome via un tunnel dans la grande sous-unité (Melnikov et al., 2012).



**Figure 1.10. La structure des sous-unités ribosomales chez les eucaryotes** (Khatter et al., 2015). Les sous-unités 60S et 40S sont toutes les deux représentées du côté solvant et de l'interface des sous-unités. Les principaux composants structurels de la grande sous-unité 60S sont la protubérance centrale (CP), les tiges P et L1, la boucle sarcine-ricine (SRL) et le tunnel de sortie. Pour la petite sous-unité 40S sont la tête (H), le bec (Be), plateforme (P), épaule (S), corps (Bo), pied gauche (LF) et pied droit (RF). Les sites A-, P- et E sont indiqués sur les deux sous-unités. L'ARNm est indiqué par une ligne pointillée.



**Figure 1.11. Organisation fonctionnelle des ribosomes** (Therizols, 2014).

- A. Représentation schématique des différents sites fonctionnels du ribosome. Le centre de décodage de l'ARNm (DC) est représenté par un rectangle vert et se situe à la base du site A. Les sites A, P et E où viennent se loger les ARNt sont indiqués par des rectangles de différentes couleurs. Le centre de transfert de la liaison peptidique (CPT) est indiqué par un ovale rouge. L'ARNm, qui passe entre les deux sous-unités du ribosome, est représenté en rose.
- B. Superposition de la structure du ribosome et des sites de liaison aux ARNt : sites A, P et E de *Thermus thermophilus*. Les couleurs sont respectées par rapport au schéma en A. Le CPT est indiqué en rouge et les nucléotides de l'ARNr 18S qui sont situés le long du passage de l'ARNm sont indiqués en vert.

### 1.6.2 Biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est conservée au cours de l'évolution et semble être indispensable à la croissance, à la prolifération et à l'homéostasie des cellules. L'assemblage des ribosomes eucaryotes est un processus complexe qui représente l'activité majeure de toute cellule en croissance. Pour une cellule en croissance, la biogenèse des ribosomes est un processus qui consomme énormément d'énergie puisqu'elle consomme environ 80% de la dépense énergétique totale de la cellule (Thomas, 2000). À titre d'exemple, une levure possède environ 200 000 ribosomes par cellule et un temps de doublement d'environ 100 min, ce qui implique donc qu'une quantité de 2 000 ribosomes par minute soit synthétisée par une cellule de levure en croissance (Warner, 1999). À

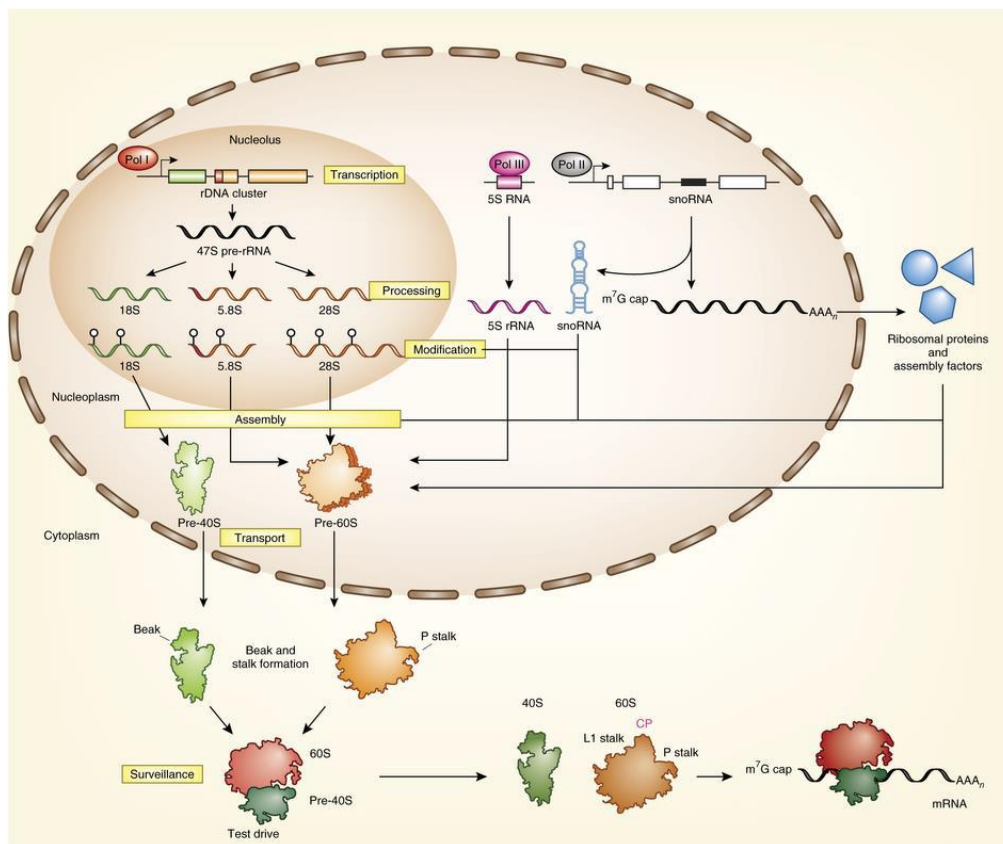
l'énorme dépense énergétique nécessaire pour produire les différents composants ribosomiaux s'ajoute la dépense énergétique pour assurer leur transport. En effet, pour une levure en croissance, dont le noyau possède environ 150 nucléopores, il y a une importation moyenne de 1000 protéines ribosomiales par minute par pore nucléaire et une exportation moyenne de 25 sous-unités ribosomiales par minute par pore nucléaire (Warner, 1999). Ce processus requiert l'intervention de plusieurs centaines de facteurs d'assemblages protéiques (AF) et la synthèse des 4 ARNr, des 80 protéines ribosomiales et de petits ARN nucléolaires (snoRNA) (Thomson et al., 2013).

La biogenèse des ribosomes est un processus multi-étape. Elle requiert la participation des trois ARN polymérases (« ARN pol »). L'ARN pol-I est responsable de la transcription de trois des quatre ARNr (28S, 18S ET 5,8S), l'ARN pol-II synthétise les ARNm des PR et l'ARN pol-III synthétise l'ARNr 5S. Chez la plante, la première étape est la transcription de l'ADN ribosomale (ADNr) via l'ARN pol-I dans le noyau cellulaire. L'ARN polymérase I (Pol I) transcrit les répétitions d'ADNr au niveau des nucléoles qui sont des structures observées au sein des noyaux cellulaires. Pol I y transcrit un pré-ARNr 45S chez les plantes, 47S chez les mammifères et 35S chez la levure, qui sera ensuite mûré et clivé par plusieurs facteurs ribonucléoprotéique (RNP) au sein du nucléole en ARNr 18S, 5,8S et 25S (ou 28S chez les mammifères) (Chédin et al., 2007; Ebersberger et al., 2014; Weis et al., 2015). Ce processus nécessite un grand nombre de facteurs de transcription généraux (Barba-Aliaga et al., 2021; Russell & Zomerdijk, 2005).

L'ARNr 5S est, quant à lui, synthétisé par l'ARN polymérase III (Pol III), qui est également responsable de la transcription des ARNt. Cette transcription se produit dans le noyau mais hors du nucléole (Ciganda & Williams, 2011). Les ARNm codant pour les protéines ribosomiales sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II (Pol II). Elles sont ensuite exportées dans le cytosol, où elles sont traduites par les ribosomes présents dans le cytoplasme. Les PR vont ensuite retourner dans le noyau afin de se fixer aux ARNr en cours de synthèse et d'assurer ainsi l'assemblage correct des petites et grandes sous-unités ribosomiales (Sáez-Vásquez & Delseny, 2019; Thomson et al., 2013; Weis et al., 2015). Les PR viennent se fixer aux pré-ARNr tout au long de leur maturation (Freed et al., 2010). Les ARNr 18S s'assemblent avec les protéines ribosomiales de la petite sous-unité (RPS) tandis que les ARNr 5S, 5,8S et 25S/28S s'assemblent avec les protéines ribosomiales de

la grande sous-unité (RPL). De tels assemblages vont former dans le noyau respectivement, des sous-unités ribosomales immatures, pré-40S et pré-60S, qui vont à leur tour, sortir du noyau sous cette forme immature. La maturation finale des petites et grandes sous-unités aura ensuite lieu dans le cytoplasme (Fig. 1.11) (Freed et al., 2010; Sáez-Vásquez & Delseny, 2019).

Dans la cellule des mammifères, des levures et des plantes, la petite sous-unité de ribosome 40S contient 30 à 33 RPS alors que la grande sous-unité 60S contient de 40 à 48 RPL (Armache et al., 2010; Ben-Shem et al., 2011). Étant donnée l'immense quantité d'énergie consommée par la biogenèse des ribosomes, cette dernière est finement régulée à différents niveaux au sein des cellules. Cette régulation se produit principalement grâce à une régulation de la transcription des ADNr (Moir & Willis, 2013)) et/ou grâce à une régulation de la traduction des ARNm 5'TOP des protéines ribosomales (Tang et al., 2001).

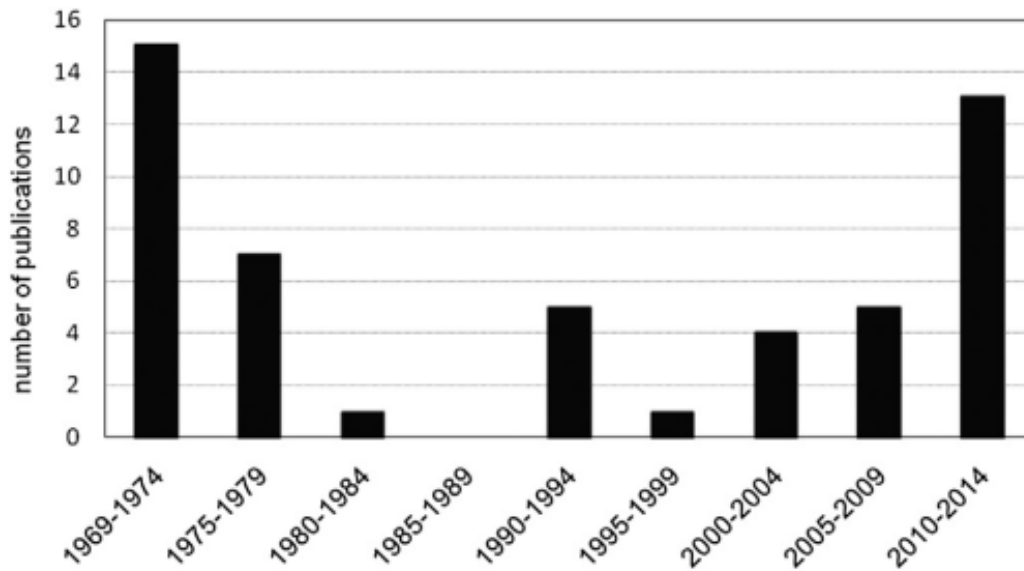


**Figure 1.12 : La biogenèse des ribosomes.** La biogenèse des ribosomes se décompose en six principales étapes (encadrés jaunes) : (i) la transcription des composants ribosomales

(ARNr, ARNm codants pour les RP et les AF, snoRNA) ; (ii) épissage des pré-ARNr ; (iii) modifications des pré-ARN, des RP et des AF ; (iv) assemblage ; (v) transport (import nucléaire des RP et des AF, export vers le cytoplasme des pré-ribosomes) et (vi) contrôle qualité et surveillance (Lafontaine, 2015).

### 1.6.3 Hétérogénéité des ribosomes

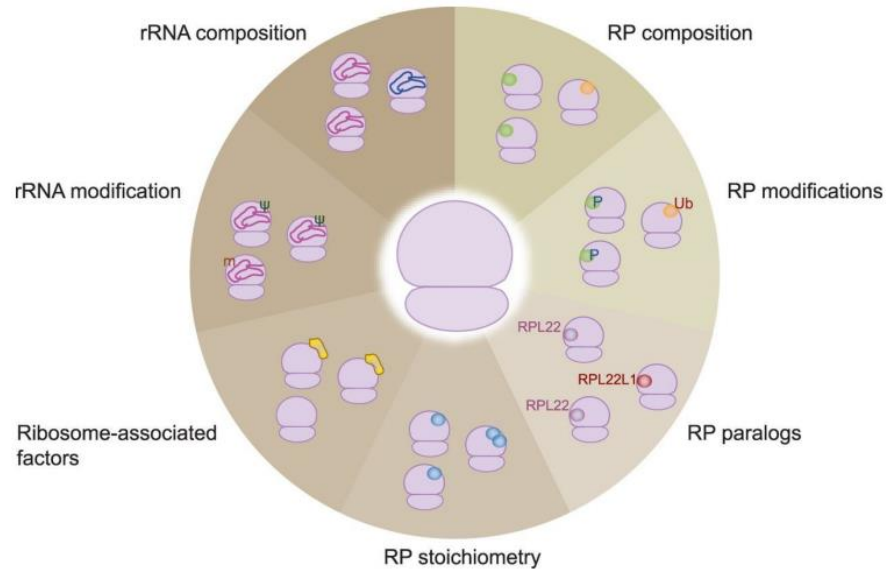
La composition du ribosome est bien conservée chez toutes les espèces de la vie, deux sous-unités ribosomales, constituées d'ARNr et des protéines, se rejoignent sur un ARNm pour décoder les codons nucléotidiques en protéines fonctionnelles. La conservation remarquable des ARNr et des PR nous a amené à considérer les ribosomes comme des structures statiques, immuables et une machine moléculaire invariable avec une structure, une composition et une fonction identique. Bien que les principaux sites catalytiques du ribosome soient universellement conservés au niveau de leur composition et de leur structure, cependant, après la découverte de Palade en 1958, d'une petite différence dans la taille et la forme des ribosomes, l'hypothèse de l'hétérogénéité des ribosomes a émergé. L'hétérogénéité des ribosomes a déjà été observée dans les années 1970, où il a été démontré que les ribosomes purifiés à partir des bactéries cultivées dans des différentes conditions, sont dépourvus de certains PR sans perdre leurs fonctions de traduction (Deusser, 1972). Pourtant, ces observations ont été négligées longtemps et le terme « Hétérogénéité des ribosomes » n'a pas été établi dans la communauté scientifique (Fig. 1.12). Au fil des années, de nombreuses études chez les eucaryotes ont montré que les ribosomes peuvent varier dans leur composition en protéines et ARNr entre les différents types cellulaires et selon leurs états de développement. Ces observations ont abouti à la postulation de « l'hypothèse du filtre ribosomale » par Mauro et Edelman en 2002 (Mauro & Edelman, 2002). Des exemples et des preuves de l'hétérogénéité des ribosomes chez les plantes ont été largement discutés dans plusieurs revues (Filipovska & Rackham, 2013; Naomi R. Genuth & Maria Barna, 2018; Gilbert, 2011; Sauert et al., 2015; Shi & Barna, 2015; Xue & Barna, 2012; Xue et al., 2015).



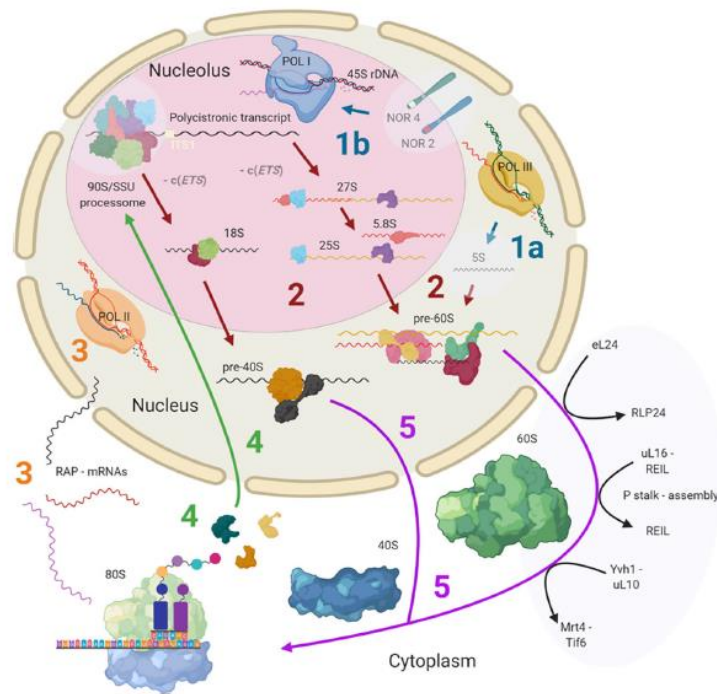
**Figure 1.13 : Nombre de publications scientifiques sur « l’hétérogénéité des ribosomes » depuis 1969.** L’hétérogénéité des ribosomes a été vu depuis plus que de 40 ans (Sauert et al., 2015)

L’hétérogénéité dans ce contexte signifie que les ribosomes varient dans la composition de leur ARNr, des protéines ribosomales (PR), des modifications post-transcriptionnelles/traductionnelles (PTM), ainsi que des protéines non ribosomales liées (Fig. 1.13). Les principales étapes au cours desquelles l’hétérogénéité des ribosomes peut être introduite sont : 1) la transcription des ADNr 45S et 5S, 2) le traitement de pré-ARNr, 3) la transcription des protéines ribosomales (PR) et des protéines associées au ribosome (RAP) telles que les facteurs de la biogenèse des ribosome (Palm et al., 2019; Weis et al., 2015) ou des facteurs de traduction (Browning & Bailey-Serres, 2015), 4) la traduction des PR et des RAP et leur réallocation au noyau, et enfin, 5) l’assemblage des PR et des RAP aux sous-unités des ribosomes au cours de leur maturation (Fig. 1.14). Ces étapes clés durant la biogenèse peuvent servir des points de contrôle pour la génération des différentes populations des ribosomes.





**Figure 1.14 : Sources de différences structurales chez les ribosomes eucaryotes (Guo, 2018).**



**Figure 1.15: Schéma simplifié de la biogenèse des ribosomes cytosoliques des plantes mettant en évidence les étapes potentielles auxquelles l'hétérogénéité structurale peut se produire et se contrôler. (1a, b) L'hétérogénéité peut provenir des loci des ADN**

codants pour les différentes espèces d'ARNr. (2) L'hétérogénéité peut résulter du recrutement des différents ARNr et des protéines associées aux ribosomes (RAP), y compris les paralogues des PR. (3) L'hétérogénéité peut résulter des modifications des disponibilités des transcrits pour la traduction ultérieure ou la présence des différentes variantes d'épissage. (4) L'hétérogénéité peut être causé par la présence des différents paralogues des RAP et des PR au moment de l'assemblage des ribosomes dans le noyau. (5) L'hétérogénéité peut provenir des dernières étapes de la biogenèse des ribosomes médiés par les protéines ribosomales et des protéines associées au ribosome (Martinez-Seidel et al., 2020).

Beaucoup d'auteurs ont proposé que la composition du ribosome fonctionne comme des facteurs de détermination de la traduction. Ils ont pu montrer que le ribosome agit comme un filtre qui sélectionne des ARNm spécifiques et module leur traduction dépendamment des séquences de PR et d'ARNr représentés dans le ribosome respectif (Ferretti & Karbstein, 2019; Filipek et al., 2018; N. R. Genuth & M. Barna, 2018; Mauro & Edelman, 2002; Mauro & Edelman, 2007).

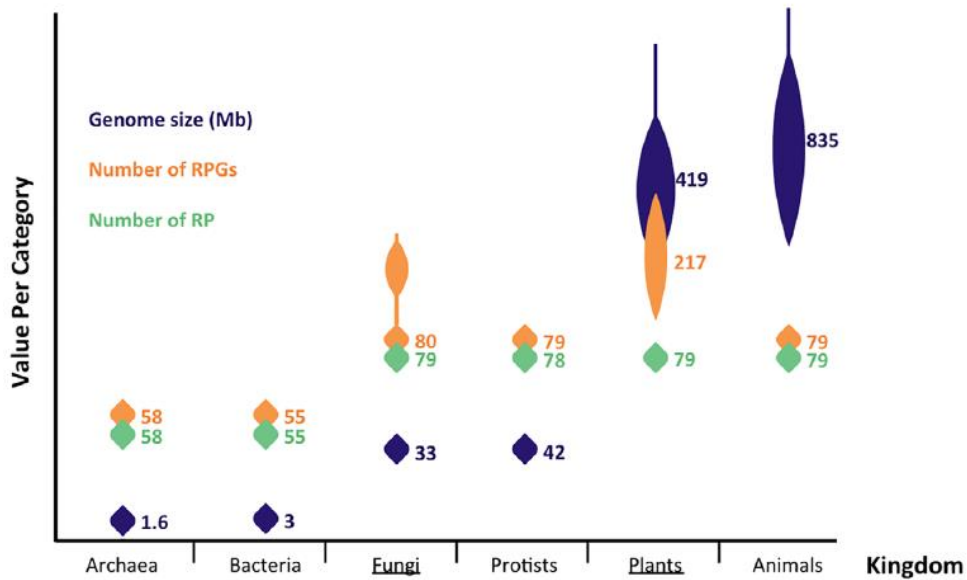
Quelques années plus tard, le laboratoire du Silver a rapporté que les différents paralogues des PR sont fonctionnellement distincts et contribuent à la sélectivité traductionnelle chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Komili et al., 2007), ce qui a conduit à l'hypothèse du « code du ribosome » analogue au « code d'histone » qui affecte la transcription. Par la suite, cette théorie qui va dans le sens de l'hypothèse du filtre ribosomique, a été étendue à la formation des ribosomes spécialisées par l'incorporation des différentes paralogues ou des modifications des ARNr, ou par des modifications post-traductionnelles des PR, qui permettent une traduction régulée des ARNm spécifiques. Dans les sections suivantes, nous allons discuter de l'importance de l'hétérogénéité des ribosomes au niveau des protéines ribosomales.

#### 1.6.4 Les protéines ribosomales

Les protéines ribosomales sont les éléments fondamentaux du ribosome, elles constituent environ 30 à 50% de la masse du ribosome. Les PR ont une durée de vie

relativement longue une fois assemblées avec les ribosomes (les complexes ribosomiaux d'*Arabidopsis* ont un temps de demi-vie moyenne de 3 à 4 jours (K. J. Salih et al., 2020)). Elles consistent généralement en des petites protéines de liaison à l'ARN, dont la masse varie de ~4 à ~30 kDa chez *E. coli* (Arnold & Reilly, 1999) et de ~3.4 à 47 kDa chez le rat (Wool et al., 1995) et chez *Arabidopsis* (Barakat et al., 2001; Chang et al., 2005b). Avec quelques exceptions, la majorité des PR sont basiques ( $pI > 8.0$ ), riche en lysine et arginine, et contiennent une petite proportion de résidus d'aspartate et de glutamate (Barakat et al., 2001; Wool et al., 1995). Cependant, il existe quelques protéines ribosomales acides et conservées ( $pI < 5.0$ ). Les eucaryotes ont deux familles des gènes des protéines ribosomales qui codent pour des petites phosphoprotéines acides, qui se dimérisent et se lient à la plus grande famille RPP0 pour former une structure de tige latérale flexible sur la grande sous-unité ribosomale, ce qui améliore ainsi l'étape de translocation de la synthèse protéique. Les plantes supérieures ont une famille RPP1 et RPP2, ainsi qu'une troisième famille des PR acides appelée RPP3 (Chang et al., 2005a; Szick et al., 1998).

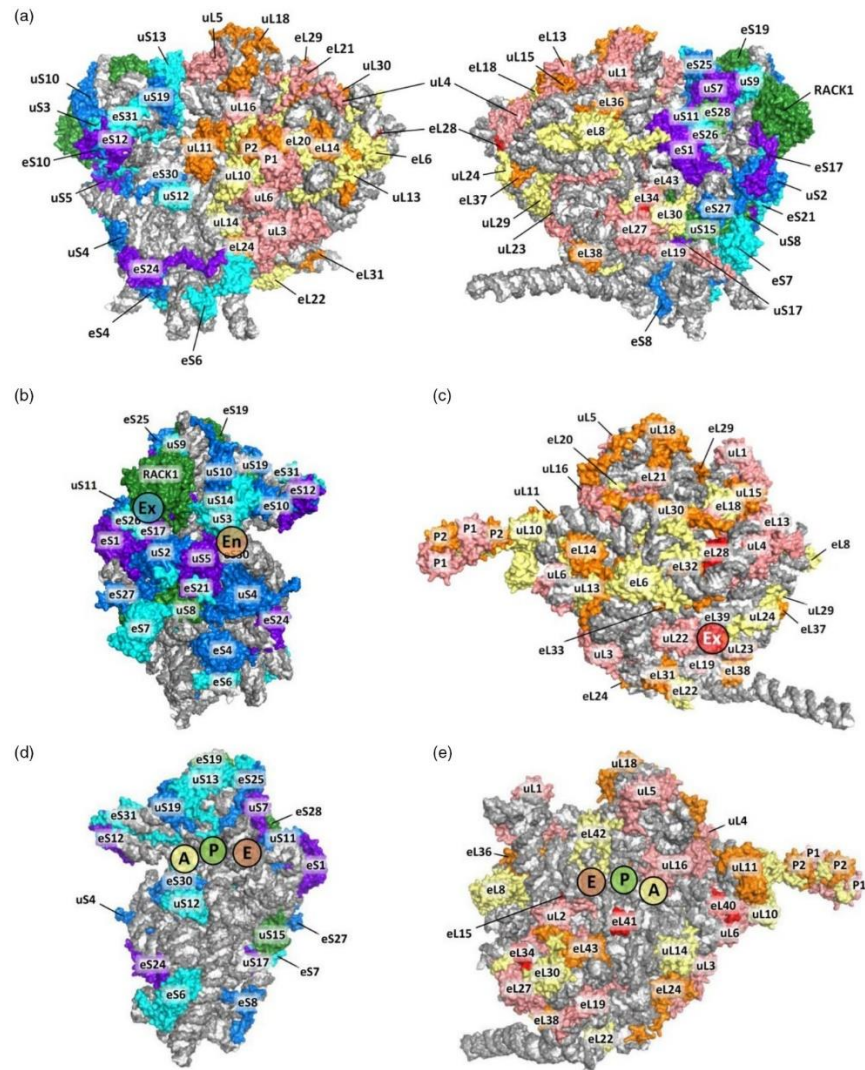
Bien que des mécanismes basés sur l'ARN hautement conservé sont au cœur de la fonction des ribosomes, plusieurs protéines ribosomales présentent également un degré élevé de conservation parmi les espèces et dans les principaux domaines de la vie : les bactéries, les archéobactéries et les eucaryotes (Lecompte et al., 2002; Mears et al., 2002). Identifiées par des analyses de gel bidimensionnelle (2D-PAGE) (Sikorski et al., 1983) ou par une comparaison des séquences (Barakat et al., 2001), le nombre des PR dans les ribosomes des procaryotes et des eucaryotes varie selon les espèces, il augmente généralement de la bactérie aux eucaryotes. Une comparaison des génomes complets dans les 3 domaines de la vie, a permis d'identifier 55 différentes familles des PR chez les bactéries, 58 types des PR chez les archéobactéries et 80 familles des PR chez les eucaryotes (Fig. 1.15) (Lecompte et al., 2002) et entre. 75 à 92 protéines ribosomales selon les espèces de plantes (J. Bailey-Serres, 1999).



**Figure 1.16: Le nombre des gènes des protéines ribosomales dans les principaux règnes de la vie.** Ce nombre augmente dans les génomes dupliqués indépendamment du nombre des protéines et de la taille du génome. Les tailles des génomes en mégabases (Mb) sont illustrées en se basant sur les données de NCBI (Petibon et al., 2021). (RPG : Ribosomal Proteine Gene, RP : Ribosomal Protein).

En général, chez les eucaryotes, les gènes des PR sont présents sous forme de plusieurs copies non identiques incluant des pseudogènes. Une recherche de l'ensemble du génome d'*Arabidopsis* avec des séquences connues des PR du rat a identifié 81 protéines ribosomales cytoplasmiques potentielles, 33 familles de protéines dans la petite sous-unité 40S et 48 familles dans la grande sous-unité 60S (Barakat et al., 2001; Carroll, 2013). Ces 81 protéines sont codées par un total de 252 gènes ; ainsi chaque protéine ribosomale est codée par deux à sept gènes paralogues, avec une moyenne de trois, et la majorité des membres de chaque famille semble être exprimée en se basant sur l'analyse des étiquettes des séquences exprimées (ESTs) (Barakat et al., 2001). Plusieurs études de spectrométrie de masse ont permis d'explorer le protéome des ribosomes d'*Arabidopsis* (Carroll, 2013; Chang et al., 2005a; Giavalisco et al., 2005) et de détecter des différences dans la composition des ribosomes au sein de la cellule.

Les récentes structures des ribosomes des eucaryotes, dont celui du blé *Triticum aestivum* (Armache et al., 2010), obtenues par la cristallographie couplée à la spectrométrie aux rayons X et la cryo-microscopie électronique (cryo-ME), ont amélioré notre compréhension de la structure des ribosomes (Klinge et al., 2012; Wilson & Cate, 2012). En conséquence, la localisation des 74 protéines parmi les 81 protéines ribosomales sont maintenant connues avec précision (Fig. 1.16). Les protéines ribosomales sont principalement situées à la surface des ribosomes (Klinge et al., 2012). Il a été suggéré qu'elles servent de station d'accueil pour les protéines associées aux ribosomes qui aident à la régulation de la traduction (Xue et al., 2015). De plus, des modifications mineures de la surface des ribosomes causées par l'hétérogénéité des séquences des PR pourraient affecter le répertoire des protéines associées aux ribosomes et qui sont liées aux surfaces des ribosomes.



**Figure 1.17: Localisation des protéines ribosomales dans le ribosome 80S du blé *Triticum aestivum* visualisé par PyMOL (Lan et al., 2022).** (a) Toutes les protéines situées à la surface sont représentées sur le ribosome. Certaines protéines (uS14, eL32, eL33, uL2, eL15, uL22, eL40, eL41, eL42, eL39) sont partiellement ou totalement enfouies et sont présentées en (d) et (e). Les protéines en saumon, jaune pâle, orange et rouge appartiennent à la grande sous-unité, tandis que les protéines de cyan, marine, violet et forêt appartiennent à la petite sous-unité. L'ARNr est représenté en gris. (b) et (c) les vues du côté solvant (d) et (e) et entre les sous-unités des ribosomes 40S (gauche) et 60S (droite). eL39 est entièrement enterré mais il est représenté en surface en (C). Les emplacements approximatifs du tunnel d'entrée et de sortie de l'ARNm et du tunnel de sortie du polypeptide sont indiqués respectivement dans les cercles orange, bleu et rouge en (b) et

(c). Les emplacements approximatifs des sites A-, P- et E- de liaison aux ARNt sont indiqués dans les cercles jaunes, verts et bruns, respectivement, en (d) et (e).

Les premières preuves que les cellules modifient la composition des protéines ribosomales proviennent de l'analyse de l'expression des PR dans différents tissus, selon les différents stades de développement ou en réponse au stress. En accord avec cette hypothèse, des changements dans l'expression des protéines ribosomales au cours de la différenciation cellulaire ont été documentés chez la levure bourgeonnante durant la méiose (Eisenberg et al., 2018), dans les cellules d'*Arabidopsis* au cours de l'embryogenèse (Weijers et al., 2001), et dans les cellules des mammifères au cours de la différenciation tissulaire (N. R. Genuth & M. Barna, 2018).

Dans ce contexte, des études protéomiques et transcriptomiques chez la plante, ont récemment permis de mettre en évidence que la composition des ribosomes en protéines ribosomales peut être modifiée selon les différents stades de développement, les différents types des cellules ou les différentes conditions telles que les agents pathogènes, les rayonnements UV, et le manque de sucrose, dans le but d'optimiser la synthèse des protéines nécessaires pour répondre aux besoins des cellules (Carroll et al., 2008; Falcone Ferreyra et al., 2010; Hummel et al., 2012; Szick-Miranda & Bailey-Serres, 2001; Whittle & Krochko, 2009). L'accumulation différentielle dans les ribosomes entre les différentes familles des gènes des protéines ribosomales ainsi qu'au sein de la même famille des gènes spécifiques suggèrent l'existence d'une hétérogénéité des ribosomes. Cette hétérogénéité peut provenir des nombreuses sources, soit l'absence des protéines ribosomales spécifiques de la structure canonique du ribosome, l'échange des paralogues des PR, les modifications post-traductionnelles des PR (telles que la phosphorylation) et éventuellement des variations supplémentaires des protéines associées aux ribosomes (Browning & Bailey-Serres, 2015). De ce fait, Hummel et al. (2012) ont rapporté que la composition du ribosome n'est pas la même dans des feuilles des plantes d'*Arabidopsis* de 5 jours récoltées et incubées pendant 24h en présence ou en absence d'une solution de sucrose à 6%. Parmi les principales familles touchées, on peut citer les familles RPS7, RPS3a, RPL8, RPL19 ainsi que la famille de RACK1 (Hummel et al., 2012). De plus, il a été démontré que chez *Arabidopsis*, la composition des PR intégrées dans le ribosome change en fonction de

l'apport en phosphate ou en fer. Dans le cas du fer, il a été démontré que la composition en PR des ribosomes peut changer entre les cellules issues des feuilles et celles venant des racines (Rodriguez-Celma et al., 2013; J. Wang et al., 2013). À cela, on peut également ajouter le fait que les PR peuvent subir des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation ou l'acétylation. Eskelin et al. (2019) ont également rapporté un changement dans la composition des différents paralogues des protéines ribosomales et dans l'état de phosphorylation des certaines protéines ribosomales (RPS6, RPP1, RPP2, RPL18, RPL27a) entre les ribosomes des plantes de *Nicotiana benthamiana* saines et infectées par le virus PVA (*Potato virus A*) (Eskelin et al., 2019). Ainsi, Turkina et al. (2011) ont étudié les différences entre les ribosomes diurnes et les ribosomes nocturnes d'*Arabidopsis* en comparant l'état de phosphorylation des protéines ribosomales dans un ribosome prélevé deux heures avant la fin de la nuit ou quatre heures après le début du jour. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une augmentation de l'état de phosphorylation de la protéine RPS6, des protéines P1 et de la protéine RPL29-1 entre le jour et la nuit.

De même, ces changements vont entraîner des modifications au niveau structural des PR et influencer sur leur fonction et ou leur association aux autres PR et/ou ARNr. Cela va aussi entraîner un changement au niveau de la traduction, où certains ARNm sont préférentiellement traduits en fonction de la composition en protéines ribosomales (Naomi R. Genuth & Maria Barna, 2018; N. R. Genuth & M. Barna, 2018; Gilbert, 2011; Guo, 2018; Shi et al., 2017). Des études antérieures, notamment certaines issues de l'équipe de Maria Barna suggéraient que les changements dans la composition des protéines ribosomales dans les ribosomes pouvaient avoir un impact sur le contrôle et la fidélité de la traduction des protéines. Leur hypothèse stipule que les ribosomes « spécialisés » possédant des activités fonctionnelles « uniques » pourraient moduler l'expression de gènes, ou réguler l'homéostasie des cellules durant le développement et les conditions du stress (Kondrashov et al., 2011).

### 1.6.5 Régulation des protéines ribosomales

La régulation de l'expression génique est étudiée depuis plusieurs années, cependant, l'étude des mécanismes de régulation des protéines ribosomales est assez récente.



L'expression des gènes des PR est régulée au niveau de la transcription, de la maturation de l'ARNm, de la traduction et de la stabilité de l'ARNm ou de la protéine (McIntosh & Bonham-Smith, 2006). La plupart des recherches sur les protéines ribosomales chez la plante, ont montré que différents membres des familles de protéines ribosomales sont exprimés de manière différentielle en réponse à une variété des facteurs, y compris les stades du développement, les différents types des tissus, et les différentes conditions du stress, suggérant la présence d'un certain niveau de régulation transcriptionnelle (Carroll et al., 2008). Pour certaines protéines ribosomales, la variation de leurs niveaux d'ARNm en réponse aux stimuli externes a déjà été rapportée chez plusieurs espèces végétales (Casati & Walbot, 2003; Hummel et al., 2012; Moin et al., 2016; Solano-De la Cruz et al., 2019). Chez *Arabidopsis*, les transcrits des paralogues des protéines ribosomales sont régulés en réponse aux différents apports environnementaux tels que le carbone, le phosphate et les métaux (Hummel et al., 2012; Jinyan Wang et al., 2013). De plus, Casati et Walbot (2003) ont démontré que la transcription de plusieurs gènes des protéines ribosomales augmente en réponse aux rayonnements UV-B chez le maïs (Casati & Walbot, 2003). Ainsi, Moin et al. (2016) et Saha et al. (2017) ont montré une expression différentielle de certaines protéines ribosomales en réponse au stress biotiques et abiotiques chez le riz (Moin et al., 2016; Saha et al., 2017). Et finalement, Solano de la Cruz et al. (2019) ont décrit un changement dans l'expression de certaines protéines ribosomales en réponse à l'infection avec l'agent *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* chez la plante *Vanilla planifolia* Jacks. (Solano de la Cruz et al., 2019).

Comme la plupart des gènes, les promoteurs des gènes des protéines ribosomales ont des éléments nécessaires pour le recrutement de l'ARN pol II et des éléments régulateurs contenant des motifs requis pour le contrôle spécifique de l'expression des gènes.

Plusieurs études sur les promoteurs des différents gènes codant pour les protéines ribosomales, ont été effectuées afin de vérifier si des motifs spécifiques étaient présents. La plupart des gènes des PR ne possède la séquence conservée de type TATA qui est considérée comme le motif central de la région promotrice qui lie le facteur de transcription générale TBP (TATA-binding protein). Chez *S. cerevisiae*, peu de RPG possèdent des boîtes TATA. Chez l'humain, environ 35 % des RPG ont une séquence de type TATA et 25 % de plus ont un motif riche en A/T (Perry, 2005). Cependant, il n'est pas clair si les

séquences de type TATA dans ces gènes sont liées par le TBP ou d'autres facteurs plus spécialisés ou s'il s'agit simplement de motifs résiduels non fonctionnels. De manière cohérente, l'analyse informatique de plusieurs RPG de mammifères et de deux amphibiens n'ont trouvé aucune boîte TATA canonique en amont du site d'initiation de la transcription (TSS), mais à la place, ils ont identifié plusieurs séquences de type TATA ou un motif riche en A/T susceptibles de recruter du TBP au moins dans des circonstances particulières (Bosio et al., 2011; McIntosh & Bonham-Smith, 2006; Perry, 2007). D'ailleurs, d'autres recherches sur les gènes des PR se sont intéressées à comprendre comment la transcription de ces gènes est régulée en réponse au stress. Des éléments de réponse au stress et sensibles au signal ont été détectés dans les promoteurs de certains gènes des protéines ribosomales. Parmi ceux-ci, on cite les éléments de réponse aux stress abiotiques : les HSE (Heat Stress Elements), les LTR (Low-Temperature Response) et les MBS (Myb Binding Site), les éléments de réponse aux hormones (HRE) : les ABRE (Abscisic acid responsive element), les motifs TGACG et CGTCA en réponse au MeJa, les TCA-motif en réponse à l'acide salicylique, les GARE (Gibberellic acid responsive element), et les motifs TGA- AuxR (réponse à l'auxine) (Moin et al., 2016; Saha et al., 2017).

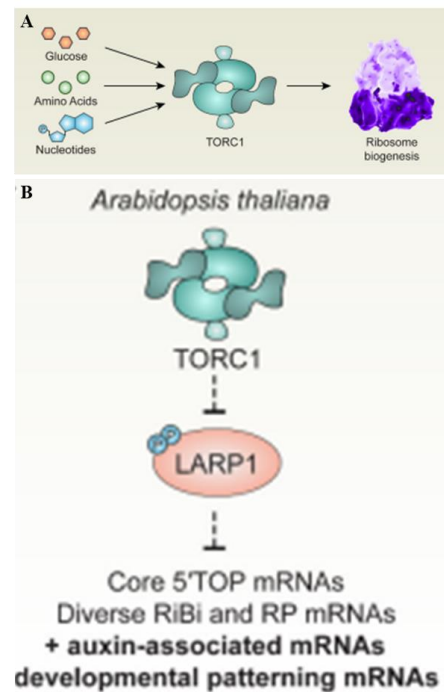
Dans certaines conditions de stress, les niveaux des transcrits de certaines protéines ribosomales n'ont pas été affectés, cependant, leur efficacité de traduction a été modifiée. Les gènes des protéines ribosomales sont parmi les gènes les plus efficacement traduits dans tous les organismes vivants (Warner et al.). Cependant, comme tous les gènes, la traduction des gènes des PR répond aux signaux généraux dues aux changements des conditions de croissance ou de l'état cellulaire. Des variations de l'efficacité de la traduction entre ces gènes commencent à être rapportées dans la littérature. En général, la régulation de la traduction des gènes de PR peut être classée en deux types; la première étant la régulation globale de la traduction et la seconde est la régulation spécialisée et spécifique aux gènes. La régulation globale se produit généralement sous la forme d'une répression générale de la traduction des ARNm codant pour les PR avec d'autres gènes en réponse aux stimuli. Cette diminution de la traduction semble être une stratégie logique pour préparer la cellule à l'effet général de ces stimuli sur la traduction (Gingras et al., 2004). D'autre part, la régulation spécifique des gènes des PR prend la forme d'un

mécanisme de régulation qui fait varier la réponse de certains PR au stress (Ghulam et al., 2020)

Dans ce contexte, une diminution d'accumulation des ARNm de certaines protéines ribosomales dans le complexe de polysomes a été observée en réponse à un certain nombre de stress environnementaux (Branco-Price et al., 2008; Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002; McIntosh & Bonham-Smith, 2006; Nicola et al., 2006; Tiruneh et al., 2013; Jinyan Wang et al., 2013). À l'inverse, une régulation positive de la traduction d'une grande majorité des ARNm des protéines ribosomales d'*Arabidopsis* a été démontrée dans plusieurs études. Par exemple, il a été démontré que l'hypoxie peut modifier l'accumulation de certains ARNm des PR dans les polysomes (Branco-Price et al., 2008; Juntawong & Bailey-Serres, 2012). Dans des conditions de carence de sucrose, les ARNm de certains PR sont retirés des polysomes et, l'accumulation d'autres ARNm des protéines ribosomales augmente dans les polysomes (Gamm et al., 2014; Hummel et al., 2012; Pal et al., 2013).

Contrairement aux gènes des protéines ribosomales des mammifères, il existe peu de données sur la régulation traductionnelle des gènes des protéines ribosomales chez la plante. Les ARNm des protéines ribosomales possèdent des séquences caractéristiques, notamment un court 5'UTR riche en GC et un court 3'UTR, qui peuvent jouer un rôle dans la régulation de leur traduction (Branco-Price et al., 2005; Juntawong & Bailey-Serres, 2012). De plus, les transcrits codant pour des protéines ribosomales d'*Arabidopsis* contiennent des séquences polypyrimidine (TOP sequences oligopyrimidine tract) immédiatement après la coiffe. 5'TOP qui commence par un nucléotide C au niveau de 5' coiffé suivi d'une série d'environ 4 à 15 pyrimidines, souvent suivie d'une région riche en G (Scarpin et al., 2020). Ce motif permet aux cellules de moduler rapidement l'expression des protéines impliquées dans la production des ribosomes et la synthèse des protéines spécifiques en réponse aux changements de l'homéostasie cellulaire. Le motif 5'TOP est crucial pour la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm des protéines ribosomales médiée par la voie TOR (Target Of Rapamycin). Chez la plante, TORC1 coordonne le métabolisme avec la biogenèse des ribosomes. Lorsque le glucose (ou ATP), les acides aminés et les nucléotides sont suffisamment disponibles, TOR favorise la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux, y compris les contrôles transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels (Fig. 1.17 A). Il a été démontré que la voie TOR est

contrôlée chez la plante, par un certain nombre des signaux, tels que le glucose (Xiong et al., 2013), la lumière (Chen et al., 2018), et les phytohormones dont l'auxine les brassinostéroïdes (Zhang et al., 2016) et l'acide abscissique (Wang et al., 2018). Plusieurs substrats ont été découverts pour médier la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP-TOR (Berman et al., 2021; Philippe et al., 2020), y compris les kinases S6 (S6K), les protéines de liaison eIF4E (4E-BP), les facteurs d'initiation eIF4G et la protéine LARP1 (La-related protein 1). Ces protéines, qui s'associent différemment à la coiffe en 5' en réponse à l'activité TOR, ont des rôles doubles et opposés dans le contrôle de la traduction des ARNm 5'TOP dépendamment de son état de phosphorylation (Hong et al., 2017), ou n'ont aucun rôle dans la régulation de la traduction, mais stabilisent plutôt ces ARNm (Gentilella et al., 2017) (Fig. 1.17 B).



**Figure 1.18: La signalisation TOR-5'TOP régule la biogenèse des ribosomes dans les conditions du stress.** La voie de signalisation TOR-5'TOP a un rôle précoce dans la régulation de la biogenèse des ribosomes chez la plante, par la régulation de la traduction des ARNm des facteurs associés à la biogenèse des ribosomes (RiBi), des protéines ribosomales eux-mêmes et des protéines de la voie de signalisation hormonal et impliquées dans le développement. Adapté de (Scarpin et al., 2020).

Et finalement, des protéines de liaison à l'ARN peuvent également être un facteur dans la régulation de la traduction. La traduction d'un grand nombre des transcrits des protéines ribosomales a été augmentée à des températures basses (4°C) par la liaison des protéines Cold Shock Protein 1(CSP1), qui possède une activité hélicase (Juntawong et al., 2013).

#### 1.6.6 Les fonctions extraribosomales des protéines ribosomales

Les protéines ribosomales ont longtemps été considérées comme des protéines structurales du ribosome, qui fonctionnent exclusivement pour maintenir l'intégrité du ribosome. Les protéines ribosomales jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et le décodage de l'ARNm, la reconnaissance de l'ARNt, l'assemblage, le transport et la stabilisation des sous-unités (Ban et al., 2000; Klein et al., 2004). Cependant, au cours des dernières années, il a été démontré qu'un certain nombre des protéines ribosomales ont la capacité de se lier à d'autres types d'ARN, d'ADN et à des protéines non ribosomales. Donc, en plus de ces rôles canoniques, des preuves émergentes ont démontré que les protéines ribosomales peuvent avoir des fonctions extraribosomales dans la transcription, le cycle cellulaire, l'épissage de l'ARNm, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la tumorigénèse (Molavi et al., 2019; Warner & McIntosh, 2009; Zhao et al., 2019). Dans ce contexte, Warner et McIntosh décrivent trois types des fonctions extraribosomales : l'autorégulation de la synthèse des protéines ribosomales, la surveillance de la biogenèse des ribosomes et les fonctions complètement extraribosomales (Warner & McIntosh, 2009). Au cours des dernières décennies, de nombreuses fonctions extraribosomales de plusieurs protéines ribosomales ont été démontrées chez les plantes, notamment la biogenèse des microARN (Li et al., 2017), les défenses contre les virus (Carvalho et al., 2008; Yang et al., 2009) et l'immunité des plantes (Cheng et al., 2015; Moin et al., 2016; Nagaraj et al., 2015), qui ont fasciné les biologistes.

Les fonctions universelles des protéines ribosomales cytoplasmiques dépendantes des ribosomes ainsi que leurs rôles potentiels indépendants des ribosomes (fonctions extraribosomales) au cours des divers processus cellulaires chez les plantes ont été résumées dans le tableau 1.1. Un exemple bien étudié d'une fonction extraribosomale est celui de la famille RPL24 (L24) d'*Arabidopsis*, qui facilite l'association entre les grandes et les petites sous-unités ribosomales chez les archéobactéries et des levures (Ban et al.,

2000; Kisly et al., 2019). Chez *Arabidopsis thaliana*, RPL24B (codé par AT3G53020) agit en dehors du ribosome en se liant aux transcrits primaires des microARN pour favoriser leur interaction avec le complexe de traitement (Fig. 1.18, tableau 1.1) (Li et al., 2017). AtRPL24B a ainsi développé des fonctions extra-ribosomales au-delà de ses fonctions ancestrales, fournissant une raison potentielle de sa rétention et de sa néofonctionnalisation.

D'autres exemples des protéines ribosomales ayant des fonctions extraribosomales ont été rapportés dans plusieurs études. Il existe peu de protéines ribosomales ayant des fonctions complètement extraribosomales, mais plusieurs d'entre elles ont des fonctions extraribosomales en lien avec le ribosome. Parmi ceux-ci, on cite des protéines ribosomales qui ont un rôle dans la biogenèse des ribosomes : chez *Arabidopsis*, RPS6 joue un rôle négatif dans la régulation de la transcription de l'ADNr et certains transcrits des PR (Kim et al., 2014), RPS27a et RPL40, facilite le traitement du pré-ARNr et l'assemblage du ribosome tout en s'associant à l'ubiquitine (Finley et al., 1989) (Fig. 1.18, Tableau 1.1).

D'autres protéines ribosomales ont été impliquées dans la croissance : AtRPS15Ae joue un rôle dans la régulation de la croissance (Szick-Miranda et al., 2010). De plus, il a été proposé que RPL18aB était impliqué dans la reproduction sexuée et jouait un rôle essentiel dans le développement des gamétophytes mâles et la formation des embryons (Yan et al., 2016). Ainsi, RPL14B s'est avéré essentiel pour la fertilisation chez *Arabidopsis* (Luo et al., 2020) (Fig. 1.18, Tableau 1.1).

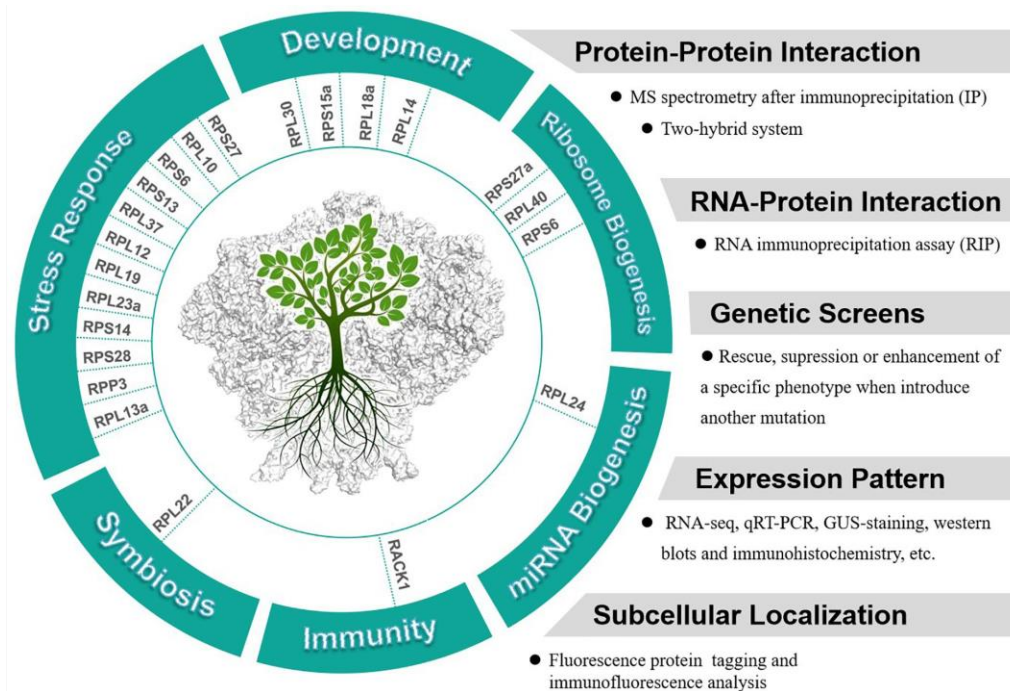
En plus des fonctions extraribosomales mentionnées précédemment, d'autres protéines ribosomales ont été citées pour jouer un rôle dans l'immunité chez la plante ou dans les réponses aux conditions du stress. Par exemple, il a été prouvé que RPS27, RPS29, et RPL10 contiennent le motif de doigt de zinc conservé qui pourrait assumer une grande variété des rôles cellulaires en jouant les rôles des protéines structurelles d'échafaudages et favorisant des interactions cruciales (Chan et al., 1993; Imafuku et al., 1999; Wan et al., 2022; Xiong et al., 2021).

RPS27B (AT3G61110), qui est l'un des trois paralogues de RPS27 chez *Arabidopsis*, a été suggéré pour jouer un rôle dans la régulation de la stabilité des transcrits en réponse aux traitements génotoxiques. Il est aussi impliqué dans la dégradation des ARN endommagés (Revenkova et al., 1999). De plus, RPL10A est impliqué dans la régulation de la voie de

défense virale (Carvalho et al., 2008). Il a également été démontré que RPP3 présentait à la fois des activités chaperonnes des protéines et d'ARN pour augmenter la tolérance des plantes aux stress liés à la chaleur et au froid (Kang et al., 2016). De plus, RPL12 et RPL19 ont été impliqués dans la résistance non hôtes contre les pathogènes bactériennes chez *N. benthamiana* (Nagaraj et al., 2015)

Enfin, en tant que composant du ribosome cytosolique, il a été démontré que RACK1 joue un rôle clé dans l'assemblage du ribosome 80S. Il est phosphorylé par la kinase C activée ce qui permet la libération du facteur d'initiation eIF6 de la grosse sous-unité 60S, permettant ainsi l'assemblage du ribosome 80S (Ceci et al., 2003). De plus, étant une protéine d'échafaudage, RACK1 libre a été identifiée comme la première protéine d'échafaudage MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) qui relie la protéine G hétérotrimérique à une cascade MAPK pour former une voie de signalisation unique dans l'immunité des plantes, ce qui représente une fonction extraribosomale (Cheng et al., 2015).

Avec les progrès continus dans l'étude des fonctions extraribosomales des protéines ribosomales chez la plante, ces modèles pourraient expliquer, au moins en partie, pourquoi les gènes des protéines ribosomales cytosoliques dupliquées ont été conservés dans les génomes des plantes.



**Figure 1.19:** Fonctions extraribosomales potentielles des protéines ribosomales cytosoliques chez les plantes et des méthodes / approches pertinentes pour analyser leur fonctions extraribosomales (Xiong et al., 2021).

Tableau 1.1 : Fonctions des protéines ribosomales chez la plante (Lan et al., 2022).

Functions	Ribosomal protein family	References
<b>Ribosome-dependent Functions</b>		
Structural role	eL15, eL18, eL32, eL42, uL1, uL15, uS14, uS10, uS2, uS3, uS5, uS4, uS11, uS8, uS15, uS17, uL2, uL4, uL22, uL24, eL37, uL3, uL6, uL10, uL11, uS12, P1, P2, P3	(Ban et al., 2000, Klein et al., 2004, Armache et al., 2010)
rRNA stabilization	eL32, uL15, uS14, uS10, uS2, uS3, uS5, uS4, uS11, uS8, uS15, uS17, uL2, uL4, uL22, uL24, eL37, uL3, uS12	(Ban et al., 2000, Klein et al., 2004, Armache et al., 2010)
Assembly, folding/initiation	uS4, uS7, uS8, uS15, uS17, uL2, uL4, uL22, uL24	(Ban et al., 2000, Klein et al., 2004, Armache et al., 2010)
Factor binding (sarcin-ricin domain, SRD)	P1, P2, P3, eL24, uL3, uL6, uL10, uL11, uL13, uL14	(Ban et al., 2000)
Peptide exit tunnel	uL4, uL22, uL24, eL31, eL19, eL39, uL23, uL29	(Ban et al., 2000, Klein et al., 2004, Armache et al., 2010)
Involved in attachment of 5S rRNA to 23S rRNA	eL21, uL5, uL16, uL18, uL30	(Klein et al., 2004, Armache et al., 2010, Spahn et al., 2001)
Intersubunit bridge	eL8, eL30, eL43	(Nollen et al., 2001, Brodersen et al., 2002)
Intersubunit interface	uS13, uS19	(Hutchinson et al., 2011)
Decoding center contact with A and (or) P site	uS9, uS12, uS13	(Ban et al., 2000, Klein et al., 2004, Armache et al., 2010)
Mediates translation initiation at the 5'-m <sup>7</sup> GpppG cap of mRNA	E56	(Hutchinson et al., 2011)
Enhance protein translation	eS6	(Chen et al., 2018)
Selenoprotein mRNA translational recoding	eL30	(Halic et al., 2005, Chavatte et al., 2005)
<b>Ribosome-independent Functions</b>		
Participates in plant immunity	RACK1	(Cheng et al., 2015)
Acts in miRNA pathway	eL24	(Li et al., 2017)
Interacts directly with histone deacetylase 2B (AtHD2B); binds directly to the rRi	eS6	(Kim et al., 2014)
Ubiquitin-extension protein	eS31, eL40	(Callis et al., 2014)
A novel protein component of Component of HMW complexes; acts as both pr	P3	(Kana et al., 2016)
Acts in the anti-virus defence	uL16	(Zoratto et al., 2015)
Involves in mRNA degradation triggered by genotoxic stress	eS27	(Revenkova et al., 1999)
Serves as a novel positive trans-regulator of telomere length set point	uL18	(Abdulkina et al., 2019)

### 1.6.7 Mutants des protéines ribosomales

Les mutations dans une seule protéine parmi les autres paralogues d'une famille des protéines ribosomales peuvent non seulement affecter les fonctions de la protéine ribosomale elle-même, mais peut également influencer les propriétés du ribosome, provoquant une insuffisance ou le dysfonctionnement partiel du ribosome, ce qui



pourraient entraîner des changements dans la traduction à différent degré (Horiguchi et al., 2011). Il a été rapporté que plusieurs mutants des différentes protéines ribosomales partageaient des phénotypes communs : feuilles pointues et étroites, racines courtes, fertilité réduite (Stewart, 2012).

Lan et al. (2022) ont effectué une revue de littérature sur les mutants des protéines ribosomales. Ils ont identifié 38 exemples des gènes des protéines ribosomales cytoplasmiques d'*Arabidopsis* présentant une variété des phénotypes chez les mutants, ils les ont classés ensuite en trois groupes. Dans le premier groupe, les mutants des protéines ribosomales des différentes familles partageaient des phénotypes de développement subtils. Par exemple, des mutations de perte de fonction de 17 gènes appartenant à 16 familles des protéines ribosomales ont été associées à des feuilles pointues et/ou étroites, ce qui suggère qu'elles peuvent entraîner une réduction globale de l'abondance des ribosomes et ainsi affecter la croissance et le développement des plantes.

Ces défauts de développement indiquent fortement que les ribosomes sont des acteurs importants contrôlant les processus de développement (Tableau 1.2). Dans le deuxième groupe, les mutants de neuf gènes appartenant à huit familles (*RPL10A*, *RPS5A*, *RPS5B*, *RPL19A*, *RPL40B*, *RPL3A*, *RPL23C*, *RPLS11A* et *RPL8A*) ont développé des phénotypes embryonnaires létaux, suggérant que chaque gène de ce groupe est essentiel pour maintenir un bon développement embryonnaire (Tableau 1.2). Dans le troisième groupe, les mutants de perte de fonction étaient associés à des phénotypes divergents parmi les paralogues des protéines ribosomales (*RPL24A/RPL24B* et *RACK1A /RACK1B /RACK1C*) ou à des phénotypes spécialisés à des paralogues (*RPS21B*, *RPS21C*, *RPS6A*, *RPS6B*, *RPL27Ac*, *RPS10B* et *RPS27b*), qui ne sont pas observés chez les mutants des autres familles des protéines ribosomales (Tableau 1.2) (Lan et al., 2022). Par exemple, *rps27b* est plus sensible à l'irradiation UV et au sulfate de méthyl méthane comparé au type sauvage (Revenkova et al., 1999). Des mutations dans les protéines ribosomales influencent l'intégrité de ribosome, dans la structure et la fonction, indiquant un certain degré d'hétérogénéité des ribosomes.

De plus, des études de profils ribosomiaux ont été réalisées pour évaluer l'impact des mutations des protéines ribosomales sur la traduction des ARNm. Les profils ribosomiaux des deux différents mutants des protéines ribosomales *rpl5a* et *rpl4d*, présentent tous les

deux des graves défauts de développement, ne présentent que des différences mineures dans la traduction en les comparant au type sauvage, suggérant que l'état générale de la traduction de la plupart des ARNm dans *rpl5a* et *rpl4d* n'a pas été changé. Cependant, des ARNm spécifiques avec des ORF en amont dans leurs séquences non traduites en 5' (5'UTR), sont traduits avec une efficacité extrêmement faible dans *rpl5a* et *rpl4d* (Rosado et al., 2012).

Jusqu'à présent, nous n'avons toujours pas une compréhension globale des mécanismes derrière les phénotypes de perte des fonctions de certaines protéines ribosomales, mais il est également possible que ces phénotypes spécifiques soient causés par la perte des fonctions extraribosomales de ces protéines ribosomales.

Tableau 1.2 : Phénotypes des mutants des gènes des protéines ribosomales chez *Arabidopsis* (Lan et al., 2022).

Ribosomal protein family	Arabidopsis ribosomal genes	Gene name	Mutant phenotypes	References
eL24	AT2G36620	<i>RPL24A</i>	proline accumulation during osmotic stress	(Park et al., 2017)
	AT3G53020	<i>RPL24, RPL24B, STV1</i>	Leaves pointed and narrow; cotyledon and leaf vascular patterning	(Nishimura et al., 2004, Nishimura et al., 2008)
uL16	AT1G14320	<i>RPL10A, SAC52</i>	Knockout cause lethal; knockdown cause conditional translational arrest	(Imai et al., 2008, Falcone Ferreyra et al., 2010)
	AT1G26910	-	Knockdown cause reduced size; narrow and pointed first leaves	(Imai et al., 2008, Falcone Ferreyra et al., 2010)
uL23	AT2G39460	<i>ATRPL23A, RPL23A, RPL23A1, RPL23AA</i>	Knockdown cause pointed and narrow leaves; fused leaves; late flowering	(Degenhardt et al., 2008)
	AT3G55280	<i>RPL23A2, RPL23AB</i>	No phenotype	(Degenhardt et al., 2008)
	AT1G18080	<i>ATARCA, ATRACK1, RACK1A, RACK1A_AT, SAC53</i>	Developmental defects in both seedlings and mature plants	(Guo et al., 2008)
RACK1	AT1G48630	<i>RACK1B, RACK1B_AT</i>	No phenotype	(Guo et al., 2008)
	AT3G18130	<i>RACK1C, RACK1C_AT</i>	No phenotype	(Guo et al., 2008)
uS7	AT2G37270	<i>ATRPS5B, RPS5B</i>	Knockdown cause most cell-division processes delayed or disrupted	(Weijers et al., 2001)
	AT3G11940	<i>AML1, ATRP5A, MEI2-LIKE PROTEIN 1, RP55A</i>	Knockdown cause most cell-division processes delayed or disrupted	(Weijers et al., 2001)
eS21	AT3G53890	<i>EVRI, RPS21B</i>	Displays a spectrum of leaf developmental defects, including pointed leaves	(Wang et al., 2018)
	AT5G27700	<i>EVRL1, RPS21C</i>	Displays a spectrum of leaf developmental defects, including pointed leaves	(Wang et al., 2018)
eS6	AT4G31700	<i>ATRPS6, RPS6, RPS6A</i>	Alters the dorsoventral leaf patterning	(Creff et al., 2010, Wang et al., 2018, Chacón et al., 2018)
	AT5G10360	<i>EMB3010, RPS6B</i>	Alters the dorsoventral leaf patterning	(Creff et al., 2010, Wang et al., 2018, Chacón et al., 2018)
eL42	AT3G23390	<i>RPL36AA</i>	Pointed leaves	(Casanova-Sáez et al., 2014)
	AT4G14320	<i>API2, RPL36AB</i>	Pointed leaves	(Casanova-Sáez et al., 2014)
eL18	AT5G27850	<i>RPL18C</i>	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
eL38	AT3G59540	-	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
eL39	AT4G31985	-	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
uL4	AT5G02870	<i>RPL4</i>	Pointed leaves	(Li et al., 2015)
uL30	AT2G01250	<i>RPL7B</i>	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
eS24	AT5G28060	<i>RPS24B</i>	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
eS28	AT5G03850	-	Pointed leaves	(Horiguchi et al., 2011)
eL28	AT2G19730	-	Pointed and narrow leaves	(Yao et al., 2008)
uL6	AT1G33140	<i>PGY2, PIGGYBACK2</i>	Pointed and narrow leaves with prominent serrations	(Pinon et al., 2008)
uL1	AT2G27530	<i>RPL10aB, PGY1, PIGGYBACK1</i>	Pointed and narrow leaves with prominent serrations	(Pinon et al., 2008)
uS13	AT1G22780	<i>PFL, PFL1, RPS18A</i>	Pointed first leaves, reduced fresh weight, and growth retardation	(Van Lijsebettens et al., 1994)
uS15	AT4G00100	<i>ATRPS13A, PFL2, RPS13, RPS13A</i>	Pointed and narrow leaves; trichome shape change; retarded root growth	(Ito et al., 2000)
uL15	AT1G70600	-	Altered shoot development; temporal delay in initiation and outgrowth	(Szakonyi et al., 2011)
eS10	AT5G41520	<i>RPS10B</i>	Affects the formation and separation of shoot lateral organs	(Stimberg et al., 2012)
eL19	AT1G02780	<i>EMB2386</i>	Embryo lethal	(Tzafirir et al., 2004)
eL40	AT3G52590	<i>EMB2167, ERD16, HAP4, HAPLESS 4, UBO1</i>	Embryo lethal	(Tzafirir et al., 2004)
uL3	AT1G43170	<i>EMB2207, RP1</i>	Embryo lethal	(Tzafirir et al., 2004)
uL14	AT3G04400	<i>EMB2171</i>	Embryo lethal	(Tzafirir et al., 2004)
uS17	AT3G48930	<i>EMB1080</i>	Embryo lethal	(Tzafirir et al., 2004)
uL2	AT2G18020	<i>EMB2296</i>	Embryo defective	(Tzafirir et al., 2004)
eS27	AT3G61110	<i>ARS27A, RS27A</i>	Hypersensitive to DNA damaging agents	(Revenkova et al., 1999)

## 1.7 Objectifs de recherche

Pour développer des stratégies de défense ciblées et produire des cultures plus résistantes, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires derrière la réponse de défense chez la plante. Lorsqu'elles sont exposées à des stress abiotiques et biotiques, les plantes ont développé des stratégies pour s'adapter aux défis imposés par ces conditions défavorables. Dans un tel contexte, le développement d'approches à large échelle dédiées à l'analyse des protéines et de leur taux de synthèse dans des conditions de stress, a permis de mettre en lumière que le processus de la traduction énergétiquement exigeant est l'une des principales cibles à réguler pour réduire la consommation de l'énergie et synthétiser sélectivement les protéines impliquées dans l'établissement d'une réponse adéquate. Le contrôle traductionnel répond à plusieurs voies de signalisation qui permettent d'adapter le protéome en fonction des conditions environnementales (disponibilité en nutriments, oxygène, hormones, stress, *etc.*), du type cellulaire ou encore de la phase du cycle de division cellulaire. Parmi les nombreux facteurs qui sont impliqués dans la régulation traductionnelle, le ribosome permet de réguler à la fois le niveau global de synthèse protéique et l'activation ou l'inhibition de la traduction spécifique de certains groupes d'ARNm. Comme nous l'avons détaillé ci-dessus, les cellules peuvent modifier leur composition des ribosomes en réponse à des stimuli. Des modifications de la structure des ribosomes peuvent se produire au niveau des protéines ribosomales qui s'assemblent dans la machinerie de traduction en réponse à différentes conditions environnementales. Des études précédentes, notamment celles de l'équipe de Maria Barna suggéraient que les différentes protéines ribosomales associées aux ribosomes pouvaient avoir un impact sur le contrôle de la fidélité de la traduction des protéines, l'hypothèse selon laquelle des ribosomes « spécialisés » possédant des activités fonctionnelles « uniques » qui pourraient moduler l'expression de gènes, ou réguler l'homéostasie des cellules durant les différentes conditions, avait été formulée.

Alors, bien qu'une hétérogénéité des ribosomes ait été décrite dans la littérature, « la spécialisation » de l'activité traductionnelle de la majorité de ces changements dans la composition des ribosomes au niveau de leurs constituants moléculaires est encore mal

comprise. Donc, il reste un défi majeur pour comprendre le rôle de ces modifications dans la régulation traductionnelle de l'expression des gènes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse qui vise à explorer le rôle des protéines ribosomales dans la traduction durant la défense chez la plante.

Mon projet a commencé par l'objectif d'identifier des candidats des RPS impliquées dans la résistance aux maladies et accumulés dans les noyaux (site de la biogenèse des ribosomes) des plantes soumises à divers stress, suite à l'analyse des données publiées sur le protéome nucléaire des différentes plantes soumises à des stress biotiques ou abiotiques (objectif I). À partir de ces études, un total de 15 différentes RPS ont montré une augmentation d'abondance dans les noyaux des plantes stressées. Les profils d'expression des gènes de ces 15 RPS ont été évalués dans des conditions de stress chez les plantes *Arabidopsis* et *N. benthamiana* en utilisant la base des données Genevestigator et la méthode qRT-PCR respectivement. Ainsi, les changements dans l'expression de ces 15 gènes des RPS chez les deux plantes ont été comparés afin de mieux comprendre la régulation des ces gènes dans des situations de stress. Pour la suite de mon projet. Nous nous sommes concentrés sur cinq RPS (RPSaA, RPS5A, RPS24A, RPS27D, RACK1A) pour d'autres analyses fonctionnelles chez *N. benthamiana*. Ces cinq gènes ont montré une augmentation de leurs expressions en réponse aux divers types de stress chez *N. benthamiana*.

Comme leurs rôles dans la cellule ne sont pas définis, l'objectif secondaire de mon projet de recherche, était de déterminer la fonction de protéines ribosomales identifiés dans la régulation de la traduction des gènes de défense (objectif II). Pour atteindre cet objectif, nous avons développé une nouvelle approche, un essai de traduction *in vivo*, pour visualiser l'effet de répression de ces 5 RPS identifiés, sur la traduction des ARNm d'un gène rapporteur (GFP) fusionné à différents 5'UTR correspondant à des gènes de défense ou des gènes de ménage. Nous avons testé la production de la protéine fluorescente verte (GFP) dans les feuilles des plantes réprimées pour des RPS spécifiques et non réprimées (contrôle). Les résultats de l'objectif I et II ont été publiés récemment dans la revue *Biomolecules* et sont présentés dans le chapitre II.

Une fois que nous avons compris les impacts de répression des RPS sur la traduction des gènes de défense, nous avons suivi notre intérêt à identifier si ces protéines ribosomales se

trouvent dans le ribosome assemblé durant la défense, ou s'ils présentent un rôle extraribosomale (Objectif III). Pour adresser cette question, une approche de protéomique quantitative précédée d'une immunoprécipitation de ribosome assemblés en servant d'une protéine de la grande sous-unité (RPL18) a été utilisée nous permettant d'identifier les RPS qui se trouvent dans le ribosome assemblé chez la plante stressée. Ces résultats ont été publiés dans la revue *Plant Molecular Biology* et sont présentés dans le chapitre III.

Donc en résumé, ce projet de thèse comprend trois objectifs :

- **Objectif I : Identifier des candidats des RPS impliqués dans la résistance aux maladies et accumulés dans les noyaux (site de la biogenèse des ribosomes) des plantes soumises à divers stress.**

Pour atteindre cet objectif, nous avons analysé les données publiées sur le protéome nucléaire des différentes plantes soumises à des stress biotiques ou abiotiques.

- **Objectif II : Déterminer la fonction de protéines ribosomales identifiés dans la régulation de la traduction des gènes de défense.**

Pour ce faire, nous avons développé une nouvelle approche, un essai de traduction *in vivo*, pour visualiser l'effet de répression de ces 5 RPS identifiés, sur la traduction des ARNm d'un gène rapporteur (GFP) fusionné à différents 5'UTR correspondant à des gènes de défense ou des gènes de ménage en testant la production de la protéine fluorescente verte (GFP).

- **Objectif III : Identifier si ces protéines ribosomales se trouvent dans le ribosome assemblé durant la défense, ou s'ils présentent un rôle extraribosomale.**

Pour adresser cette question, une approche de protéomique quantitative précédée d'une immunoprécipitation de ribosome assemblés en servant d'une protéine de la grande sous-unité (RPL18) a été utilisée nous permettant d'identifier les RPS qui se trouvent dans le ribosome assemblé chez la plante stressée.

Une discussion est présentée au chapitre IV.

**Chapitre II** contient une étude qui explique nos choix de sélection particulier des candidats des protéines ribosomales de la petite sous-unité des ribosomes à partir des données publiées sur le protéome nucléaire des plantes soumises à des stress biotique et abiotique et qui démontre que ces RPS jouent un rôle dans la traduction des gènes de défense chez la plante.

## CHAPITRE II

### DIFFERENTIAL PARTICIPATION OF PLANT RIBOSOMAL PROTEINS FROM THE SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT IN PROTEIN TRANSLATION UNDER STRESS.

**Zainab Fakh**, Mélodie B. Plourde and Hugo Germain

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique qui a été publié en anglais dans la revue *Biomolecules* le 21 juillet 2023. La référence de cet article est la suivante:

**Fakh, Z.;** Plourde, M.B.; Germain, H. Differential Participation of Plant Ribosomal Proteins from the Small Ribosomal Subunit in Protein Translation under Stress. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1160. <https://doi.org/10.3390/biom13071160>

#### 2.1 Contributions des auteurs

Zainab Fakh et Hugo Germain ont effectué la conception de l'étude et la méthodologie; Zainab Fakh a effectué la réalisation des expérimentations, l'analyse des données ainsi que l'écriture du manuscrit. Hugo Germain est le directeur de recherche du laboratoire. Il a supervisé le projet, contribué au design expérimental, a révisé et participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu les subventions pour l'étude. Mélodie B. Plourde a contribué à la révision du manuscrit.

#### 2.2 Résumé de l'article

Exposées à des stress biotiques et abiotiques, les plantes ont développé des stratégies pour s'adapter aux défis imposés par ces conditions défavorables. Le mécanisme de traduction énergétiquement exigeant est l'un des principaux éléments régulés pour réduire la consommation d'énergie et synthétiser sélectivement les protéines impliquées dans l'établissement d'une réponse adéquate. De nouvelles données ont montré que les

ribosomes se remodelent pour s'adapter aux contraintes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les ribosomes sont constitués d'environ quatre-vingt-une protéines ribosomales (PR) distinctes, chacune étant codée par deux à sept gènes. Des recherches récentes ont montré qu'une mutation dans une seule protéine ribosomale chez les plantes peut affecter non seulement les fonctions du PR lui-même, mais également les propriétés du ribosome, ce qui pourrait entraîner des changements dans la traduction à différents niveaux.

Cependant, une question est de savoir si certains PR permettent aux ribosomes de traduire préférentiellement des ARNm spécifiques. Pour révéler le rôle des protéines ribosomales de la petite sous-unité (RPS) dans une traduction spécifique, nous avons développé une nouvelle approche pour visualiser l'effet de la répression des gènes du RPS sur la traduction d'un ARNm de gène rapporteur (GFP) combiné au 5'UTR des différents gènes contrôles et les gènes de défense. La répression des gènes codant pour *NbRPSaA*, *NbRPS5A* et *NbRPS24A* chez *Nicotiana benthamiana* a diminué la traduction des gènes de défense. La plante réprimée pour *NbRACK1A* a montré une diminution de la traduction d'enzymes antioxydantes spécifiques. Cependant, la traduction de tous les gènes testés a été affectée dans les plantes réprimées pour *NbRPS27D*. Ces résultats suggèrent que certains RPS pourraient être potentiellement impliqués dans le contrôle de la traduction des protéines.

### **2.3 Article complet (anglais): Differential participation of plant ribosomal proteins from the small ribosomal subunit in protein translation under stress**

#### **Abstract**

Upon exposure to biotic and abiotic stress, plants have developed strategies to adapt to the challenges imposed by these unfavorable conditions. The energetically demanding translation process is one of the main elements regulated to reduce energy consumption and to selectively synthesize proteins involved in the establishment of an adequate response. Emerging data have shown that ribosomes remodel to adapt to stresses. In *Arabidopsis thaliana*, ribosomes consist of approximately eighty-one distinct ribosomal proteins (RPs), each of which is encoded by two to seven genes. Recent research has revealed that a mutation in a given single RP in plants can not only affect the functions of the RP itself but can also influence the properties of the ribosome, which could bring about



changes in the translation to varying degrees. However, a pending question is whether some RPs enable ribosomes to preferentially translate specific mRNAs. To reveal the role of ribosomal proteins from the small subunit (RPS) in a specific translation, we developed a novel approach to visualize the effect of RPS silencing on the translation of a reporter mRNA (GFP) combined to the 5'UTR of different housekeeping and defense genes. The silencing of genes encoding for *NbRPSaA*, *NbRPS5A*, and *NbRPS24A* in *Nicotiana benthamiana* decreased the translation of defense genes. The *NbRACK1A*-silenced plant showed compromised translations of specific antioxidant enzymes. However, the translations of all tested genes were affected in *NbRPS27D*-silenced plants. These findings suggest that some RPS may be potentially involved in the control of protein translation.

## Introduction

As sessile beings, plants have developed various strategies to overcome the range of challenging conditions they are exposed to. These responses are built on finely tuned gene expressions, which, in turn, lead to protein level variations. Changes in protein level depend on the regulation of multiple factors, such as transcription, mRNA structure, stability, transport, storage, protein synthesis, and degradation [1,2]. Among them, the translation process is one of the main elements that finely modulates protein accumulation under both biotic and abiotic stress situations; its regulation reduces energy consumption and allows for the selective synthesis of proteins involved in the proper establishment of an appropriate response [3,4]. Many examples of global translational inhibition and the preferential production of key proteins that are critical for adapting to environmental conditions are known [5,6,7,8]. A general decrease in global translation levels is observed in plants under conditions of sucrose starvation [9,10] and those acting in response to cold stress [11]. Furthermore, the overall translation activity in plants is higher in the light than in the dark; this is correlated with the higher energetic status of the plant cells under light conditions [12].

Protein synthesis is mediated by ribosomes and ribosomal-associated proteins. Ribosome assembly occurs within the nucleolus and requires the coordinated production and transport of four rRNAs (5S, 5.8S, 18S, and 28S) and eighty-one ribosomal proteins

(RPs) [13]. The eukaryotic ribosome, termed the 80S ribosome, consists of two ribonucleoprotein subunits; the 40S small subunit binds the mRNA and provides the decoding site, which is formed by the 18S rRNA and thirty-three small ribosomal proteins (RPS). The 60S large subunit, which is composed of the 5S, 5.8S, and 23S rRNAs and 48 large ribosomal proteins (RPL), catalyzes the formation of peptide bonds [14,15,16]. All of these RPs are present in a single copy in each ribosome, except for the RPs forming a flexible lateral stalk on the large subunit [17,18]. In the model plant, *Arabidopsis thaliana*, each RP can be encoded by two to seven different members of the small families [15]. Thus, the 81 RP families may produce up to  $10^{34}$  different potential ribosome structural conformations that could theoretically serve as a source of translation heterogeneity [3]. Although each RP gene has multiple paralogs, their expressions appear to be differentially regulated by various environmental cues and treatments with signaling molecules [19,20,21,22,23,24,25]. This differential expression between gene families, as well as within specific ribosomal gene families, opens vast possibilities for the functional role of these RPs in stress conditions. Furthermore, ribosome composition has, to date, been examined in several mass spectrometric studies, which have identified different r-protein paralogs within ribosomes that act in response to different stimuli, showing that ribosome composition may also be dynamic [3,26,27,28]. This heterogeneity can constitute specialized ribosomes that may regulate mRNA translation and control protein synthesis. Thus, specialized ribosomes are defined as a functional subpopulation of ribosomes that appear, for example, after an altered condition; they work to constrain translation to specific mRNAs and to shape the acclimated proteome [29].

The differential expression between the RP genes and the ribosomal composition implies a diversified functional relevance regarding RPs [30]. This is consistent with accumulating evidence that emphasizes the RP involvement in several ribosome functions, as well as roles away from the ribosome, such as DNA repair, histone binding, transcription-factors activity, and cell-cycle regulation [31,32,33]. For instance, mutations in some RPs influence the integrity of ribosomes, in structure and in function. The mutational analysis of several prokaryotic RPs has highlighted their importance in a variety of ribosomal processes. *RPS12* was shown to be required for tRNA decoding in the ribosomal A site [34] and the *RPS4* and *RPS5* mutations showed ribosome translational

inaccuracy [35]; whereas, *RPSa*, *RPS7*, and *RPS11* are essential for mRNA binding [36]. Furthermore, in mammalian cells, the binding of the RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) to ribosomes is essential for the full translation of capped mRNAs and the efficient recruitment of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) [37]. In *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana*, QM/RPL10A plays a transcriptional role in regulating translational mechanisms and defense-associated genes [38]; also, *RPS27B* is involved in the degradation of damaged RNAs (induced by genotoxic treatments) [39].

The involvement and specific constitution of the protein-translation machinery in plant defense is poorly studied. Some reports have shown that the deficiency and mutation of ribosomal proteins themselves are associated with disease responses in plants. The silencing of *RPL12* and *RPL19* in *N. benthamiana* and *A. thaliana* showed compromised nonhost disease resistance against multiple bacterial pathogens [40]; the silencing of *RPL10* in *N. benthamiana* and *A. thaliana* showed compromised disease resistance against the nonhost pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 [38]; and the silencing of *RPS6* in *N. benthamiana* affected the accumulation of the *Cucumber mosaic virus*, *Turnip mosaic virus* (TuMV), and *Potato virus A* (PVA), but not the *Turnip crinkle virus* and *Tobacco mosaic virus* [41].

Despite these studies, a systematic understanding of the functional role of RPs in the context of plant defense is still lacking. In the present study, using previously published nuclear proteomes of plants under stress, we identified several RPS that accumulated in the nuclei (the site of ribosome biogenesis) of stressed plants. We hypothesize that the accumulated RPS paralogs generate ribosomes that shape the cellular translome and plant defense responses. To address the role of the identified RPS in a specific translation, we first developed a translation assay in which we tested the production of the green fluorescent protein (GFP) fused to different 5'UTR corresponding to known defense genes, or housekeeping genes, in the leaves of RPS-silenced and control plants. We found that three tested proteins (*RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A*) are involved in the efficient translation of some defense proteins. In contrast, the protein *RPS27D* is involved in the general translational activity of the ribosome, whereas, *RACK1A* is involved in the efficient translation of several antioxidant enzymes. Our technical approach defines a suitable methodological strategy for testing ribosomal protein requirements for the translation of

specific groups of mRNAs. Moreover, this suggests that RPS paralogs play a crucial role in translational control.

## **Materials and Methods**

### **Plant Growth and Stress Treatments**

Seeds of *N. benthamiana* were vernalized for 48 h at 4 °C and plants were grown in soil (AgroMix) at 23 °C and 60% relative humidity with a 14 h/10 h light/dark cycle in a growth chamber.

For 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) treatment, 3-week-old plants were sprayed to imminent runoff with an aqueous solution of 0.65 mM INA containing 0.05% Sylgard 309 surfactant; whereas, the mock treatment consisted of only the Sylgard 309 aqueous solution. Leaf tissues were harvested 24 h after being sprayed with INA, as previously described [42]. INA was used to induce plant defense as it was shown to induce a response similar to those of salicylic acid and pathogen infection [43]. For cold stress treatments, 3-week-old plants were placed at 4 °C for 6 h [44].

For the biotic stress experiments, we used the bacterial pathogen *P. fluorescens* EtHAn (Effector-to-Host Analyzer) strain, which allowed for the development of the PTI response in *N. benthamiana* [45]. The bacterial suspension of *P. fluorescens* EtHAn at  $OD_{600} = 0.2$  in 10 mM of  $MgCl_2$  was infiltrated into the abaxial side of 3-week-old *N. benthamiana* leaves; tissue was collected 7 h post-inoculation. Leaf samples of infiltrated plants, with 10 mM of  $MgCl_2$  grown under similar conditions, were used as a control to normalize the expression. All of the samples were collected in the form of three biological replicates after each time interval and were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C.

### **Differential Gene Expression Analysis**

A gene expression analysis in a *N. benthamiana* plant was performed on RNA extracted from the frozen tissue using the Genezol Total RNA kit (Geneaid), following the manufacturer's instructions. The RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and quantified by spectrophotometry. In total, 1 µg of each sample was used as the template for first-strand cDNA synthesis using the M-MuLV Reverse Transcriptase (New England

Biolabs, Whitby, ON, Canada). Quantitative PCR amplification was performed on a CFX Connect detection system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) using gene-specific primers and the SYBR Green PCR Master Mix (Bioline, Toronto, ON, Canada). The primers used were designed using the Primer 3 software; they were designed in such a way that they targeted a region that is completely absent of all other paralogous genes and is unique. This selection was performed using the VIGS Tool from the Sol Genomics Network (<https://vigs.solgenomics.net/>, accessed on 1 March 2018) (Figure S1). The specificity of the primers was then verified by using the Primer-Blast tool at NCBI. In total, a 100 ng cDNA template and 0.4  $\mu$ M of each primer (listed in Supplementary Table S1) were used in a final volume of 20  $\mu$ L. The amplification protocol included an initial denaturation at 95 °C for 2 min, with 40 cycles at 95 °C for 5 s, a primer-specific annealing temperature for 10 s, and an extension at 72 °C for 5 s. This was followed by constructing a melt curve at the end to estimate the amplification specificity of each gene. The data were analyzed with CFX Maestro qPCR software. *PP2A* and *UBQ1* (Polyubiquitin 1) were used as reference genes for normalization under INA conditions and those of a *P. fluorescens* EtHAN infection [46]. *ACT 2* and *UBQ1* were considered suitable genes to normalize with for the cold treatment [47]. The mean values of the relative fold change were calculated as per the  $\Delta\Delta C_t$  method [48]. RPS genes in each condition were defined as differentially expressed only if the expression value of the gene was more than 1.5-fold the control and had a *p*-value of less than 0.05 compared to the control.

The expression of the identified RPS genes in *Arabidopsis* was analyzed using the Genevestigator tool (<https://genevestigator.com/>, accessed on 6 February 2018) with the *Arabidopsis* Gene Chip platforms (ATH1: 22k array). The perturbation tool of the Genevestigator software was used to estimate the levels of gene expression as a heat map under different conditions. Data were presented as absolute  $\log_2$  values of fold change compared with that of the control samples.

### **Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)**

The pBINTRA6 and pTV00 vectors were used for silencing in the *N. benthamiana*. The pTV00::*NbRPSaA*, pTV00::*NbRPS5A*, pTV00::*NbRPS27D*, pTV00::*NbRPS24A*, and pTV00::*NbRACK1A* constructs were developed and used for VIGS, as described [49]. In order to select VIGS silencing sections that were specific to a single paralog of the targeted

protein, we used the VIGS Tool from the Sol Genomics Network (<https://vigs.solgenomics.net/>, accessed on 1 March 2018); we were able to design VIGS fragments unique to the 3'UTR of each targeted gene that was absent from the other paralogs (Figure S1). Table S2 provides a list of all of the paralogs of the investigated RPS. PCR was used to amplify the desired fragments with specific primers (Table S3) using genomic DNA prepared from the plant tissues. The amplified fragments of the RPS genes and the pTV00 vectors were digested by the restriction enzymes *KpnI* and *HindIII*, according to the manufacturer's instructions; the purified products of the RPS sequence were inserted into the pTV00 vectors using T4 DNA ligase (NEB, England). The vectors were then transformed into competent cells of the *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . The selected positive clones with the correct sequence were used to transform the *Agrobacterium tumefaciens* strain of GV3101 electrocompetent cells. Plant infiltration was performed, as described previously [49]. The *Agrobacterium* strains of GV3101 containing pTV::*NbRPSaA*, pTV::*NbRPS5A*, pTV::*NbRPS27D*, pTV::*NbRPS24A*, or pTV::*NbRACK1A* and those of C58C1 containing pBINTRA6 were grown at 28 °C in a liquid Luria-Bertani medium including antibiotics (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  kanamycin and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  rifampicin). After 24 h, the cells were harvested by centrifugation and resuspended in the infiltration buffer (10 mM of  $\text{MgCl}_2$  with 200  $\mu\text{M}$  of acetosyringone and 10 mM of MES, pH 5.6) to a final optical density, at 600 nm, of approximately 0.5 and were agitated for 2 h (28 °C) before mixing in a 1:1 ratio. The *Agrobacterium* mix, containing either pBINTRA6 or pTV-*NbRPS* vectors, was infiltrated using a needleless 1-mL syringe that was inserted into the lower leaves of 2-week-old *N. benthamiana* plants [50]. As a control, the empty cloning vector pTV was used to distinguish the nonspecific phenotypic effects of VIGS.

### Quantitative RT-PCR

Leaf tissue was collected 3 weeks after TRV inoculation to test the downregulation of ribosomal protein-encoding gene transcripts in *N. benthamiana*-silenced plants. The total RNA was extracted from silenced and mock-infiltrated plants and the first-strand cDNA was synthesized with oligo(dT<sub>15</sub>) primers using M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. The RT-qPCR was performed using the CFX Connect detection system (Bio-Rad Laboratories,

Mississauga, ON, Canada). *ACT 1* and *EF1 $\alpha$*  were used to normalize the transcript levels [51]. Each sample was run in triplicate and repeated six times from two pooled biological replicates of silenced and non-silenced plants. The average of the six experiments was calculated and the results were graphed, with the corresponding standard deviations indicated with bars in the figures. The primers used in this study are listed in [Table S4](#).

### **5'UTR Chimeras and Plasmid Construction**

The Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter (p35S) and 5'UTR fusion constructs were assembled by PCR stitching. Briefly, two rounds of a PCR were carried out. In the first round, two separate PCRs were performed: one amplified the p35S from the *pB7FWG2* vector using specific primers listed in [Supplementary Table S5](#); the other amplified the 5' upstream region of 5 defense genes, or 3 housekeeping genes, from the *N. benthamiana* genomic DNA using gene-specific primers ([Table S5](#)). The selection of these genes and the categorization of housekeeping and defense genes were made following a literature review. For instance, the *PP2A*, *F-BOX*, and *GAPDH* genes were consistently reported as housekeeping genes within the context of different viral infections in *Nicotiana benthamiana* [51,52,53] and under different conditions in other species [54,55,56,57]. Furthermore, the catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase proteins play a crucial role in overcoming various stress conditions and work as part of the antioxidant defense system [58]. In addition, the NPR1 (NONEXPRESSOR OF PR1) protein functions as a master regulator of plant hormone salicylic acid (SA)-signaling and plays an essential role in promoting defense responses [59]. Finally, the MAPK3 protein is implicated in stomatal development, biotic stress responses, and abiotic stress responses and is required for the complete “priming” of plants [60]. The mRNAs encoding these proteins showed a status indicating a higher translational efficiency in response to stress [61,62,63]. The 5'UTRs of these genes were identified using the Sol Genomics *N. benthamiana* draft genome ([https://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_benthamiana/genome](https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome), accessed on 3 June 2023). In the second round, the products of these two PCRs, which overlapped at one end, were subsequently mixed and amplified.

Amplified fragments containing the p35S promoter and the 5'UTR were used to generate expression vectors, having different 5'UTRs linked to the reporter gene GFP. Amplicons were inserted into the pDONR221 vector (Invitrogen, part of Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) via BP recombination reactions and then into the plant-expression vector PBGWFS7 via LR recombination reactions using Gateway technology [64].

### **Leaf-Infiltration Method**

For transient GFP protein expression, constructs were introduced into the *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation and were delivered into the leaf cells of silenced and non-silenced *N. benthamiana* (5-week-old) using the agroinfiltration method, as previously described [65]. Briefly, recombinant bacterial strains were grown overnight in a liquid Luria-Bertani medium with spectinomycin (50 mg/L); then, they were harvested and resuspended into an infiltration buffer (10 mM of MgCl<sub>2</sub> and 150 μM of acetosyringone) to obtain a 0.5 unit of optical density at 600 nm. One hour after resuspension, leaves were infiltrated on their abaxial side. To minimize leaf-to-leaf variation, each leaf was infiltrated with a vector containing the 5'UTR of two housekeeping genes (*F-box* and *PP2A*) as normalization controls, alongside vectors containing the 5'UTRs to be tested. Three independent infiltrations were made for each experiment and were compared using the Student's *t*-test. Ultimately,  $p < 0.05$  was represented with one star (\*). The agro-infected leaves were collected at 5 days post-infiltration to be photographed and analyzed for GFP production by spectrofluorimetry.

### **Detection of GFP Fluorescence**

Leaves producing GFP were photographed under UV illumination generated by a 100 W, hand-held, long-wave UV lamp (Model B-100, UVP, Upland, CA, USA). The GFP fluorescence intensity was quantified at an excitation of 485 nm and an emission of 538 nm using a Synergy H1 Microplate Reader, BioTek, as described by Diamos et al. [66]. GFP samples were prepared by a serial two-fold dilution with phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM of NaCl, 2.6 mM of KCl, 10 mM of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4); 100 μL of each sample was added to black-wall 96-well plates (Thermo Fisher Scientific), in triplicate. All measurements were performed at room temperature and the reading of an extract from an uninfiltrated plant leaf was subtracted before graphing. A standard curve of fluorescence for the GFP concentration was generated by measuring the fluorescence of a dilution series of GFP (triplicate) in a 96-well plate in the plate reader.



## Protein Extraction

Total protein extract was obtained by homogenizing agroinfiltrated leaf samples with a 1:5 (*w:v*) ice-cold extraction buffer (25 mM of sodium phosphate, pH 7.4, 100 mM of NaCl, 1 mM of EDTA, 0.2% Triton X-100, 10 mg/mL of sodium ascorbate, 10 mg/mL of leupeptin, and 0.3 mg/mL of phenylmethylsulfonyl fluoride) using a mortar and pestle. To enhance solubility, homogenized tissue was rotated at room temperature for 30 min. The crude plant extracts were clarified by centrifugation at 10,000× *g* for 10 min at 4 °C.

## Results

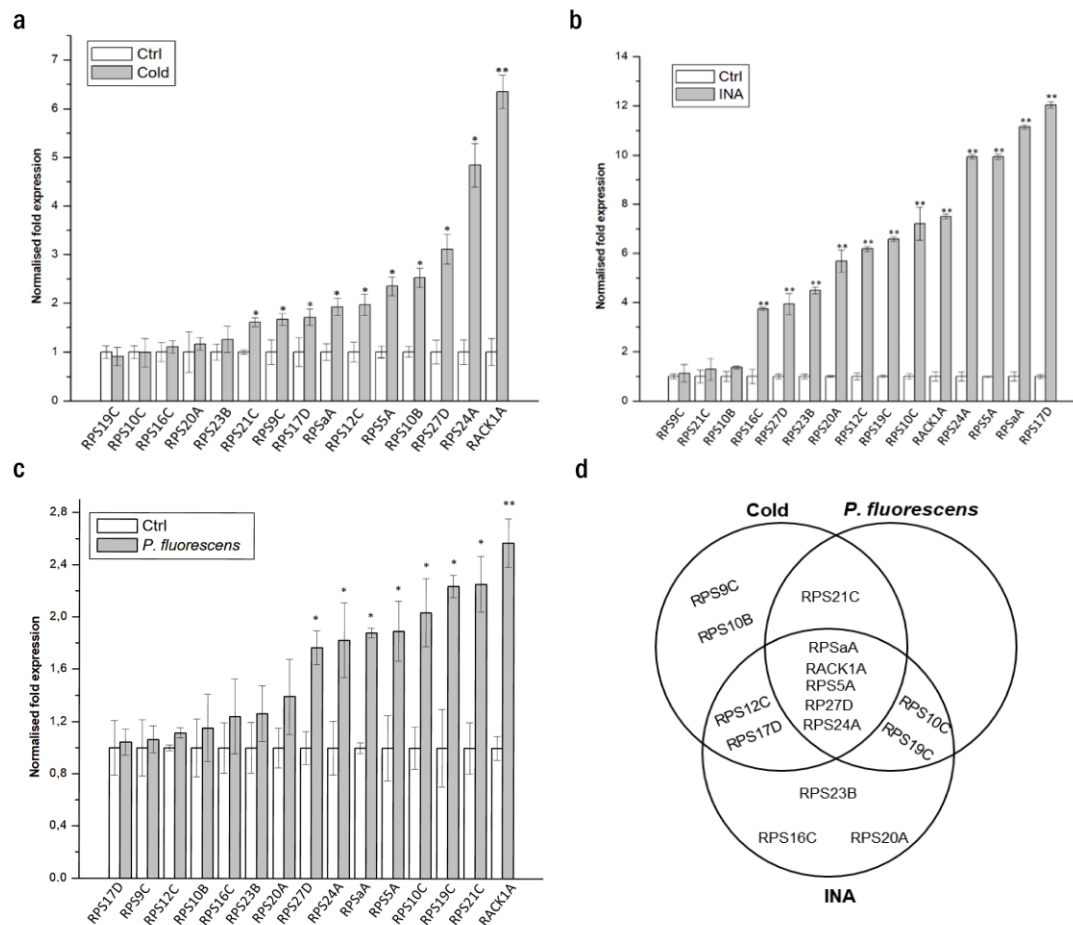
### Small Ribosomal Proteins Are Deregulated by Different Stresses in *A. thaliana* and *N. benthamiana*

Ribosome biogenesis represents a compendium of steps by which the ribosomes may become assembled, involving the import of most RPs into the nucleus and nucleolus and their association with rRNA to constitute the ribosomal subunits [13]. Hence, many studies have identified ribosomal proteins in the nuclei of various plants under stress [44,67,68,69,70]. In line with this idea, we analyzed the published datasets on the biotic and abiotic stress-responsive nuclear proteomes in various plant species to identify plant ribosomal proteins of the small subunit involved in disease resistance and selected RPS detected in the nuclei of stressed plants [44,67,68]. A previous proteomics analysis identified a subset of 11 RPS detected in the nuclei of elicited immunity in *Arabidopsis* plants following a chitosan elicitor treatment [44,67,68] (Figure S2a). In response to cold stress, eight RPS were overrepresented in the nuclear proteome of *Arabidopsis* [44] (Figure S2a). Furthermore, seven RPS had a significant change in abundance in the nucleus of a tomato (*Solanum lycopersicum*) during an infection caused by the oomycete pathogen *Phytophthora capsici* [68] (Figure S2a). From these three studies, a total of 15 different RPS displayed an increased nuclear abundance under various stress conditions.

The gene-expression patterns of these 15 RPS were evaluated under stress conditions in *Arabidopsis* using the *Genevestigator* application's compendium of microarray experiments. We evaluated the expression of these genes following cold stress (Figure S2b), elicitor treatment (Figure S2c), and biotic stress (Figure S2d). Genes that showed a

strong induction in at least two conditions were selected as upregulated. Interestingly, six genes (*RPSaA*, *RPS10C*, *RPS12C*, *RPS19C*, *RPS27D*, and *RACK1A*) showed high levels of expression in response to all three stresses (Figure S2e).

To gain insights into the expression patterns of RPS genes in *N. benthamiana* plants in stress contexts and, also, to provide a comparative analysis of the RPS expression between the two model plants, we performed a quantitative reverse transcription qRT-PCR of the 15 RPS genes using *N. benthamiana* tissues with cold stress conditions (Figure 1a), an INA treatment, an analog of SA that induces plant defense [43] (Figure 1b), and infection with the bacteria *Pseudomonas fluorescens EtHAn* (Figure 1c). Five genes (*RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D*, and *RACK1A*) were highly regulated under the three stress treatments (Figure 1d). It is worth mentioning that the expression patterns of *RPSaA*, *RACK1A*, and *RPS27D* in *N. benthamiana* are consistent with the *Arabidopsis* data from the Genevestigator microarray database. We herein focus on these five RPS genes for further functional analyses in *N. benthamiana*.

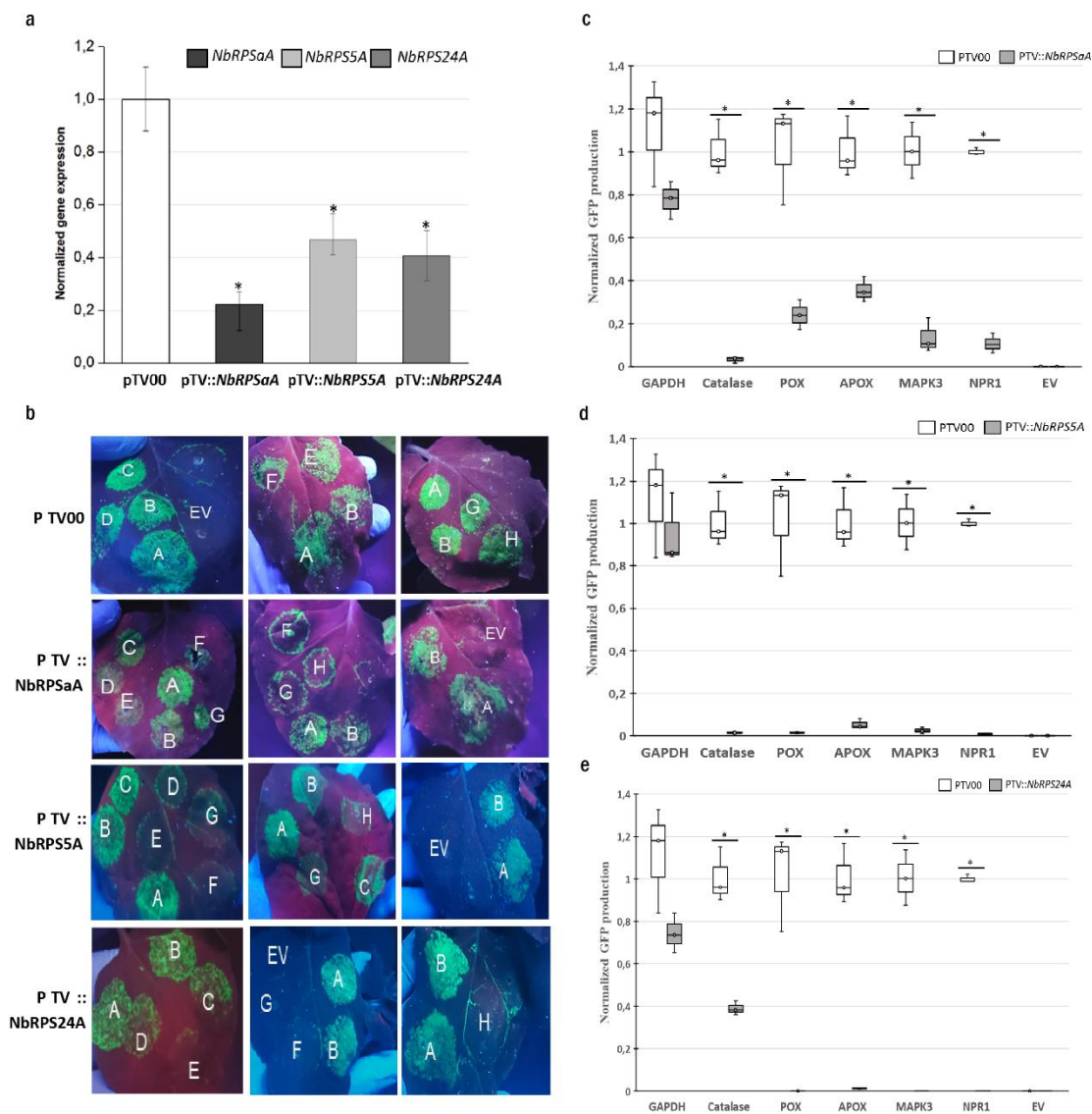


**Figure 1. The mRNA levels of the ribosomal proteins of the small subunit are deregulated by different stresses in *N. benthamiana*.** Relative expression of selected RPS genes in *N. benthamiana* following (a) cold stress, (b) INA treatment, and (c) *Pseudomonas fluorescens* EtHAN infection. \* p-values < 0.05 and \*\* p-values < 0.01, Student's t-test. (d) Venn diagram of the deregulated RPS genes under the three conditions.

### **RPSaA, RPS5A, and RPS24A Proteins Are Involved in the Translation of Defense Proteins Encoding mRNAs.**

To test whether the silencing of a specific *NbRPS* gene compromises defense genes' translations, direct measurements of chimeric reporter mRNA translational efficiencies were compared between RPS-silenced and mock-infiltrated plants. Each chimeric mRNA contained the 5' upstream region of either a defense gene or a housekeeping gene fused to

the coding sequence of the green fluorescent protein ([Table 1](#)). All silenced plants showed more than a 50% down-regulation of the target transcripts ([Figure 2a](#)). Then, the different chimeric constructs were delivered into the *N. benthamiana* leaves of silenced and control plants by an *A. tumefaciens*-mediated transformation and the green fluorescence was monitored. To minimize leaf-to-leaf variation, each leaf was infiltrated with a vector containing the 5'UTR of two housekeeping genes, *F-box* and *PP2A*, as controls alongside vectors containing the 5'UTRs to be tested. No fluorescence was detected in the plant leaves infiltrated with empty vectors without any 5'UTRs (PBGWFS7 vector); whereas, a significant GFP fluorescence was observed with all of the 5'UTR-GFP chimeras in the control plants ([Figure 2b](#)). Using this system, we found that the GAPDH 5'UTR construct produced intense green fluorescence in both silenced and control plants; whereas, the constructs containing the 5'UTRs of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, NPR1, and MAPK3 showed poor GFP signals in pTV::*NbRPSaA*, pTV::*NbRPS5A*, and pTV::*NbRPS24A* compared to the mock plant ([Figure 2b](#)). GFP fluorescence was quantified by spectrofluorimetry and was decreased by more than 50%; sometimes it was almost absent, particularly for the defense chimeric constructs in RPS-silenced plants ([Figure 2c–e](#)). These results indicated that *NbRPSaA*, *NbRPS5A*, and *NbRPS24A* are essential for the optimal translation of many defense genes in planta.



**Figure 2. *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* each have a role in the translation of defense proteins encoding mRNAs.** (a) Relative expression levels of *NbRPSaA*, *NbRPS5A*, and *NbRPS24A* using quantitative RT-PCR analysis in the VIGS-treated *N. benthamiana* plants 21 days after agroinfiltration with TRV vectors. *ACTIN 1* and *EF1 $\alpha$*  were used as internal references. Error bars represent the standard deviations of six independently infiltrated leaves from two biological replicates; asterisks (\*) indicate significant differences based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). (b) GFP fluorescence in *N. benthamiana* leaves under UV light 5 days after infiltration (dpi), with *A. tumefaciens* carrying the p35S-5'UTR-GFP-expression cassettes (A: F-BOX, B: PP2A, C: GAPDH, D: CAT, E: POX, F: APX, G: NPR1, H: MAPK3, EV: Empty vector

(PBGWFS7)). All leaves were infiltrated with the 5' UTRs of two housekeeping gene vectors (A and B), in addition to the other vectors, as an internal control for leaf and plant variability. (c–e) Fluorimetric analysis of GFP accumulation. GFP fluorescence was quantified on ground tissue from three independently infiltrated leaves using a plate reader. Box plots show the replicate distributions in GFP concentration for each 5'UTR construct. The asterisks (\*) represent significant differences between silenced and mock-infiltrated samples, based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

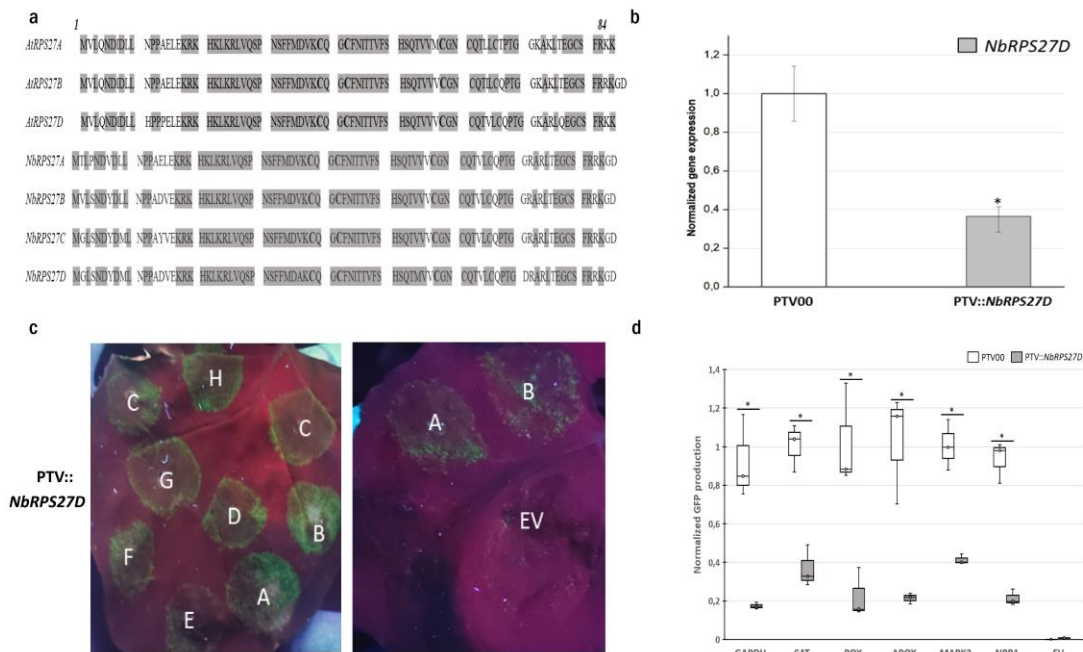
**Table 1.** List of the 5'UTRs used in this study.

Gene Symbol	Gene Name	Description	References
F-BOX	F-box protein	Normalizing gene	[52]
PP2A	Protein phosphatase 2A	Normalizing gene	[52]
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Housekeeping gene	[52]
CAT	Catalase	ROS-scavenging enzymes	[71]
POX	Peroxidase	ROS-scavenging enzymes	[72]
APX	Ascorbate peroxidase	ROS-scavenging enzymes	[72]
MAPK3	Mitogen-activated protein kinases 3	PAMP-triggered immunity (PTI)	[73]
NPR1	Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1	Positive regulator of SAR	[74]

### RPS27D Is Required for Efficient Translation in *N. benthamiana*

The ribosomal protein *S27* (*RPS27*), belongs to the 40S subunit and, through its zinc-finger-like motif, it acts as an RNA-binding protein and subsequently influences the transcription of many genes through transcript degradation [39]. *A. thaliana* and *N. benthamiana* both have four *RPS27* gene family members: A, B, C, and D. The amino acid similarity between *AtRPS27* and *NbRPS27* proteins is between 89.8 and 96.5% (Figure 3a) [26]. The alignment of the *S27* ribosomal protein sequences of different species (rice, barley, rat, and human) shows high conservation [39]. We sought to investigate the role of *NbRPS27D* in the translation of defense genes in *N. benthamiana* using the same TRV-mediated virus-induced gene-silencing approach to downregulate *NbRPS27D* expression. The silenced plants showed a more than 60% down-regulation of the target transcript compared to the control (Figure 3b). We then tested translational efficiency by analyzing the GFP accumulation from the agro-infiltration of chimeric mRNAs. *NbRPS27D* silencing resulted in a more than 50% decrease in GFP production in the zone of infiltration, with the vectors containing the 5'UTRs of defense genes (Figure

3c,d). Interestingly, a similar decrease was observed for the GFP vector containing the 5'UTR of the housekeeping gene, GAPDH (Figure 3c,d). The data presented here suggest that one paralog of ribosomal protein *S27* (*RPS27D*) may play a crucial role in the ribosome translational activity in *N. benthamiana*.



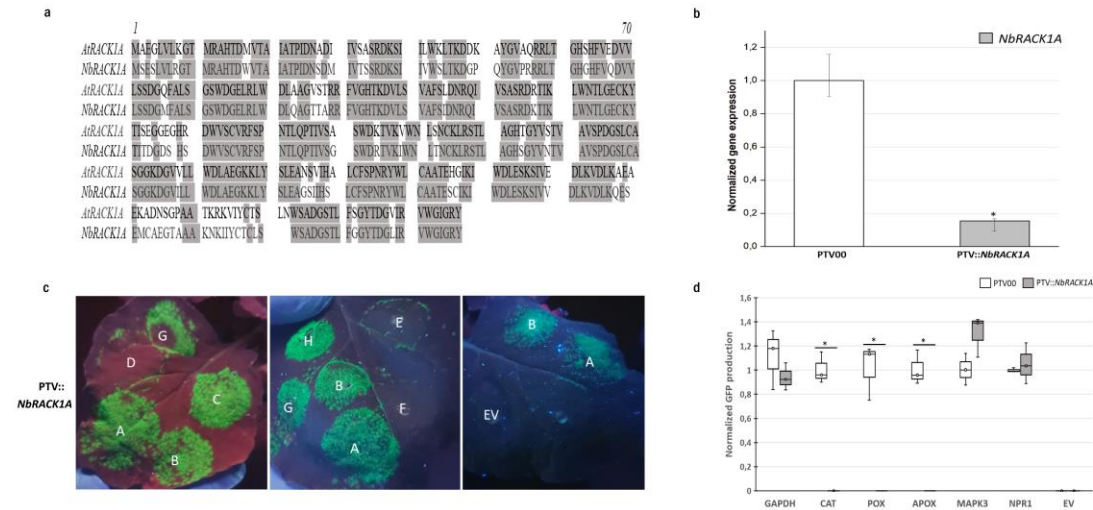
**Figure 3.** *RPS27D* is required for efficient translation in *N. benthamiana*. **(a)** Sequence alignment of *A. thaliana* and *N. benthamiana* ribosomal protein *S27* family members. Conserved amino acids in all the homologs are highlighted. Conserved cysteines forming a zinc finger are shown in bold. **(b)** Relative expression levels of *NbRPS27D* using quantitative RT-PCR analysis in the VIGS-treated *N. benthamiana* plants. *ACTIN1* and *EF1 $\alpha$*  were used as references. Error bars represent the standard deviations of six independently infiltrated leaves from two biological replicates; the asterisk (\*) indicates a significant difference based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). **(c)** GFP fluorescence in the *N. benthamiana* leaves of pTV::NbRPS27D plants under UV light 5 days after infiltration, with *A. tumefaciens* carrying the p35S-5'UTR-GFP-expression cassettes (A: F-BOX, B: PP2A, C: GAPDH, D: CAT, E: POX, F: APX, G: NPR1, H: MAPK3, EV: Empty vector (PBGWFS7)). All leaves were infiltrated with the 5' UTRs of two housekeeping gene vectors (A and B), in addition to the other vectors, as an internal control for leaf and plant variability. **(d)** Fluorimetric analysis of GFP accumulation. GFP fluorescence was quantified on ground tissue from three independently

infiltrated leaves using a plate reader. Box plots show the replicate distributions in GFP concentration for each 5'UTR construct. The asterisks (\*) represent significant differences between silenced and mock-infiltrated samples based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

### **RACK1A Is Required for the Efficient Translation of Several Antioxidant Enzymes**

RACK1 was originally isolated as a receptor for activated C-kinase 1. In addition to its signaling roles, it interacts with the ribosomal machinery, several cell surface receptors, and nuclear proteins [75]. The most stable and consistent interaction of RACK1 is the one it has with the ribosome. Indeed, RACK1 is found at the surface exposed region of the 40S ribosomal subunit, next to the mRNA exit channel [14,76,77]. It is known that RACK1 specifically modulates translational efficiency in various model systems [37,78,79]; however, its role in the efficient translation of mRNA subsets in the context of defense in planta is not well characterized. *N. benthamiana* has five RACK1 homologs [26] and *A. thaliana* has three [74]. *AtRACK1A* and *NbRACK1A* share 82% of their amino acid identities (Figure 4a). Since *RACK1A* is the paralog that was previously detected in the nucleus of stressed plants (Figure S2a), we silenced *NbRACK1A* to investigate its role in the translation of defense genes. Additionally, qRT-PCR analyses confirmed a down-regulation of more than 70% of the targeted transcript in the silenced plants compared to the control (Figure 4b). *NbRACK1A* silencing caused an important decrease in the GFP fluorescence in leaves infiltrated with the vectors containing the 5'UTRs of peroxidase, ascorbate peroxidase, and catalase (Figure 4c). Similarly, the quantification data indicate that the GFP production under these 5'UTRs was decreased in the pTV::*NbRACK1A* plants compared to control plants (Figure 4d). By contrast, *NbRACK1A* silencing had no effect on GFP production in the areas infiltrated with the other 5'UTRs (Figure 4c,d). These results suggest that *NbRACK1A* silencing in *N. benthamiana* compromises the translation of several antioxidant enzymes.





**Figure 4. *RACK1A* is required for the efficient translation of several antioxidant enzymes.** (a) Sequence alignment of *AtRACK1A* and *NbRACK1A*. (b) Relative expression levels of *NbRACK1A* using quantitative RT-PCR analysis in the VIGS-treated *N. benthamiana* plants. *ACTIN1* and *EF1 $\alpha$*  were used as references. Error bars represent the standard deviations of six independently infiltrated leaves from two biological replicates; the asterisk (\*) indicates a significant difference based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). (c) GFP fluorescence in the *N. benthamiana* leaves of pTV::*NbRACK1A* plants under UV light 5 days after infiltration, with *A. tumefaciens* carrying the p35S-5'UTR-GFP-expression cassettes (A: F-BOX, B: PP2A, C: GAPDH, D: CAT, E: POX, F: APX, G: NPR1, H: MAPK3, EV: Empty vector (PBGWFS7)). All leaves were infiltrated with the 5' UTRs of two housekeeping gene vectors (A and B), in addition to the other vectors, as an internal control for leaf and plant variability. (d) Fluorimetric analysis of GFP accumulation. GFP fluorescence was quantified on ground tissue from three independently infiltrated leaves using a plate reader. Box plots show the replicate distributions in GFP concentration for each 5'UTR construct. The asterisks (\*) represent significant differences between silenced and mock-infiltrated samples based on the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

## Discussion and Conclusions

Plants' responses to stress vary according to stress-type and the outcome is mainly specific to a particular stress [80,81]. Recently developed technologies, such as ribosome profiling and quantitative proteomics, have shown that many stresses inhibit protein

synthesis in cells [2,5,6,82]. Protein synthesis accounts for a large proportion of the energy budget of a cell and, thus, requires tight regulation [83]. However, a severe reduction in translation can be harmful during stress as it is precisely the time when cells require new protein synthesis in order to repair damage and adapt to the new environment [84]. Thus, selective translation regulation may allow cells to react to adverse conditions more effectively. As translation modulation is a fast response to environmental signals, the ribosome could be a player in this adaptation. It has been shown that translational regulation mainly takes place during the initiation steps [85]. In plants, the initiation of a translation requires initiation factors, mRNAs, tRNAs, and ribosomes. It involves numerous protein–RNA and protein–protein interactions. Briefly, the 40S subunit of the ribosome directly binds to mRNAs in a way that is dependent on the mRNAs' structures. After mRNA binding and scanning to the AUG start codon in a favorable context, the 60S subunit is recruited to form an 80S initiation complex capable of entry into the elongation phase [86]. During the initiation process, mRNA recruitment to the 40S ribosomal subunit is thought to be the rate-limiting step and is often modulated. The translation efficiency is determined by structural features in the 5' untranslated region (5'UTR) of the mRNA. These features not only determine how well an mRNA is translated but also whether specific ribosomal proteins and other proteins can interact with it [87].

Recent studies on *Arabidopsis* ribosomes revealed that numerous r-proteins are represented by two or more gene family members and most members of each family are expressed [29,88]; meanwhile, r-proteins are generally found as a single copy per ribosome [17,89]. However, the expression of each RP gene appears to be differentially regulated by different conditions. In line with this idea, changes in the expression patterns of these 15 RPS genes in *Arabidopsis* and *Nicotiana* were compared in order to gain insights into the regulation of the response to stress. We have shown differential expression under the three stress treatments of these seven (*RPSaA*, *RPS10C*, *RPS12C*, *RPS19C*, *RPS21C*, *RPS27D*, and *RACK1A*), five (*RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D*, and *RACK1A*), and three (*RPSaA*, *RACK1A*, and *RPS27D*) RPS genes in *Arabidopsis*, *Nicotiana*, and both plants, respectively. Similarly, several r-protein genes have been found to be upregulated under different stimuli in plants [19,20,21]. These results indicate the fundamental stress-specific reprogramming of RP gene transcription under stress conditions.

With that in mind, it is interesting to speculate that these RPS endow ribosomes with the capacity for preferential mRNA selection for translation. To substantiate this hypothesis, using the VIGS method, we prepared plants with reduced levels of *RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D*, and *RACK1A* mRNAs and tested the translation efficiency of specific groups of selected mRNAs. *NbRPSaA*-, *NbRPS5A*-, and *NbRPS24A*-silenced *N. benthamiana* plants showed varying extents of compromised translation when compared to control plants. The green fluorescence intensity from the GAPDH 5'UTR-GFP chimera was similar in *RPSaA*-, *RPS5A*-, and *RPS24A*-silenced leaves and non-silenced control plants. However, the silencing of these three RPS genes resulted in a dramatic reduction in the translations of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, NPR1, and MAPK3 5'UTR-GFP chimeras. Interestingly, previous studies have reported that *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* have roles in the regulation of reactive oxygen species (ROS)-mediated systemic signaling. *RPS5A* may play an important role in dark treatment by participating in the autophagy regulatory process, which is triggered to degrade excessive ROS to help protect cells [90]. Then, it was shown that *RPSaA* and *RPS24A* had lower degradation rates and were more stable after oxidative stress [91]. Thus, the transcript levels of *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* increased significantly in vanilla infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanilla* [20]; additionally, the expression of *RPS5A* was also induced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Rhizoctonia solani*, rice pathogens that, respectively, cause very serious bacterial leaf blight and sheath blight diseases [19]. Moreover, the expression of *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* was upregulated under the three stress treatments in *Nicotiana* in our study. A differential accumulation of *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* in the ribosomal apparatus was reported in *Arabidopsis* following treatment with the defense-inducing compound INA [28]. The data obtained in this study demonstrate that *RPSaA*, *RPS5A*, and *RPS24A* are required for the selective translation of defense genes to cope with unfavorable conditions.

Meanwhile, the data presented here suggest that *NbRPS27D* silencing leads to a general translation defect. As mentioned above, *RPS27* was shown to contain a conserved zinc finger motif, which may confirm its ability to interact with non-ribosomal components, especially mRNAs. In *Arabidopsis*, *RPS27B* has been said to act as a regulator of transcript stability in response to genotoxic treatments via the degradation of

damaged RNAs [39]. Recent data have shown that mutations in *RPS27B* influence the integrity of ribosomes in both structure and function [90].

RACK1 is a highly conserved scaffold protein located at the surface exposed region of the 40S subunit, near the mRNA exit channel [92]. The recent identification of RACK1 as a core component of the small subunit of the ribosome suggests it possesses signaling functions, allowing for translation regulation in response to cell stimuli [93,94]. RACK1 regulates several signaling pathways by acting as a receptor for signaling proteins, such as the protein kinase C (PKC) family [95,96], and by controlling mRNA-specific translation [37,97]. Previous studies have reported on the role of *RACK1A* in plant immune signaling and hormone responses [98,99,100]. *RACK1A* has also been demonstrated to be a key regulator of reactive oxygen species (ROS)-mediated systemic signaling [99,101]. ROS are important and common messengers produced in response to various environmental stresses and are known to activate many MAPKs [102]. They are recognized as threshold-level signaling molecules that regulate adaptations to various biotic and abiotic stresses, i.e., the ROS level determines whether they will be defensive or destructive molecules, which is maintained by a balance between ROS-producing and ROS-scavenging pathways for normal cellular homeostasis [103]. Interestingly, RACK1 affects ROS levels and ROS levels also affect RACK1 gene expression [104]. It has been reported that the knockdown of endogenous RACK1 increases the intracellular ROS level following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation in human hepatocellular carcinoma cells, leading to cell death promotion [105]. At the same time, Saelee et al. showed that *Penaeus monodon*-RACK1 protected shrimp cells from oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [106]. Núñez et al. have shown that RACK1 positively regulates the synthesis of cytoplasmic catalase, a detoxification enzyme induced by hydrogen peroxide treatment, and controls the cellular defense against the oxidative stress in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [97]. In contrast, rice RACK1 (*OsRACK1A*) has been shown to be involved in the immune response against pathogen attacks through enhanced reactive oxygen species (ROS) [99]. Our study is in line with *RACK1A* regulating the ROS in plants. The observation that *RACK1A* knockdown reduces the translation of catalase, APOX, and POX mRNAs is in agreement with RACK1's positive regulation of the detoxification enzyme synthesis induced by ROS. These enzymes are part of the antioxidant machinery, which helps to mitigate oxidative

stress-induced damage. With respect to the role of RACK1 in signaling, accumulating evidence suggests that free RACK1 can act as a signaling molecule at a threshold level to enhance the production of ROS. Overall, it is noteworthy that the signal activated by free RACK1 is transient because, in the absence of ribosomal binding, the protein is unstable [37]. In contrast, RACK1 as a ribosomal protein controls the cellular defense against oxidative stress, positively regulating the translation of specific gene products involved in detoxification [97]. In conclusion, we propose that the association of *RACK1A* with the ribosome may indeed be regulated downstream of the ROS burst in order to modulate its translation functions; however, this possibility should be further investigated.

Our findings would argue that ribosomal proteins function in a modular fashion to decode genetic information in a context-dependent manner. The silencing of one r-protein, as was conducted in this study, could impact the stability and efficiency of the entire ribosome. In our case, the controls showed us that the overall translation efficiency was not impacted and, therefore, we believe that some variable ribosomal proteins additionally function in a coordinated manner to shape the translome, which is adapted to different environmental cues in plants.

Overall, our study clearly demonstrates that some RPS are involved in the optimal translation regulation of many genes that are important for defense. However, our experimental design does not allow us to rule out whether the results presented herein are paralog-specific or if the effects could be true for all paralogs (or more than one paralog) of the same ribosomal protein. The findings of this study provide a novel strategy to assess translation efficiency that opens new and interesting avenues for research about the roles of ribosomal proteins during biotic and abiotic stress in *N. benthamiana*. Based on these data, we anticipate that some of the previously described biological functions of these RPS in plant immunity might be linked to their function as putative translational regulators. Future studies into the connection between the RP-mediated translation of defense proteins and the broader role of paralog specificity may provide a novel perspective on specialized ribosomes and translational control in plant disease.

## Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom13071160/s1>, **Figure S1:** Graphical representation of siRNA from targets (in blue) and off-targets (in red), suggesting the best construct predicted (in yellow) and allowing us to define a custom construct using the VIGS tool; **Figure S2:** (a) Venn diagram showing the deregulated ribosomal proteins detected in the nuclei of different plants under three types of stress collected from the previously published nuclear proteomes. Heat maps showing the differential expression patterns of the RPS genes deregulated in the nucleus during (b) cold treatment, (c) during elicitor treatments (d), and under biotic stresses. Relative expression ratios of the treatments versus controls are shown in green (down-regulated) and red (up-regulated). The scale on the top represents the  $\log_2$  fold change value. The maximum value is displayed in dark red and the minimum value is displayed in light green. Images have been created and retrieved by Genevestigator v.3. using a meta-analysis tool and (e) the localization of deregulated RPS within the *Arabidopsis* 80S ribosome upon stress conditions. The visualization outlines mapped the upregulated RPS in response to cold stress, INA treatment, and biotic stress compared to control conditions. For the mapping, PyMOL visualization software was used to obtain a surface representation and to highlight proteins with significant changes. Red indicates RP families with increased transcripts following the three types of stress and purple indicates RP families with increased transcripts following either the biotic or elicitor treatment. Pink and blue represent RP families with increased transcript abundances following biotic and cold stress conditions, respectively; **Table S1:** List of the primer used to test the expression of the RPS in *N. benthamiana*; **Table S2:** *N. benthamiana* r-proteins, their size distribution (in amino acids, aa) and homologies to *A. thaliana*; **Table S3:** List of the primers used in the VIGS; **Table S4:** List of the primers used to test the silencing of RPS by qRT-PCR; **Table S5:** List of the primers used in P35s-5'UTR constructs for gateway cloning.

## Author Contributions

Conceptualization, Z.F. and H.G.; methodology, Z.F. and H.G.; formal analysis, Z.F.; investigation, Z.F.; resources, H.G.; writing—original draft preparation, Z.F.; writing—review and editing, M.B.P. and H.G.; supervision, H.G.; project administration,

H.G.; funding acquisition, H.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Funding**

Canada Natural Sciences and Engineering Research Council Discovery program RGPIN 4002-2020.

### **Acknowledgments**

We are thankful to David Joly from University of Moncton for sharing the *Pseudomonas fluorescens* strain.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Echevarría-Zomeño, S.; Yángüez, E.; Fernández-Bautista, N.; Castro-Sanz, A.B.; Ferrando, A.; Castellano, M.M. Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 4670–4683.
2. Fennoy, S.L.; Nong, T.; Bailey-Serres, J. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* 1998, *15*, 727–735.
3. Hummel, M.; Cordewener, J.H.; de Groot, J.C.; Smeekens, S.; America, A.H.; Hanson, J. Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MSE proteomics. *Proteomics* 2012, *12*, 1024–1038.
4. Groppo, R.; Palmenberg, A.C. Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *J. Virol.* 2007, *81*, 13067–13074.
5. Bailey-Serres, J.; Sorenson, R.; Juntawong, P. Getting the message across: Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci.* 2009, *14*, 443–453.
6. Bailey-Serres, J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci.* 1999, *4*, 142–148
7. Liu, L.; Simon, M.C. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol.* 2004, *3*, 492–497.
8. Braunstein, S.; Karpisheva, K.; Pola, C.; Goldberg, J.; Hochman, T.; Yee, H.; Cangiarella, J.; Arju, R.; Formenti, S.C.; Schneider, R.J. A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* 2007, *28*, 501–512.
9. Gamm, M.; Peviani, A.; Honsel, A.; Snel, B.; Smeekens, S.; Hanson, J. Increased sucrose levels mediate selective mRNA translation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 2014, *14*, 306.
10. Nicolai, M.; Roncato, M.A.; Canoy, A.S.; Rouquié, D.; Sarda, X.; Freyssinet, G.; Robaglia, C. Large-Scale Analysis of mRNA Translation States during Sucrose Starvation in *Arabidopsis* Cells Identifies Cell Proliferation and Chromatin Structure as Targets of Translational Control. *Plant Physiol.* 2006, *141*, 663–673.
11. Wang, L.; Li, H.; Zhao, C.; Li, S.; Kong, L.; Wu, W.; Kong, W.; Liu, Y.; Wei, Y.; Zhu, J.K.; et al. The inhibition of protein translation mediated by AtGCN1 is essential for cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 2017, *40*, 56–68.
12. Juntawong, P.; Bailey-Serres, J. Dynamic Light Regulation of Translation Status in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2012, *3*, 66.
13. Sáez-Vásquez, J.; Delseny, M. Ribosome Biogenesis in Plants: From Functional 45S Ribosomal DNA Organization to Ribosome Assembly Factors. *Plant Cell* 2019, *31*, 1945–1967.
14. Chang, I.F.; Szick-Miranda, K.; Pan, S.; Bailey-Serres, J. Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant Physiol.* 2005, *137*, 848–862.
15. Barakat, A.; Szick-Miranda, K.; Chang, I.F.; Guyot, R.; Blanc, G.; Cooke, R.; Delseny, M.; Bailey-Serres, J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol.* 2001, *127*, 398–415.



16. Carroll, A.J. The *Arabidopsis* Cytosolic Ribosomal Proteome: From form to Function. *Front. Plant Sci.* 2013, 4, 32.
17. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 2000, 289, 905–920.
18. Yusupova, G.; Yusupov, M. High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* 2014, 83, 467–486.
19. Saha, A.; Das, S.; Moin, M.; Dutta, M.; Bakshi, A.; Madhav, M.S.; Kirti, P.B. Genome-Wide Identification and Comprehensive Expression Profiling of Ribosomal Protein Small Subunit (RPS) Genes and their Comparative Analysis with the Large Subunit (RPL) Genes in Rice. *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1553.
20. Solano de la Cruz, M.T.; Adame-García, J.; Gregorio-Jorge, J.; Jiménez-Jacinto, V.; Vega-Alvarado, L.; Iglesias-Andreu, L.; Escobar-Hernández, E.E.; Luna-Rodríguez, M. Increase in ribosomal proteins activity: Translational reprogramming in *Vanilla planifolia* Jacks., against *Fusarium infection*. *bioRxiv* 2019.
21. Moin, M.; Bakshi, A.; Saha, A.; Dutta, M.; Madhav, S.M.; Kirti, P.B. Rice Ribosomal Protein Large Subunit Genes and Their Spatio-temporal and Stress Regulation. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 1284.
22. Ban, Z.; Yan, J.; Wang, Y.; Zhang, J.; Yuan, Q.; Li, L. Effects of postharvest application of chitosan-based layer-by-layer assemblies on regulation of ribosomal and defense proteins in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*). *Sci. Hortic.* 2018, 240, 293–302.
23. Wang, J.; Lan, P.; Gao, H.; Zheng, L.; Li, W.; Schmidt, W. Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient *Arabidopsis* roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. *BMC Genom.* 2013, 14, 783.
24. Vemanna, R.S.; Bakade, R.; Bharti, P.; Kumar, M.K.P.; Sreeman, S.M.; Senthil-Kumar, M.; Makarla, U. Cross-Talk Signaling in Rice During Combined Drought and Bacterial Blight Stress. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 193.
25. Guimaraes, J.C.; Zavolan, M. Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biol.* 2016, 17, 236.
26. Eskelin, K.; Varjosalo, M.; Ravanti, J.; Mäkinen, K. Ribosome profiles and riboproteomes of healthy and Potato virus A- and *Agrobacterium*-infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol. Plant Pathol.* 2019, 20, 392–409.
27. Reschke, M.; Clohessy, J.G.; Seitzer, N.; Goldstein, D.P.; Breitkopf, S.B.; Schmolze, D.B.; Ala, U.; Asara, J.M.; Beck, A.H.; Pandolfi, P.P. Characterization and analysis of the composition and dynamics of the mammalian riboproteome. *Cell Rep.* 2013, 4, 1276–1287.
28. Fakih, Z.; Plourde, M.B.; Nkouankou, C.E.T.; Fourcassie, V.; Bourassa, S.; Droit, A.; Germain, H. Specific alterations in riboproteomes composition of isonicotinic acid treated arabidopsis seedlings. *Plant Mol. Biol.* 2023, 111, 379–392.
29. Genuth, N.R.; Barna, M. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* 2018, 19, 431–452.
30. Luan, Y.; Tang, N.; Yang, J.; Liu, S.; Cheng, C.; Wang, Y.; Chen, C.; Guo, Y.N.; Wang, H.; Zhao, W.; et al. Deficiency of ribosomal proteins reshapes the

- transcriptional and translational landscape in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2022, *50*, 6601–6617.
31. Kim, J.; Chubatsu, L.S.; Admon, A.; Stahl, J.; Fellous, R.; Linn, S. Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *J. Biol. Chem.* 1995, *270*, 13620–13629.
  32. Zhang, Y.; Lu, H. Signaling to p53: Ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 2009, *16*, 369–377.
  33. Ni, J.Q.; Liu, L.P.; Hess, D.; Rietdorf, J.; Sun, F.L. Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev.* 2006, *20*, 1959–1973.
  34. Funatsu, G.; Wittmann, H.G. Ribosomal proteins. 33. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J. Mol. Biol.* 1972, *68*, 547–550.
  35. Stöffler, G.; Deusser, E.; Wittmann, H.G.; Apirion, D. Ribosomal proteins: XIX. Altered S5 ribosomal protein in an *Escherichia coli* revertant from streptomycin dependence to independence. *Mol. Gen. Genet. MGG* 1971, *111*, 334–341.
  36. Brodersen, D.E.; Nissen, P. The social life of ribosomal proteins. *FEBS J.* 2005, *272*, 2098–2108.
  37. Gallo, S.; Ricciardi, S.; Manfrini, N.; Pesce, E.; Oliveto, S.; Calamita, P.; Mancino, M.; Maffioli, E.; Moro, M.; Crosti, M.; et al. RACK1 Specifically Regulates Translation through Its Binding to Ribosomes. *Mol. Cell Biol.* 2018, *38*, e00230-18.
  38. Ramu, V.S.; Dawane, A.; Lee, S.; Oh, S.; Lee, H.K.; Sun, L.; Senthil-Kumar, M.; Mysore, K.S. Ribosomal protein QM/RPL10 positively regulates defence and protein translation mechanisms during nonhost disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* 2020, *21*, 1481–1494.
  39. Revenkova, E.; Masson, J.; Koncz, C.; Afsar, K.; Jakovleva, L.; Paszkowski, J. Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *Embo J.* 1999, *18*, 490–499.
  40. Nagaraj, S.; Senthil-Kumar, M.; Ramu, V.S.; Wang, K.; Mysore, K.S. Plant Ribosomal Proteins, RPL12 and RPL19, Play a Role in Nonhost Disease Resistance against Bacterial Pathogens. *Front. Plant Sci.* 2015, *6*, 1192.
  41. Rajamäki, M.L.; Xi, D.; Sikorskaite-Gudziuniene, S.; Valkonen, J.P.T.; Whitham, S.A. Differential Requirement of the Ribosomal Protein S6 and Ribosomal Protein S6 Kinase for Plant-Virus Accumulation and Interaction of S6 Kinase with Potyviral VPg. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2017, *30*, 374–384.
  42. Cheng, Y.T.; Germain, H.; Wiermer, M.; Bi, D.; Xu, F.; Garcia, A.V.; Wirthmueller, L.; Despres, C.; Parker, J.E.; Zhang, Y.; et al. Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009, *21*, 2503–2516.
  43. Conrath, U.; Chen, Z.; Ricigliano, J.R.; Klessig, D.F. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, *92*, 7143–7147.
  44. Bae, M.S.; Cho, E.J.; Choi, E.Y.; Park, O.K. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* 2003, *36*, 652–663.

45. Badel, J.L.; Piquerez, S.J.; Greenshields, D.; Rallapalli, G.; Fabro, G.; Ishaque, N.; Jones, J.D. In planta effector competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2013, *26*, 745–757.
46. Lu, X.; Liu, Y.; Zhao, L.; Liu, Y.; Zhao, M. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR during methyl jasmonate, salicylic acid and hydrogen peroxide treatments in *Ganoderma lucidum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018, *34*, 92.
47. Kreps, J.A.; Wu, Y.; Chang, H.-S.; Zhu, T.; Wang, X.; Harper, J.F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 2002, *130*, 2129–2141.
48. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001, *25*, 402–408.
49. Ratcliff, F.; Martin-Hernandez, A.M.; Baulcombe, D.C. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 2001, *25*, 237–245.
50. Senthil-Kumar, M.; Mysore, K.S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnol. J.* 2011, *9*, 797–806.
51. Zhang, G.; Zhang, Z.; Wan, Q.; Zhou, H.; Jiao, M.; Zheng, H.; Lu, Y.; Rao, S.; Wu, G.; Chen, J.; et al. Selection and Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Gene Expression in *Nicotiana benthamiana* upon Single Infections by 11 Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses from Four Genera. *Plants* 2023, *12*, 857.
52. Liu, D.; Shi, L.; Han, C.; Yu, J.; Li, D.; Zhang, Y. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS ONE* 2012, *7*, e46451.
53. Baek, E.; Yoon, J.-Y.; Palukaitis, P. Validation of reference genes for quantifying changes in gene expression in virus-infected tobacco. *Virology* 2017, *510*, 29–39.
54. Chi, C.; Shen, Y.; Yin, L.; Ke, X.; Han, D.; Zuo, Y. Selection and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis in *Vigna angularis* Using Quantitative Real-Time RT-PCR. *PLoS ONE* 2016, *11*, e0168479.
55. Lilly, S.T.; Drummond, R.S.; Pearson, M.N.; MacDiarmid, R.M. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011, *24*, 294–304.
56. Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M.K.; Scheible, W.-R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005, *139*, 5–17.
57. Migocka, M.; Papierniak, A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol. Breed.* 2011, *28*, 343–357.
58. Rajput, V.D.; Harish; Singh, R.K.; Verma, K.K.; Sharma, L.; Quiroz-Figueroa, F.R.; Meena, M.; Gour, V.S.; Minkina, T.; Sushkova, S.; et al. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 2021, *10*, 267.
59. Chen, J.; Mohan, R.; Zhang, Y.; Li, M.; Chen, H.; Palmer, I.A.; Chang, M.; Qi, G.; Spoel, S.H.; Mengiste, T.; et al. NPR1 Promotes Its Own and Target Gene

- Expression in Plant Defense by Recruiting CDK8. *Plant Physiol.* 2019, *181*, 289–304.
60. Taj, G.; Agarwal, P.; Grant, M.; Kumar, A. MAPK machinery in plants: Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal. Behav.* 2010, *5*, 1370–1378.
  61. Xu, G.; Greene, G.H.; Yoo, H.; Liu, L.; Marqués, J.; Motley, J.; Dong, X. Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature* 2017, *545*, 487–490.
  62. Li, Y.; Li, Q.; Beuchat, G.; Zeng, H.; Zhang, C.; Chen, L.Q. Combined analyses of transcriptome and transcriptome in *Arabidopsis* reveal new players responding to magnesium deficiency. *J. Integr. Plant Biol.* 2021, *63*, 2075–2092.
  63. Yanguuez, E.; Castro-Sanz, A.B.; Fernandez-Bautista, N.; Oliveros, J.C.; Castellano, M.M. Analysis of genome-wide changes in the transcriptome of *Arabidopsis* seedlings subjected to heat stress. *PLoS ONE* 2013, *8*, e71425.
  64. Karimi, M.; Inzé, D.; Depicker, A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002, *7*, 193–195.
  65. Sparkes, I.A.; Runions, J.; Kearns, A.; Hawes, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* 2006, *1*, 2019–2025.
  66. Diamos, A.G.; Rosenthal, S.H.; Mason, H.S. 5' and 3' Untranslated Regions Strongly Enhance Performance of Geminiviral Replicons in *Nicotiana benthamiana* Leaves. *Front. Plant Sci.* 2016, *7*, 200.
  67. Fakih, Z.; Ahmed, M.B.; Letanneur, C.; Germain, H. An unbiased nuclear proteomics approach reveals novel nuclear protein components that participates in MAMP-triggered immunity. *Plant Signal. Behav.* 2016, *11*, e1183087.
  68. Howden, A.J.M.; Stam, R.; Martinez Heredia, V.; Motion, G.B.; Ten Have, S.; Hodge, K.; Marques Monteiro Amaro, T.M.; Huitema, E. Quantitative analysis of the tomato nuclear proteome during *Phytophthora capsici* infection unveils regulators of immunity. *New Phytol.* 2017, *215*, 309–322.
  69. Ayash, M.; Abukhalaf, M.; Thieme, D.; Proksch, C.; Heilmann, M.; Schattat, M.H.; Hoehenwarter, W. LC-MS Based Draft Map of the *Arabidopsis thaliana* Nuclear Proteome and Protein Import in Pattern Triggered Immunity. *Front. Plant Sci.* 2021, *12*, 744103.
  70. Palm, D.; Simm, S.; Darm, K.; Weis, B.L.; Ruprecht, M.; Schleiff, E.; Scharf, C. Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol.* 2016, *13*, 441–454.
  71. Diaz-Albiter, H.; Mitford, R.; Genta, F.A.; Sant'Anna, M.R.; Dillon, R.J. Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PLoS ONE* 2011, *6*, e17486.
  72. Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2014, *2*, 53.
  73. Chang, M.; Chen, H.; Liu, F.; Fu, Z.Q. PTI and ETI: Convergent pathways with diverse elicitors. *Trends Plant Sci.* 2022, *27*, 113–115.

74. Backer, R.; Naidoo, S.; van den Berg, N. The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and Related Family: Mechanistic Insights in Plant Disease Resistance. *Front. Plant Sci.* 2019, *10*, 102.
75. Adams, D.R.; Ron, D.; Kiely, P.A. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun. Signal.* 2011, *9*, 22.
76. Rabl, J.; Leibundgut, M.; Ataide, S.F.; Haag, A.; Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* 2011, *331*, 730–736.
77. Giavalisco, P.; Wilson, D.; Kreitler, T.; Lehrach, H.; Kloese, J.; Gobom, J.; Fucini, P. High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Mol. Biol.* 2005, *57*, 577–591.
78. Volta, V.; Beugnet, A.; Gallo, S.; Magri, L.; Brina, D.; Pesce, E.; Calamita, P.; Sanvito, F.; Biffo, S. RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol. Life Sci.* 2013, *70*, 1439–1450.
79. Thompson, M.K.; Rojas-Duran, M.F.; Gangaramani, P.; Gilbert, W.V. The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *eLife* 2016, *5*, e11154.
80. Georgieva, M.; Vassileva, V. Stress Management in Plants: Examining Provisional and Unique Dose-Dependent Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, *24*, 5105.
81. Zhang, H.; Zhao, Y.; Zhu, J.-K. Thriving under Stress: How Plants Balance Growth and the Stress Response. *Dev. Cell* 2020, *55*, 529–543.
82. Hummel, M.; Dobrenel, T.; Cordewener, J.J.; Davanture, M.; Meyer, C.; Smeekens, S.J.; Bailey-Serres, J.; America, T.A.; Hanson, J. Proteomic LC-MS analysis of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes: Identification of ribosomal protein paralogs and re-annotation of the ribosomal protein genes. *J. Proteom.* 2015, *128*, 436–449.
83. Hershey, J.W.; Sonenberg, N.; Mathews, M.B. Principles of translational control: An overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, *4*, a011528.
84. Shcherbik, N.; Pestov, D.G. The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: From Injury to Regulation. *Cells* 2019, *8*, 1379.
85. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell* 2009, *136*, 731–745.
86. Roy, B.; von Arnim, A.G. Translational Regulation of Cytoplasmic mRNAs. *Arab. Book* 2013, *11*, e0165.
87. Merchante, C.; Stepanova, A.N.; Alonso, J.M. Translation regulation in plants: An interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant J.* 2017, *90*, 628–653.
88. Browning, K.S.; Bailey-Serres, J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arab. Book/Am. Soc. Plant Biol.* 2015, *13*, e0176.
89. Tal, M.; Weissman, I.; Silberstein, A. A new method for stoichiometric analysis of proteins in complex mixture—Reevaluation of the stoichiometry of *E. coli* ribosomal proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1990, *21*, 247–266.
90. Shen, J.J.; Chen, Q.S.; Li, Z.F.; Zheng, Q.X.; Xu, Y.L.; Zhou, H.N.; Mao, H.Y.; Shen, Q.; Liu, P.P. Proteomic and metabolomic analysis of *Nicotiana benthamiana* under dark stress. *FEBS Open Bio* 2022, *12*, 231–249.

91. Salih, K.; Duncan, O.; Li, L.; O'Leary, B.; Fenske, R.; Troesch, J.; Millar, A. Impact of oxidative stress on the function, abundance and turnover of the *Arabidopsis* 80S cytosolic ribosome. *Plant J.* 2020, *103*, 128–139.
92. Sengupta, J.; Nilsson, J.; Gursky, R.; Spahn, C.M.; Nissen, P.; Frank, J. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, *11*, 957–962.
93. Link, A.J.; Eng, J.; Schieltz, D.M.; Carmack, E.; Mize, G.J.; Morris, D.R.; Garvik, B.M.; Yates, J.R., 3rd. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 1999, *17*, 676–682.
94. Nilsson, J.; Sengupta, J.; Frank, J.; Nissen, P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: A platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* 2004, *5*, 1137–1141.
95. Ron, D.; Chen, C.H.; Caldwell, J.; Jamieson, L.; Orr, E.; Mochly-Rosen, D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, *91*, 839–843.
96. Su, J.; Xu, J.; Zhang, S. RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends Plant Sci.* 2015, *20*, 405–407.
97. Núñez, A.; Franco, A.; Madrid, M.; Soto, T.; Vicente, J.; Gacto, M.; Cansado, J. Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 2009, *20*, 3996–4009.
98. Rahman, M.A.; Fennell, H.; Ullah, H. Receptor for Activated C Kinase1B (OsRACK1B) Impairs Fertility in Rice through NADPH-Dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, *23*, 8455.
99. Nakashima, A.; Chen, L.; Thao, N.P.; Fujiwara, M.; Wong, H.L.; Kuwano, M.; Umemura, K.; Shirasu, K.; Kawasaki, T.; Shimamoto, K. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* 2008, *20*, 2265–2279.
100. Chen, J.G.; Ullah, H.; Temple, B.; Liang, J.; Guo, J.; Alonso, J.M.; Ecker, J.R.; Jones, A.M. RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2006, *57*, 2697–2708.
101. Shirasu, K.; Schulze-Lefert, P. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: Protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* 2003, *8*, 252–258.
102. Jalmi, S.; Sinha, A. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Front. Plant Sci.* 2015, *6*, 769.
103. Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 2004, *9*, 490–498.
104. Fennell, H.W.W.; Ullah, H.; van Wijnen, A.J.; Lewallen, E.A. *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* receptor for activated C kinase 1 (RACK1) mediated signaling pathway shows hypersensitivity to oxidative stress. *Plant Gene* 2021, *27*, 100299.
105. Zhou, S.; Cao, H.; Zhao, Y.; Li, X.; Zhang, J.; Hou, C.; Ma, Y.; Wang, Q. RACK1 promotes hepatocellular carcinoma cell survival via CBR1 by suppressing TNF- $\alpha$ -induced ROS generation. *Oncol. Lett.* 2016, *12*, 5303–5308.

106. Saelee, N.; Tonganunt-Srithaworn, M.; Wanna, W.; Phongdara, A. Receptor for Activated C Kinase-1 protein from *Penaeus monodon* (Pm-RACK1) participates in the shrimp antioxidant response. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011, *49*, 32–36.

## Supplementary material



**Figure S1:** Graphical representation of siRNA from targets (in blue) and off-targets (in red), suggesting the best construct predicted (in yellow) and allowing us to define a custom construct using the VIGS tool;





Genevestigator v.3. using a meta-analysis tool and (e) the localization of deregulated RPS within the *Arabidopsis* 80S ribosome upon stress conditions. The visualization outlines mapped the upregulated RPS in response to cold stress, INA treatment, and biotic stress compared to control conditions. For the mapping, PyMOL visualization software was used to obtain a surface representation and to highlight proteins with significant changes. Red indicates RP families with increased transcripts following the three types of stress and purple indicates RP families with increased transcripts following either the biotic or elicitor treatment. Pink and blue represent RP families with increased transcript abundances following biotic and cold stress conditions, respectively;

**Table S1:** List of the primer used to test the expression of the RPS in *N. benthamiana*;

RPSaA-F	CTTGGTGGTGATTGGTCTAGC
RPSaA-R	CATCTCCAGTCCAGCCACT
RPS5A-F	AGTGCCCAATTGTTGAGAGG
RPS5A-R	TGACGGCATCAACAATGACT
RPS9-F	TGAGGAAGCTAAAAGCACACG
RPS9-R	TACCGACGCATGACATTAGG
RPS10B-F	ATTAATCGATGTGCCGAACC
RPS10B-R	CCAGTAGTAGTGCATCCAAGC
RPS10C-F	GAATATCGATGTGCCGAACC
RPS10C-R	GCCGTCATTGGTCAGATACC
RPS12C-F	TCATGGTGGGTTAGTAAAGG
RPS12C-R	TAGTCTGGTTGGTCGCAGTC
RPS16C-F	ATTCGCGGGAGTGGACAT
RPS16C-R	GAAAGCAACAAGTGCCTTAGC
RPS17D-F	ACCCTTGACATGCTTTCAGC
RPS17D-R	TTCCTCCAAAACCTCCTG
RPS19c-F	CTGC AAGAGCAGTGGTTCAG
qRT-PCR RPS19c-R	CTGCATTCCTCCATTTTCATTC
RPS20A-F	GCACAAAATACATGGGACAGG
RPS20A-R	CAATGGTGACCTCAACCTCA
RPS21C-F	CCAACAGGGTGATCACTTCA
RPS21C-R	CACGGATGAAACCACAGAGA
RPS23B-F	GATTGCTGGATTGGTCGAA
RPS23B-R	TCTCCTGAAGAGAGCCAAGA
RPS24A-F	GATCCAAATGCCATCTTTGTG
RPS24A-R	TCAACCTGTA CTGGGCTCAT
RPS27D-F	GCCAGCAGATGTTGAAAAGA
RPS27D-R	GGTTGGCACA AACTGTCTG
RACK1A-F	GCCATTTGCTCAAGACGTT
RACK1A-F	ACGGACACATGAAACCAAT
ACTINE2-IT	TGTCAGCAACTGGGATGAC
ACTINE2-IG	GTTGCTTGGGGTTAAGT
UBI3-F	AATGTGAAAGCCAAGATCCAAG
UBI3-R	CGGAGCGGAGCAGAGATGAA
ACTINE-F	TCCTGATGGGCAAGTGATTAC
ACTINE-R	TTGTATGTGGTCTCGTGGATT
EF1a-F	AGCTTACCTCCAAGTCATC
EF1a-R	AGAAGCCTGTCAATCTTGG

**Table S2:** *N. benthamiana* r-proteins, their size distribution (in amino acids, aa) and homologies to *A. thaliana*;

Family	A. thaliana r-protein gene	A. thaliana r-Count	N. benthamiana r-proteins	aa-length	Similarity % to A. thaliana	Count	
Sa	AT1G72370, AT3G04770	280-332	2	0000191g0119, NbS00000191g0	279-316	84.1-97.7	2
S5	AT2G37270, AT3G11940	207-207	2	00003570g0008, NbS00009842gC	206-294	83.9-99.5	2
S24	AT3G04920, AT5G28060	112-133	2	00004, NbS00009468g0012, NbS0	119-133	81.6-100.0	3
S27	AT3G61110, AT3G61111,	82-86	4	NDSUUU14158gUUU2, NbS00020875g0028, NbS00009043g0009	85-109	76.9-97.5	4
RACK1	At1g080, At1g48630, At3g18	310-328	3	00017092g0006, NbS00035760gC	320-330	76.18-83.96	5

**Table S3:** List of the primers used in the VIGS;

<b>RPSaA-202 F</b>	<b>GAGAAAGCTTGTGGACCTCTTCTTCTACAGA</b>
<b>RPSaA-202R</b>	<b>GAGAGGTACCCATCTCCAGTCCAGCCACT</b>
<b>RPS5A- 156F</b>	<b>GAGAAAGCTTAGTGCCCAATTGTTGAGAGG</b>
<b>RPS5A-156R</b>	<b>GAGAGGTACCTGACGGCATCAACAATGACT</b>
<b>RPS24A- 140F</b>	<b>GAGAAAGCTTGCTGAGTTGAAAGAGAAATTGG</b>
<b>RPS24A-140R</b>	<b>GAGAGGTACCTTAGCGTTCTCAACAGAGTC</b>
<b>RPS27D-125 F</b>	<b>GAGAAAGCTTACCCTTGACATGCTTTCAGC</b>
<b>RPS27D-125R</b>	<b>GAGAGGTACCTTCCTCCCAAACCTCCTG</b>
<b>RACK1A-281F</b>	<b>GAGAAAGCTTGCCATTTTCGTTCAAGACGTT</b>
<b>RACK1A-281-R</b>	<b>GAGAGGTACCACGGACACATGAAACCCAAT</b>

**Table S4:** List of the primers used to test the silencing of RPS by qRT-PCR;

<b>RPSAa-F</b>	<b>GTGGACCTCTTCTTCTACAGA</b>
<b>RPSAa-R</b>	<b>CTCCATCTCCAGTCCAGC</b>
<b>RT-RPS5A</b>	<b>AGTGCCCAATTGTTGAGAGG</b>
<b>RT-RPS5A</b>	<b>TGACGGCATCAACAATGACT</b>
<b>RT-RPS24</b>	<b>GCTGAGTTGAAAGAGAAATTGGCAA</b>
<b>RT-RPS24</b>	<b>CCTGATCAACCTGTACTTGGG</b>
<b>RT-RPS27I</b>	<b>ACCCTTGACATGCTTTCAGC</b>
<b>RT-RPS27I</b>	<b>TTCCTCCCAAACCTCCTG</b>
<b>RT-RACK1A</b>	<b>TCATTTACTGCACCTGTTTGAGC</b>
<b>RT-RACK1A</b>	<b>TAATAACGCCCAATTCCCCATAC</b>
<b>ACTINE -F</b>	<b>TGGTCGTACCACCGGTATTGTGTT</b>
<b>ACTINE-R</b>	<b>TCACTTGCCCATCAGGAAGCTCAT</b>
<b>EF1a-F</b>	<b>ACGTGAGCGTGGTATCACCATT</b>
<b>EF1a-R</b>	<b>ATCAGGACAGCACAGTCAGCTT</b>

**Table S5:** List of the primers used in P35s-5'UTR constructs for gateway cloning.

---

<b>35S-F</b>	<b>GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTGGT</b> CGACTAGAATAGTAAATTGTAATGTTG
<b>35S-R</b>	GACTAGAGCCAAGCTGATC
<b>F-BOX-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCTCATTTTTTTTAAACATTTAAAATTTAAATTA AAAAAAATCC
<b>F-BOX-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> GGTTTCGATTGAACAGAGCAA
<b>PP2A-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCATTATACTGGACTAATTTCTATTGTAATAACAT
<b>PP2A-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TCTCTCGAGTTTTTGTACAGC
<b>GAPDH-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCTAGTCGGATTAATGAATTTGGAATAGT
<b>GAPDH-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TGTTCTTTTTAGAAATGCAGCAG
<b>CAT-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCTGTGCTTTCTTTAAACTCTTTTCC
<b>CAT-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TAGTTGCCTTTCTTTTGCTTGA
<b>POX-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCGTTTGAAATTGTCAAGAATAAATCAGG
<b>POX-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> ATTTGTTTTTTATTTCTATTAGGTAGATAATAACT
<b>APX-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCCACAAAAATCCAACACATAACAAA
<b>APX-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> AGAAATTGCTCTGAAGAAACTGC
<b>DHN-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCGAGGCCACGTCGATGTC
<b>DHN-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TTTTTTTTCAATCAAAAACAAAGAAAAAC
<b>MAPK3-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCATATTAGTTTAATAAGTTGTTAATGAGGAAAGAC
<b>MAPK3-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TTTGAAGAGCAGTAAACCCTAGA
<b>NPR1-F</b>	GATCAGCTTGGCTCTAGTCATTTATTTAAACTCTTATGGTAATTCAATTTCA
<b>NPR1-R</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</b> TACATAAAGCCGCTTACATAAG

---

Le **chapitre III** contient une étude qui montre que 4 parmi nos 5 candidats des protéines ribosomales de la petite sous-unité présentés dans le chapitre II (RPSaA, RPS5A, RPS24A, RPS27D) sont associées à la petite sous-unité des ribosome assemblés 80S des plantes induites pour la défense par un analogue de l'acide salicylique (INA).

## CHAPITRE III

### **Specific alterations in riboproteomes composition of isonicotinic acid treated arabidopsis seedlings.**

**Zainab Fakh**, Mélodie B. Plourde, Charlène Eugénie Tomi Nkouankou, Victor Fourcassié, Sylvie Bourassa, Arnaud Droit, and Hugo Germain

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique qui a été publié en anglais dans la revue *Plant Molecular Biology* le 15 février 2023. La référence de cet article est la suivante:

**Fakh Z**, Plourde MB, Nkouankou CET, Fourcassié V, Bourassa S, Droit A, Germain H. Specific alterations in riboproteomes composition of isonicotinic acid treated arabidopsis seedlings. *Plant Mol Biol.* 2023 Mar;111(4-5):379-392. doi: 10.1007/s11103-022-01332-2. Epub 2023 Feb 15. PMID: 36790538; PMCID: PMC10090002.

#### **3.1 Contributions des auteurs**

Zainab Fakh et Hugo Germain ont effectué la conception de l'étude et la méthodologie; Zainab Fakh a effectué la réalisation des expérimentations, l'analyse des données ainsi que l'écriture de la première ébauche du manuscrit. L'analyse des échantillons par

spectrométrie de masse a été réalisée par nos collaborateurs à la Plateforme de Protéomique du Centre de Recherche du CHU de Québec, soit Victor Fourcassié, Sylvie Bourassa et Arnaud Droit. Le graphique présenté à la figure 2.a et 2.b a été réalisé par ces mêmes collaborateurs. Toutes les autres figures, graphiques et tableaux présentés ont été réalisés par Zainab Fakhri. Hugo Germain est le directeur de recherche du laboratoire. Il a supervisé le projet, contribué au design expérimental, a révisé et participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu les subventions pour l'étude. Mélodie B. Plourde a contribué à la révision du manuscrit. Tous les auteurs ont lu le manuscrit et participé à la version finale de celui-ci.

### 3.2 Résumé de l'article

Les plantes ont développé des stratégies pour faire face à la grande variété de défis auxquels elles sont exposées. Parmi celles-ci, les cibles communes sont la régulation de la transcription et de la traduction pour moduler les niveaux de protéines lors de stress biotiques et abiotiques. De plus en plus, des preuves suggèrent que les ribosomes sont des structures moléculaires modulaires hautement adaptables qui se remodelent pour s'adapter aux contraintes. Chez *Arabidopsis thaliana*, chaque ribosome est constitué d'environ 81 protéines ribosomales (PR) distinctes, chacune étant codée par deux à sept gènes. Pour identifier les protéines ribosomales de la petite sous-unité (RPS) et de la grande sous-unité (RPL) ainsi que les protéines associées aux ribosomes, nous avons analysé par spectrométrie de masse (LC/MS/MS) des ribosomes immunopurifiés de feuilles d'*A. thaliana* traitées à l'acide isonicotinique (INA), un inducteur de l'immunité innée des plantes. Nous avons quantifié un total de 2084 protéines. Cent- soixante-cinq protéines associées aux ribosomes ont montré une abondance accrue tandis que cinquante-deux étaient moins abondantes dans le riboprotéome des plantes induites pour la défense par INA. Sur les 52 protéines ribosomales de la petite sous-unité (RPS) identifiées (sur une possibilité de 104 gènes codant), 15 ont été dérégulées. De même, sur les 148 protéines de la grande sous-unité (RPL) possibles, 80 ont été détectées et 9 ont été dérégulées. Nos résultats ont révélé des candidats potentiels impliqués dans l'immunité innée qui pourraient être des cibles intéressantes pour des études de génomique fonctionnelle.

### **3.3 Article complet (anglais): Differential participation of plant ribosomal proteins from the small ribosomal subunit in protein translation under stress**

#### **Abstract**

Plants have developed strategies to deal with the great variety of challenges they are exposed to. Among them, common targets are the regulation of transcription and translation to finely modulate protein levels during both biotic and abiotic stresses. Increasing evidence suggests that ribosomes are highly adaptable modular supramolecular structures which remodel to adapt to stresses. Each *Arabidopsis thaliana* ribosome consists of approximately 81 distinct ribosomal proteins (RPs), each of which is encoded by two to seven genes. To investigate the identity of ribosomal proteins of the small subunit (RPS) and of the large subunit (RPL) as well as ribosomes-associated proteins, we analysed by LC/MS/MS immunopurified ribosomes from *A. thaliana* leaves treated with isonicotinic acid (INA), an inducer of plant innate immunity. We quantified a total of 2084 proteins. 165 ribosome-associated proteins showed increased abundance while 52 were less abundant. Of the 52 identified RPS (from a possibility of 104 encoding genes), 15 were deregulated. Similarly, from the 148 possible RPL, 80 were detected and 9 were deregulated. Our results revealed potential candidates involved in innate immunity that could be interesting targets for functional genomic studies.

#### **Introduction**

Plants are exposed to a variety of abiotic and biotic stresses which induce numerous adverse effects and eventually reduce growth, development, and overall productivity (Pandey et al. 2017; Verma et al. 2013). Depending on the external stimuli, pathogen lifestyles, and infection strategies, plants have developed multiple defense tactics to respond to these adverse conditions, leading to a massive reprogramming of the cell. Studies on pathogen-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) have shown that significant transcriptome and proteome changes occur during plant defense (Jones et al. 2004, 2006). Various factors can affect the correlation between mRNA



transcripts and proteins levels such as different half-lives of mRNAs and proteins, mRNA structural features e.g. 5'cap m<sup>7</sup>GpppN, translation enhancer in the poly(A), internal ribosomal entry sites (IRESs) promoting cap-independent translation, hairpins and upstream open reading frames (uORFs) affecting translation of the main open reading frame, protein–RNA interactions and ribosome occupancy (Fütterer and Hohn 1996; Haider and Pal 2013; Merchante et al. 2017; Schwanhäusser et al. 2011).

Previously viewed as a passive mediator catalyzing protein synthesis from messenger RNA, ribosomes are now considered to be dynamic macromolecular complexes with specialized roles in the cell (Genuth and Barna 2018). *Arabidopsis thaliana* ribosomes are composed of the 40S subunit, consisting of the 18S rRNA and 33 ribosomal proteins (RPs), while the 60S subunit contains three rRNA (25S, 5.8S, and 5S) and 48 RPs. Those 81 distinct RPs are encoded by a total of 252 genes; thus, each RP is encoded by two to seven paralogous genes, with an average of three (Barakat et al. 2001; Carroll et al. 2008). Most RP genes are expressed preferentially at different developmental points, in different cell types, or under different conditions (Carroll et al. 2008). This differential expression between gene families as well as within specific ribosomal gene families points to ribosome heterogeneity, which includes the absence of specific RPs from the canonical ribosome structure, RP paralogs exchange, rRNAs sequence variation and posttranscriptional modifications, RPs posttranslational modifications, and possibly additional variations of the ribosome-associated proteome (Browning and Bailey-Serres 2015). Furthermore, different ribosome types could preferentially translate specific subsets of mRNAs and thus regulate protein synthesis under particular cell conditions (Giavalisco et al. 2005; Li and Wang 2020). Functionally specialized ribosomes would appear after a specific cue to shape an acclimated proteome (Ferretti and Karbstein 2019; Genuth and Barna 2018; Martinez-Seidel et al. 2020a, b).

The objective of the present study is to provide insights into the riboproteome when the plant defense response to biotic stress is induced by isonicotinic acid (INA), an analog of salicylic acid (SA). Using label-free relative quantitation proteomics, we quantified *A. thaliana* ribosomal and ribosome-associated proteins and identified 217 differentially

expressed proteins. Out of the 252 ribosomal proteins annotated in TAIR10, 24 were differentially accumulated in *Arabidopsis* leaves following INA treatment. The 5' upstream region of all RP genes was also assessed *in silico* for the presence of cis elements. Our results demonstrate the ability of this approach to address the dynamic nature of the riboproteome and suggest that specialized ribosomes or certain ribosomal proteins might be required during the defense response.

## **Materials and methods**

### **Plant growth conditions and INA treatment**

Transgenic *A. thaliana* plants expressing FLAG-RPL18 were obtained from Professor Peter Moffett (Université de Sherbrooke, Qc, Canada). The seeds were grown in soil (AgroMix), in a growth chamber after a stratification period of 48 h at 4 °C. The plant growth chamber was maintained at 22 °C, 60% relative humidity, and with a 14 h/10 h light/dark cycle. INA was used to induce plant defense as it was shown to induce a response similar to salicylic acid and pathogen infection (Conrath et al. 1995). 4-week-old plants were sprayed to imminent runoff with an aqueous solution of 0.65 mM INA containing 0,05% Sylgard 309 surfactant, whereas mock treatment consisted of only the Sylgard 309 aqueous solution, leaf tissues were harvested 24 h after being sprayed with INA as previously described (Cheng et al. 2009).

### **Gene expression analysis**

Gene expression analysis was performed on RNA extracted from 4-week-old soil-grown plants using the Genezol Total RNA kit (Geneaid) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and quantified by spectrophotometry. 1 µg of each sample was reverse transcribed into cDNA with the M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs Canada). Quantitative RT-PCR amplification was done on a CFX Connect detection system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, On, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Bioline). 100 ng cDNA

template and 0.4  $\mu\text{M}$  of each primer (listed in Supplementary Table 1) were used in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ . The qRT-PCR thermal profile was 95  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min, 40 cycles of 95  $^{\circ}\text{C}$  for 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  for 10 s, and 72  $^{\circ}\text{C}$  for 5 s. The data were analyzed with CFX Maestro qPCR software. *Atlg13320* was used as a reference gene since it was previously demonstrated to be amongst the most stable genes in Arabidopsis (Czechowski et al. 2005) and was also used as a reference gene in a similar study (Vos et al. 2015). The expression level of each gene was calculated according to the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method. Three technical replicates for each treatment were analyzed.

### **Ribosome immunopurification**

Leaves from three independent batches of transgenic FLAG-RPL18B *A. thaliana* plants were sprayed with INA and collected after 24 h for ribosome purification. Ribosomes were isolated using the previously published protocol (Zanetti et al. 2005) with minor modifications. Frozen, pulverized leaf tissue ( $\sim 2.5$  g) was mixed with two volume of polysome extraction buffer [(PEB); 200 mM Tris-HCl (pH 9.0), 200 mM KCl, 36 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM EGTA, 1 mg/ml heparin, 1 mM DTT, 50  $\mu\text{g/ml}$  cycloheximide, 50  $\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol, 2% (v/v) Triton X-100, 2% (v/v) Tween 40, 2% (w/v) Brij-35, 2% (v/v) NP-40, 2% (v/v) polyoxyethylene (10) tridecyl ether and 1% (w/v) sodium deoxycholate] and incubated for 30 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  with gentle rotation. Homogenates were clarified by two consecutive centrifugations at 16,000xg for 10 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The supernatants were incubated with 100  $\mu\text{l}$  (packed volume) of buffer-equilibrated anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich, USA) for 2 h at 4  $^{\circ}\text{C}$  with gentle agitation. The beads were washed three times with 1 ml of wash buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 mM KCl, 25 mM EGTA pH 8.0, 36 mM  $\text{MgCl}_2$ ) at 4  $^{\circ}\text{C}$ , then five times with 50 mM ammonium bicarbonate buffer and stored at -80  $^{\circ}\text{C}$ . The beads were sent on dry ice to the Proteomics platform of the Centre hospitalier universitaire de Québec, where they were further processed.

## Sample preparation for mass spectrometry

Proteins were on-beads digested using 0.1  $\mu\text{g}$  of modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega, Madison, WI) in 50 mM ammonium bicarbonate for 5 h at 37 °C. Digestion was stopped with 5% formic acid (FA) and peptides were eluted from the beads with 60% acetonitrile (ACN) + 0.1% FA. The tryptic peptides were desalted on a C18 stage tip, lyophilized, re-dissolved in 10  $\mu\text{l}$  LC loading solvent and peptides quantities were estimated with 205 nm absorbance (Nanodrop, Thermo Scientific). Peptide samples (1  $\mu\text{g}$ ) were injected and separated using a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific) connected to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  in loading solvent (2% acetonitrile, 0.05% TFA) on a 5 mm x 300  $\mu\text{m}$  C18 PepMap cartridge (Thermo Fisher Scientific) for 5 min. Then, the pre-column was switched online with a 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  internal diameter separation column (PepMap Acclaim column, ThermoFisher) and the peptides were eluted with a linear gradient from 5 to 40% solvent B (A: 0.1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) for 90 min at 300  $\text{nl}/\text{min}$ . Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Thermo XCalibur software version 4.1.50. Full scan mass spectra (350 to 1800  $m/z$ ) were acquired in the orbitrap using an AGC target of  $4e5$ , a maximum injection time of 50 ms and a resolution of 120 000. Internal calibration using lock mass on the  $m/z$  445.12003 siloxane ion was used. Each MS scan was followed by acquisition of fragmentation MSMS spectra of the most intense ions for a total cycle time of 3 s (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer with 1.6  $m/z$  windows and fragmented by Higher energy Collision-induced Dissociation (HCD) with 35% of collision energy. The resulting fragments were detected by the linear ion trap in rapid scan rate with an AGC target of  $1e4$  and a maximum injection time of 50 ms. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 30 s and a tolerance of 10 ppm.

## Protein identification and data analysis

Mass spectra were searched against the *A. thaliana* protein sequence database (Uniprot Arabidopsis thaliana UP000006548 version of August 24, 2020) using the search engine Andromeda integrated into the MaxQuant software (version 1.6.10.43) assuming the digestion enzyme trypsin. Carbamidomethyl cysteine and methionine oxidation or acetylation were set as fixed and variable modifications, respectively. For protein validation, a false discovery rate (FDR) of 1% was allowed at peptide and protein level based on a target/decoy search. Text files generated by MaxQuant were analysed using the R software (version 4.0.4). For data processing, only MaxQuant normalized LFQ intensities from the proteinGroups.txt file were considered. Decoy proteins and potential contaminants were excluded from the analysis. For each sample, a noise value corresponding to the 0.01 percentile of all LFQ intensities of said sample was calculated. This noise value was imputed when an intensity value was missing from a sample. Only proteins which presented intensity values (not noise imputed value) in 100% of the replicates of one group were considered as quantifiable proteins and kept for further analysis. Among these, only proteins identified with at least two razor unique peptides were kept for analysis. Outputs from individual runs (2 treatments, 6 purifications) were merged and filtered in Excel and multiple hits were removed to obtain the number of distinct proteins. The average LFQ intensity value from each experimental condition was calculated for each protein, then the values of the INA treated samples were divided by those of control samples. The Limma statistical test was performed to determine the probability value (*P*-value) and the Benjamini Hochberg adjusted probability value (*q*-value) of variation for each protein. Significant change between treated and untreated plants was conservatively defined as absolute  $\log_2$  value of fold change  $\geq 1.5$  and *q*-value  $< 0.05$  as previously described and with at least 2 unique peptides. Proteins were divided into ribosomal proteins and potential ribosome-associated proteins based on the annotations, and RPs were further subdivided into RPS and RPL proteins. Mass spectrometry data and relative quantitation results are publicly available on the MassiVE repository (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) with the identifier MSV000089714.

## Visualization of RP localization

The RP localization was visualized using PyMol software (<http://www.pymol.org>). To the best of our knowledge, the wheat structure is the currently most complete and adequate, high-resolution plant cytosolic ribosome structure in the PDB database and represents the current canonical structure model of plant 80S ribosomes. Given that a high-resolution structure of the mature, translating Arabidopsis cytosolic ribosome has yet to be made publically available, the *Triticum aestivum* 80S ribosomal structure published by Armache et al. 2010b was used as reference for our visualizations (PDB ID 4v7e). Using protein BLAST comparisons, Martinez-Seidel et., 2020 verified the RP identity of Arabidopsis RP. Homologs of the protein entries linked to the macromolecular Crystallographic Information Files (mmCIF) of the wheat 80S structure model. The Arabidopsis RPs are adequately matched to the wheat RPs mapped in the 80S structure model.

## 5' upstream region analysis

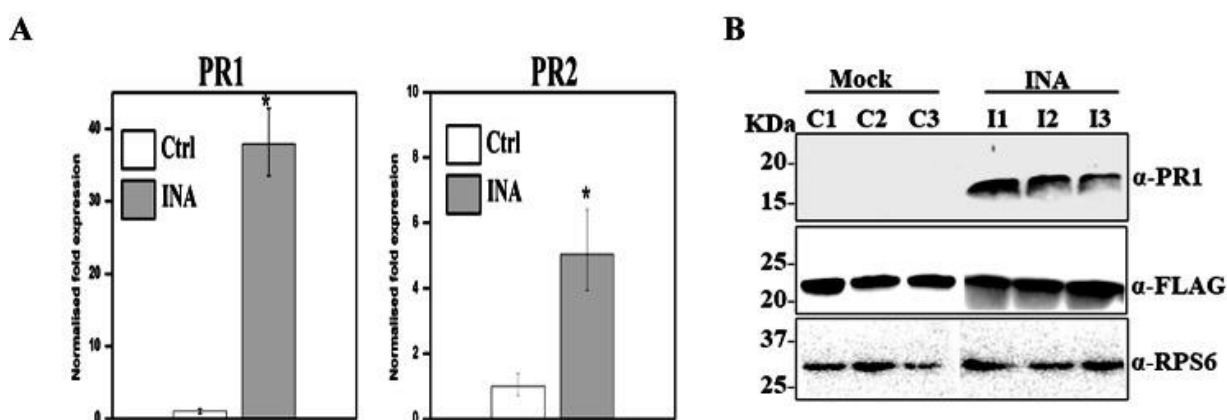
Since 24 ribosomal proteins (RP) exhibited differential expression following INA treatment, we checked for the presence of putative cis elements in the 5' upstream region of the RP genes using an *in silico* approach. We considered only the 5' upstream region and did not include introns to compare more homogenous data since several ribosomal gene are intronless (Supplementary Table 2). The nucleotide sequence of the 5' upstream region of each of the RPS genes was submitted to PlantCARE (Cis-Acting Regulatory Elements) Database<sup>10</sup> (Dhadi et al. 2009; Ding et al. 2011) to identify regulatory elements. We also compared the 5' upstream region of some of the significant deregulated RP genes in other databases, such as PlantPAN 3.0, and found functional similarity with the PlantCare database.

## Results

### Ribosome enrichment following immunity activation.

To assess the efficiency of SA defense pathway induction, we quantified the mRNA levels of two reporter genes, *PR1* and *PR2* (pathogenesis related protein). It has been

shown that exogenous application of SA, or of one of its functional analogs (2,6-dichloroisonicotinic acid [INA]) can activate *PR* gene expression and resistance in plants without pathogen inoculation. PRs possess antimicrobial activity and are thought to contribute to the broad-spectrum resistance (Ali et al. 2018; Chandrashekar et al. 2018). 24 h post-INA treatment, both *PR1* and *PR2* were upregulated by 37.9- and 5-fold respectively (Fig. 1 A). We also detected PR1 protein accumulation in extracts of INA treated tissues but not in untreated leaves (Fig. 1B). The affinity purification of ribosomes was performed using FLAG-tagged large ribosomal protein RPL18, which has successfully been used in studies of the *Arabidopsis* transcriptome and proteome (Eskelin et al. 2019; Hummel et al. 2012; Meteignier et al. 2017; Zanetti et al. 2005) and RPL18-FLAG level was assessed prior to immunoprecipitation (Fig. 1B). The presence of small ribosomal proteins was verified by western blotting of the small subunit ribosomal protein RPS6 in the mock and treated samples (Fig. 1B).



**Figure 1. Ribosome enrichment following immunity activation.** (A) qRT-PCR analysis of INA-induced *PR1* and *PR2* expression. *At1G13320* was used as the reference gene. The error bars represent  $\pm$  SD (n=3). The asterisks represent a significant difference between treated and mock-treated samples. \**P-values* < 0.01, Student's *t*-test. (B) Western blot analysis of ribosome enriched protein extracts of untreated and INA-treated leaf tissues of the FLAG-RPL18 transgenic *A. thaliana* line. Top panel: PR1 accumulation in INA samples, middle panel: FLAG-RPL18, bottom panels: detection of the small subunit protein RPS6.

## The riboproteome is deregulated by INA treatment

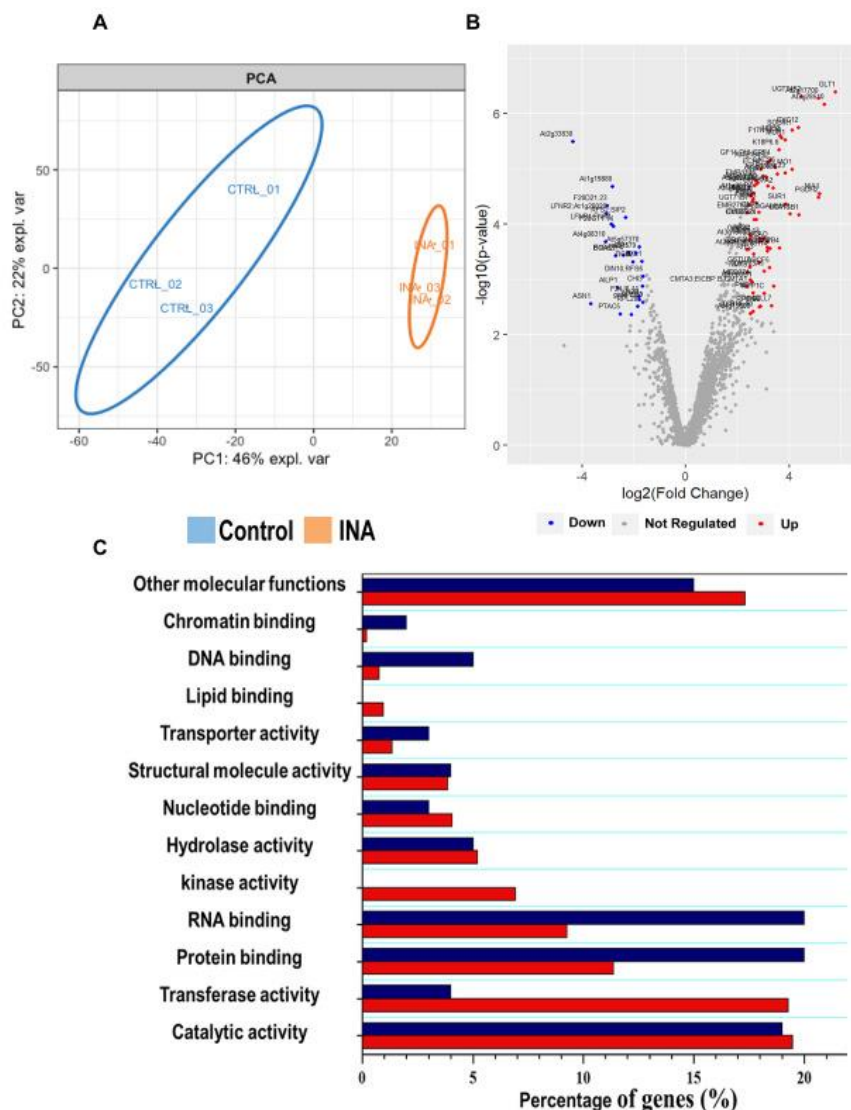
A total of 2813 proteins were detected in the ribosome preparations from INA treated and control plants (Figure S1). 2376 proteins were detected in all biological replicates of at least one experimental condition and were thus considered as quantifiable proteins. Among these, 2084 proteins were identified with at least two razor unique peptides and kept for the analysis (Figure S1; Table S3). The presence of non-ribosomal proteins was examined in the combined data of all samples, revealing 1882 distinct non-ribosomal proteins identified on the basis of unique peptides (Table S4). Many non-ribosomal proteins important for translation regulation, such as elongation factors (At1g30230, At3g18760), ribosome assembly factors (At1g25260) and ribosome biogenesis proteins (AT1G52930) were found to associate with ribosomes.

To globally present the variation between the INA treated and control ribosomal preparations, a Principal Component Analysis (PCA) was performed using  $\log_2$  transformed normalized protein intensities with noise-imputed missing values. In this plot (Fig. 2A), the INA-treated and control samples are clearly separated. The biological replicates from each treatment clustered together, indicating that the variance between the replicates is much smaller than between treatments.

We next sought to assess and quantify the dynamic changes occurring in the riboproteome as a consequence of plant immunity induction with INA. All proteins for which label-free relative quantitation (LFQ) data was available in both treated and control samples, and across all three biological replicates in one of the two conditions, were analysed to identify significant changes in protein abundance (Table S5). These analyses identified 165 proteins with increased abundance and 52 proteins with reduced levels in treated samples (Fig. 2B). Detailed differential abundance ratios are shown in supplementary Figure S2 and Table S5. To identify processes that may be perturbed during the induction of plant immunity, we examined the predicted functions of the affected proteins. Gene ontology (GO) terms associated with catalytic activity, hydrolase activity, nucleotide binding and structural molecule activity were highly ranked in proteins that both increased and decreased in abundance upon induction (Fig. 2C). In addition, proteins annotated with transferase activity and kinase activity were highly ranked in proteins which increased in abundance during treatment, while RNA binding and protein binding were



among the top GO terms for downregulated proteins (Fig. 2C). These data allowed us to determine the average protein composition of the ribosome population (the 60S subunit and intact 80S ribosomes, as well as large polysomes) and its associated proteins and evaluate relative differences in the Arabidopsis riboproteome.



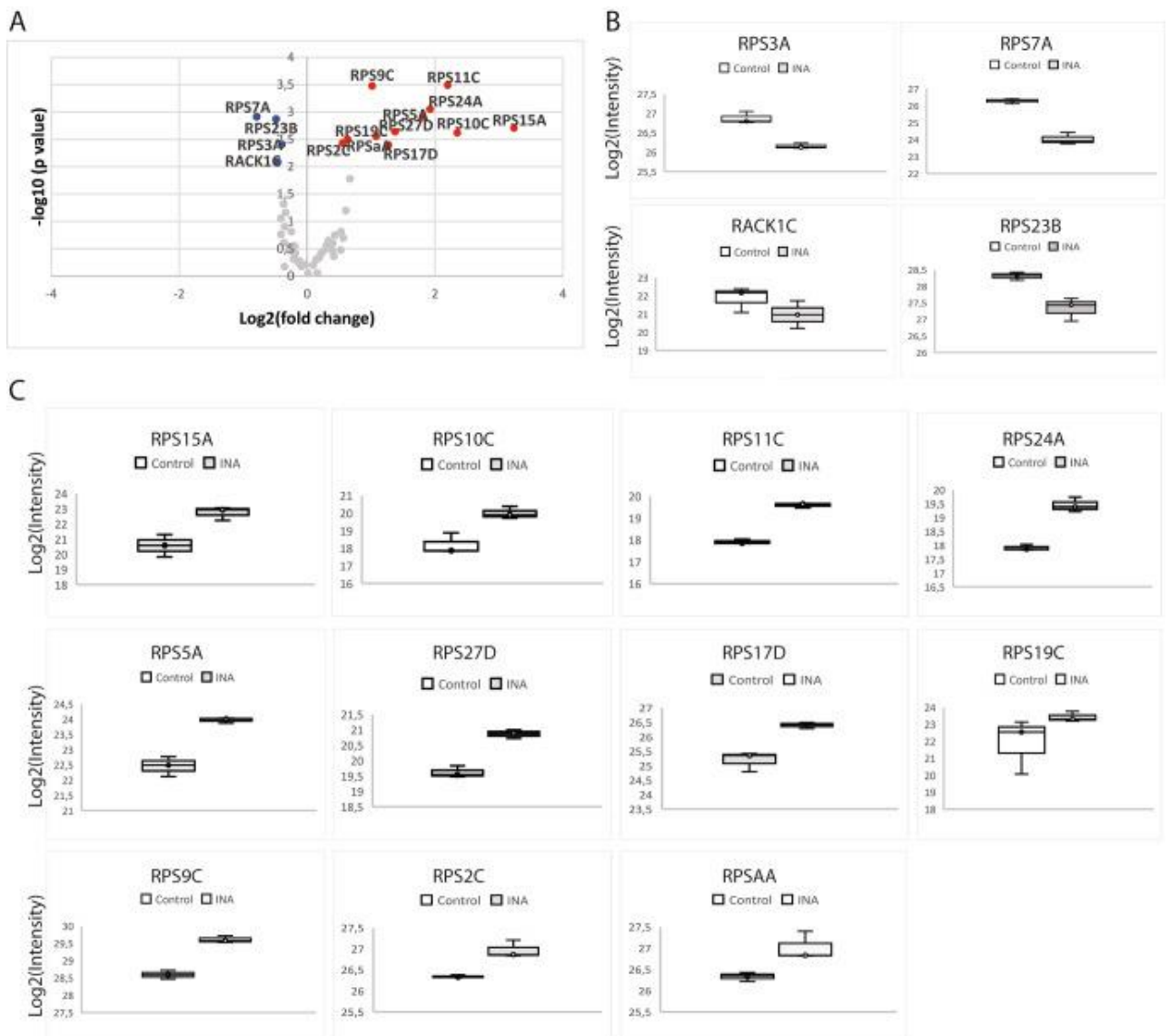
**Figure 2. The riboproteome is deregulated by INA treatment.** (A) PCA of all the mass spectra matched peaks obtained from immunopurified ribosomal preparations of INA treated and control leaves. Ellipses encircle biological replicates. (B) Volcano plot of the deregulated proteins. Significant deregulation was set as an absolute  $\log_2$  value of fold

change  $\geq 1.5$  and a  $q$ -values  $< 0.05$ . (C) GO functional analysis of the deregulated proteins, retrieved using the PANTHER Classification System.

### **Small subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatment**

We next examined the presence of the 40S small subunit proteins (RPS) in our ribosomal enriched samples, since the immunoprecipitation was performed with FLAG-tagged RPL18, we can safely assumed that detected RPS proteins were part of ribosome comprising the small and large ribosomal subunit. Notably, our approach identified 52 distinct RPS from 30 of the 33 families (Table 1; Table S5) and 50% of the 104 genes encoding RPS were identified in all replicates. Within the filtered LC-MS/MS data, we did not have hits for RPS12, RPS21 and RPS29 but one unique peptide for RPS21B, RPS21C and RPS29A were detected in the raw data (Table S3).

Relative quantitation proteomic profile analysis showed that 15 proteins of the small subunit were differentially accumulated in response to INA treatment (Fig. 3A). Among them, 4 RPS were downregulated (Fig. 3B) and 11 RPS were upregulated (Fig. 3C). Fold-change of these 15 RPS are also represented as a heat map (Table S7). These results show that the 40S subunit composition changes drastically in response to INA treatment. Interestingly, as can be seen in Fig. 3, among the detected proteins, only one protein per family, and not their paralogs, is affected by INA treatment. Among the 15 deregulated RPS, all the paralogous proteins of families RPSa, RPS2, RPS3, RPS5, RPS24 and RACK1 were detected, whereas not all members were detected for the remaining 9 families. The most strongly deregulated proteins are presented in Fig. 3. To visualize the spatial distribution and location within the 80S ribosome, the increased and decreased RP families were mapped onto the representation of the 80 S wheat monosome applying different color codes to the significantly changed RP families (Fig. 4). For the mapping, PyMOL visualization software was used to obtain a surface representation and to highlight proteins with significant changes. By choice of rotations, emphasis was given to the proteins that are visible from either the interface- or solvent-sides. These data indicate that specific ribosomal protein paralogs incorporation into ribosomes is differentially regulated in response to INA and suggest that some RPS may play an important role in the stress response.

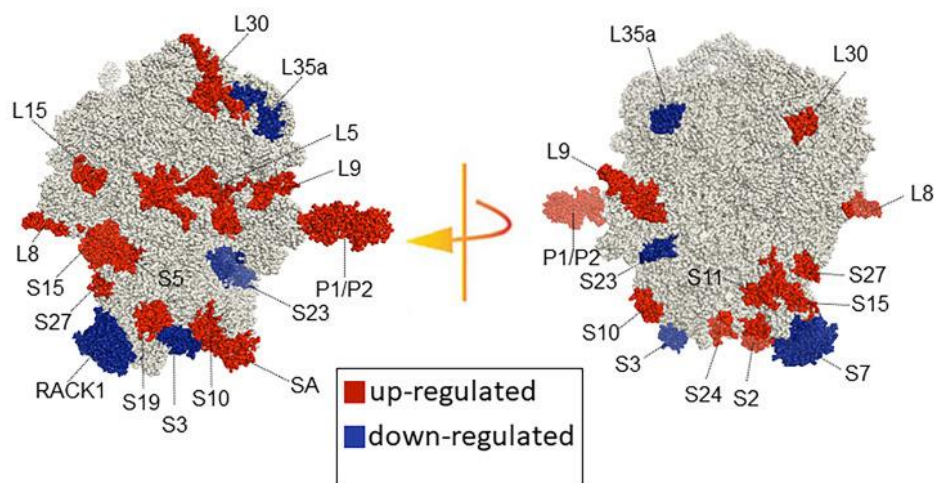


**Figure 3. Small subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatment**  
 (A) Volcano plots of deregulated RPS: downregulated in blue and upregulated in red. Significant deregulation was set as an absolute  $\log_2$  value of fold change  $\geq 1.5$  and a  $q$ -values  $< 0.05$  (B, C) Box plots showing the differences and replicate distribution of replicates for each statistically significant downregulated (B) and upregulated proteins (C).

**Table 1. RPS detected by MS analysis in this study**

Family	AGI code	Name	MW (kD)	Razor unique peptides
<b>S1A</b>	At1g72370	<b>RPSaA</b>	32.3	8
	At3g04770	RPSaB	30.7	4
<b>S2</b>	At1g58380	RPS2A	30.7	8
	Q93VB8	RPS2B	30.8	4
	At2g41840	<b>RPS2C</b>	30.9	12
<b>S3</b>	At2g31610	<b>RPS3A</b>	27.5	15
	At3g53870	RPS3B	27.3	2
	At5g35530	RPS3C	27.5	4
<b>S3a</b>	At3g04840	RPS3aA	29.9	22
	At4g34670	RPS3aB	29.8	8
<b>S4</b>	At2g17360	RPS4A	30.1	3
	At5g07090	RPS4B	29.9	16
<b>S5</b>	At2g37270	<b>RPS5A</b>	23.0	9
	At3g11940	RPS5B	29.9	6
<b>S6</b>	At4g31700	RPS6A	28.4	5
	At5g10360	RPS6B	28.1	13
<b>S7</b>	Q9C514	<b>RPS7A</b>	21.9	9
	At5g16130	RPS7C	22.1	12
<b>S8</b>	At5g20290	RPS8A	24.1	9
<b>S9</b>	At5g15200	RPS9B	23.0	13
	At5g39850	<b>RPS9C</b>	23.2	10
<b>S10</b>	At4g25740	RPS10A	19.4	3
	At5g52650	<b>RPS10C</b>	19.8	3
<b>S11</b>	At3g48930	RPS11A	18.0	3
	At5g23740	<b>RPS11C</b>	17.7	2
<b>S13</b>	At3g60770	RPS13A	17.0	11
<b>S14</b>	At2g36160	RPS14A	16.3	12
<b>S15</b>	At1g04270	<b>RPS15A</b>	17.1	8
	At5g09500	RPS15C	16.7	6
	At5g09510	RPS15D	17.1	2
<b>S15a</b>	At1g07770	RPS15aA	14.8	6
<b>S16</b>	At5g18380	RPS16C	16.6	9
<b>S17</b>	At5g04800	<b>RPS17D</b>	16.0	4
<b>S18</b>	At1g22780	RPS18A	17.5	7
<b>S19</b>	At5g15520	RPS19B	15.8	9
	At5g61170	<b>RPS19C</b>	15.7	9
<b>S20</b>	At3g45030	RPS20A	13.1	4
<b>S23</b>	At5g02960	<b>RPS23B</b>	16.2	6
<b>S24</b>	At3g04920	<b>RPS24A</b>	15.4	9
	At5g28060	RPS24B	15.4	3
<b>S25</b>	At2g21580	RPS25B	12.1	8

	At4g34670	RPS25D	12.1	2
	At4g39200	RPS25E	12.1	5
<b>S26</b>	At3g56340	RPS26C	14.6	5
<b>S27</b>	At3g61110	RPS27B	9.5	3
	At5g47930	<b>RPS27D</b>	9.5	2
<b>S27a</b>	At1g23410	RPS27aA	17.7	7
<b>S28</b>	At3g10090	RPS28A	7.4	2
<b>S30</b>	At2g19750	RPS30A	6.9	3
<b>RACK1</b>	At1g18080	RACK1A	35.7	10
	At1g48630	RACK1B	35.8	2
	At3g18130	<b>RACK1C</b>	35.8	5



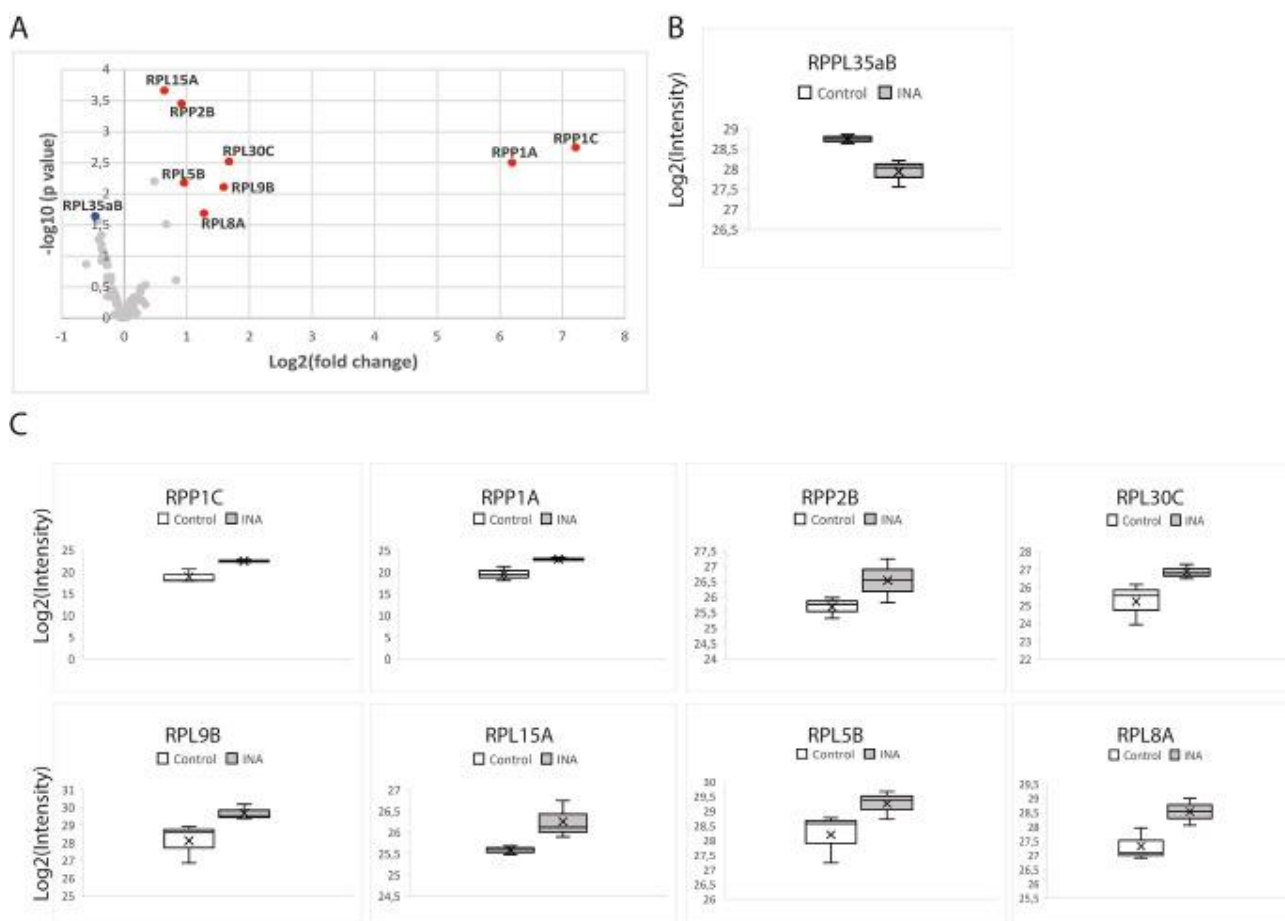
**Figure 4. RP remodeling potential of Arabidopsis 80S ribosomes upon INA treatment.**

The visualization outlines mapped changed protein abundances in response to INA treatment compared to control conditions. Proteomic data were statistically evaluated across individual paralogs within RP families as reported in Supplementary Table S4 and mapped to the wheat 80S monosome used as reference (Armache et al. 2010). Homology of wheat and Arabidopsis RP families was confirmed by protein BLAST matching (Martinez-Seidel et al. 2020a, b). Red and blue represent RP families with increased (red) or decreased (blue) protein abundances of at least one of the RP paralogs. The paralog identities and specific protein changes are reported in Figures 3 and 5.

## Large subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatment

We next investigated how INA treatment affects the 60S large subunit proteins (RPL) in the purified samples. Out of the 148 genes encoding large subunit proteins annotated in TAIR10, 80 distinct proteins (Table 2; Table S8) (from 43 families out of a possibility of 48) were found. Members of families RPP3, RPL23a, RPL29, RPL40 and RPL41 were not detected (Tables S3 and S8). When we looked for these proteins in the non-filtered LC-MS/MS data, we found a few RPP3 and RPL23a hits with one unique peptide, but no hits for RPL29, RPL40 nor RPL41. In *Arabidopsis*, RPL41 (a lysine- and arginine-rich 25 amino acids long protein) is currently the only RP that has not been detected by proteomic approaches (Hummel et al., 2015), probably because its tryptic digestion generates peptides that are too small to be detected by LC-MS/MS.

Using the criteria listed above, a total of 9 RPL were differentially accumulated in the large subunit of ribosomes in response to INA treatment, one protein had reduced levels (Fig. 5B) while 8 had an increased abundance (Fig. 5C), fold-change of these RPL is also represented as a heat map (Table S9). Among these more abundant proteins, induction of RPP1C and RPP1A was more pronounced than the other 6: RPL30C, RPL9B, RPL8A, RPL5B, RPP2B and RPL15A (Fig. 5C). Interestingly, among the detected proteins, only one protein per family is changing in response to INA treatment except for the RPP1 family, for which 2 paralogs are deregulated. These data indicate that the 60S RP composition changes in response to isonicotinic acid treatment. PyMOL visualization software was used to obtain a surface representation and to highlight proteins with significant changes (Fig. 4).



**Figure 5. Large subunit ribosomal protein levels change in response to INA treatments.** (A) Volcano plots of deregulated RPS: downregulated in blue and upregulated in red. Significant deregulation was set as an absolute log<sub>2</sub> value of fold change  $\geq 1.5$  and a q-values  $< 0.05$  (B, C) Box plots showing the differences and replicate distribution of replicates for each statistically significant downregulated (B) and upregulated proteins (C).

**Table 2. RPL detected by MS analysis in this study**

Family	AGI code	Name	MW (kD)	Razor unique peptides
<b>P0</b>	At3g09200	RPP0B	34.1	15
	At3g11250	RPP0C	34.4	2
<b>P1</b>	At1g01100	<b>RPP1A</b>	11.2	2
	At5g47700	<b>RPP1C</b>	11.2	3
<b>P2</b>	At2g27720	RPP2A	11.4	5
	At2g27710	<b>RPP2B</b>	11.4	9
<b>L3</b>	At1g43170	RPL3A	44.6	33
	At1g61580	RPL3B	44.5	12

<b>L4</b>	At3g09630	RPL4A	44.7	11
	At5g02870	RPL4B	44.7	26
<b>L5</b>	At5g39740	<b>RPL5B</b>	34.4	17
<b>L6</b>	At1g18540	RPL6A	26.2	24
	At1g74050	RPL6B	26.0	12
<b>L7</b>	At2g01250	RPL7B	28.1	26
	At2g44120	RPL7C	28.5	9
<b>L7a</b>	At3g13580	RPL7D	28.4	5
	At2g47610	RPL7aA	29.1	2
	At3g62870	RPL7aB	29.0	15
<b>L8</b>	At2g18020	<b>RPL8A</b>	27.9	2
	At4g36130	RPL8C	27.9	15
<b>L9</b>	At1g33120	RPL9A	22.0	16
	At1g33140	<b>RPL9B</b>	22.0	16
	At4g10450	RPL9D	22.0	5
<b>L10</b>	At1g14320	RPL10A	24.9	3
	At1g66580	RPL10C	24.1	14
<b>L10a</b>	At1g08360	RPL10aA	24.3	5
	At2g27530	RPL10aB	24.3	2
<b>L11</b>	At2g42740	RPL11A	20.9	7
<b>L12</b>	At2g37190	RPL12A	18.0	5
<b>L13</b>	At3g49010	RPL13B	18.6	23
	At5g23900	RPL13C	18.6	10
	At3g07110	RPL13aA	23.5	11
<b>L13a</b>	At3g24830	RPL13aB	23.5	15
	At4g13170	RPL13aC	23.6	2
	At5g48760	RPL13aD	23.6	7
	At2g20450	RPL14A	15.5	7
<b>L14</b>	At4g27090	RPL14B	15.5	15
	At4g16720	<b>RPL15A</b>	24.2	12
<b>L17</b>	At1g67430	RPL17B	19.9	10
<b>L18</b>	At3g05590	RPL18B	20.9	22
	At5g27850	RPL18C	20.9	7
	At1g29965	RPL18aA	21.4	2
<b>L18a</b>	At2g34480	RPL18aB	21.3	17
	At3g14600	RPL18aC	21.3	9
	At4g16030	RPL19A	24.6	19
<b>L19</b>	At1g02780	RPL19B	24.3	8
	At3g16780	RPL19C	23.3	7
	At1g57660	RPL21E	18.7	14
<b>L22</b>	At3g05560	RPL22C	14.0	5
<b>L23</b>	At2g33370	RPL23B	15.0	9
<b>L24</b>	At3g53020	RPL24C	18.6	5
<b>L26</b>	At3g49910	RPL26A	16.9	12
	At5g67510	RPL26B	16.8	10
	At3g22230	RPL27B	15.6	2
<b>L27</b>	At4g15000	RPL27C	15.6	4
	At1g70600	RPL27aC	16.5	7
<b>L28</b>	At2g19730	RPL28A	15.9	4
<b>L30</b>	At4g29410	RPL28B	15.9	7
	At1g36240	RPL30A	12.3	2
	At3g18740	<b>RPL30C</b>	12.3	2
<b>L31</b>	At4g26230	RPL31B	13.8	4
	At5g56710	RPL31C	13.8	4
<b>L32</b>	At4g18100	RPL32A	15.5	11
	At5g46430	RPL32B	14.5	2
<b>L34</b>	At1g26880	RPL34A	13.7	4
	At1g69620	RPL34B	13.7	6
	At3g28900	RPL34C	13.6	3

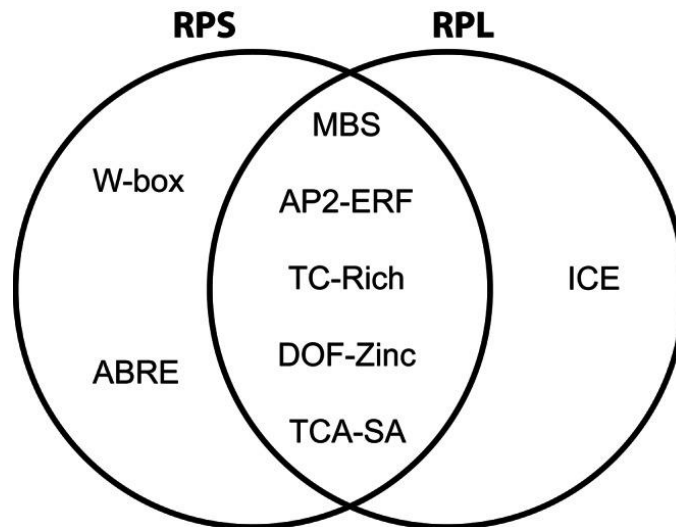


<b>L35</b>	At2g39390	RPL35A	14.3	17
	At3g55170	RPL35C	14.2	3
	At5g02610	RPL35D	14.3	11
<b>L35a</b>	At1g07070	RPL35aA	12.9	3
	At1g41880	<b>RPL35aB</b>	12.8	6
<b>L36</b>	At5g02450	RPL36C	12.2	9
<b>L36a</b>	At3g23390	RPL36aA	12.1	6
<b>L37</b>	At1g52300	RPL37B	10.8	3
<b>L37a</b>	At3g10950	RPL37aB	10.4	2
<b>L38</b>	At2g43460	RPL38A	8.1	5
<b>L39</b>	At2g25210	RPL39A	6.4	2

### 5' upstream analysis of deregulated RPs

Our proteomic study showed that many RPS and RPL are differentially accumulated in the ribosome following INA treatment. To elucidate whether this differential accumulation pattern correlates with the presence of stress or signal-responsive elements in their regulatory regions, we analysed the nucleotide sequences 1 kb upstream of the genes coding for all RP using the PlantCARE and PlantPAN databases. Because several RPs are intronless (Table S2), we only considered the 5' upstream region for this analysis. This analysis identified multiple stress-responsive elements, distributed in two groups according to their functions: hormone-responsive elements (HREs) and defence/stress-responsive elements (DSREs). Interestingly, both the salicylic acid (SA)-responsive element (TCA-motif) and the abscisic acid (ABA)-responsive elements (ABRE) were enriched in the 5' upstream regions of the 11 RPS genes showing modified accumulation following INA treatment (P-values < 0.05; Supplementary Table S10). In addition, the SA-responsive element was also enriched in the 5' upstream regions of the 8 RPL genes with increased accumulation following INA treatment (P-values < 0.05; Supplementary Table S11). Similarly, all the INA-upregulated RPs have 5' upstream regions enriched an abiotic responsiveness element (AP2 domain), the dehydration stress responsive element (MBS), a defence and stress-responsive element (TC-rich repeats) and the DOF domain enriched in their (P-values < 0.05; Supplementary Table S10, S11). Interestingly, all the RPS with increased abundance showed enrichment of a fungal elicitor-responsive element (W Box) in their 5' upstream regions (P-values < 0.05; Supplementary Table S10). All the stress responsive cis-acting elements are presented in Table S12. Altogether, our analysis demonstrates that a total of seven and six responsive elements are significantly enriched in

the 5' upstream region of the INA regulated RPS and RPL respectively, whilst five of them are common between the RPS and RPL (Fig. 6).



**Figure 6.** Venn diagram showing the regulatory elements enriched in the 5' upstream region of the INA-deregulated ribosomal proteins.

## Discussion

In order to adapt to stress conditions, plants have evolved complex signaling mechanisms implicating various molecular changes to establish appropriate responses. Since protein translation is an energetically demanding process, stress can cause a global drop of protein synthesis (Matsuura et al. 2010; Muñoz and Castellano 2012). However, some proteins are still synthesized during stress to enable cells to tolerate the stress conditions more effectively (Holcik and Sonenberg 2005). In such context, regulation of the identity of some components of the ribosomal subunits may be key to the plant survival under stress conditions (Bailey-Serres et al. 2009; Hummel et al. 2012; Merchante et al. 2017; Solano-De la Cruz et al. 2019). Furthermore, Arabidopsis ribosomes are extensively heterogeneous, each individual RP being encoded by two to seven paralogous genes (Weis et al. 2015). With that in mind, it is interesting to speculate that ribosomal protein composition specializes in response to external stimuli to enable the plant adaptation to specific conditions. To address this hypothesis, we immunoprecipitated FLAG-tagged

ribosomes followed by protein identification and relative quantitation by LC-MS/MS. This approach allowed us to characterize the abundance of core RP in the Arabidopsis ribosome. Our proteomic characterization shows that the majority of RPs encoded by *A. thaliana* are present in the riboproteome. 24 ribosomal proteins (15 RPS and 9 RPL) out of 252 RP-encoding genes showed a significant change in their abundance in response to defense activation. Our results agree with those reported by Hummel et al. (2012), who concluded that different ribosomal protein paralogs are incorporated into the ribosomes depending on growth conditions.

We used untargeted proteomic to address riboproteome (encompassing ribosomal proteins and ribosome-associated proteins) modulation in the context of plant immune activation. Following INA treatment and immunoprecipitation, a total of 1882 non-ribosomal proteins were detected (Table S3). Of those, more than a quarter (508) were only observed following INA treatment, indicating an important rearrangement in ribosome-associated protein following immunity stimulation. These included several proteins with a known link to immunity such as VASCULAR ASSOCIATED DEATH-1 (Lorrain et al. 2004), HSP90 (Huang et al. 2014), PR5 (Zeidler et al. 2004), IMP- $\alpha$  (Palma et al. 2005), BIG and CCT2 (Meteignier et al. 2017). As translational activity and regulation are not solely accomplished by ribosomal protein and require a plethora of accessory proteins, these may represent elements required to fine tune translation in response to stresses.

In eukaryotes, the small subunit of the ribosome makes first contact with the mRNA prior to assembly with the large ribosomal subunit to constitute a translation-competent ribosome. As such, the small subunit is involved in the selection of the mRNAs to be translated and the identity of the ribosomal proteins within the small subunit could impact the identity of the recruited mRNAs. In addition to their crucial roles in translation, specific ribosomal proteins of the small subunit (RPS) are known to play vital roles in abiotic stress and plant-pathogen interactions. In the present study, 11 RPS had increased abundance following the INA treatment (RPS15A, RPS10C, RPS11C, RPS24A, RPS5A, RPS27D, RPS17D, RPS19C, RPS9C, RPS2C and RPSaA, Fig. 3). For some of these RPS, variation in their mRNA levels in response to external stimuli has been previously reported in several plant species. Indeed, the transcript levels of RPS15A, the most deregulated RPS in our data, increased significantly in Arabidopsis in response to oxidative stress (Saha et al.

2017). Similarly, in the transcriptome of vanilla infected with *Fusarium oxysporum f. sp. vanillae*, differential expression of RPSaA, RPS5A, RPS17D and RPS24A was observed (Solano-De la Cruz et al. 2019), these four RPS are also being upregulated in our riboproteome. In addition, it has been documented that RPS are induced in response to stress in *Oryza sativa*. RPS9C and 19C are among the early responsive genes upregulated under salt stress (Kawasaki et al. 2001), both were also increased in our data. The transcript of some RPS genes accumulated at remarkably high levels ( $\geq 100$  fold) under drought stress (RPS9C, RPS17D, RPS19C, RPS27D) or under oxidative stress (RPS9C) (Saha et al. 2017); all of these RPS accumulated in our dataset. RPS gene expression was also studied in response to biotic stress in rice. *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* and *Rhizoctonia solani*, pathogens that respectively cause very serious Bacterial Leaf Blight and Sheath Blight diseases in rice, induced the upregulation of RPS10C (29 fold), RPS9C (18 fold), and RPS5A (14 fold) (Saha et al. 2017), and in our data these same RPS accumulated in response to INA treatment. These reports point toward a differential expression of RPS genes in response to stress treatments leading to a differential accumulation of RPS in the ribosomal apparatus, which might help subunit remodeling and selective translation to cope up with unfavorable conditions.

Interestingly, disease and stress resistance functions of RPL have been reported in recent years. Silencing of *RPL12*, *RPL19*, *RPL30* and *RPL10* in *Nicotiana benthamiana* or *Arabidopsis thaliana* compromised nonhost disease resistance against multiple bacterial pathogens (Nagaraj et al. 2015; Ramu et al. 2020); of those, only RPL30C was deregulated in our experiment. In the present study, 8 RPL showed increased abundance following INA treatment. Figure 5 shows the resulting changes in RPP1C, RPP1A, RPL30C, RPL9B, RPL8A, RPL5B, RPP2B and RPL15A. Several reports focused on stress induced differential expression of these RPL. Induction of RPL30C with 60S acidic RP was reported in vanilla infected by *Fusarium oxysporum f. sp. vanillae* (Solano-De la Cruz et al. 2019). Similarly, the transcript levels of RPL30C increased significantly in response to phytohormones in *Arabidopsis* and in response to oxidative stress in rice (Cherepneva et al. 2003). In our data, we observed a 2,7 fold increased accumulation of RPL30C. In rice, under MeJa and SA treatments, RPL8A showed upregulation up to 100 fold, whereas we observed a 2-fold upregulation of RPL8A. Microarray of rice response to *Xanthomonas*

*oryzae pv. oryzae* revealed that RPL15 was up-regulated more than 10 fold (Moin et al. 2016), while we observed a 1,6-fold increased accumulation of RPL15A.

The enrichment in common cis-regulatory elements in the 5' upstream region of RPS and RPL genes (TCA-motifs, AP2 domain, MBS, TC-rich repeats, and DOF domain) suggests that variation in accumulation is the result of transcriptional changes. As discussed above, the observed changes in riboproteome composition can mostly be explained by higher mRNA levels leading to higher accumulation of ribosomal protein.

While there is evidence of ribosomes with varying composition, there is little understanding of how the cell regulates ribosome heterogeneity. It can occur in part during ribosome biogenesis, a complex process taking place in the nucleolus and involving association of ribosomal proteins with rRNA to constitute the ribosomal subunits. Previous studies have measured differential ribosomal protein levels in the nucleus following immunity elicitation (Ayash et al. 2021; Bae et al. 2003; Fakhri et al. 2016; Howden et al. 2017). We previously reported that some ribosomal proteins were overrepresented in the nucleus after chitosan elicitor treatment (RPSaA, RPS5A, RPS9C, RPS10C, RPS11C, RPS17D, RPS19C, RPS24A, RPS27D and RPL30C) (Fakhri et al. 2016). RPS5A and RPS11C were also found to have a significant change in their abundance in the *Arabidopsis* nucleus during PTI (Ayash et al. 2021). In tomato (*Solanum lycopersicum*), five RPS (RPSaA, RPS5A, RPS10C, RPS17D and RPS19C) were more abundant in the nucleus during infection by the oomycete pathogen *Phytophthora capsici* (Howden et al. 2017). These reports support a probable role of RPs during the plant immune response. Additionally, switching between RPs which are assembled onto the pre-ribosomal subunits in the nucleolus is possible before the new ribosomes are functional (Genuth and Barna 2018).

In summary, the findings of this study open new and interesting avenues for research in ribosome composition during biotic and abiotic stress. The mass spectrometry approach used here detected a total of 52 RPS and 80 RPL of which 15 and 9 were deregulated respectively. However, a number of ribosomal proteins were undetected. It is possible that they were undetected because they were at an abundance level below the detection threshold of the mass spectrometer or because of technical reason. We cannot exclude that these undetected proteins were not deregulated. In addition, one limitation of the approach

used in our study is that it is not possible to state if the co-IPs in both treatments have the same amount of free versus translating ribosomes. While the conclusions drawn for the RPL could be affected by this fact, the ones for the RPS should not, since if RPS can be immunoprecipitated using RPL18-FLAG these have to be from assembled ribosomes. Our study expands our molecular knowledge of the ribosomal proteins and ribosome-associated proteins and highlights the importance of studying the function of individual RPs paralogs by genetic analysis of ribosomal protein mutants to clarify their roles in response to stresses. Future work will be aimed at unraveling the specific mechanisms by which RPs affects the plant defense.

**Supplementary information:** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11103-022-01332-2>

### **Author Contributions**

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Zainab Fakhri, Charlene Eugénie Tomi Nkouankou, Victor Fourcassié and Sylvie Bourassa. The first draft of the manuscript was written by Zainab Fakhri and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Funding**

This work was supported by a Canada Research Chair and NSERC Discovery grant to HG, respectively CRC-2017-103 and RGPIN/4002-2020.

### **Data availability**

All raw proteomic data is available at: MassiVE repository (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) with the identifier MSV000089714.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## References

Ali S, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Chandrashekar N, Yadav P, Rawat S, Sultana M, Grover A. Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene PR1 and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech*. 2018;8:1–14. doi: 10.1007/s13205-017-1027-8.

Armache J-P, Jarasch A, Anger AM, Villa E, Becker T, Bhushan S, Jossinet F, Habeck M, Dindar G, Franckenberg S (2010) Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:19754–19759

Ayash M, Abukhalaf M, Thieme D, Proksch C, Heilmann M, Schattat MH, Hoehenwarter W (2021) LC–MS based draft map of the *Arabidopsis thaliana* Nuclear Proteome and Protein Import in Pattern Triggered immunity. *Frontiers in Plant Science* 12

Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J*. 2003;36:652–663. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01907.x. [

Bailey-Serres J, Sorenson R, Juntawong P. Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci*. 2009;14:443–453. doi: 10.1016/j.tplants.2009.05.004.

Barakat A, Szick-Miranda K, Chang I-F, Guyot R, Blanc G, Cooke R, Delseny M, Bailey-Serres J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol*. 2001;127:398–415. doi: 10.1104/pp.010265.

Browning KS, Bailey-Serres J (2015) Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *The Arabidopsis book*/American Society of Plant Biologists 13

Carroll AJ, Heazlewood JL, Ito J, Millar AH. Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol Cell Proteom.* 2008;7:347–369. doi: 10.1074/mcp.M700052-MCP200.

Chandrashekar N, Ali S, Grover A. Exploring expression patterns of PR-1, PR-2, PR-3, and PR-12 like genes in Arabidopsis thaliana upon Alternaria brassicae inoculation. *3 Biotech.* 2018;8:1–10. doi: 10.1007/s13205-018-1259-2.

Cheng YT, Germain H, Wiermer M, Bi D, Xu F, García AV, Wirthmueller L, Després C, Parker JE, Zhang Y, Li X. Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2009;21:2503–2516. doi: 10.1105/tpc.108.064519.

Cherepneva G, Schmidt K-H, Kulaeva O, Oelmüller R, Kusnetsov V. Expression of the ribosomal proteins S14, S16, L13a and L30 is regulated by cytokinin and abscisic acid: implication of the involvement of phytohormones in translational processes. *Plant Sci.* 2003;165:925–932. doi: 10.1016/S0168-9452(03)00204-8.

Conrath U, Chen Z, Ricigliano JR, Klessig DF (1995) Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:7143–7147

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2005;139:5–17. doi: 10.1104/pp.105.063743. [

Dhadi SR, Krom N, Ramakrishna W. Genome-wide comparative analysis of putative bidirectional promoters from rice. *Arabidopsis and Populus Gene.* 2009;429:65–73.



Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) *J Exp Bot.* 2011;62:3563–3573. doi: 10.1093/jxb/err046

Eskelin K, Varjosalo M, Ravantti J, Mäkinen K. Ribosome profiles and riboproteomes of healthy and Potato virus A-and Agrobacterium-infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol Plant Pathol.* 2019;20:392–409. doi: 10.1111/mpp.12764.

Fakih Z, Ahmed MB, Letanneur C, Germain H. An unbiased nuclear proteomics approach reveals novel nuclear protein components that participates in MAMP-triggered immunity. *Plant Signal Behav.* 2016;11:e1183087. doi: 10.1080/15592324.2016.1183087.

Ferretti MB, Karbstein K. Does functional specialization of ribosomes really exist? *RNA.* 2019;25:521–538. doi: 10.1261/rna.069823.118.

Fütterer J, Hohn T (1996) Translation in plants—rules and exceptions. *Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants* 159–189

Genuth NR, Barna M. The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Mol Cell.* 2018;71:364–374. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.018.

Giavalisco P, Wilson D, Kreitler T, Lehrach H, Klose J, Gobom J, Fucini P. High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Mol Biol.* 2005;57:577–591. doi: 10.1007/s11103-005-0699-3.

Haider S, Pal R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr Genom.* 2013;14:91–110. doi: 10.2174/1389202911314020003.

Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:318–327. doi: 10.1038/nrm1618

Howden AJ, Stam R, Martinez Heredia V, Motion GB, Ten Have S, Hodge K, Marques Monteiro Amaro TM, Huitema E. Quantitative analysis of the tomato nuclear proteome during *Phytophthora capsici* infection unveils regulators of immunity. *New Phytol.* 2017;215:309–322. doi: 10.1111/nph.14540.

Huang S, Monaghan J, Zhong X, Lin L, Sun T, Dong OX, Li X. HSP 90s are required for NLR immune receptor accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2014;79:427–439. doi: 10.1111/tpj.12573.

Hummel M, Cordewener JH, de Groot JC, Smeekens S, America AH, Hanson J. Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MS E proteomics. *Proteomics.* 2012;12:1024–1038. doi: 10.1002/pmic.201100413.

Jones AM, Thomas V, Truman B, Lilley K, Mansfield J, Grant M. Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry.* 2004;65:1805–1816. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.005.

Jones AM, Thomas V, Bennett MH, Mansfield J, Grant M. Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 2006;142:1603–1620. doi: 10.1104/pp.106.086231.

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell.* 2001;13:889–905. doi: 10.1105/tpc.13.4.889.

Li D, Wang J (2020) Ribosome heterogeneity in stem cells and development. *Journal of Cell Biology* 219

Lorrain S, Lin B, Auriac MC, Kroj T, Saindrenan P, Nicole M, Balaguée C, Roby D. VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a Novel GRAM domain-containing

protein, is a Regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*. 2004;16:2217–2232. doi: 10.1105/tpc.104.022038.

Martinez-Seidel F, Beine-Golovchuk O, Hsieh Y-C, Kopka J (2020a) Systematic review of Plant Ribosome heterogeneity and specialization. *Frontiers in Plant Science*

Martinez-Seidel F, Beine-Golovchuk O, Hsieh Y-C, Kopka J. Systematic review of plant ribosome heterogeneity and specialization. *Front Plant Sci*. 2020;11:948. doi: 10.3389/fpls.2020.00948.

Matsuura H, Ishibashi Y, Shinmyo A, Kanaya S, Kato K. Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2010;51:448–462. doi: 10.1093/pcp/pcq010.

Merchante C, Stepanova AN, Alonso JM. Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant J*. 2017;90:628–653. doi: 10.1111/tbj.13520.

Meteignier L-V, El Oirdi M, Cohen M, Barff T, Matteau D, Lucier J-F, Rodrigue S, Jacques P-E, Yoshioka K, Moffett P. Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 2017;68:2333–2344. doi: 10.1093/jxb/erx078.

Moin M, Bakshi A, Saha A, Dutta M, Madhav SM, Kirti PB (2016) : Rice Ribosomal protein large subunit genes and their spatio-temporal and stress regulation. *Frontiers in Plant Science* 7

Muñoz A, Castellano MM (2012) Regulation of translation initiation under Abiotic stress conditions in plants: is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? *Comparative and functional genomics*. 2012:406357–406357

Nagaraj S, Senthil-Kumar M, Ramu VS, Wang K, Mysore KS. Plant Ribosomal Proteins, RPL12 and RPL19, play a role in Nonhost Disease Resistance against Bacterial Pathogens. *Front Plant Sci.* 2015;6:1192.

Palma K, Zhang Y, Li X. An importin alpha homolog, MOS6, plays an important role in plant innate immunity. *Curr Biol.* 2005;15:1129–1135. doi: 10.1016/j.cub.2005.05.022.

Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. Impact of combined Abiotic and Biotic stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front Plant Sci.* 2017;8:537. doi: 10.3389/fpls.2017.00537.

Ramu VS, Dawane A, Lee S, Oh S, Lee HK, Sun L, Senthil-Kumar M, Mysore KS. Ribosomal protein QM/RPL10 positively regulates defence and protein translation mechanisms during nonhost disease resistance. *Mol Plant Pathol.* 2020;21:1481–1494. doi: 10.1111/mpp.12991.

Saha A, Das S, Moin M, Dutta M, Bakshi A, Madhav MS, Kirti PB. Genome-wide identification and comprehensive expression profiling of ribosomal protein small subunit (RPS) genes and their comparative analysis with the large subunit (RPL) genes in Rice. *Front Plant Sci.* 2017;8:1553. doi: 10.3389/fpls.2017.01553.

Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011;473:337–342. doi: 10.1038/nature10098.

Solano-De la Cruz MT, Adame-García J, Gregorio-Jorge J, Jiménez-Jacinto V, Vega-Alvarado L, Iglesias-Andreu LG, Escobar-Hernández EE, Luna-Rodríguez M. Functional categorization of de novo transcriptome assembly of *Vanilla planifolia* jacks. Potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *BMC Genomics.* 2019;20:826. doi: 10.1186/s12864-019-6229-5.

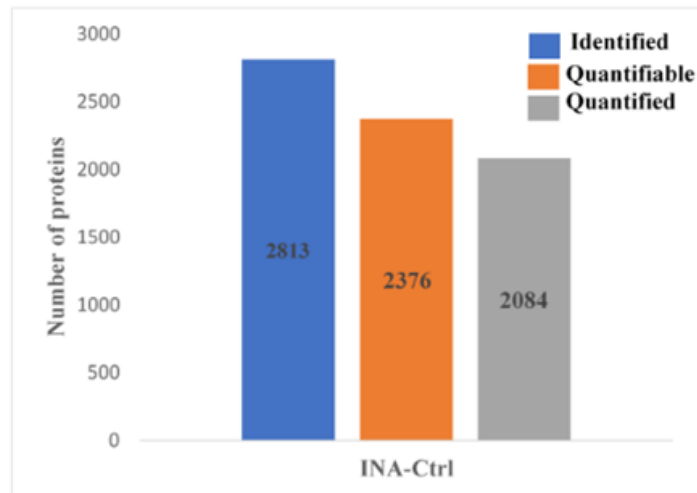
Verma S, Nizam S, Verma PK (2013) Biotic and abiotic stress signaling in plants stress signaling in plants: Genomics and Proteomics Perspective, vol 1. Springer, pp 25–49

Vos IA, Moritz L, Pieterse CM, Van Wees SC. Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Front Plant Sci.* 2015;6:639. doi: 10.3389/fpls.2015.00639.

Weis BL, Kovacevic J, Missbach S, Schleiff E. Plant-specific features of Ribosome Biogenesis. *Trends Plant Sci.* 2015;20:729–740. doi: 10.1016/j.tplants.2015.07.003

Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J. Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol.* 2005;138:624–635. doi: 10.1104/pp.105.059477.

Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15811–15816. doi: 10.1073/pnas.0404536101.

**Supplementary material**

**Figure S1.** In blue, the total number of proteins identified in the ribosome enriched fractions for all conditions. Proteins with 100% of observed intensities in at least all replicates of one of the two groups are considered as quantifiable proteins (orange). From the quantifiable proteins, those identified with at least 2 peptides are considered as quantified proteins (gray).



**Figure S2.** Boxplots showing the proteins intensity values for all replicates of each treatment group.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Étant fixes et n'ayant pas l'option de la fuite ou de l'évitement, les plantes s'appuient sur des mécanismes internes pour s'adapter aux défis imposés par les conditions défavorables (Huey et al., 2002; Zhang et al., 2022). Elles nécessitent un système de réponse efficace basé sur l'expression génique finement régulée. Le principal but des cellules végétales face au stress est de préserver l'énergie (Zandalinas et al., 2022) tout en répondant au stress. Parmi tous les niveaux de régulation de l'expression génique, le mécanisme de traduction énergétiquement exigeant est l'un des principaux éléments régulés pour réduire la consommation d'énergie (Munoz & Castellano, 2012). De cette façon, l'énergie auparavant investie dans la croissance est redirigée vers des adaptations physiologiques qui aident la plante à survivre dans des conditions difficiles. Cependant, une réduction sévère de la traduction peut être dangereuse pendant le stress, alors que c'est précisément le moment où les cellules ont besoin de synthétiser de nouvelles protéines pour réparer les dommages et s'adapter au nouvel environnement (Shcherbik & Pestov, 2019). Donc, une régulation sélective de la traduction peut permettre aux cellules de réagir plus efficacement aux conditions défavorables. Le ribosome est considéré comme la pierre angulaire de la machinerie de synthèse protéique dans la cellule (Wilson & Cate, 2012). Bien qu'il fût considéré comme un organelle invariable et passif, le rôle des ribosomes a pris de nouvelles couleurs au cours des dernières décennies. Comme décrit ci-dessus, les ribosomes sont des macro-complexes composés de quatre molécules d'ARN ribosomiaux et d'environ 80 protéines ribosomiales (PR). Deux sous-unités, une grande (60S) et une petite (40S), composent le ribosome eucaryote. La grande sous-unité est constituée d'ARN ribosomal 25S/28S, 5.8S et 5S conjugués et 47 protéines (RPL), et la petite sous-unité est l'ensemble de l'ARN 18S plus 33 protéines (RPS). Chaque PR est codifié par plusieurs gènes qui sont des membres de plusieurs petites familles (Barakat et al., 2001). Dans leur analyse, Carroll et al. (2008) ont trouvé que chez *Arabidopsis*, les 33 PR de la petite sous-unité et les 48 de la grande sous-unité sont respectivement codées par 104 et 148 gènes,



soit en moyenne trois gènes pour chaque PR (Carroll et al., 2008). Même si la nature multigénique des PR se retrouve couramment chez les eucaryotes, la plupart des copies de gènes sont des pseudogènes (Harrison et al., 2002; Wool et al., 1995; Zhang et al., 2002). Cependant, les plantes font exception en ayant la plupart des copies de gènes des PR exprimées et fonctionnelles (Barakat et al., 2001; Carroll, 2013). L'expression différentielle des protéines ribosomales dans de nombreux organismes, y compris les plantes, a conduit à l'hétérogénéité des ribosomes. Récemment, l'hétérogénéité du ribosome est apparue comme une idée valable auprès de nombreux groupes scientifiques présentant des preuves corroborant la diversité de la composition du ribosome. En revanche, la mise en évidence d'une variation de composition des ribosomes entre différentes espèces, ou selon des conditions physiologiques différentes dans une même espèce, a suggéré que les ribosomes ne sont pas toujours composés de la même façon, mais sont plutôt hétérogènes. Ces différences peuvent provenir de plusieurs manières : l'absence de PR spécifique de la structure canonique du ribosome, l'échange des paralogues des PR, la variation des séquences d'ARNr et les modifications post-transcriptionnelles, les modifications post-traductionnelles de RP et éventuellement des variations supplémentaires du protéome associé au ribosome (Browning & Bailey-Serres, 2015). De plus, des récentes études ont montré qu'une variation de la composition des ribosomes au niveau des PR altère la traduction de certains ARNm, faisant du ribosome un régulateur de la traduction. Ces observations ont permis de mettre en évidence un nouveau concept nommé « ribosome spécialisé ». Ce concept propose qu'un ribosome avec une composition particulière va traduire préférentiellement des ARNm spécifiques et contrôle la synthèse des protéines. Ainsi, les ribosomes spécialisés sont définis comme une sous-population des ribosomes fonctionnelles qui apparaissent, par exemple, après une condition altérée ; ils travaillent pour contraindre la traduction à des ARNm spécifiques et pour remodeler le protéome acclimaté.

Initialement considérés comme les unités structurales qui maintenaient l'ARNr ensemble, des nouvelles études ont montré que les changements dans la composition des protéines ribosomales dans les ribosomes pouvaient avoir un impact sur le contrôle et la fidélité de la traduction des protéines (Gallo et al., 2018; N. R. Genuth & M. Barna, 2018; Kondrashov et al., 2011). L'hétérogénéité des PR en termes d'expression et de composition ribosomale

implique la pertinence fonctionnelle diversifiée des PR (Luan et al., 2022). Ceci est en cohérence avec l'accumulation de données qui soulignent l'implication des PR dans plusieurs fonctions très importantes dans l'assemblage des ribosomes, la synthèse des protéines et d'autres fonctions cellulaires de base en association avec plusieurs autres composants (décodage de l'ARNm et de l'ARNt, liaison de l'ARNm, échafaudage et cofacteurs de la peptidyl transférase) (Brodersen & Nissen, 2005) et loin du ribosome (régulation traductionnelle, réparation de l'ADN, liaison des histones, activité des facteurs de transcription et régulation du cycle cellulaire (Kim et al., 1995; Ni et al., 2006; Zhang & Lu, 2009).

L'implication et la constitution spécifique des protéines de la machinerie de traduction dans la défense des plantes sont peu étudiées. Des études protéomiques de plantes soumises à un stress ont également été réalisés. Ils ont montré que les PR et les facteurs de biogenèse des ribosomes font partie des principaux groupes de protéines qui sont différentiellement abondants entre les génotypes des plantes sensibles au stress et tolérants au stress (Kosová et al., 2018). Certains rapports ont montré que la déficience et la mutation des protéines ribosomales elles-mêmes sont associées à des réponses aux maladies chez les plantes. La répression de *RPL12* et *RPL19* chez *N. benthamiana* et *A. thaliana* a montré une résistance compromise aux maladies non-hôtes contre plusieurs agents pathogènes bactériens (Nagaraj et al., 2015). La répression de *RPL10* chez *N. benthamiana* et *A. thaliana* a montré une résistance à la maladie compromise contre le pathogène non-hôte *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* *TI* (Ramu et al., 2020). Et la répression de *RPS6* chez *N. benthamiana* a affecté l'accumulation du virus de la mosaïque du concombre, du virus de la mosaïque du navet (TuMV) et du virus A de la pomme de terre (PVA), mais pas du virus du navet froissé et du virus de la mosaïque du tabac (Rajamäki et al., 2017). De plus, des études protéomiques et transcriptomiques chez la plante, ont récemment permis de mettre en évidence que la composition des ribosomes en protéines ribosomales peut être modifiée selon les différents stades de développement, les différents types des cellules ou les différentes conditions telles que les agents pathogènes, les rayonnements UV, et le manque de sucrose (Carroll et al., 2008; Falcone Ferreyra et al., 2010; Hummel et al., 2012; Szick-Miranda & Bailey-Serres, 2001; Whittle & Krochko, 2009). Sur la base des études disponibles, nous avons émis l'hypothèse qu'une variation dans la composition des

ribosomes au niveau des PR régule la traduction des ARNm des protéines dans le contexte de défense chez la plante.

### **Processus de sélection des candidats des protéines ribosomales**

La biogenèse des ribosomes représente les étapes par lesquelles les ribosomes spécialisés peuvent s'assembler, impliquant l'importation de la plupart des PR dans le noyau et le nucléole et leur association avec l'ARNr pour constituer les sous-unités ribosomales. Les protéines ribosomales sont transcrites dans le noyau, exportées pour être traduites dans le cytoplasme puis relocalisées au noyau pour être intégrées aux ribosomes en cours de synthèse. Les protéines ribosomales sont rajoutées au fur et à mesure pour former les sous-unités ribosomales. Donc, de nombreuses études ont identifié des protéines ribosomales dans les noyaux de diverses plantes en situation de stress. Afin de sélectionner des protéines ribosomales de la petite sous-unité (RPS) ayant la possibilité de jouer un rôle dans le mécanisme de défense chez la plante, nous avons analysé les ensembles de données publiés sur les protéomes nucléaires de diverses espèces végétales soumises à des stress biotiques et abiotiques. Dans ce projet de thèse, on s'est intéressé aux protéines ribosomales spécifiques de la petite sous-unité (RPS) du fait du rôle de la petite sous-unité dans l'étape de l'initiation de traduction. Chez les eucaryotes, la petite sous-unité du ribosome établit un premier contact avec l'ARNm avant l'assemblage avec la grande sous-unité ribosomale pour constituer un ribosome compétent en traduction. Ainsi, la petite sous-unité est impliquée dans la sélection des ARNm à traduire et l'identité des protéines ribosomales au sein de la petite sous-unité pourrait avoir un impact sur l'identité des ARNm recrutés.

Durant mon projet de maîtrise on a pu identifier 11 RPS détectés dans les noyaux des plantes d'*Arabidopsis* à la suite d'un traitement avec un éliciteur, le chitosane (Fakih et al., 2016). De plus, en réponse au stress dû au froid, huit RPS étaient surreprésentés dans le protéome nucléaire d'*Arabidopsis* (Bae et al., 2003). De plus, sept RPS ont eu un changement significatif d'abondance dans le noyau de la tomate (*Solanum lycopersicum*) lors d'une infection causée par l'oomycète *Phytophthora capsici* (Howden et al., 2017). À partir de ces trois études, un total de 15 différents RPS ont montré une abondance nucléaire accrue dans diverses conditions de stress.

Si l'hétérogénéité des ribosomes apparaît au niveau de la biogenèse de ribosome, cela implique tout d'abord qu'il peut y avoir une différence au niveau de la transcription ou la traduction des PR. Dans ce contexte, l'expression de ces 15 RPS ont été évalués dans des conditions de stress chez *Arabidopsis* à l'aide de base de données *Genevestigator*. Nous avons évalué l'expression de ces gènes après un stress dû au froid, un traitement avec les éliciteurs et un stress biotique. Les gènes qui ont montré une forte induction dans au moins deux conditions ont été sélectionnés comme surexprimés. Fait intéressant, six gènes (*RPSaA*, *RPS10C*, *RPS12C*, *RPS19C*, *RPS27D* et *RACK1A*) ont montré des niveaux élevés d'expression en réponse aux trois stress.

Pour étudier l'expression de ces RPS chez les plantes *N. benthamiana* dans des contextes de stress et, également, pour fournir une analyse comparative de l'expression des RPS entre les deux plantes modèles, nous avons effectué une PCR en temps réel (qRT-PCR) de ces 15 gènes en utilisant des tissus de *N. benthamiana* soumis à des conditions de stress dû au froid, un traitement INA, un analogue de l'acide salicylique qui induit la défense des plantes (Conrath et al., 1995) et une infection par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* EtHAN. Cinq gènes (*RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D* et *RACK1A*) étaient surexprimés sous les trois traitements de stress. Nous nous concentrons sur ces cinq gènes RPS pour d'autres analyses fonctionnelles chez *N. benthamiana*.

### **Quelles sont les implications fonctionnelles de ces RPS? Est-ce qu'ils jouent un rôle dans la traduction des ARNm de gène de défense?**

Après l'identification de ces 5 RPS qui se sont accumulés dans les noyaux (le site de la biogenèse des ribosomes) de plantes stressées en utilisant des protéomes nucléaires de plantes stressées publiés précédemment, nous avons posé comme hypothèse que les paralogues de ces RPS accumulés, génèrent des ribosomes qui remodelent le traductome cellulaire et la réponse de défense des plantes ainsi qu'ils dotent les ribosomes de la capacité de sélection préférentielle de l'ARNm pour la traduction. Ainsi, pour la suite du projet, nous avons testé si ces 5 RPS était également impliquées dans la traduction sélective des ARNm du gène de défense pendant le stress. Pour tester cette hypothèse, en utilisant la méthode VIGS, nous avons préparé des plantes avec des niveaux réduits d'ARNm pour *RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D* et *RACK1A* et nous avons testé l'efficacité de la

traduction de groupes spécifiques d'ARNm sélectionnés. Nous avons développé une nouvelle approche pour visualiser l'effet de la répression de ces RPS sur la traduction d'un ARNm rapporteur (GFP) combiné au 5'UTR de différents gènes de ménage et de défense connus. Dans cette approche, nous avons testé la production de la protéine fluorescente verte (GFP) fusionnée aux différents 5'UTR dans les feuilles de plantes réprimées pour RPS et témoins. Pour minimiser la variation d'une feuille à l'autre, chaque feuille a été infiltrée avec un vecteur contenant le 5'UTR de deux gènes contrôle, F-box et PP2A, comme contrôle interne à côté de vecteurs contenant les 5'UTR à tester. Les plantes *N. benthamiana* réprimées pour *NbRPSaA*, *NbRPS5A* et *NbRPS24A* ont montré des degrés variables de traduction compromise par rapport aux plantes témoins non-réprimées. L'intensité de la fluorescence verte de la chimère 5'UTR *GAPDH*-GFP était similaire dans les feuilles réprimées pour *RPSaA*, *RPS5A* et *RPS24A* et les plantes témoins non réprimées. Cependant, la répression de ces trois gènes du RPS a entraîné une réduction importante de la traduction des chimères 5'UTR catalase, peroxydase, ascorbate peroxydase, NPR1 et MAPK3-GFP. En utilisant la méthode VIGS pour réprimer l'expression des gènes, on a une diminution de plus de 50% des niveaux des ARNm de PR dans les feuilles des plantes réprimées. Cette diminution a entraîné une diminution de production des protéines de défense testées mais pas les protéines de ménage. Dans ce contexte, des études antérieures ont rapporté que *RPSaA*, *RPS5A* et *RPS24A* jouent un rôle dans la régulation de la signalisation systémique médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, il a été montré que *RPSaA* et *RPS24A* avaient des taux de dégradation plus faibles et étaient plus stables après un stress oxydatif (K. Salih et al., 2020). Ensuite, *RPS5A* peut jouer un rôle important dans le traitement à l'obscurité en participant au processus de régulation de l'autophagie, qui est déclenché pour dégrader un excès de ROS pour aider à protéger les cellules (Shen et al., 2022). Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que *RPSaA*, *RPS5A* et *RPS24A* sont nécessaires à la traduction sélective des gènes de défense pour faire face à des conditions défavorables. La répression de *NbRPS27D* a entraîné une diminution de plus de 50% de la production de GFP dans la zone d'infiltration des vecteurs contenant les 5'UTR des gènes de défense et du gène de ménage (*GAPDH*). Les résultats présentés ici suggèrent que la répression du *NbRPS27D* conduit à un défaut de traduction général. Des données récentes ont montré que les mutations de *RPS27B* influencent l'intégrité des

ribosomes à la fois dans la structure et la fonction (Shen et al., 2022). La répression de *NbRACK1A* a provoqué une diminution importante de la fluorescence de la GFP dans les feuilles infiltrées par les vecteurs contenant les 5'UTR de la peroxydase, de l'ascorbate peroxydase et de la catalase. Par contre, la répression de *NbRACK1A* n'a eu aucun effet sur la production de GFP dans les zones infiltrées par les autres 5'UTR. Ces résultats suggèrent que la répression de *NbRACK1A* chez *N. benthamiana* a compromis la traduction de plusieurs enzymes antioxydantes. Ces enzymes font partie de la machinerie antioxydante, qui aide à atténuer les dommages induits par le stress oxydatif.

La position de RACK1 au niveau de la petite sous-unité du ribosome, proche de tunnel de sortie de l'ARNm, suggère qu'il pourrait assembler des complexes de signalisation au niveau du ribosome, permettant la régulation de la traduction en réponse aux stimuli cellulaires (Nilsson et al., 2004). Il a été montré que RACK1 régule positivement la traduction des gènes spécifiques impliqués dans des processus biologiques clés tels que la défense contre le stress oxydatif et la progression du cycle cellulaire dans les conditions du stress oxydatif (Núñez et al., 2009; Saelee et al., 2011; Zhou et al., 2016). Cependant, chez le riz, il a été démontré que *OsRACK1A* est impliqué dans la réponse immunitaire contre les attaques d'agents pathogènes par l'induction de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Nakashima et al., 2008). Nos résultats sont en accord avec la régulation positive par *RACK1* de la synthèse des enzymes de détoxification induites par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). En ce qui concerne le rôle de RACK1 dans la signalisation, de plus en plus des preuves suggèrent que RACK1 libre peut agir comme une molécule de signalisation à un niveau seuil pour améliorer la production de ROS. Cependant, il est à noter que le signal activé par RACK1 libre est transitoire car, en absence de liaison ribosomale, la protéine est instable (Gallo et al., 2018). En revanche, RACK1 en tant que protéine ribosomale contrôle la défense cellulaire contre le stress oxydatif, régulant positivement la traduction des gènes spécifiques impliqués dans la détoxification (Núñez et al., 2009). En conclusion, nous proposons que l'association de *RACK1A* avec le ribosome puisse effectivement être régulée en aval du burst oxydatif (une réaction rapide produisant des formes réactives de l'oxygène) afin de moduler ses fonctions de traduction. Cependant, cette possibilité devrait être étudiée plus en détail.

Bien qu'elle ait apporté des résultats intéressants il semble important de soulever quelques limitations liées à la méthodologie que nous avons retenue. D'abord nos constructions chimériques étaient constituées du 5'UTR du gène à tester en fusion avec la GFP, nous avons choisi ce type de construction car il permet de limiter à la région 5'UTR les éléments qui affecte la traduction ou la liaison avec la petite sous-unité du ribosome. Il ne peut être exclu que des éléments de régulation de la traduction soit situés plus en aval du transcrit mais dans notre cas tous les 5'UTR étaient suivis de la GFP afin de diminuer les effets confondants. Par ailleurs, bien que nos résultats aient permis d'identifier des RPS qui semblent avoir des rôles spécifiques en contexte de défense ou dans la traduction d'enzymes du stress oxydatif, nous ne pouvons exclure que d'autres paralogues des mêmes familles puissent aussi avoir des fonctions similaires. Finalement, afin de valider les résultats obtenus, il aurait été idéal de valider nos résultats par des essais fonctionnels, c'est-à-dire que voir si nos plantes VIGS qui semblent moins performantes dans la traduction de gènes de défense sont plus susceptibles aux pathogènes et si les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène s'accumulent dans les plantes VIGS qui semblent traduire moins les gènes d'enzymes antioxydantes.

### **La composition des protéines des ribosomes peut changer en réponse au stress**

Afin de vérifier l'augmentation de l'abondance de ces RPS dans les ribosomes des plantes stressées, ainsi que la variation de composition des protéines ribosomales en réponse à des stimuli externes permettant à la plante de s'adapter à des conditions spécifiques, nous avons immunoprécipité des ribosomes marqués par l'étiquette FLAG, suivis d'une identification et d'une quantification relative des protéines par LC-MS/MS. Suite à l'immunoprécipitation des protéines de la plante RPL18-FLAG, nous avons aussi répété l'expérience avec Col-0 et soustrait toutes ces protéines non spécifiques. Malgré cela il est demeuré un grand nombre de protéines non ribosomales, mais probablement associées au ribosome en cours de traduction. Cette approche nous a permis de déterminer de façon quantitative les différences au niveau de l'abondance des PR entre des plantes en condition normales, ou en réponse de défense via l'induction par l'INA. Les feuilles ont été récoltées 24h après l'application des traitements puis les ribosomes ont été purifiés. Nous avons envoyé un total de 6 échantillons enrichis en ribosomes à analyser par

spectrométrie de masse, soit trois réplicats par conditions (contrôle et INA). Une analyse par composantes principales (PCA) a permis de comparer ces protéomes entre eux. L'analyse a démontré que les échantillons de la même condition expérimentale possèdent des profils protéomiques similaires et qu'il y a peu de variation entre les trois réplicats. L'analyse a aussi établi que les deux conditions expérimentales peuvent être distinguées en fonction de leurs profils protéomiques. Nos résultats montrent que le protéome ribosomal des feuilles diffère selon les conditions avec une faible variabilité entre les réplicats biologiques d'un même traitement.

Notre étude protéomique montre que la majorité des PR codées par *A. thaliana* sont présents dans le riboprotéome. Notre approche a identifié 52 RPS distincts provenant de 30 des 33 familles représentant 50 % des 104 gènes codant pour le RPS. D'autre part, sur les 148 gènes codant pour des protéines de grandes sous-unités (RPL) annotées dans TAIR10, 80 RPL distinctes (provenant de 43 familles sur une possibilité de 48) ont été identifiées. Des membres des familles RPS12, RPS21, RPS29, RPP3, RPL23a, RPL29, RPL40 et RPL41 n'ont pas été détectés dans les données de spectrométrie de masse filtrées. Des membres de ces familles se trouvent dans les données brutes avec un peptide unique ou dans un réplicat parmi les trois réplicats biologiques de l'une des deux conditions. 24 PR (15 RPS et 9 RPL), sur 252 gènes codant pour les PR, ont montré un changement significatif dans leur abondance en réponse à l'activation de la défense par l'application d'une solution d'INA. 11 RPS et 8 RPL avaient augmenté leur abondance dans les ribosomes des plantes induites pour la défense (RPS15A, RPS10C, RPS11C, RPS24A, RPS5A, RPS27D, RPS17D, RPS19C, RPS9C, RPS2C, RPSaA, RPP1C, RPP1A, RPL30C, RPL9B, RPL8A, RPL5B, RPP2B et RPL15A). De manière intéressante, 4 RPS (*RPSaA*, *RPS5A*, *RPS24A*, *RPS27D*) de nos 5 candidats d'intérêt dont leur abondance a augmenté dans les noyaux (site de biogenèse de ribosome) des plantes activées pour la défense, se trouvent parmi ces 15 RPS. Pour certaines de ces PR, une variation de leurs niveaux d'ARNm en réponse à des stimuli externes a déjà été rapportée chez plusieurs espèces végétales (Cherepneva et al., 2003; Kawasaki et al., 2001; Moin et al., 2016; Saha et al., 2017; Solano-De la Cruz et al., 2019). Ces études pointent vers une expression différentielle des gènes de PR en réponse aux stress conduisant à une accumulation différentielle de PR dans les ribosomes, ce qui pourrait aider au remodelage des sous-unités



et la traduction sélective pour faire face à des conditions défavorables. L'enrichissement en éléments cis-régulateurs communs dans la région 5'UTR en amont des gènes RPS et RPL (motifs TCA, domaine AP2, MBS, répétitions riches en TC et domaine DOF) explique le résultat de changements transcriptionnels de PR en réponse aux stress. La différence au niveau de la transcription et de la traduction de gènes de PR, pourrait être évaluée respectivement par qRT-PCR ou Microarray et p-SILAC, PUNCH-P ou BONCAT.

Il est intéressant de souligner que la plupart de ces PR se trouve du côté solvant, exposé au cytoplasme, des sous-unités de ribosome. RPS3, RPS9, RPS2, RPS15, RPS23 et RPS30 se trouvent proche du centre de décodage. Donc, elles pourraient jouer un rôle dans la surveillance des interactions ARNm-ARNt. RPS5 est situé proche du site d'entrée de l'ARNm (Dong & Hinnebusch, 2022; Spahn et al., 2004; Yusupov et al., 2001), elle peut se lier aux facteurs d'initiation eIF3 et eEF1A ou interagir avec eIF2 $\alpha$  pour affecter l'efficacité de l'initiation (Ghosh et al., 2014; Spahn et al., 2004). Finalement, la position de RACK1 à la tête de la petite sous-unité du ribosome, proche du canal d'entrée de l'ARNm, ouvre la possibilité pour un rôle de RACK1 comme sélecteur traductionnel (Nielsen et al., 2017). Elle pourrait assembler des complexes de signalisation au niveau du ribosome en facilitant les interactions avec de nombreuses protéines de signalisation, permettant ainsi une régulation de la traduction en réponse à des stimuli (Nilsson et al., 2004). Du côté des protéines de la grande sous-unité, RPL5 avec d'autres RPL forment la protubérance centrale (CP). Elle participe à la formation des ponts entre les 2 sous-unités. Il connecte par exemple le centre de décodage à des régions fonctionnelles de la grande sous-unité, comme le centre peptidyl transférase, pour permettre un processus de traduction coordonné. RPP1A, RPP1C et RPP2B se trouvent dans la tige P. Cette structure n'est ajoutée que dans les derniers stades de la maturation de la grande sous-unité 60S et elle est nécessaire à un ribosome fonctionnel (Remacha et al., 1995). Ces protéines sont nécessaires pour recruter des facteurs d'élongation. Et finalement, RPL8 se trouve proche du centre peptidyl transférase (PTC) qui est situé à proximité des sites A et P de la grande sous-unité. Ainsi, en termes de protéomique des protéines ribosomales, nous observons que le remodelage des ribosomes après l'induction de défense est significativement limité au centre peptidyl transférase, à la tige P et à la tête du ribosome. Les trois structures modulées représentent des cibles possibles de mécanismes susceptibles de contraindre la traduction

par une hétérogénéité contrôlée des ribosomes. Nous proposons que l'hétérogénéité non aléatoire des ribosomes contrôlée par des mécanismes de biogenèse spécialisés puisse contribuer à une sélection préférentielle des transcrits nécessaires à des changements rapides de protéome et à une acclimatation réussie.

Dans un autre ordre d'idées, bien que le projet se soit concentré sur le changement d'abondance des différents PR dans le ribosome, l'analyse de spectrométrie de masse des échantillons a permis d'obtenir les variations quantitativement significatives de toutes les protéines contenues dans les ribosomes. Ces analyses ont permis d'identifier 165 protéines avec une abondance accrue et 52 protéines avec des niveaux réduits dans les échantillons traités. Pour identifier les processus perturbés lors de l'induction de l'immunité des plantes, nous avons examiné les fonctions prédites des protéines affectées. Les termes d'ontologie génique (GO) associés à l'activité transférase et à l'activité kinase étaient très bien classées dans les protéines dont l'abondance a augmenté au cours du traitement. Parmi ces protéines, on cite le Glutathion S-transférase (GST) qui est connu pour jouer un rôle dans les mécanismes de défense chez la plante et pour être induite par le traitement à l'INA. Il joue un rôle comme détoxifiant des molécules toxiques surtout des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De même, il y en a des études qui ont montré que le GST pourrait être des récepteurs pour l'AS (Gullner et al., 2018). D'autre part, les protéines de liaison à l'ARN et de liaison aux protéines figuraient parmi les principaux termes GO pour les protéines régulées négativement lors de l'induction. Il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur l'ensemble des changements d'abondance du protéome ribosomale. Tout d'abord, il faut s'assurer si ces protéines s'associent au ribosome ou bien ce sont des protéines entrain de traduction. Donc, pour répondre à cette question, on peut isoler les ARNm qui sont attachés aux ribosomes et les séquencer. Alors si on trouve qu'elles sont des liants aux ribosomes, on peut se servir des techniques permettant d'étudier les interactions entre les protéines comme le yeast two hybrid (Y2H) ou FRET ou bien des outils bio-informatique (SCAN PROSITE, STRING) pour étudier s'il y en a des motifs dans ces protéines permettant son liaison avec les ARNm ou d'autres protéines.

## Conclusion

L'expansion rapide de la population humaine nécessite une production agricole croissante, mais la détérioration du climat mondial ne la favorise pas. Dans ce scénario, l'augmentation de la production agricole représente un énorme défi pour les agriculteurs et les scientifiques. Par conséquent, la sécurité alimentaire des prochaines générations dépend de la création de cultivars conjuguant deux caractères contradictoires dans des conditions défavorables, la tolérance et un rendement élevé, ce qui constitue une tâche ambitieuse qui nécessite la mise en œuvre de stratégies créatives. Vue l'impossibilité d'avoir un environnement sans perturbations et pour faire face au changement climatique, il paraît incontournable de trouver de nouvelles variétés de plantes plus tolérantes. En tant que pièce importante dans la production de biomasse, l'activité des ribosomes est fortement coordonnée avec les signaux externes. Nos résultats suggèrent que cette coordination étroite pourrait être fondée sur l'induction des différentes composantes des ribosomes. De plus, nos travaux de recherche ont conduit à identifier comment les altérations dans la composition des ribosomes contrôlent la synthèse des protéines pour répondre aux besoins de la plante dans un environnement perturbé. Ils suggèrent que les protéines ribosomales fonctionnent de manière modulaire pour décoder les informations génétiques dépendamment du contexte. La répression d'une seule RPS pourrait avoir un impact sur la stabilité et l'efficacité de l'ensemble du ribosome. Dans notre cas, nos contrôles négatifs nous ont montré que l'efficacité globale de la traduction n'était pas affectée et, par conséquent, nous pensons de la présence des différentes populations des ribosomes dans la cellule en réponse à des stimuli externes et que certaines protéines ribosomales fonctionnent également de manière coordonnée pour remodeler le traductome, permettant à la plante de s'adapter à des conditions spécifiques. Sur la base de ces données, nous suggérons que certaines fonctions biologiques décrites dans la littérature de certaines protéines ribosomales dans l'immunité des plantes pourraient être liées à leur fonction de régulateurs de synthèse protéique.

Le projet de la thèse effectué constitue le fondement sur lequel repose la perspective de construire des variantes de ribosomes capables de définir un rythme de croissance répondant à un stress spécifique dans le but de créer de cultivars tolérants au stress qui sont

également productifs dans des environnements hostiles. Pour réussir les projets d'ingénierie des ribosomes, il faut prendre en considération certains points essentiels tels que :

- La complexité des facteurs de stress doit être abordée :

Bien qu'elles répondent aux objectifs de la science fondamentale, la plupart des études limitent le spectre de réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques en analysant chaque type de stress individuellement. Un seul type de stress à la fois est le scénario inverse de ce qui se passe dans la nature. Les plantes doivent généralement lutter contre différents facteurs de stress simultanément. Ainsi, leur réaction dans ce cas n'est sûrement pas la même que lorsqu'un seul facteur est appliqué, comme l'ont démontré Rasmussen et al. (2013) (Rasmussen et al., 2013). Donc, pour atteindre notre but, les recherches sur l'hétérogénéité des ribosomes induite par une combinaison de stress doivent être intensifiées. De cette façon, l'ingénierie des ribosomes peut être centrée sur des données qui reflètent de manière plus cohérente les conditions rencontrées sur le terrain.

- Les techniques de biologie synthétique doivent être optimisées pour la recherche sur les plantes :

Si des techniques telles que CRISPR/Cas ont été largement utilisées pour éditer avec précision le génome des espèces cultivées et développer des cultivars plus durables (Zhu et al., 2020), d'autres restent à maîtriser par la recherche végétale. Alors que certains des premiers exemples de l'utilité de CRISPR/Cas en biologie végétale étaient l'inactivation de gènes dans des organismes modèles, la technologie a maintenant été étendue à une grande variété d'applications, notamment l'édition à grande échelle, l'édition de bases, les insertions ciblées et les applications transcriptomiques et les modifications épigénétiques (Gaillochet et al., 2021; Zong et al., 2022). Les technologies CRISPR sont bien placées pour permettre une réponse de défense inductible. L'expression des enzymes Cas par des promoteurs inductibles permet la manipulation du génome uniquement en réponse à des stimuli spécifiques (Ji et al., 2018; X. Wang et al., 2020). Grâce à l'expression multiplexée de l'ARNg, des voies entières peuvent être régulées artificiellement en tant que mécanisme d'immunité adaptative. D'autre part, des méthodes de synthèse de ribosomes *in vitro* telles que « Synthèse, assemblage et traduction intégrés » (iSAT) (Fritz & Jewett, 2014; Jewett

et al., 2013) et « Synthèse et évolution de ribosomes in vitro » (RISE) (Hammerling et al., 2020) permettent la production et l'étude de variantes de ribosomes. Une fois optimisés et pleinement explorés par les biologistes végétaux, des progrès significatifs dans la connaissance des ribosomes végétaux pourront être réalisés grâce à eux.

Finalement, notre devis expérimental fournit une nouvelle approche pour évaluer l'implication des protéines ribosomale dans des contextes spécifiques, ouvrant de nouvelles voies intéressantes pour la recherche sur les rôles des protéines ribosomales lors des stress biotiques et abiotiques chez la plante.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, H., & Kamoun, S. (2022). NLR receptor networks in plants. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 541-549.
- Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I., & Solano, R. (2007). Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 160-177.
- Agrawal, A. A., & Karban, R. (1999). Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. *The ecology and evolution of inducible defenses*, 10, 000331745.
- Ainsworth, E. A., Yendrek, C. R., Sitch, S., Collins, W. J., & Emberson, L. D. (2012). The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annual review of plant biology*, 63, 637-661.
- Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., & Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *nature*, 497(7447), 80-85. <https://doi.org/10.1038/nature12104>
- Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., Marquez, V., Mielke, T., Thomm, M., Berninghausen, O., Beatrix, B., Söding, J., Westhof, E., Wilson, D. N., & Beckmann, R. (2010). Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 19754-19759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010005107>
- Arnold, R. J., & Reilly, J. P. (1999). Observation of Escherichia coli Ribosomal Proteins and Their Posttranslational Modifications by Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry*, 269(1), 105-112.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *nature*, 415(6875), 977-983.
- Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E. Y., & Park, O. K. (2003). Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J*, 36(5), 652-663. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01907.x>
- Bailey-Serres, J. (1999). Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci*, 4(4), 142-148. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01386-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01386-2)
- Bailey-Serres, J. (1999). Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science*, 4(4), 142-148.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant  $\beta$ -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett*, 34(11), 1983-1990. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481), 905-920. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>
- Barakat, A., Szick-Miranda, K., Chang, I. F., Guyot, R., Blanc, G., Cooke, R., Delseny, M., & Bailey-Serres, J. (2001). The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiol*, 127(2), 398-415.
- Barba-Aliaga, M., Alepuz, P., & Pérez-Ortín, J. E. (2021). Eukaryotic RNA polymerases: the many ways to transcribe a gene. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 663209.
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*, 69, 473-488.
- Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T. V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P. A., Vos, M. R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P., & Spahn, C. M. (2015). Structural snapshots of

- actively translating human ribosomes. *Cell*, 161(4), 845-857.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.052>
- Bektas, Y., & Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5, 804.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062), 1524-1529.
- Berman, A. J., Thoreen, C. C., Dedeic, Z., Chettle, J., Roux, P. P., & Blagden, S. P. (2021). Controversies around the function of LARP1. *RNA biology*, 18(2), 207-217.
- Bharath, P., Gahir, S., & Raghavendra, A. S. (2021). Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure: An Important Component of Plant Defense Against Abiotic and Biotic Stress. *Front Plant Sci*, 12, 615114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.615114>
- Bjornson, M., & Zipfel, C. (2021). Plant immunity: Crosstalk between plant immune receptors. *Current Biology*, 31(12), R796-R798.
- Bol, J. F., Buchel, A. S., Knoester, M., Baladin, T., Van Loon, L. C., & Linthorst, H. J. M. (1996). Regulation of the expression of plant defence genes. *Plant Growth Regulation*, 18, 87-91.
- Bosio, M. C., Negri, R., & Dieci, G. (2011). Promoter architectures in the yeast ribosomal expression program. *Transcription*, 2(2), 71-77. <https://doi.org/10.4161/trns.2.2.14486>
- Boudsocq, M., Willmann, M. R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., & Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *nature*, 464(7287), 418-422.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B., & Bailey-Serres, J. (2005). Genome-wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in Arabidopsis Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation. *Annals of Botany*, 96(4), 647-660. <https://doi.org/10.1093/aob/mci217>
- Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J. H., Larive, C. K., & Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 56(5), 743-755.
- Brar, G. A., & Weissman, J. S. (2015). Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(11), 651-664.  
<https://doi.org/10.1038/nrm4069>
- Brodersen, D. E., & Nissen, P. (2005). The social life of ribosomal proteins. *Febs j*, 272(9), 2098-2108. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04651.x>
- Browning, K. S., & Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 13.
- Carroll, A. J. (2013). The Arabidopsis Cytosolic Ribosomal Proteome: From form to Function. *Front Plant Sci*, 4, 32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00032>
- Carroll, A. J., Heazlewood, J. L., Ito, J., & Millar, A. H. (2008). Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Molecular & cellular proteomics*, 7(2), 347-369.
- Carvalho, C. M., Santos, A. A., Pires, S. R., Rocha, C. S., Saraiva, D. I., Machado, J. P. B., Mattos, E. C., Fietto, L. G., & Fontes, E. P. B. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS pathogens*, 4(12), e1000247.
- Casati, P., & Walbot, V. (2003). Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiology*, 132(4), 1739-1754.

- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L. A., Offenhäuser, N., Carlo Marchisio, P., & Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *nature*, 426(6966), 579-584.
- Chan, Y. L., Suzuki, K., Olvera, J., & Wool, I. G. (1993). Zinc finger-like motifs in rat ribosomal proteins S27 and S29. *Nucleic Acids Res*, 21(3), 649-655.  
<https://doi.org/10.1093/nar/21.3.649>
- Chan, Z. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics*, 100(2), 110-115.
- Chang, I.-F., Szick-Miranda, K., Pan, S., & Bailey-Serres, J. (2005a). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of Arabidopsis cytosolic ribosomes. *Plant Physiology*, 137(3), 848-862.
- Chang, I.-F., Szick-Miranda, K., Pan, S., & Bailey-Serres, J. (2005b). Proteomic Characterization of Evolutionarily Conserved and Variable Proteins of Arabidopsis Cytosolic Ribosomes *Plant Physiology*, 137(3), 848-862. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053637>
- Chang, M., Chen, H., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2022). PTI and ETI: convergent pathways with diverse elicitors. *Trends Plant Sci*, 27(2), 113-115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.013>
- Checker, V. G., Kushwaha, H. R., Kumari, P., & Yadav, S. (2018). Role of phytohormones in plant defense: signaling and cross talk. *Molecular aspects of plant-pathogen interaction*, 159-184.
- Chédin, S., Laferté, A., Hoang, T., Lafontaine, D. L. J., Riva, M., & Carles, C. (2007). Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle*, 6(1), 11-15.
- Chen, G.-H., Liu, M.-J., Xiong, Y., Sheen, J., & Wu, S.-H. (2018). TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in deetioliating Arabidopsis seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(50), 12823-12828.
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., & Whitham, S. A. (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*, 14(3), 559-574.
- Cheng, Z., Li, J.-F., Niu, Y., Zhang, X.-C., Woody, O. Z., Xiong, Y., Djonović, S., Millet, Y., Bush, J., & McConkey, B. J. (2015). Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *nature*, 521(7551), 213-216.
- Cherepneva, G. N., Schmidt, K. H., Kulaeva, O. N., Oelmüller, R., & Kusnetsov, V. V. (2003). Expression of the ribosomal proteins S14, S16, L13a and L30 is regulated by cytokinin and abscisic acid: implication of the involvement of phytohormones in translational processes. *Plant Science*, 165(5), 925-932.
- Ciganda, M., & Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(4), 523-533.
- Cohn, J., Sessa, G., & Martin, G. B. (2001). Innate immunity in plants. *Current opinion in immunology*, 13(1), 55-62.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., & Vad, K. (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3(1), 31-40.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R., & Klessig, D. F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7143-7147.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7143>
- de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5(12), 1512-1526.  
<https://doi.org/10.1039/b908315d>



- de Wit, P. J. G. M. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*, 2726-2732.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., & Ryals, J. A. (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(14), 6602-6606.
- Delannoy, E., Lyon, B. R., Marmey, P., Jalloul, A., Daniel, J. F., Montillet, J. L., Essenberg, M., & Nicole, M. (2005). Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *43*, 63-82.
- Deusser, E. (1972). Heterogeneity of ribosomal populations in *Escherichia coli* cells grown in different media. *Mol Gen Genet*, *119*(3), 249-258. <https://doi.org/10.1007/bf00333862>
- Dietz, K. J., Zörb, C., & Geilfus, C. M. (2021). Drought and crop yield. *Plant Biology*, *23*(6), 881-893.
- Divekar, P. A., Narayana, S., Divekar, B. A., Kumar, R., Gadratagi, B. G., Ray, A., Singh, A. K., Rani, V., Singh, V., & Singh, A. K. (2022). Plant secondary metabolites as defense tools against herbivores for sustainable crop protection. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5), 2690.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, *3*(5), 371-390.
- Dong, J., & Hinnebusch, A. G. (2022). uS5/Rps2 residues at the 40S ribosome entry channel enhance initiation at suboptimal start codons in vivo. *Genetics*, *220*(1), iyab176.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *42*, 185-209.
- Ebersberger, I., Simm, S., Leisegang, M. S., Schmitzberger, P., Mirus, O., von Haeseler, A., Bohnsack, M. T., & Schleiff, E. (2014). The evolution of the ribosome biogenesis pathway from a yeast perspective. *Nucleic acids research*, *42*(3), 1509-1523.
- Echevarría-Zomeño, S., Yáñez, E., Fernández-Bautista, N., Castro-Sanz, A. B., Ferrando, A., & Castellano, M. M. (2013). Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses. *Int J Mol Sci*, *14*(3), 4670-4683. <https://doi.org/10.3390/ijms14034670>
- Einhorn, E. (2019). Role of the ribosomal protein RACK1 in translation regulation.
- Eisenberg, A. R., Higdon, A., Keskin, A., Hodapp, S., Jovanovic, M., & Brar, G. A. (2018). Precise post-translational tuning occurs for most protein complex components during meiosis. *Cell reports*, *25*(13), 3603-3617.
- Eskelin, K., Varjosalo, M., Ravantti, J., & Mäkinen, K. (2019). Ribosome profiles and riboproteomes of healthy and Potato virus A- and *Agrobacterium*-infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol Plant Pathol*, *20*(3), 392-409. <https://doi.org/10.1111/mpp.12764>
- Fakih, Z., Ahmed, M. B., Letanneur, C., & Germain, H. (2016). An unbiased nuclear proteomics approach reveals novel nuclear protein components that participates in MAMP-triggered immunity. *Plant Signaling & Behavior*, *11*(6), e1183087.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K., Casati, P., & Grotewold, E. (2010). Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *The Plant Journal*, *62*(1), 77-91.
- Ferretti, M. B., & Karbstein, K. (2019). Does functional specialization of ribosomes really exist? *Rna*, *25*(5), 521-538.
- Filipek, K., Deryło, K., & Michalec-Wawiórka, B. (2018). The ribosome filter hypothesis and specialized ribosomes. *World Scientific News*(93), 19-29.

- Filipovska, A., & Rackham, O. (2013). Specialization from synthesis: how ribosome diversity can customize protein function. *FEBS letters*, *587*(8), 1189-1197.
- Finley, D., Bartel, B., & Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *nature*, *338*(6214), 394-401. <https://doi.org/10.1038/338394a0>
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G., & Mauch-Mani, B. (2005). Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology*, *153*(7-8), 377-383.
- Fragnière, C., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Métraux, J.-P., & L'Haridon, F. (2011). Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. *FEBS letters*, *585*(12), 1847-1852.
- Freed, E. F., Bleichert, F., Dutca, L. M., & Baserga, S. J. (2010). When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Molecular BioSystems*, *6*(3), 481-493.
- Freeman, B., & Beattie, G. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*, *149*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0226-01>
- Fritz, B. R., & Jewett, M. C. (2014). The impact of transcriptional tuning on in vitro integrated rRNA transcription and ribosome construction. *Nucleic acids research*, *42*(10), 6774-6785.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology*, *64*, 839-863.
- Gaillochet, C., Develtere, W., & Jacobs, T. B. (2021). CRISPR screens in plants: approaches, guidelines, and future prospects. *The Plant Cell*, *33*(4), 794-813.
- Gallo, S., Ricciardi, S., Manfrini, N., Pesce, E., Oliveto, S., Calamita, P., Mancino, M., Maffioli, E., Moro, M., Crosti, M., Berno, V., Bombaci, M., Tedeschi, G., & Biffo, S. (2018). RACK1 Specifically Regulates Translation through Its Binding to Ribosomes. *Mol Cell Biol*, *38*(23). <https://doi.org/10.1128/mcb.00230-18>
- Gamm, M., Peviani, A., Honsel, A., Snel, B., Smeekens, S., & Hanson, J. (2014). Increased sucrose levels mediate selective mRNA translation in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0306-3>
- Gentilella, A., Moron-Duran, F. D., Fuentes, P., Zweig-Rocha, G., Riano-Canalias, F., Pelletier, J., Ruiz, M., Turon, G., Castano, J., & Tauler, A. (2017). Autogenous control of 5' TOP mRNA stability by 40S ribosomes. *Molecular cell*, *67*(1), 55-70.
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Molecular cell*, *71*(3), 364-374.
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat Rev Genet*, *19*(7), 431-452. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z>
- Georgieva, M., & Vassileva, V. (2023). Stress Management in Plants: Examining Provisional and Unique Dose-Dependent Responses. *Int J Mol Sci*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065105>
- Ghanashyam, C., & Jain, M. (2009). Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(9), 846-848.
- Ghosh, A., Jindal, S., Bentley, A. A., Hinnebusch, A. G., & Komar, A. A. (2014). Rps5-Rps16 communication is essential for efficient translation initiation in yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic acids research*, *42*(13), 8537-8555.
- Ghozlan, M. H., Eman, E. L. A., Tokgöz, S., Lakshman, D. K., & Mitra, A. (2020). Plant defense against necrotrophic pathogens. *American Journal of Plant Sciences*, *11*(12), 2122-2138.

- Ghulam, M. M., Catala, M., & Abou Elela, S. (2020). Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress. *Nucleic acids research*, 48(4), 1954-1968.
- Giavalisco, P., Wilson, D., Kreitler, T., Lehrach, H., Klose, J., Gobom, J., & Fucini, P. (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the Arabidopsis thaliana 80S ribosome. *Plant Mol Biol*, 57(4), 577-591. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0699-3>
- Gilbert, W. V. (2011). Functional specialization of ribosomes? *Trends in biochemical sciences*, 36(3), 127-132.
- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (2004). mTOR signaling to translation. *TOR: Target of Rapamycin*, 169-197.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., Zhu, T., & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*, 34(2), 217-228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01717.x>
- Guest, D., Brown, J., Brown, J. F., & Ogle, H. J. (1997). Plant pathogens and plant diseases. *Plant Pathogens and Plant Diseases. Armidale, New South Wales Rockvale Publications*, 263-285.
- Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. *Front Plant Sci*, 9, 1836. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01836>
- Guo, H. (2018). Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochemical Society Transactions*, 46(4), 855-869. <https://doi.org/10.1042/BST20160426>
- Hahn, M., & Walbot, V. (1989). Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol*, 91(3), 930-938. <https://doi.org/10.1104/pp.91.3.930>
- Ham, J. H., Kim, M. G., Lee, S. Y., & Mackey, D. (2007). Layered basal defenses underlie non-host resistance of Arabidopsis to Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. *Plant J*, 51(4), 604-616. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03165.x>
- Hammerling, M. J., Fritz, B. R., Yoesep, D. J., Kim, D. S., Carlson, E. D., & Jewett, M. C. (2020). In vitro ribosome synthesis and evolution through ribosome display. *Nature Communications*, 11(1), 1108.
- Hann, D. R., & Rathjen, J. P. (2007). Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on Nicotiana benthamiana. *The Plant Journal*, 49(4), 607-618.
- Harrison, P. M., Hegyi, H., Balasubramanian, S., Luscombe, N. M., Bertone, P., Echols, N., Johnson, T., & Gerstein, M. (2002). Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22. *Genome research*, 12(2), 272-280.
- Heikkilä, J. J., Papp, J. E., Schultz, G. A., & Bewley, J. D. (1984). Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid, and wounding. *Plant Physiol*, 76(1), 270-274. <https://doi.org/10.1104/pp.76.1.270>
- Heintzman, N. D., & Ren, B. (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 386-400.
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*, 352(6292), 1413-1416. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>
- Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 318-327. <https://doi.org/10.1038/nrm1618>

- Hong, S., Freeberg, M. A., Han, T., Kamath, A., Yao, Y., Fukuda, T., Suzuki, T., Kim, J. K., & Inoki, K. (2017). LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *eLife*, *6*, e25237.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J. M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Tsukaya, H. (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *The Plant Journal*, *65*(5), 724-736.
- Horváth, E., Szalai, G., & Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, *26*, 290-300.
- Howden, A. J. M., Stam, R., Martinez Heredia, V., Motion, G. B., Ten Have, S., Hodge, K., Marques Monteiro Amaro, T. M., & Huitema, E. (2017). Quantitative analysis of the tomato nuclear proteome during *Phytophthora capsici* infection unveils regulators of immunity. *New Phytol*, *215*(1), 309-322. <https://doi.org/10.1111/nph.14540>
- Huey, R. B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A., & Kingsolver, J. G. (2002). Plants versus animals: do they deal with stress in different ways? *Integrative and Comparative Biology*, *42*(3), 415-423.
- Hummel, M., Cordewener, J. H., de Groot, J. C., Smeekens, S., America, A. H., & Hanson, J. (2012). Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MSE proteomics. *Proteomics*, *12*(7), 1024-1038. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100413>
- Imafuku, I., Masaki, T., Waragai, M., Takeuchi, S., Kawabata, M., Hirai, S. I., Ohno, S., Nee, L. E., Lippa, C. F., & Kanazawa, I. (1999). Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *The Journal of cell biology*, *147*(1), 121-134.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jalali, B. L., Bhargava, S., & Kamble, A. (2006). Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. *Journal of Phytopathology*, *154*(2), 65-74.
- Jewett, M. C., Fritz, B. R., Timmerman, L. E., & Church, G. M. (2013). In vitro integration of ribosomal RNA synthesis, ribosome assembly, and translation. *Molecular systems biology*, *9*(1), 678.
- Ji, X., Si, X., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, F., & Gao, C. (2018). Conferring DNA virus resistance with high specificity in plants using virus-inducible genome-editing system. *Genome biology*, *19*(1), 1-7.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, *444*(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, *444*(7117), 323-329.
- Juntawong, P., & Bailey-Serres, J. (2012). Dynamic Light Regulation of Translation Status in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, *3*, 66. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00066>
- Juntawong, P., Sorenson, R., & Bailey-Serres, J. (2013). Cold shock protein 1 chaperones mRNA during translation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *74*(6), 1016-1028.
- Kang, C. H., Lee, Y. M., Park, J. H., Nawkar, G. M., Oh, H. T., Kim, M. G., Lee, S. I., Kim, W. Y., Yun, D. J., & Lee, S. Y. (2016). Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant, Cell & Environment*, *39*(7), 1631-1642.
- Kaplan, I., Halitschke, R., Kessler, A., Sardanelli, S., & Denno, R. F. (2008). Constitutive and induced defenses to herbivory in above-and belowground plant tissues. *Ecology*, *89*(2), 392-406.

- Kapp, L. D., & Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem*, 73, 657-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>
- Karmous, I., Trevisan, R., El Ferjani, E., Chaoui, A., & Sheehan, D. (2017). Redox biology response in germinating *Phaseolus vulgaris* seeds exposed to copper: Evidence for differential redox buffering in seedlings and cotyledon. *PLOS ONE*, 12(10), e0184396.
- Kawaguchi, R., & Bailey-Serres, J. (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 460-465.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., & Bohnert, H. J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*, 13(4), 889-905.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20(4), 219-229.
- Khare, S., Singh, N. B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K. M., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R. K., & Amist, N. (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, 63, 203-216.
- Kim, J., Chubatsu, L. S., Admon, A., Stahl, J., Fellous, R., & Linn, S. (1995). Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *J Biol Chem*, 270(23), 13620-13629. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13620>
- Kim, Y.-K., Kim, S., Shin, Y.-j., Hur, Y.-S., Kim, W.-Y., Lee, M.-S., Cheon, C.-I., & Verma, D. P. S. (2014). Ribosomal protein S6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3901-3912.
- Kirsch, J. F., Siekevitz, P., & Palade, G. E. (1960). Amino acid incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from guinea pig liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 235(5), 1419-1424.
- Kisly, I., Remme, J., & Tamm, T. (2019). Ribosomal protein eL24, involved in two intersubunit bridges, stimulates translation initiation and elongation. *Nucleic acids research*, 47(1), 406-420.
- Klein, D. J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *Journal of molecular biology*, 340(1), 141-177.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., & Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in biochemical sciences*, 37(5), 189-198.
- Knogge, W., Lee, J., Rosahl, S., & Scheel, D. (2009). Signal perception and transduction in plants. *Plant relationships*, 337-361.
- Kombrink, E., & Schmelzer, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 69-78.
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., & Silver, P. A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, 131(3), 557-571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037>
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., & Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*, 145(3), 383-397.
- Kopecká, R., Kameniarová, M., Černý, M., Brzobohatý, B., & Novák, J. (2023). Abiotic Stress in Crop Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6603.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Práčil, I. T., Klíma, M., & Renaut, J. (2021). Plant Proteoforms Under Environmental Stress: Functional Proteins Arising From a Single Gene. *Front Plant Sci*, 12, 793113. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.793113>

- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 122.
- Lacerda, R., Menezes, J., & Romão, L. (2017). More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*, 1659-1680.
- Lafontaine, D. L. J. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nature structural & molecular biology*, *22*(1), 11-19.
- Lan, T., Xiong, W., Chen, X., Mo, B., & Tang, G. (2022). Plant cytoplasmic ribosomal proteins: an update on classification, nomenclature, evolution and resources. *Plant J*, *110*(1), 292-318. <https://doi.org/10.1111/tpj.15667>
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D., & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic acids research*, *30*(24), 5382-5390.
- Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A. P., Memelink, J., Pieterse, C. M. J., & Ritsema, T. (2010). Ethylene signaling renders the jasmonate response of Arabidopsis insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(2), 187-197.
- Li, S., Liu, K., Zhang, S., Wang, X., Rogers, K., Ren, G., Zhang, C., & Yu, B. (2017). STV1, a ribosomal protein, binds primary microRNA transcripts to promote their interaction with the processing complex in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(6), 1424-1429.
- Lim, C. W., Baek, W., Jung, J., Kim, J. H., & Lee, S. C. (2015). Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. *Int J Mol Sci*, *16*(7), 15251-15270. <https://doi.org/10.3390/ijms160715251>
- Liu, B., & Qian, S. B. (2014). Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *5*(3), 301-305.
- Luan, Y., Tang, N., Yang, J., Liu, S., Cheng, C., Wang, Y., Chen, C., Guo, Y. N., Wang, H., Zhao, W., Zhao, Q., Li, W., Xiang, M., Ju, R., & Xie, Z. (2022). Deficiency of ribosomal proteins reshapes the transcriptional and translational landscape in human cells. *Nucleic Acids Res*, *50*(12), 6601-6617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac053>
- Luo, A., Zhan, H., Zhang, X., Du, H., Zhang, Y., & Peng, X. (2020). Cytoplasmic ribosomal protein L14B is essential for fertilization in Arabidopsis. *Plant Science*, *292*, 110394.
- Maier, T., Schmidt, A., Güell, M., Kühner, S., Gavin, A. C., Aebersold, R., & Serrano, L. (2011). Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Molecular systems biology*, *7*(1), 511.
- Martinez-Seidel, F., Beine-Golovchuk, O., Hsieh, Y. C., & Kopka, J. (2020). Systematic Review of Plant Ribosome Heterogeneity and Specialization. *Front Plant Sci*, *11*, 948. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00948>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(19), 12031-12036. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2007). The Ribosome Filter Redux. *Cell Cycle*, *6*(18), 2246-2251. <https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4739>
- McIntosh, K. B., & Bonham-Smith, P. C. (2006). Ribosomal protein gene regulation: what about plants? *Botany*, *84*(3), 342-362.
- McQuillen, K., Roberts, R. B., & Britten, R. J. (1959). Synthesis of nascent protein by ribosomes in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *45*(9), 1437-1447.

- Mears, J. A., Cannone, J. J., Stagg, S. M., Gutell, R. R., Agrawal, R. K., & Harvey, S. C. (2002). Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. *Journal of molecular biology*, 321(2), 215-234.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 560-567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969-980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Mencia, R., Céccoli, G., Fabro, G., Torti, P., Colombatti, F., Ludwig-Müller, J., Alvarez, M. E., & Welchen, E. (2020). OXR2 increases plant defense against a hemibiotrophic pathogen via the salicylic acid pathway. *Plant Physiology*, 184(2), 1112-1127.
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245-266.
- Merchante, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant J*, 90(4), 628-653. <https://doi.org/10.1111/tpj.13520>
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., & Shinozaki, K. (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in biotechnology*, 15(1), 15-19.
- Moin, M., Bakshi, A., Saha, A., Dutta, M., Madhav, S. M., & Kirti, P. B. (2016). Rice Ribosomal Protein Large Subunit Genes and Their Spatio-temporal and Stress Regulation. *Front Plant Sci*, 7, 1284. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01284>
- Moir, R. D., & Willis, I. M. (2013). Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 361-375.
- Molavi, G., Samadi, N., & Hosseingholi, E. Z. (2019). The roles of moonlight ribosomal proteins in the development of human cancers. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8327-8341.
- Muench, D. G., Zhang, C., & Dahodwala, M. (2012). Control of cytoplasmic translation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(2), 178-194.
- Munoz, A., & Castellano, M. (2012). Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? *Comparative and functional genomics*, 2012.
- Murcia, G., Fontana, A., Pontin, M., Baraldi, R., Bertazza, G., & Piccoli, P. N. (2017). ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*, 135, 34-52.
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J Biosci*, 38(2), 433-449. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
- Myers Jr, R. J., Fichman, Y., Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2023). Jasmonic acid and salicylic acid modulate systemic reactive oxygen species signaling during stress responses. *Plant Physiology*, 191(2), 862-873.
- Nagaraj, S., Senthil-Kumar, M., Ramu, V. S., Wang, K., & Mysore, K. S. (2015). Plant Ribosomal Proteins, RPL12 and RPL19, Play a Role in Nonhost Disease Resistance against Bacterial Pathogens. *Front Plant Sci*, 6, 1192. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01192>
- Nakashima, A., Chen, L., Thao, N. P., Fujiwara, M., Wong, H. L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T., & Shimamoto, K. (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell*, 20(8), 2265-2279. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054395>

- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, *34*(5), 1447-1478.  
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Hess, D., Rietdorf, J., & Sun, F. L. (2006). Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev*, *20*(14), 1959-1973. <https://doi.org/10.1101/gad.390106>
- Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiology*, *150*(4), 1638-1647. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139709>
- Nicolai, M., Roncato, M. A., Canoy, A. S., Rouquié, D., Sarda, X., Freyssinet, G., & Robaglia, C. (2006). Large-Scale Analysis of mRNA Translation States during Sucrose Starvation in Arabidopsis Cells Identifies Cell Proliferation and Chromatin Structure as Targets of Translational Control. *Plant Physiology*, *141*(2), 663-673.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.079418>
- Nielsen, L. K., Cook, D. J., Edwards, S. G., & Ray, R. V. (2014). The prevalence and impact of Fusarium head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International journal of food microbiology*, *179*, 38-49.
- Nielsen, M. H., Flygaard, R. K., & Jenner, L. B. (2017). Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control. *Cellular Signalling*, *35*, 272-281.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., & Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO reports*, *5*(12), 1137-1141.
- Núñez, A., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, *20*(18), 3996-4009.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Paul Bolwell, G. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, *236*, 765-779.
- Ohashi, Y., & Matsuoka, M. (1985). Synthesis of Stress Proteins in Tobacco Leaves. *Plant and Cell Physiology*, *26*(3), 473-480. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076931>
- Olivares-Hernández, R., Bordel, S., & Nielsen, J. (2011). Codon usage variability determines the correlation between proteome and transcriptome fold changes. *BMC systems biology*, *5*, 1-9.
- Overmyer, K., Brosché, M., & Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*, *8*(7), 335-342.
- Pal, S. K., Liput, M., Piques, M., Ishihara, H., Obata, T., Martins, M. C. M., Sulpice, R., van Dongen, J. T., Fernie, A. R., & Yadav, U. P. (2013). Diurnal changes of polysome loading track sucrose content in the rosette of wild-type Arabidopsis and the starchless pgm mutant. *Plant Physiology*, *162*(3), 1246-1265.
- Palm, D., Streit, D., Shanmugam, T., Weis, B. L., Ruprecht, M., Simm, S., & Schleiff, E. (2019). Plant-specific ribosome biogenesis factors in Arabidopsis thaliana with essential function in rRNA processing. *Nucleic acids research*, *47*(4), 1880-1895.
- Perry, R. P. (2007). Balanced production of ribosomal proteins. *Gene*, *401*(1-2), 1-3.
- Petibon, C., Malik Ghulam, M., Catala, M., & Abou Elela, S. (2021). Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *12*(3), e1632.  
<https://doi.org/10.1002/wrna.1632>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hsiao, C., Norris, A. M., Kovacs, N. A., Waterbury, C. C., Stepanov, V. G., Harvey, S. C., Fox, G. E., Wartell, R. M., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2014). Evolution



- of the ribosome at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28), 10251-10256.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1407205111>
- Philippe, L., Vasseur, J.-J., Debart, F., & Thoreen, C. C. (2020). La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic acids research*, 48(13), 7604-7605.
- Plotkin, J. B. (2010). Transcriptional regulation is only half the story. *Molecular systems biology*, 6(1), 406.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A., & Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*, 331(6018), 730-736. <https://doi.org/10.1126/science.1198308>
- Raghavan, A., Ogilvie, R. L., Reilly, C., Abelson, M. L., Raghavan, S., Vasdewani, J., Krathwohl, M., & Bohjanen, P. R. (2002). Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic acids research*, 30(24), 5529-5538.
- Rajamäki, M. L., Xi, D., Sikorskaite-Gudziuniene, S., Valkonen, J. P. T., & Whitham, S. A. (2017). Differential Requirement of the Ribosomal Protein S6 and Ribosomal Protein S6 Kinase for Plant-Virus Accumulation and Interaction of S6 Kinase with Potyviral VPg. *Mol Plant Microbe Interact*, 30(5), 374-384. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-16-0122-r>
- Ramu, V. S., Dawane, A., Lee, S., Oh, S., Lee, H. K., Sun, L., Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2020). Ribosomal protein QM/RPL10 positively regulates defence and protein translation mechanisms during nonhost disease resistance. *Mol Plant Pathol*, 21(11), 1481-1494. <https://doi.org/10.1111/mpp.12991>
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A. M., Nielsen, H. B., & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(4), 1783-1794.
- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Gabriel, M. A. R., Guarinos, E., & Ballesta, J. P. G. (1995). Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(11-12), 959-968.
- Revenkova, E., Masson, J., Koncz, C., Afsar, K., Jakovleva, L., & Paszkowski, J. (1999). Involvement of Arabidopsis thaliana ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *Embo j*, 18(2), 490-499. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.490>
- Rodriguez-Celma, J., Lattanzio, G., Jimenez, S., Briat, J.-F., Abadia, J., Abadia, A., Gogorcena, Y., & Lopez-Millan, A.-F. (2013). Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the root protein profile of a peach-almond hybrid rootstock. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1162-1172.
- Roeber, V. M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2021). Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant Cell Environ*, 44(3), 645-664. <https://doi.org/10.1111/pce.13948>
- Rosado, A., Li, R., van de Ven, W., Hsu, E., & Raikhel, N. V. (2012). Arabidopsis ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19537-19544.
- Roy, B., & von Arnim, A. G. (2013). Translational Regulation of Cytoplasmic mRNAs. *Arabidopsis Book*, 11, e0165. <https://doi.org/10.1199/tab.0165>
- Russell, J., & Zomerdijk, J. C. B. M. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in biochemical sciences*, 30(2), 87-96.
- Saboki. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci. Against Microb. Pathog*, 2, 1043-1054.

- Saelee, N., Tonganunt-Srithaworn, M., Wanna, W., & Phongdara, A. (2011). Receptor for Activated C Kinase-1 protein from *Penaeus monodon* (Pm-RACK1) participates in the shrimp antioxidant response. *International journal of biological macromolecules*, *49*(1), 32-36.
- Sáez-Vásquez, J., & Delseny, M. (2019). Ribosome Biogenesis in Plants: From Functional 45S Ribosomal DNA Organization to Ribosome Assembly Factors. *Plant Cell*, *31*(9), 1945-1967. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00874>
- Saha, A., Das, S., Moin, M., Dutta, M., Bakshi, A., Madhav, M. S., & Kirti, P. B. (2017). Genome-Wide Identification and Comprehensive Expression Profiling of Ribosomal Protein Small Subunit (RPS) Genes and their Comparative Analysis with the Large Subunit (RPL) Genes in Rice. *Front Plant Sci*, *8*, 1553. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01553>
- Salih, K., Duncan, O., Li, L., O'Leary, B., Fenske, R., Troesch, J., & Millar, A. (2020). Impact of oxidative stress on the function, abundance and turnover of the Arabidopsis 80S cytosolic ribosome. *The Plant Journal*, *103*. <https://doi.org/10.1111/tbj.14713>
- Salih, K. J., Duncan, O., Li, L., Trosch, J., & Millar, A. H. (2020). The composition and turnover of the Arabidopsis thaliana 80S cytosolic ribosome. *Biochem J*, *477*(16), 3019-3032. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200385>
- Sauert, M., Temmel, H., & Moll, I. (2015). Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *Biochimie*, *114*, 39-47.
- Scarpin, M. R., Leiboff, S., & Brunkard, J. O. (2020). Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. *eLife*, *9*, e58795. <https://doi.org/10.7554/eLife.58795>
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *nature*, *473*(7347), 337-342.
- Shcherbik, N., & Pestov, D. G. (2019). The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: From Injury to Regulation. *Cells*, *8*(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111379>
- Shen, J. J., Chen, Q. S., Li, Z. F., Zheng, Q. X., Xu, Y. L., Zhou, H. N., Mao, H. Y., Shen, Q., & Liu, P. P. (2022). Proteomic and metabolomic analysis of *Nicotiana benthamiana* under dark stress. *FEBS Open bio*, *12*(1), 231-249.
- Shi, Z., & Barna, M. (2015). Translating the genome in time and space: specialized ribosomes, RNA regulons, and RNA-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, *31*, 31-54.
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K. M., Genuth, N. R., Röst, H. L., Teruel, M. N., & Barna, M. (2017). Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Molecular cell*, *67*(1), 71-83.
- Sikorski, M. M., Przybyl, D., Legocki, A. B., & Nierhaus, K. H. (1983). Group fractionation of wheat germ ribosomal proteins. *Plant science letters*, *30*(3), 303-320.
- Smith, S. M., Li, C., & Li, J. (2017). Hormone function in plants.
- Solano-De la Cruz, M. T., Adame-García, J., Gregorio-Jorge, J., Jiménez-Jacinto, V., Vega-Alvarado, L., Iglesias-Andreu, L. G., Escobar-Hernández, E. E., & Luna-Rodríguez, M. (2019). Functional categorization of de novo transcriptome assembly of *Vanilla planifolia* Jacks. potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *BMC Genomics*, *20*(1), 826. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6229-5>
- Solano de la Cruz, M. T., Adame-García, J., Gregorio-Jorge, J., Jiménez-Jacinto, V., Vega-Alvarado, L., Iglesias-Andreu, L., Escobar-Hernández, E. E., & Luna-Rodríguez, M. (2019). <https://doi.org/10.1101/660860>

- Son, S., & Park, S. R. (2023). Plant translational reprogramming for stress resilience. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1151587.
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jørgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P., & Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *Embo j*, *23*(5), 1008-1019. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600102>
- Spriggs, K. A., Bushell, M., & Willis, A. E. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular cell*, *40*(2), 228-237.
- Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M., & Willis, A. E. (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biology of the Cell*, *100*(1), 27-38.
- Stewart, C. (2012). Ribosomal protein mutants and their effects on plant growth and development.
- Szick-Miranda, K., & Bailey-Serres, J. (2001). Regulated heterogeneity in 12-kDa P-protein phosphorylation and composition of ribosomes in maize (*Zea mays* L.). *J Biol Chem*, *276*(14), 10921-10928. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011002200>
- Szick-Miranda, K., Zanical, A. S., Zanical, A. S., Abidayo, S., & Slater, K. L. C. (2010). Analysis of RPS15aE, an isoform of a plant-specific evolutionarily distinct ribosomal protein in *Arabidopsis thaliana*, reveals its potential role as a growth regulator. *Plant molecular biology reporter*, *28*, 239-252.
- Szick, K., Springer, M., & Bailey-Serres, J. (1998). Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(5), 2378-2383.
- Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J., & Meyuhas, O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, *21*(24), 8671-8683.
- Therizols, G. (2014). Rôle des ribosomes et de leur biogénèse dans la tumorigénèse et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques.
- Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol*, *2*(5), E71-72. <https://doi.org/10.1038/35010581>
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of cell science*, *126*(21), 4815-4821.
- Tiruneh, B. S., Kim, B.-H., Gallie, D. R., Roy, B., & Von Arnim, A. G. (2013). The global translation profile in a ribosomal protein mutant resembles that of an eIF3 mutant. *BMC biology*, *11*(1), 1-17.
- Ton, J., & Mauch-Mani, B. (2004).  $\beta$ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, *38*(1), 119-130.
- Trémousaygue, D., & Deslandes, L. (2020). L'immunité des plantes Pour des cultures résistantes aux maladies. In.
- Tuteja, N. (2007). Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, *2*(3), 135-138.
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 85.
- Vogel, C., de Sousa Abreu, R., Ko, D., Le, S. Y., Shapiro, B. A., Burns, S. C., Sandhu, D., Boutz, D. R., Marcotte, E. M., & Penalva, L. O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration

- can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Molecular systems biology*, 6(1), 400.
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*, 13(4), 227-232.
- Wan, J., Lv, J., Wang, C., & Zhang, L. (2022). RPS27 selectively regulates the expression and alternative splicing of inflammatory and immune response genes in thyroid cancer cells. *Adv Clin Exp Med*, 31(8), 889-901. <https://doi.org/10.17219/acem/147271>
- Wang, J., Lan, P., Gao, H., Zheng, L., Li, W., & Schmidt, W. (2013). Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. *BMC Genomics*, 14, 783. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-783>
- Wang, J., Lan, P., Gao, H., Zheng, L., Li, W., & Schmidt, W. (2013). Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. *BMC Genomics*, 14(1), 1-14.
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J., & Li, M. (2020). Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1446.
- Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C.-C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y.-J., Du, Y., Xie, S., & Zhang, C. (2018). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Molecular cell*, 69(1), 100-112.
- Wang, X., Ye, L., Lyu, M., Ursache, R., Löytynoja, A., & Mähönen, A. P. (2020). An inducible genome editing system for plants. *Nature plants*, 6(7), 766-772.
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2393.
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., & Jin, B. (2021). Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8568.
- Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular cell*, 34(1), 3-11.
- Warner, J. R., Vilardell, J., & Sohn, J. H. (2001). Economics of ribosome biosynthesis.
- Weijers, D., Franke-van Dijk, M., Vencken, R.-J., Quint, A., Hooykaas, P., & Offringa, R. (2001). An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene.
- Weis, B. L., Kovacevic, J., Missbach, S., & Schleiff, E. (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends in Plant Science*, 20(11), 729-740.
- Whittle, C. A., & Krochko, J. E. (2009). Transcript profiling provides evidence of functional divergence and expression networks among ribosomal protein gene paralogs in Brassica napus. *The Plant Cell*, 21(8), 2203-2219.
- Wilson, D. N., & Cate, J. H. D. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(5), a011536.
- Wool, I. G., Chan, Y.-L., & Glück, A. (1995). Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(11-12), 933-947.
- Xiong, W., Lan, T., & Mo, B. (2021). Extraribosomal Functions of Cytosolic Ribosomal Proteins in Plants. *Front Plant Sci*, 12, 607157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.607157>
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *nature*, 496(7444), 181-186.
- Xue, S., & Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 355-369.

- Xue, S., Tian, S., Fujii, K., Kladwang, W., Das, R., & Barna, M. (2015). RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *nature*, 517(7532), 33-38.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M., Kleier, D. A., & Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell*, 3(8), 809-818.
- Yan, H., Chen, D., Wang, Y., Sun, Y., Zhao, J., Sun, M., & Peng, X. (2016). Ribosomal protein L18aB is required for both male gametophyte function and embryo development in Arabidopsis. *Sci Rep*, 6, 31195. <https://doi.org/10.1038/srep31195>
- Yang, C., Zhang, C., Dittman, J. D., & Whitham, S. A. (2009). Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. *Virology*, 390(2), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.018>
- Yang, L., Li, B., Zheng, X.-y., Li, J., Yang, M., Dong, X., He, G., An, C., & Deng, X. W. (2015). Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in Arabidopsis hybrids. *Nature Communications*, 6(1), 7309.
- Yang, Y., Shah, J., & Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & development*, 11(13), 1621-1639.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292(5518), 883-896. <https://doi.org/10.1126/science.1060089>
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., & Mittler, R. (2022). Plant responses to climate change: metabolic changes under combined abiotic stresses. *J Exp Bot*, 73(11), 3339-3354. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac073>
- Zhang, A., Yang, X., Lu, J., Song, F., Sun, J., Wang, C., Lian, J., Zhao, L., & Zhao, B. (2021). OsIAA20, an Aux/IAA protein, mediates abiotic stress tolerance in rice through an ABA pathway. *Plant Science*, 308, 110903.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature reviews genetics*, 23(2), 104-119.
- Zhang, Y., & Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*, 16(5), 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.024>
- Zhang, Z., Harrison, P., & Gerstein, M. (2002). Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome. *Genome research*, 12(10), 1466-1482.
- Zhang, Z., Zhu, J.-Y., Roh, J., Marchive, C., Kim, S.-K., Meyer, C., Sun, Y., Wang, W., & Wang, Z.-Y. (2016). TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in Arabidopsis. *Current Biology*, 26(14), 1854-1860.
- Zhao, L., Cao, J., Hu, K., Wang, P., Li, G., He, X., Tong, T., & Han, L. (2019). RNA-binding protein RPS3 contributes to hepatocarcinogenesis by post-transcriptionally up-regulating SIRT1. *Nucleic acids research*, 47(4), 2011.
- Zhou, S., Cao, H., Zhao, Y., Li, X., Zhang, J., Hou, C., Ma, Y., & Wang, Q. (2016). RACK1 promotes hepatocellular carcinoma cell survival via CBR1 by suppressing TNF- $\alpha$ -induced ROS generation. *Oncol Lett*, 12(6), 5303-5308. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5339>
- Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11), 661-677.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zlotorynski, E. (2022). ncRNA regulation of mitochondrial transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(8), 520-520. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00509-3>

Zong, Y., Liu, Y., Xue, C., Li, B., Li, X., Wang, Y., Li, J., Liu, G., Huang, X., & Cao, X. (2022). An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nature Biotechnology*, 40(9), 1394-1402.

## ANNEXES

Tableau 1 : Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomales de la grande sous unités des ribosomes cytoplasmiques (48 PR) (Lan et al., 2022).

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>				
uL15	B A E	<i>AthuL14C</i>	AT3G04400	<i>RPL23C</i> , <i>EMB2171</i> , <i>EMBRYO DEFECTIVE 2171</i>	<i>OsauL14C</i>	LOC_Os10g32920					
		<i>AthuL15C</i>	AT1G70900	<i>RPL27aC</i>	<i>OsauL15A</i>	LOC_Os02g07890		rpIO	RPL28	RPL27A	Rpl27a
		<i>AthuL15B</i>	AT1G23290	<i>RPL27aB</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L27A</i> , <i>RPL27A</i> , <i>RPL27AB</i>	<i>OsauL15B</i>	LOC_Os03g29460					
uL16	B A E	<i>AthuL16A</i>	AT1G14320	<i>RPL10A</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L10</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L10 A</i> , <i>RPL10</i> , <i>RPL10A</i> , <i>SACS2 SUPPRESSOR OF ACAULIS 52</i>	<i>OsauL15C</i>	LOC_Os07g42170		rpIP	RPL10	RPL10	Rpl10
		<i>AthuL16B</i>	AT1G25910	<i>RPL10B</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L10 B</i> , <i>RPL10B</i>	<i>OsauL16A</i>	LOC_Os05g07700					
		<i>AthuL16C</i>	AT1G66580	<i>RPL10C</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L10 C</i> , <i>RPL10C</i> , <i>SAG24</i> , <i>SENESCENCE ASSOCIATED GENE 24</i>							
uL18	B A E	<i>AthuL18A</i>	AT3G25520	<i>RPL5A</i> , <i>ATL5</i> , <i>OLU5</i> , <i>OLIGOCELLULAR 5</i> , <i>PGY3</i> , <i>PIGGYBACK3</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L5</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L5 A</i> , <i>RPL5A</i>	<i>OsauL18A</i>	LOC_Os01g67134 <sup>b</sup>		rpIR	RPL5	RPL5	Rpl5
		<i>AthuL18B</i>	AT5G39740	<i>RPL5B</i> , <i>OL7</i> , <i>OLIGOCELLULAR 7</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L5 B</i> , <i>RPL5B</i>	<i>OsauL18B</i>	OsauL18-1 <sup>a</sup>					
uL22	B A E	<i>AthuL22A</i>	AT1G27400	<i>RPL17A</i>	<i>OsauL22A</i>	LOC_Os08g41810 <sup>b</sup>		rpIV	RPL17A	RPL17	Rpl17
		<i>AthuL22B</i>	AT1G67430	<i>RPL17B</i>	<i>OsauL22B</i>	LOC_Os09g08430					
uL23	B A E	<i>AthuL23A</i>	AT2G39460	<i>RPL23aA</i> , <i>ARABIDOPSIS THALIANA RIBOSOMAL PROTEIN L23A</i> , <i>ATRPL23A</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L23A</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L23A1</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L23AA</i> , <i>RPL23A</i> , <i>RPL23A1</i> , <i>RPL23AA</i>	<i>OsauL23A</i>	LOC_Os01g24690		rpW	RPL25	RPL23A	Rpl23a
		<i>AthuL23B</i>	AT3G55260	<i>RPL23aB</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L23A2</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L23AB</i> , <i>RPL23A2</i> , <i>RPL23AB</i>	<i>OsauL23B</i>	LOC_Os04g42270					
		<i>AthuL24A</i>	AT3G49910	<i>RPL26A</i>	<i>OsauL24A</i>	LOC_Os01g04730		rpIX	RPL26A	RPL26	Rpl26
uL24	B A E	<i>AthuL24B</i>	AT5G67510	<i>RPL26B</i>	<i>OsauL24B</i>	LOC_Os11g05370 <sup>b</sup>			RPL26B		
		<i>AthuL24C</i>	AT5G67510		<i>OsauL24C</i>	LOC_Os12g05430					
uL29	B A E	<i>AthuL29B</i>	AT2G39390	<i>RPL35B</i>	<i>OsauL29A</i>	LOC_Os02g30050		rpmC	RPL35A	RPL35	Rpl35
		<i>AthuL29A</i>	AT3G09500	<i>RPL35A</i>	<i>OsauL29B</i>	OsauL29-1 <sup>a</sup>			RPL35B		
		<i>AthuL29C</i>	AT3G55170	<i>RPL35C</i>							
		<i>AthuL29D</i>	AT5G02610	<i>RPL35D</i>							
uL30	B A E	<i>AthuL30B</i>	AT2G01250	<i>RPL7B</i>	<i>OsauL30A</i>	LOC_Os04g51630		rpmD	RPL7A	RPL7	Rpl7

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs	
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>					
eL6	E	<i>AthuL30C</i>	AT2G44120	<i>RPL7C</i>	<i>OsauL30B</i>	LOC_Os08g13690				RPL7B		
		<i>AthuL30D</i>	AT3G13580	<i>RPL7D</i>								
		<i>AtheL6C</i>	AT1G74050	<i>RPL6C</i>	<i>OsaeL6B</i>	LOC_Os04g39700				RPL6A	RPL6	Rpl6
		<i>AtheL6B</i>	AT1G74060	<i>RPL6B</i>	<i>OsaeL6A</i>	LOC_Os02g37862				RPL6B		
		<i>AtheL6A</i>	AT1G18540	<i>RPL6A</i>								
eL8	A E	<i>AtheL8A</i>	AT2G47610	<i>RPL7aA</i>	<i>OsaeL8B</i>	LOC_Os09g32976				RPL8A	RPL7A	Rpl7a
		<i>AtheL8B</i>	AT3G62870	<i>RPL7aB</i>	<i>OsaeL8A</i>	LOC_Os08g23710				RPL8B		
eL13	A E	<i>AtheL13C</i>	AT3G48960 <sup>d</sup>	<i>RPL13C</i>	<i>OsaeL13A</i>	LOC_Os03g37970				RPL13A	RPL13	Rpl13
		<i>AtheL13B</i>	AT3G49010	<i>RPL13B</i> , <i>40S RIBOSOMAL PROTEIN</i> , <i>ATBBC1</i> , <i>BBC1</i> , <i>BREAST BASIC CONSERVED 1</i> , <i>RSU2</i>	<i>OsaeL13B</i>	LOC_Os06g02510				RPL13B		
eL14	A E	<i>AtheL13D</i>	AT5G23900	<i>RPL13D</i>								
		<i>AtheL14A</i>	AT2G20450	<i>RPL14A</i>	<i>OsaeL14A</i>	LOC_Os02g40880				RPL14A	RPL14	Rpl14
		<i>AtheL14B</i>	AT4G27090	<i>RPL14B</i> , <i>RPL14B</i>	<i>OsaeL14B</i>	OsaeL14-1 <sup>a</sup> <sup>b</sup>				RPL14B		
		<i>AtheL15A</i>	AT4G16720	<i>RPL15A</i>	<i>OsaeL15A</i>	LOC_Os03g40180				RPL15A	RPL15	Rpl15
		<i>AtheL15B</i>	AT4G17390	<i>RPL15B</i>	<i>OsaeL15B</i>	LOC_Os05g19370				RPL15B		
eL18	A E	<i>AtheL18A</i>	AT2G47570 <sup>d</sup>	<i>RPL18A</i>	<i>OsaeL18A</i>	LOC_Os03g22180				RPL18A	RPL18	Rpl18
		<i>AtheL18B</i>	AT3G05590	<i>RPL18B</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L18</i> , <i>RPL18</i>	<i>OsaeL18B</i>	LOC_Os05g06310				RPL18B		
eL19	A E	<i>AtheL18C</i>	AT5G27850	<i>RPL18C</i> , <i>RPL18C</i>	<i>OsaeL18C</i>	LOC_Os07g47780						
		<i>AtheL19A</i>	AT1G02780	<i>RPL19A</i> , <i>EMB2386</i> , <i>EMBRYO DEFECTIVE 2386</i>	<i>OsaeL19A</i>	LOC_Os03g21940				RPL19A	RPL19	Rpl19
		<i>AtheL19B</i>	AT3G16780	<i>RPL19B</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 19B</i> , <i>RPL19B</i>	<i>OsaeL19B</i>	LOC_Os03g38260				RPL19B		
eL20	E	<i>AtheL19C</i>	AT4G02230	<i>RPL19C</i>								
		<i>AtheL20A</i>	AT1G29965		<i>OsaeL20A</i>	LOC_Os01g47660				RPL20A	RPL18A	Rpl18a
		<i>AtheL20B</i>	AT2G34480	<i>RPL18aB</i> , <i>L18AB</i> , <i>RPL18AB</i>	<i>OsaeL20B</i>	LOC_Os01g54870				RPL20B		
eL21	A E	<i>AtheL20C</i>	AT3G14600	<i>RPL18aC</i>	<i>OsaeL20C</i>	LOC_Os05g49030						
		<i>AtheL21A</i>	AT1G09590	<i>RPL21A</i>	<i>OsaeL21A</i>	LOC_Os03g04750				RPL21A	RPL21	Rpl21
		<i>AtheL21C</i>	AT1G09490	<i>RPL21C</i>	<i>OsaeL21B</i>	LOC_Os10g32920				RPL21B		LOC108349002
		<i>AtheL21E</i>	AT1G57660	<i>RPL21E</i>								
eL22	E	<i>AtheL21G</i>	AT1G57860	<i>RPL21G</i>	<i>OsaeL22A</i>	LOC_Os03g22340				RPL22A	RPL22	Rpl22
		<i>AtheL22A</i>	AT1G02830 <sup>d</sup>	<i>RPL22A</i>	<i>OsaeL22B</i>	LOC_Os07g47710				RPL22B		
		<i>AtheL22B</i>	AT3G05560	<i>RPL22B</i>								
eL24	A E	<i>AtheL22C</i>	AT5G27770	<i>RPL22C</i>								
		<i>AtheL24A</i>	AT2G36820	<i>RPL24A</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L24</i> , <i>RPL24A</i>	<i>OsaeL24A</i>	LOC_Os01g59990				RPL24A	RPL24	Rpl24
		<i>AtheL24B</i>	AT3G53020	<i>RPL24B</i> , <i>RIBOSOMAL PROTEIN L24</i> , <i>RPL24</i> , <i>RPL24B</i> , <i>SHORT VALVE1</i> , <i>STV1</i>	<i>OsaeL24B</i>	LOC_Os05g40620 <sup>b</sup>				RPL24B		
eL27	E	<i>AtheL27A</i>	AT2G32220	<i>RPL27A</i>	<i>OsaeL24C</i>	LOC_Os07g12250						
					<i>OsaeL27A</i>	LOC_Os02g18380				RPL27A	RPL27	Rpl27

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>				
eL28	E	AtheL27B	AT3G22230	RPL27B	OsaL27B	LOC_Os10g41470		RPL27B			
		AtheL27C	AT4G15000	RPL27C							
		AtheL28A	AT2G19730	RPL28A	OsaL28A	LOC_Os01g51020			RPL28	Rpl28	
eL29	E	AtheL28C	AT4G29410	RPL28C	OsaL28B	LOC_Os05g46430					
		AtheL29B	AT3G06680	RPL29B	OsaL29A	LOC_Os01g19840			RPL29	RPL29	Rpl29
		AtheL29A	AT3G06700	RPL29A	OsaL29B	LOC_Os05g28750					
eL30	A E	AtheL30A	AT1G36240 <sup>e</sup>	RPL30A	OsaL30A	LOC_Os01g16890			RPL30	RPL30	Rpl30
		AtheL30B	AT1G77940	RPL30B	OsaL30B	LOC_Os01g59730					
		AtheL30C	AT3G18740	RPL30C	OsaL30C	LOC_Os05g41110 <sup>b</sup>					
eL31	A E	AtheL31A	AT2G19740	RPL31A	OsaL31A	LOC_Os02g48860			RPL31A	RPL31	Rpl31
		AtheL31B	AT4G26230	RPL31B	OsaL31B	LOC_Os06g21480			RPL31B		
		AtheL31C	AT5G56710	RPL31C	OsaL31C	LOC_Os08g39500					
eL32	A E	AtheL32A	AT4G18100	RPL32A	OsaL32A	LOC_Os08g41300			RPL32	RPL32	Rpl32
		AtheL32B	AT5G46430	RPL32B	OsaL32B	LOC_Os09g32500					
					OsaL32C	LOC_Os09g32520					
eL33	A E	AtheL33A	AT1G07070	RPL35aA	OsaL32D	LOC_Os09g32532			RPL33A	RPL35A	Rpl35a
		AtheL33B	AT1G41880	RPL35aB	OsaL33A	LOC_Os02g54470			RPL33B		LOC108349682
		AtheL33C	AT1G74270	RPL35aC	OsaL33B	LOC_Os05g48220					
eL34	A E	AtheL33D	AT3G55750	RPL35aD	OsaL33C	LOC_Os05g48310					
		AtheL34A	AT1G26880	RPL34A	OsaL34A	LOC_Os08g08040			RPL34A	RPL34	Rpl34
		AtheL34B	AT1G89820	RPL34B, RIBOSOMAL PROTEIN L34, RPL34	OsaL34B	LOC_Os08g33920			RPL34B		
eL36	E	AtheL34C	AT3G28900	RPL34C	OsaL34C	LOC_Os09g24690					
		AtheL36A	AT2G37800	RPL36A	OsaL36A	LOC_Os01g62350			RPL36A	RPL36	Rpl36
		AtheL36B	AT3G53740	RPL36B	OsaL36B	LOC_Os05g38520			RPL36B		
eL37	A E	AtheL36C	AT5G02450	RPL36C							
		AtheL37A	AT1G15250	RPL37A	OsaL37A	LOC_Os02g02130			RPL37A	RPL37	Rpl37
		AtheL37B	AT1G52300	RPL37B	OsaL37B	LOC_Os02g58990			RPL37B		
eL38	A E	AtheL37C	AT3G16080	RPL37C	OsaL37C	LOC_Os08g03450					
		AtheL38A	AT2G43460	RPL38A	OsaL38A	LOC_Os11g24610 <sup>b</sup>			RPL38	RPL38	Rpl38
		AtheL38B	AT3G59540	RPL38B	OsaL38B	OsaL38-1 <sup>a</sup>					
eL39	A E	AtheL39A	AT2G25210	RPL39A	OsaL38C	OsaL38-2 <sup>a</sup>			RPL39	RPL39	Rpl39
		AtheL39B	AT3G02190	RPL39B	OsaL39A	LOC_Os02g55370					LOC103692831
		AtheL39C	AT4G31985	RPL39C	OsaL39B	LOC_Os06g08320					LOC103694169
				OsaL39C	OsaL39-1 <sup>a</sup>					LOC103690821	
										LOC103692785	
										LOC103693375	
										LOC103694404	

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>				
eL40	A E	AtheL40A	AT2G36170	RPL40A, 60S RIBOSOMAL PROTEIN L40 A, RPL40A, UBIQUITIN EXTENSION PROTEIN 2, UBO2	OsaL40A	LOC_Os03g13170	Ubq		RPL40A	UBA52	Uba52
		AtheL40B	AT3G52590	RPL40B, EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 16, EMB2167, EMBRYO DEFECTIVE 2167, ERD16, HAP4, HAPLESS 4, UBIQUITIN EXTENSION PROTEIN 1, UBO1	OsaL40B	LOC_Os03g15370	Ubl402		RPL40B		
eL41	A E	AtheL40C			OsaL40C	LOC_Os07g30640					
		AtheL40D			OsaL40D	LOC_Os09g27930 <sup>a</sup>	Ubl401				
		AtheL40E			OsaL40E	LOC_Os09g31019					
		AtheL40F			OsaL40F	LOC_Os09g39500					
		AtheL41H	AT1G56045	RPL41H	OsaL41A	OsaL41-1 <sup>a</sup>			RPL41A	RPL41	Rpl41
		AtheL41C	AT2G40205	RPL41C	OsaL41B	OsaL41-2 <sup>a</sup>			RPL41B		
eL42	A E	AtheL41D	AT3G08520	RPL41D	OsaL41C	OsaL41-3 <sup>a</sup>					
		AtheL41E	AT3G11120	RPL41E							
		AtheL41G	AT3G56020	RPL41G							
		AtheL41I		AtheL41-1 <sup>a</sup> <sup>b</sup>							
		AtheL41J		AtheL41-2 <sup>a</sup> <sup>b</sup>							
		AtheL42A	AT3G23390	RPL36aA, RPL36A, RPL36AA	OsaL42A	LOC_Os07g26740			RPL42A	RPL36A	Rpl36a
AtheL42B	AT4G14320	RPL36aB, API2, APICULATA 2, RPL36A B, RPL36AB	OsaL42B	LOC_Os07g33896 <sup>b</sup>			RPL42B		LOC108348287		
eL43	A E				OsaL42C	LOC_Os07g33997 <sup>b</sup>					
					OsaL42D	OsaL42-1 <sup>a</sup>					
					OsaL42E	OsaL42-2 <sup>a</sup>					
					OsaL42F	OsaL42-3 <sup>a</sup>					
					OsaL42G	OsaL42-4 <sup>a</sup>					
					OsaL42H	OsaL42-5 <sup>a</sup>					
P1	A E	AtheL43B	AT3G10950 <sup>d</sup>	RPL37aB	OsaL42I	OsaL42-6 <sup>a</sup>					
		AtheL43C	AT3G60245	RPL37aC	OsaL43A	LOC_Os01g48770			RPL43A	RPL37A	Rpl37a
		AthP1A	AT1G01100	RPP1A, 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1-1, RPP1 CO-ORTHOLOGOUS GENE 1, RPP1.1, RPP1A	OsaL43B	LOC_Os05g48320			RPL43B		LOC108348813
P2	A E	AthP1B	AT4G00810	RPP1B, 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1-2, RPP1 CO-ORTHOLOGOUS GENE 2, RPP1.2, RPP1B	OsaP1A	LOC_Os08g02340			RPP1A	RPLP1	Rplp1
		AthP1D	AT5G24510	RPP1D					RPP1B		

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>				
P2	A E	AthP1C	AT5G47700	RPP1C, 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1-3, RPP1 CO-ORTHOLOGOUS GENE 3, RPP1.3, RPP1C							
		AthP2B	AT2G27710	RPP2B	OsaP2A	LOC_Os01g09510 <sup>b</sup>			RPP2A	RPLP2	Rplp2
		AthP2A	AT2G27720 <sup>b</sup>	RPP2A	OsaP2B	LOC_Os02g32760			RPP2B		
		AthP2C	AT3G28500	RPP2C	OsaP2C	LOC_Os05g37330					
		AthP2D	AT3G44590	RPP2D	OsaP2D	LOC_Os07g14750					
		AthP2E	AT5G40040	RPP2E	OsaP2E	LOC_Os07g28710 <sup>d</sup>					
P3	E	AthP3A	AT4G25890	RPP3A	OsaP2F	LOC_Os08g15180 <sup>d</sup>					
		AthP3B	AT5G57290	RPP3B, ATP3B, P3B, RIBOSOMAL P3 PROTEIN B	OsaP3A	LOC_Os01g13080					
					OsaP3B	LOC_Os06g48780					

b, bactérien; e, eucaryotique; u, universel; B, bacteria; A, archaea; E, eucaryotes.



Tableau 2 : Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomales de la petite sous unités des ribosomes cytoplasmiques (33 PR) (Lan et al., 2022).

New family name	Taxonomic range	Arabidopsis			Oryza sativa			Bacteria CRPs	Yeast CRPs	Human CRPs	Rat CRPs
		New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>	New name	Gene ID	Old names <sup>d</sup>				
uS2	B A E	<i>AthuS2A</i>	AT1G72370	<i>RPSaA</i> , 40S RIBOSOMAL PROTEIN SA, AP40, P40, RP40, RPSAA	<i>OsauS2A</i>	LOC_0s03g08440		rpsB	RPS0A	RPSA	Rpsa
		<i>AthuS2B</i>	AT3G04770 <sup>d</sup>	<i>RPSaB</i> , 40S RIBOSOMAL PROTEIN SA B, RPSAB	<i>OsauS2B</i>	LOC_0s07g42450			RPS0B		
uS3	B A E	<i>AthuS3A</i>	AT2G31610	<i>RPS3A</i>	<i>OsauS3A</i>	LOC_0s03g38000		rpsC	RPS3	RPS3	Rps3
		<i>AthuS3B</i>	AT3G53870	<i>RPS3B</i>	<i>OsauS3B</i>	LOC_0s07g41750					
		<i>AthuS3C</i>	AT5G35530	<i>RPS3C</i>							
uS4	B A E	<i>AthuS4B</i>	AT5G15200	<i>RPS0B</i>	<i>OsauS4A</i>	LOC_0s03g05980		rpsD	RPS9A	RPS9	Rps9
		<i>AthuS4C</i>	AT5G39850	<i>RPS9C</i>	<i>OsauS4B</i>	LOC_0s11g38959			RPS9B		LOC103689992
uS5	B A E	<i>AthuS5A</i>	AT1G58380	<i>RPS2A</i> , XW8	<i>OsauS5A</i>	LOC_0s03g59310		rpsE	RPS2	RPS2	Rps2
		<i>AthuS5E</i>	AT1G58884	<i>RPS2E</i>	<i>OsauS5B</i>	LOC_0s07g10860					
		<i>AthuS5F</i>	AT1G58883	<i>RPS2F</i>							
		<i>AthuS5B</i>	AT1G59059	<i>RPS2B</i>							
		<i>AthuS5C</i>	AT2G41840	<i>RPS2C</i>							
uS7	B A E	<i>AthuS5D</i>	AT3G57490	<i>RPS2D</i>							
		<i>AthuS7A</i>	AT2G37270	<i>RPS5A</i> , ATRP5B, RIBOSOMAL PROTEIN 5B, RPS5B	<i>OsauS7A</i>	LOC_0s01g01060		rpsG	RPS5	RPS5	Rps5
		<i>AthuS7B</i>	AT3G11940	<i>RPS5B</i> , AML1, ARABIDOPSIS MINUTE-LIKE 1, ATRP5SA, ME12-LIKE PROTEIN 1, RIBOSOMAL PROTEIN 5A, RPS5A	<i>OsauS7B</i>	LOC_0s11g29190 <sup>d</sup>					
uS8	B A E	<i>AthuS8A</i>	AT1G07770	<i>RPS15aA</i> , RIBOSOMAL PROTEIN S15A, RPS15A	<i>OsauS8A</i>	LOC_0s02g27760		rpsH	RPS22A	RPS15A	Rps15a
		<i>AthuS8C</i>	AT2G39590 <sup>d</sup>	<i>RPS15aC</i>	<i>OsauS8B</i>	LOC_0s07g10720			RPS22B		
		<i>AthuS8D</i>	AT3G46040	<i>RPS15aD</i> , RIBOSOMAL PROTEIN S15A D, RPS15AD							
		<i>AthuS8F</i>	AT5G59650	<i>RPS15aF</i>							
		<i>AthuS9A</i>	AT2G09990	<i>RPS16A</i>	<i>OsauS9A</i>	LOC_0s11g03400		rpsI	RPS16A	RPS16	Rps16
uS9	B A E	<i>AthuS9B</i>	AT3G04230	<i>RPS16B</i>	<i>OsauS9B</i>	LOC_0s12g03090			RPS16B		
		<i>AthuS9C</i>	AT5G18380	<i>RPS16C</i>							
		<i>AthuS10A</i>	AT3G45030	<i>RPS20A</i>	<i>OsauS10A</i>	LOC_0s03g14530		rpsJ	RPS20	RPS20	Rps20
		<i>AthuS10B</i>	AT3G47370	<i>RPS20B</i>	<i>OsauS10B</i>	LOC_0s06g04290					
uS11	B A E	<i>AthuS10C</i>	AT5G62300	<i>RPS20C</i>	<i>OsauS10C</i>	LOC_0s10g08930					
		<i>AthuS11A</i>	AT2G38160	<i>RPS14A</i>	<i>OsauS11A</i>	LOC_0s02g08700 <sup>d</sup>		rpsK	RPS14A	RPS14	Rps14
		<i>AthuS11B</i>	AT3G11510	<i>RPS14B</i>	<i>OsauS11B</i>	LOC_0s02g03140			RPS14B		
		<i>AthuS11C</i>	AT3G52580	<i>RPS14C</i>	<i>OsauS11C</i>	<i>OsauS11-1<sup>b</sup></i>					
		<i>AthuS12A</i>	AT3G09680	<i>RPS23A</i>	<i>OsauS12A</i>	LOC_0s01g61814 <sup>d</sup>		rpsL	RPS23A	RPS23	Rps23
uS12	B A E	<i>AthuS12B</i>	AT5G02960	<i>RPS23B</i>	<i>OsauS12B</i>	LOC_0s03g04000			RPS23B		



b, bactérien; e, eucaryotique; u, universel; B, bacteria; A, archaea; E, eucaryotes.