

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES PARALOGUES *RPS18A* ET *RPS18B* DE LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

FRÉDÉRIQUE SERVANT

MAI 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d’abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, Dr François Dragon, pour son soutien constant. Je vous remercie de m’avoir accueillie dans votre laboratoire et de m’avoir accordée votre confiance. Merci de toujours souhaiter sincèrement le succès et le bien-être de vos étudiants. Ce fut un privilège et un réel plaisir de travailler à vos côtés au cours de ces dernières années.

Je tiens aussi à remercier sincèrement Dre Claire Bénard et Dr Jean Danyluk pour avoir accepté d’évaluer ce mémoire.

Merci à tous mes collègues du laboratoire pour vos conseils et votre soutien. Merci à Sophie, Ismaël, Nazim, Sandra, Aniket, Mouloud et Mathilde. J’aimerais particulièrement souligner ma reconnaissance envers Ndiellé, Imene et Chloé pour leur implication dans ce projet. Ndiellé, ce fut un plaisir de participer à ton développement scientifique. Je suis fière de toi et très heureuse que tu prennes le relais.

Finalement, je n’aurais pas pu relever ce défi sans l’aide précieuse de mon conjoint Charly. Merci pour ton amour, ta patience, tes encouragements, ton écoute et tous les petits sacrifices que tu as faits.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	x
RÉSUMÉ	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Le ribosome.....	2
1.1.1 La structure du ribosome.....	2
1.1.2 La traduction chez les eucaryotes.....	4
1.2 La biogenèse des ribosomes eucaryotes	6
1.2.1 La synthèse et la maturation des ARNr.....	6
1.2.2 Le SSU processome	8
1.3 Les ribosomopathies	9
1.4 Les protéines ribosomiques	10
1.4.1 Les fonctions des protéines ribosomiques	10
1.4.2 La paralogie des gènes encodant des protéines ribosomiques	11
1.4.3 La régulation de l'expression des protéines ribosomiques	14
1.5 La spécialisation des ribosomes	16
1.5.1 L'évolution du concept des ribosomes spécialisés	16
1.5.2 L'hétérogénéité structurale des ribosomes.....	17
1.5.3 L'hétérogénéité fonctionnelle des ribosomes	19
1.6 Les gènes <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i>	21
1.7 Les protéines uS13a et uS13b.....	24
1.8 Hypothèses et objectifs.....	27
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
2.1 Souches de bactéries et de levures.....	28

2.2 Milieux de culture	29
2.3 Préparation et transformation des cellules compétentes	29
2.4 Courbes de croissance.....	30
2.5 Mutagenèse dirigée et sous-clonage	30
2.6 Test de complémentation en milieu solide.....	32
2.7 Préparation de la souche YFS18ΔΔ	32
2.8 Rétrotranscription et PCR quantitative en temps réel.....	33
2.8.1 Extraction de l'ARN	33
2.8.2 Rétrotranscription.....	33
2.8.3 PCR en temps réel.....	33
2.8.4 Analyse quantitative	34
2.9 Extraction et analyse des protéines par immunobuvardage	35
2.10 Gradients de densité de saccharose	35
2.11 Immunoprécipitation et détermination des modifications post-traductionnelles.....	35
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	37
3.1 Le gène <i>RPS18A</i> a une contribution majeure dans la cellule.....	37
3.1.1 Le gène <i>RPS18A</i> contribue davantage à la croissance cellulaire que son paralogue <i>RPS18B</i>	37
3.1.2 Le gène <i>RPS18A</i> est plus important pour l'assemblage des ribosomes que son paralogue <i>RPS18B</i>	39
3.2 Création d'outils moléculaires pour étudier les paralogues <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i>	39
3.3 Régulation intergénique des paralogues <i>HA-RPS18A</i> et <i>MYC-RPS18B</i>	45
3.4 Le dosage génique affecte la croissance cellulaire de façon non-linéaire.....	49
CHAPITRE 4 DISCUSSION	53
4.1 Contribution inégale des paralogues <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i> dans la cellule.....	53
4.1.1 Le gène <i>RPS18A</i> est plus important que <i>RPS18B</i> pour la croissance cellulaire.	53
4.1.2 Le gène <i>RPS18A</i> est plus important que <i>RPS18B</i> pour la biogenèse des ribosomes.....	54
4.2 Création d'outils moléculaires pour distinguer uS13a et uS13b.....	55
4.2.1 Expression et détection des protéines marquées	55
4.2.2 Constructions plasmidiques et contrôle du dosage génique.....	56
4.2.3 Système génétique pour étudier la spécialisation des ribosomes	57
4.3 La régulation des paralogues <i>HA-RPS18A</i> et <i>MYC-RPS18B</i> selon leur dosage génique.....	58
4.3.1 Le gène <i>HA-RPS18A</i> est régulé transcriptionnellement.	60
4.3.2 Le gène <i>MYC-RPS18B</i> est régulé post-transcriptionnellement.....	61
4.3.3 Effets de multiples copies de <i>HA-RPS18A</i> ou <i>MYC-RPS18B</i> sur la croissance cellulaire.....	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	63
ANNEXE A Modifications post-traductionnelles répertoriées de uS13.....	65

ANNEXE B Courbe standard des réactions de qPCR.....	67
RÉFÉRENCES	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure du ribosome (80S) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Figure 1.2 La structure des sous-unités ribosomiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
Figure 1.3 Structure de l'ADNr et voies de maturation du pré-ARNr de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figure 1.4 Assemblage cotranscriptionnel du SSU processome dans le nucléole.	9
Figure 1.5 Estimation de la relation phylogénétique entre différentes espèces de levure.	12
Figure 1.6 Schéma des scénarios de duplication du génome après le croisement entre deux espèces de levure.	13
Figure 1.7 Les différentes sources d'hétérogénéité structurale des ribosomes.	18
Figure 1.8 Mécanismes potentiels de régulation de la traduction par des ribosomes spécialisés.	20
Figure 1.9 Alignement des séquences codantes de <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i>	22
Figure 1.10 Les protéines uS13a et uS13b ont des séquences d'acides aminés parfaitement identiques.	23
Figure 1.11 Structure des ARNm de <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i>	24
Figure 1.12 Sous-unité 40S du ribosome de <i>Tetrahymena thermophila</i>	25
Figure 1.13 Structure du SSU processome de la levure.	26
Figure 2.1 Plasmides YCplac33, YCplac111 et YEplac195.	31
Figure 3.1 Ralentissement de croissance des souches <i>rps18aΔ</i> et <i>rps18bΔ</i>	38
Figure 3.2 Défauts d'assemblage des ribosomes de souches <i>rps18aΔ</i> et <i>rps18bΔ</i>	39
Figure 3.3 Constructions <i>HA-RPS18A</i> et <i>MYC-RPS18B</i>	40
Figure 3.4 Souche de déplétion <i>P_{GAL}-RPS18A-rps18bΔ</i>	41
Figure 3.5 Test de complémentation en milieu solide.	42
Figure 3.6 Détection des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b par immunobuvardage.	43
Figure 3.7 La température n'a pas d'impact sur la complémentation avec les constructions marquées. .	44
Figure 3.8 Vérification de la délétion du gène <i>RPS18B</i>	44
Figure 3.9 Immunoprécipitation des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b.....	45

Figure 3.10 Surexpression des gènes <i>HA-RPS18A</i> et <i>MYC-RPS18B</i> en absence de leur paralogue respectif.	46
Figure 3.11 Régulation post-transcriptionnelle du gène <i>MYC-RPS18B</i>	47
Figure 3.12 Immundétection des protéines HA-uS13A et Myc-uS13b dans les souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9.....	49
Figure 3.13 Effets du dosage génique des paralogues <i>RPS18A</i> et <i>RPS18B</i> sur la croissance cellulaire.	50
Figure S.1 Phosphorylation de la Thr62 de la protéine uS13a.	66
Figure S.2 Courbe standard de l'efficacité des réactions de qPCR.....	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Composantes des sous-unités ribosomiques procaryotes et eucaryotes.	4
Tableau 2.1 Série de souches YFS18ΔΔ avec plasmides correspondants.	29
Tableau 2.2 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée.	31
Tableau 2.3 Plasmides utilisés pour l'expression dans la levure et leurs caractéristiques.	32
Tableau 2.4 Oligonucléotides utilisés pour la délétion du gène <i>RPS18B</i>	33
Tableau 2.5 Oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR.....	34
Tableau 3.1 Ralentissement de croissance des souches <i>rps18aΔ</i> et <i>rps18bΔ</i>	38
Tableau 3.2 Temps de doublement des souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 en milieu SD-Ura-Leu.	51
Tableau S.1 Modifications post-traductionnelles répertoriées des protéines uS13a et uS13b de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

A ₆₀₀	Absorbance à 600 nm
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
DO	Densité optique
ETS	Espaceur externe transcrit (<i>External Transcribed Spacer</i>)
IRES	Site d'entrée interne du ribosome (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ITS	Espaceur interne transcrit
LSU	Grande sous-unité (<i>Large Subunit</i>)
ORF	Cadre de lecture ouvert (<i>Open Reading Frame</i>)
Pré-ARNr	Acide ribonucléique ribosomique précurseur
RNP	Ribonucléoprotéine
RP	Protéine ribosomique
RPG	Gène de protéine ribosomique
RT	Transcription inverse (<i>Reverse Transcription</i>)
snoRNA	Petit acide ribonucléique nucléolaire
SSU	Petite sous-unité (<i>Small Subunit</i>)
uORF	ORF en amont (<i>Upstream Open Reading Frame</i>)
UTR	Région non-traduite (<i>untranslated region</i>)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Å	Ångström
°C	Degré Celsius
h	Heure
μL	Microlitre
mM	Millimolaire
min	Minute
ng	Nanogramme
S	Svedberg

RÉSUMÉ

Les ribosomes eucaryotes sont structurellement hétérogènes. Notamment, la composition en protéines ribosomiques varie d'un ribosome à l'autre. Cette diversité a conduit à l'hypothèse que des «ribosomes spécialisés» sont capables de traduire préférentiellement certains sous-ensembles d'ARNm. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un excellent modèle pour explorer cette hétérogénéité, car la plupart de ses protéines ribosomiques sont encodées par des gènes dupliqués. Parmi ceux-ci, les paralogues *RPS18A* et *RPS18B* codent pour la protéine universellement conservée uS13. Bien que leurs séquences nucléotidiques diffèrent (promoteurs, introns, 3'UTR), les protéines uS13a et uS13b qu'ils produisent ont des séquences en acides aminés identiques. Toutefois, la délétion de *RPS18A* entraîne des défauts de croissance et des déséquilibres dans le ratio des sous-unités ribosomiques plus sévères que celle de *RPS18B*, suggérant des fonctions distinctes. Pour distinguer uS13a et uS13b, nous avons inséré des séquences encodant les épitopes HA et Myc dans *RPS18A* et *RPS18B*, respectivement. Les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b marquées ont été exprimées à partir de plasmides. La fonctionnalité des protéines recombinantes a été confirmée par complémentation d'une souche délétée pour les deux gènes. La complémentation a été réalisée avec des plasmides centromériques (simple copie) ou 2 microns (multicopies) pour contrôler le dosage génique de *HA-RPS18A* et de *MYC-RPS18B*. L'analyse de l'abondance des pré-ARNm et ARNm épissés suggère que *RPS18A* est régulé au niveau transcriptionnel, tandis que *RPS18B* serait régulé à l'étape de l'épissage. Les outils moléculaires créés pour ces travaux permettront éventuellement de réaliser des analyses complémentaires telles que l'immunoprécipitation des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b et le profilage des ribosomes qui contiennent l'une ou l'autre de ces protéines.

Mots clés : Protéines ribosomiques, paralogues, ribosomes spécialisés, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Eukaryotic ribosomes are structurally heterogeneous. In particular, the composition in ribosomal proteins varies from one ribosome to another. This diversity has led to the hypothesis that “specialized ribosomes” are able to preferentially translate certain subsets of mRNAs. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an excellent model to explore this heterogeneity, as most of its ribosomal proteins are encoded by duplicated genes. Among these, the paralogs *RPS18A* and *RPS18B* encode the universally conserved protein uS13. Although their nucleotide sequences differ (promoters, introns, 3' UTRs), proteins uS13a and uS13b have identical amino acid sequences. However, deletion of *RPS18A* results in more severe growth defects and imbalance of ribosomal subunits ratio than deletion of *RPS18B*, suggesting distinct functions. To distinguish uS13a and uS13b, we inserted sequences encoding the HA and Myc epitopes into *RPS18A* and *RPS18B*, respectively. The tagged HA-uS13a and Myc-uS13b proteins were expressed from plasmids. The functionality of recombinant proteins was confirmed by complementation of a strain deleted for both genes. Complementation was performed using centromeric (single-copy) or 2-micron (multi-copy) plasmids to control gene dosage of *HA-RPS18A* and *MYC-RPS18B*. Analysis of the abundance of pre-mRNAs and spliced mRNAs suggests that *RPS18A* is regulated at the transcriptional level, whereas *RPS18B* is regulated at the splicing step. The molecular tools generated in this work will ultimately enable additional analyses, such as immunoprecipitation of the HA-uS13a and Myc-uS13b proteins and profiling of ribosomes that contain one or the other.

Keywords : Ribosomal proteins, paralogs, specialized ribosomes, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCTION

La traduction de l'information génétique en protéines repose sur l'activité des ribosomes, des complexes ribonucléoprotéiques hautement conservés. Longtemps considérés comme des machines moléculaires uniformes, les ribosomes eucaryotes se révèlent structurellement très diversifiés. Cette hétérogénéité soulève des questions fondamentales quant à ses conséquences fonctionnelles. Notamment, des maladies génétiques rares nommées ribosomopathies sont causées par des défauts dans l'assemblage ou la fonction des ribosomes. Bien que ces derniers soient ubiquitaires, les patients souffrant de ces maladies présentent souvent des symptômes restreints à des tissus ou organes spécifiques, selon les gènes affectés.

Dans ce travail, nous nous concentrons sur une source majeure de variation d'un ribosome à l'autre : les protéines ribosomiques. Pour ce faire, nous utilisons l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* qui partage de nombreux gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes avec l'humain. La protéine ribosomique universellement conservée uS13 est encodée par deux gènes paralogues chez la levure, soit *RPS18A* et *RPS18B*. Pourtant, les séquences en acides aminés de uS13a et uS13b sont parfaitement identiques. Nous nous interrogeons sur l'avantage évolutif conféré par cette apparente redondance génétique. Pour répondre à cette question, nous évaluons les différences fonctionnelles entre ces paralogues à l'aide d'analyses de la croissance cellulaire et de l'assemblage des ribosomes. Nous étudions aussi la régulation de leur expression. Les outils moléculaires développés dans ce cadre pourront ensuite être utilisés pour d'autres analyses complémentaires. Dans l'ensemble, cette recherche vise à améliorer notre compréhension de l'hétérogénéité des ribosomes.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre présente le cadre théorique général nécessaire pour comprendre le contexte de cette recherche ainsi que les hypothèses et objectifs. Le deuxième chapitre décrit le matériel, les constructions génétiques et les approches expérimentales utilisés. Le troisième chapitre aborde les résultats obtenus, notamment les différences fonctionnelles entre les paralogues *RPS18A* et *RPS18B* et leur régulation différentielle. Finalement, le quatrième chapitre constitue une discussion intégrative des résultats obtenus et propose des perspectives pour approfondir cette recherche à l'aide de futures analyses.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le ribosome

Le ribosome est le complexe ribonucléoprotéique fondamental qui effectue la traduction dans toutes les cellules vivantes. Durant la synthèse des protéines, le ribosome décode l'information génétique contenue dans l'ARN messager (ARNm) et catalyse la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés qui composent la protéine. Cette machine cellulaire est extrêmement conservée au cours de l'évolution, ce qui témoigne de son rôle essentiel (Petrov *et al.*, 2015).

1.1.1 La structure du ribosome

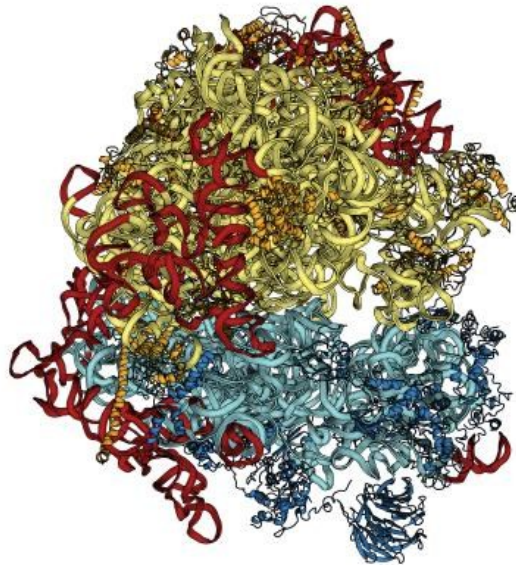


Figure 1.1 Structure du ribosome (80S) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette structure a été obtenue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 4.15 Å (Ben-Shem *et al.*, 2010). L'ARNr et les protéines de la sous-unité 40S sont indiqués en bleu pâle et bleu foncé, respectivement. L'ARNr et les protéines de la sous-unité 60S sont en jaune pâle et jaune orangé, respectivement. Les segments d'extension des ARNr (présents dans les ribosomes eucaryotes mais absents chez les procaryotes) sont représentés en rouge. Figure tirée de Ben-Shem *et al.* (2010).

Les ribosomes possèdent deux sous-unités: une petite sous-unité (SSU) qui contient le centre de décodage et une grande sous-unité (LSU) dans laquelle se trouve le centre peptidyl-transférase (Figure 1.1). Chacune

de ces sous-unités est composée d'ARN ribosomique (ARNr), responsable de l'activité catalytique, et de protéines ribosomiques (RP), qui ont un rôle structural (Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000).

Chacune des sous-unités ribosomiques est divisée en plusieurs structures. La petite sous-unité contient la tête, le bec, la plateforme et le corps (Figures 1.2A, B). La grande sous-unité possède la protubérance centrale, la tige L1 et la tige acide (Figures 1.2C, D).

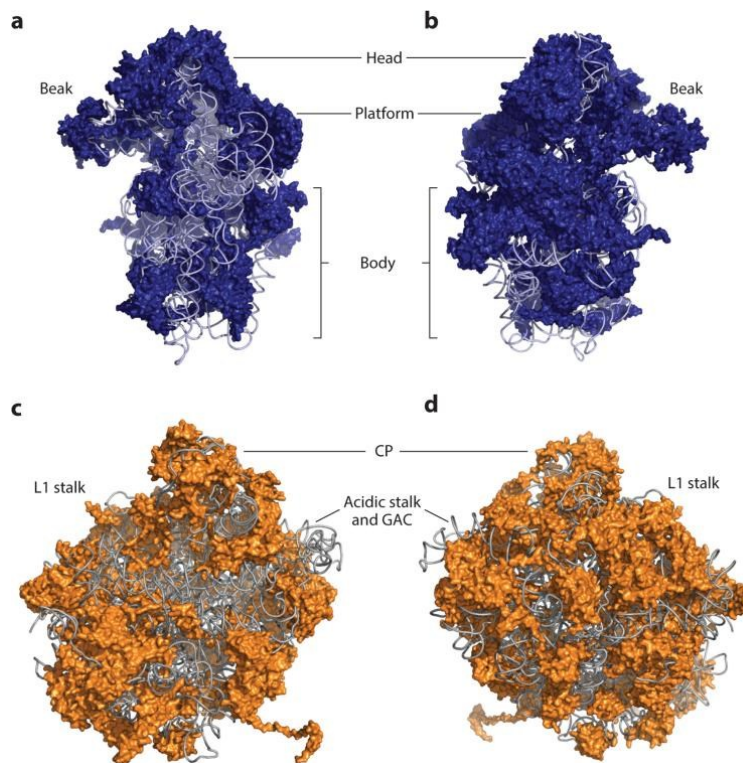


Figure 1.2 La structure des sous-unités ribosomiques de *Saccharomyces cerevisiae*.

La structure a été obtenue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 3.0 Å (Ben-Shem *et al.*, 2011). PDB: 3U5B, 3U5C, 3U5D, et 3U5E. Les sous-unités 40S (A, B) et 60S (C, D) sont composées d'ARNr (en gris) et de protéines (en bleu et orange, respectivement). Les SSU et LSU sont positionnées du côté de l'interface (A, C) ou du solvant (B, D). CP : protubérance centrale. Figure tirée de de la Cruz *et al.* (2015).

Bien que leurs composantes individuelles varient selon les espèces, la structure tridimensionnelle des ribosomes demeure extrêmement conservée (Melnikov *et al.*, 2012). Par exemple, les ribosomes procaryotes et eucaryotes diffèrent par la taille de leurs sous-unités, le nombre d'ARNr qu'ils contiennent

et la diversité de leurs protéines (Tableau 1.1). Toutefois, les ribosomes procaryotes et eucaryotes ont une forte homologie structurale, traduisant une conservation fonctionnelle essentielle (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Tableau 1.1 Composantes des sous-unités ribosomiques procaryotes et eucaryotes.

Ribosome procaryote (70S) de <i>E. coli</i>		Ribosome eucaryote (80S) de <i>S. cerevisiae</i>	
SSU (30S)	1 ARNr (16S) 21 RP	SSU (40S)	1 ARNr (18S) 33 RP
LSU (50S)	2 ARNr (5S et 23S) 33 RP	LSU (60S)	3 ARNr (5S, 5.8S et 25S) 46 RP

Les ribosomes de la bactérie *Escherichia coli* contiennent trois ARNr et 54 protéines (Shoji *et al.*, 2011). Les ribosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* possèdent quatre ARNr et 79 protéines (Ban *et al.*, 2014).

1.1.2 La traduction chez les eucaryotes

L'ARN messager eucaryote contient généralement une coiffe en 5' formée d'un résidu de 7-méthylguanosine (m⁷G) (Cowling, 2010) et une queue poly(A) d'environ 50 à 250 répétitions d'adénine à l'extrémité 3' du transcrit (Rodríguez-Molina & Turtola, 2022). En plus des séquences codantes pour une protéine, les ARNm contiennent aussi certaines régions non-codantes. Les séquences non traduites (UTR) se retrouvent aux extrémités 5' et en 3' de l'ARNm. Les UTR font partie du transcrit mature. La longueur du 3'UTR est déterminée par un signal de polyadénylation. Toutefois, certains ARNm possèdent plusieurs sites de polyadénylation menant à des variants des transcrits avec des 3'UTR de longueurs différentes (Guo & Lin, 2021). Les introns ne font pas partie des transcrits matures. Ils sont éliminés par le processus d'épissage avant leur exportation au cytoplasme. Les trois étapes de maturation de l'ARNm (ajout de la coiffe, polyadénylation et épissage) ont toutes des rôles importants dans la régulation de l'expression des gènes.

La traduction de l'ARNm en protéine est divisée en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction nécessite au moins 12 facteurs (Jackson *et al.*, 2010). L'initiation de la traduction débute par le recrutement d'un complexe de pré-initiation (PIC) de 43S à la coiffe 5' de l'ARNm. Ce complexe est constitué de la petite sous-unité (40S) du ribosome, de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction (eIF) et de l'ARNt initiateur porteur d'une méthionine. Le PIC se déplace le long de l'ARNm à la recherche du codon initiateur AUG. Ce mouvement de balayage permet au ribosome de tester la complémentarité des codons avec l'anticodon de l'ARNt initiateur. Les facteurs eIF1 et eIF1A assurent la fidélité en bloquant l'initiation aux codons non AUG (Basu *et al.*, 2022).

Lorsque le codon initiateur se retrouve au site peptidyl (P), le facteur eIF1 est libéré et le PIC subit un changement de conformation. Il y a ensuite formation du complexe d'initiation de la traduction (48S) et la liaison de la grande sous-unité ribosomique (60S). Toutes ces étapes nécessitent l'action coordonnée des eIF et facteurs auxiliaires (Jackson *et al.*, 2010).

Il existe des mécanismes alternatifs d'initiation de la traduction. Par exemple, les sites d'entrée interne du ribosome (IRES) sont des régions structurées dans le 5'UTR de l'ARNm qui recrutent directement le ribosome de façon indépendante de la coiffe 5' (Filbin & Kieft, 2009; Leppek *et al.*, 2018). La réinitiation de la traduction après un uORF est un autre mécanisme non-canonique de l'initiation de la traduction. Un uORF est un cadre de lecture ouvert (ORF) court en amont de l'ORF principal d'un ARNm. La réinitiation a lieu lorsqu'un ribosome initie la traduction de l'ORF principal directement après la terminaison de la traduction de l'uORF qui le précède sur l'ARNm (Jackson *et al.*, 2010). Les mécanismes alternatifs de l'initiation de la traduction contribuent à la régulation de la synthèse protéique, particulièrement dans des conditions de stress.

La phase d'élongation débute une fois le ribosome entier (80S) positionné au codon AUG initiateur de l'ARNm. Le facteur eEF1A guide l'ARN de transfert (ARNt) portant un acide aminé spécifique vers le site aminoacyl-ARNt (A) du ribosome. La correspondance entre l'anticodon de l'ARNt et le codon de l'ARNm déclenche l'hydrolyse de la GTP et la libération de eEF1A. L'activité catalytique de l'ARNr de la grande sous-unité du ribosome permet la formation d'une liaison peptidique entre l'acide aminé couplé à l'ARNt au site A et l'acide aminé ou le peptide associé à l'ARNt au site peptidyl-ARNt (P). Le facteur d'élongation eEF2 contribue au décalage de l'ARNm de trois nucléotides et à la translocation des ARNt qui passent des sites A et P aux sites P et E, respectivement. L'ARNt désacylé qui se retrouve au site *exit* (E) est relâché et le cycle se répète avec l'arrivée d'un nouvel aminoacyl-ARNt au site A (Dever & Green, 2012).

La terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome atteint un codon UAA, UAG ou UGA au site A. Les facteurs eRF1 et eRF3 reconnaissent ces codons d'arrêt et catalysent la libération de la chaîne polypeptidique. Après la terminaison, les sous-unités du ribosome, l'ARNm et l'ARNt désacétylé doivent être dissociés et recyclés pour une nouvelle ronde de traduction (Dever & Green, 2012). Cette dissociation est parfois partielle, ce qui peut mener à la réinitiation d'un second ORF sur le même ARNm (Kozak, 1984).

1.2 La biogenèse des ribosomes eucaryotes

La biogenèse des ribosomes eucaryotes est un processus très complexe nécessitant la coordination des trois ARN polymérases et de centaines de protéines et de petits ARN nucléolaires (snoRNA) (Fromont-Racine *et al.*, 2003). Les différentes étapes pour synthétiser les ribosomes ont lieu dans le nucléole, dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme (Kressler *et al.*, 2010).

Le nucléole est un sous-compartiment du noyau contenant, dans la levure, environ 150 répétitions en tandem d'ADNr situées sur le chromosome XII (Petes, 1979). Ces unités de transcription observées par microscopie électronique forment des structures nommées *Christmas tree* (Miller & Beatty, 1969). Le tronc de cet arbre correspond à l'ADNr et les branches sont les brins de pré-ARNr activement transcrits. Des ornements ou granules observés aux extrémités de ces branches sont composés de protéines et de RNP qui commencent à s'assembler à l'extrémité 5' des pré-ARNr de façon cotranscriptionnelle (Osheim *et al.*, 2004).

1.2.1 La synthèse et la maturation des ARNr

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le pré-ARNr 35S est transcrit par l'ARN polymérase I dans le nucléole. Il est le précurseur des ARNr 18S, 5.8S et 25S. Cet ARN polycistronique de 6,6 kb contient des espaceurs externes (ETS) en 5' et en 3' et des espaceurs internes (ITS) qui séparent les séquences des ARNr 18S, 5.8S et 25S (Figure 1.3). L'ARNr 5S est transcrit séparément par l'ARN polymérase III dans le nucléoplasme et les gènes encodant les protéines ribosomiques sont transcrits par l'ARN polymérase II puis traduits dans le cytoplasme. Les protéines sont ensuite importées dans le noyau afin d'être incorporées dans les sous-unités ribosomiques pendant la transcription et la maturation des ARNr.

La maturation des ARNr inclut les modifications chimiques d'environ 200 nucléotides et des clivages successifs de l'ARNr précurseur. Les modifications covalentes du pré-ARNr dans le nucléole sont guidées par des petits ARN nucléolaires (snoRNA). La 2'-O-méthylation est guidée par des snoRNA de la famille C/D associés à la méthyltransférase Nop1. La pseudouridylation, c'est-à-dire la conversion d'uridines en pseudouridines (Ψ), est guidée par les snoRNA de la famille H/ACA et est catalysée par la pseudouridine synthase Cbf5 (Gerbi *et al.*, 2003). Ces étapes de maturation peuvent avoir lieu de façon cotranscriptionnelle (Koř & Tollervey, 2010; Osheim *et al.*, 2004).

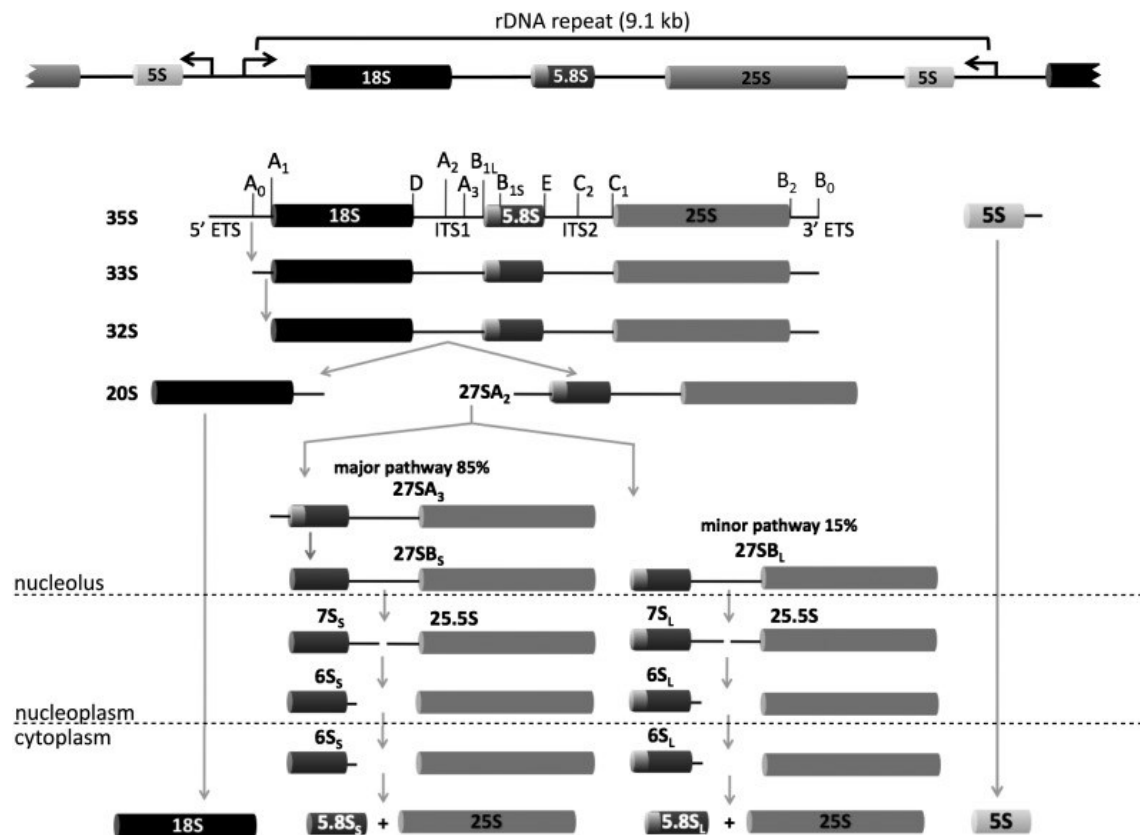


Figure 1.3 Structure de l'ADNr et voies de maturation du pré-ARNr de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les séquences correspondant aux ARNr 18S, 5.8S_S et 5.8S_L, 25S et 5S sont représentés par des cylindres noir, gris foncé, gris clair et blanc, respectivement. Les ETS et ITS sont représentés par des lignes noires. Figure tirée de Woolford & Baserga (2013).

La RNase III est responsable du clivage en 3' qui génère le pré-ARNr 35S (Kufel *et al.*, 1999). Les clivages aux sites A0 et A1 éliminent le 5'ETS. L'ITS 1 est clivé au site A2, séparant l'intermédiaire 32S en pré-ARNr 20S et 27SA2 (Figure 1.3). Le pré-ARNr 20S est exporté au cytoplasme et clivé en 3' au site D par l'endonucléase Nob1 afin de générer l'ARNr 18S mature. La majorité (environ 85 à 90%) du pré-ARNr 27SA2 est clivé au site A3 (Henry *et al.*, 1994). L'extrémité 5' de cet intermédiaire est retirée par les exonucléases Rat1 et Rrp17 jusqu'au site B1_S. Le reste (environ 10 à 15%) du pré-ARNr 27SA2 est clivé directement au site B1_L. Les deux intermédiaires générés, 27SB_S (90%) et 27SB_L (10%), sont ensuite clivés au site C2. Les ARNr 25S et 5.8S sont générés après quelques étapes de maturation. L'ARNr 5.8S est divisé en deux formes : La forme courte, 5.8S_S et la forme longue, 5.8S_L qui diffèrent de seulement six nucléotides. L'une ou l'autre des formes peut être intégrée au ribosome (Woolford & Baserga, 2013).

1.2.2 Le SSU processome

Le SSU processome est une grande ribonucléoprotéine (environ 80S) nécessaire pour les premières étapes de la maturation de la sous-unité 40S (SSU) du ribosome eucaryote (Dragon *et al.*, 2002; Phipps *et al.*, 2011). Il est constitué du petit ARN nucléolaire (snoRNA) U3 et d'environ 72 protéines ribosomiques et non ribosomiques (Dragon *et al.*, 2002; Grandi *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2011). Les composantes du SSU processome peuvent stabiliser et protéger l'ARN de la dégradation, empêcher la formation de structures secondaires prématurées, guider le positionnement d'autres facteurs ou avoir une activité enzymatique (Chaker-Margot, 2018).

Le SSU processome se forme progressivement à l'extrémité 5' du pré-ARNr pendant sa transcription et initie le repliement et le clivage du précurseur de l'ARNr 18S (Figure 1.4). Les composants du SSU processome sont assemblés de façon coordonnée, selon une hiérarchie bien définie (Pérez-Fernández *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016). Ils sont rassemblés en cinq sous-complexes : UtpA, UtpB, UtpC, Mpp10 et U3 snoRNP (Barandun *et al.*, 2018). Des protéines ribosomiques sont également incorporées au SSU processome (Barandun *et al.*, 2018). Certaines de ces protéines ont des fonctions de stabilisation et de repliement de l'ARNr, de chaperonne ou de site de liaison pour d'autres protéines (Kovacs *et al.*, 2009).

Le SSU processome joue un rôle essentiel dans la biogenèse des ribosomes eucaryotes. Il est essentiel aux clivages du pré-ARNr 35S aux sites A0, A1 et A2 (Bernstein *et al.*, 2004; Dragon *et al.*, 2002; Dunbar *et al.*, 1997). Il est aussi indispensable pour la transcription, la modification et l'assemblage de l'ARNr (Phipps *et al.*, 2011). Des mutations dans les composants du SSU processome causent des défauts dans la biogenèse des ribosomes. Chez l'humain, ces mutations causent des maladies génétiques rares nommées ribosomopathies (Sondalle & Baserga, 2014).

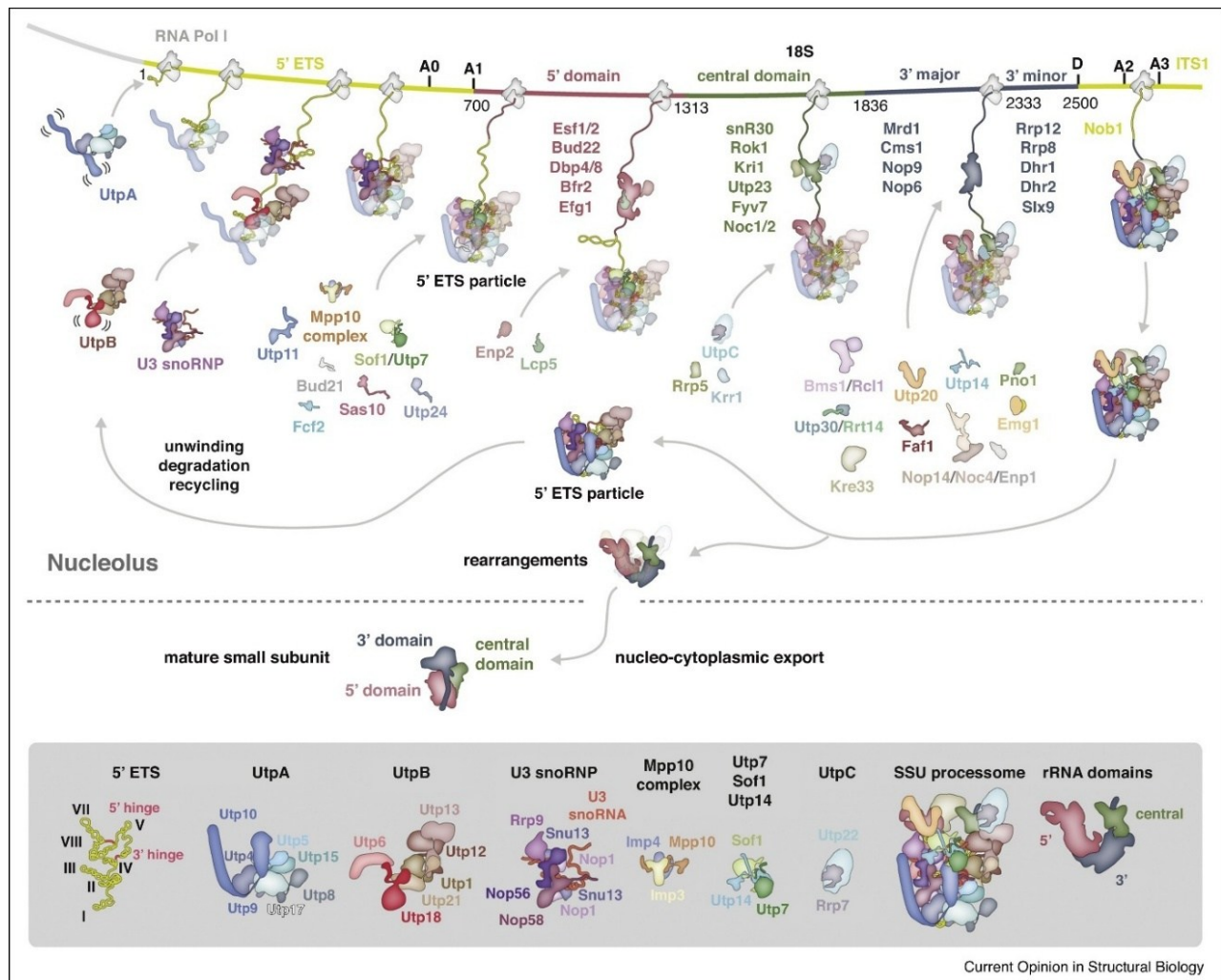


Figure 1.4 Assemblage cotranscriptionnel du SSU processome dans le nucléole.

Les sections 5'ETS et ITS1 sont indiquées en jaune, l'ARNr 18S est en rouge (domaine 5'), vert (domaine central) et en gris (domaine 3'). Les facteurs transitoires sont colorés selon le domaine d'ARNr auquel ils s'associent. Figure tirée de Barandun *et al.* (2018).

1.3 Les ribosomopathies

Les ribosomopathies sont des maladies génétiques causées par des défauts dans l'assemblage ou la fonction des ribosomes. La ribosomopathie la plus étudiée est l'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) ou érythroblastopénie congénitale. Dans cette maladie, les globules rouges sont particulièrement affectés par les défauts dans la biogenèse des ribosomes. Les patients atteints de DBA ont également des malformations des membres, du visage et de plusieurs organes (Danilova & Gazda, 2015).

L'haploinsuffisance de certaines protéines ribosomiques est la cause de plusieurs ribosomopathies (Dutt *et al.*, 2011). Notamment, des mutations dans le gène *RPS19* sont détectées dans 25% des cas de DBA (Draptchinskaia *et al.*, 1999; Dutt *et al.*, 2011). L'haploinsuffisance de plusieurs protéines ribosomiques (RP), comme uL18, est associée à plusieurs types de cancers (Fancello *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2021; Keersmaecker *et al.*, 2013). De plus, les patients atteints de ribosomopathies sont plus susceptibles de développer des cancers (Kampen *et al.*, 2020). Dans les ribosomopathies, l'activation de la voie p53 est fréquente en raison du stress causé par les ribosomes défectueux (Kang *et al.*, 2021).

D'autres ribosomopathies, telles que le syndrome de Shwachman-Diamond, la dyskératose congénitale ou le syndrome de Treacher Collins sont causées par des mutations dans d'autres gènes aussi impliqués dans la biogenèse des ribosomes : *SBDS*, *DKC1* et *TCOF1* (Narla & Ebert, 2010).

Il est intéressant de noter que, bien que les ribosomes soient présents partout dans le corps, les phénotypes des ribosomopathies sont souvent localisés dans certains tissus spécifiques (McCann & Baserga, 2013). Par ailleurs, différents tissus sont affectés par différentes ribosomopathies (Narla & Ebert, 2010). Les phénotypes spécifiques aux tissus pourraient être expliqués par l'hypothèse de la spécialisation des ribosomes (Nakhoul *et al.*, 2014).

1.4 Les protéines ribosomiques

1.4.1 Les fonctions des protéines ribosomiques

Les protéines ribosomiques jouent un rôle structural dans le ribosome. Elles sont nécessaires non seulement pour la traduction, mais aussi pour la maturation et l'assemblage des ribosomes. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 64 des 79 protéines ribosomiques sont essentielles pour la croissance (Steffen *et al.*, 2012).

Durant la biogenèse du ribosome, l'incorporation des RP est cruciale pour la maturation des sous-unités. Elles affectent le repliement de l'ARNr ce qui peut créer des nouveaux sites de liaison pour d'autres protéines ou facteurs d'assemblage (Ramaswamy & Woodson, 2009). Les RP agissent parfois comme chaperonnes en protégeant des sections d'ARNr d'un mauvais repliement et en stabilisant les bonnes conformations (Kovacs *et al.*, 2009; Semrad *et al.*, 2004). La délétion de protéines ribosomiques essentielles cause des défauts de clivage aux sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr (Guthrie *et al.*, 1969).

Plusieurs protéines ribosomiques font partie du SSU processome (Bernstein *et al.*, 2004). Elles sont ajoutées aux sous-unités selon une hiérarchie précise (Kruiswijk *et al.*, 1978). Les RP situées dans le corps de la sous-unité 40S sont généralement importantes pour des étapes précoces de la maturation du pré-ARNr, alors que celles situées près de la tête de la SSU sont souvent plus importantes pour des étapes tardives (Woolford & Baserga, 2013). Certaines RP de la sous-unité 40S sont également nécessaires pour l'exportation de l'intermédiaire 20S au cytoplasme (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

Une fois le ribosome formé, les protéines ribosomiques stabilisent les structures d'ARNr et sont responsables d'interactions entre les sous-unités (Rhodin & Dinman, 2011). Elles peuvent servir de sites de liaison pour des facteurs impliqués dans la traduction. Par exemple, la protéine uS2 (S0) interagit directement avec la sous-unité Tif32 du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (Kouba *et al.*, 2012; Valášek *et al.*, 2003). Les RP sont également nécessaires pour assurer la fidélité de la traduction (Stansfield *et al.*, 1998; Synetos *et al.*, 1996).

Plusieurs protéines ribosomiques ont également des rôles en dehors du ribosome. Par exemple, la phosphorylation de la protéine ribosomique eS6 régule la taille cellulaire par la voie mTOR chez la souris (Ruvinsky & Meyuhas, 2006). Un autre exemple est la protéine uL30 (L7) qui interagit directement avec le récepteur de la vitamine D et corégule son activation (Berghöfer-Hochheimer *et al.*, 1998). Plus d'une douzaine de RP, lorsqu'elles sont hors du ribosome, activent la voie p53 en réponse au stress ribosomique (Deisenroth *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2015). En plus d'activer des suppresseurs de tumeurs, plusieurs RP inactivent directement des oncoprotéines comme c-Myc (Zhou *et al.*, 2015). Certaines RP peuvent lier des ARNm spécifiques et moduler leur traduction en dehors du ribosome (Lindström, 2009).

1.4.2 La paralogie des gènes encodant des protéines ribosomiques

Chez les mammifères, la majorité des protéines ribosomiques sont encodées par un seul gène. Toutefois, dans plusieurs organismes tels que la levure, les plantes et la drosophile, de nombreuses protéines ribosomiques sont encodées par des gènes paralogues (Xue & Barna, 2012). Les gènes paralogues sont des gènes homologues issus de la duplication d'un gène ancestral.

Chez la levure, 59 des 79 protéines ribosomiques sont encodées par des gènes dupliqués (Planta & Mager, 1998; Simoff *et al.*, 2009). Deux hypothèses peuvent expliquer le dédoublement de nombreux gènes de la

levure. La première et la plus populaire est celle d'un événement ancestral de duplication du génome entier datant d'environ 100 millions d'années (Figure 1.5) (Kellis *et al.*, 2004; Wolfe & Shields, 1997).

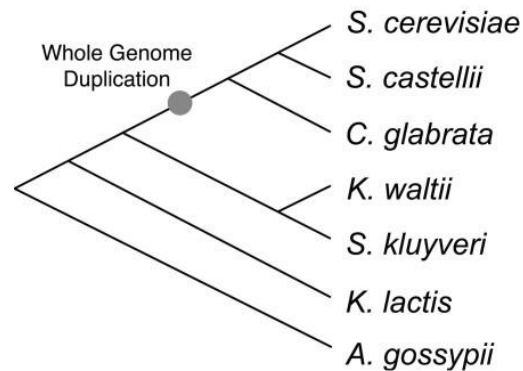


Figure 1.5 Estimation de la relation phylogénétique entre différentes espèces de levure.

La duplication du génome entier est représentée par un cercle gris (pas à l'échelle). Figure tirée de Byrne & Wolfe (2005).

Une autre hypothèse, proposée plus récemment, est l'hybridation de deux espèces de levure apparentées (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). Lors d'un croisement entre deux espèces ayant des génomes différents, une duplication devrait tout de même avoir lieu (Figure 1.6) pour restaurer la fertilité de la nouvelle espèce hybride (Wolfe, 2015).

Puisqu'il est encore difficile de distinguer l'origine évolutive exacte des gènes dupliqués, l'appellation « paralogues » sera utilisée pour désigner les paires de gènes encodant des protéines ribosomiques.

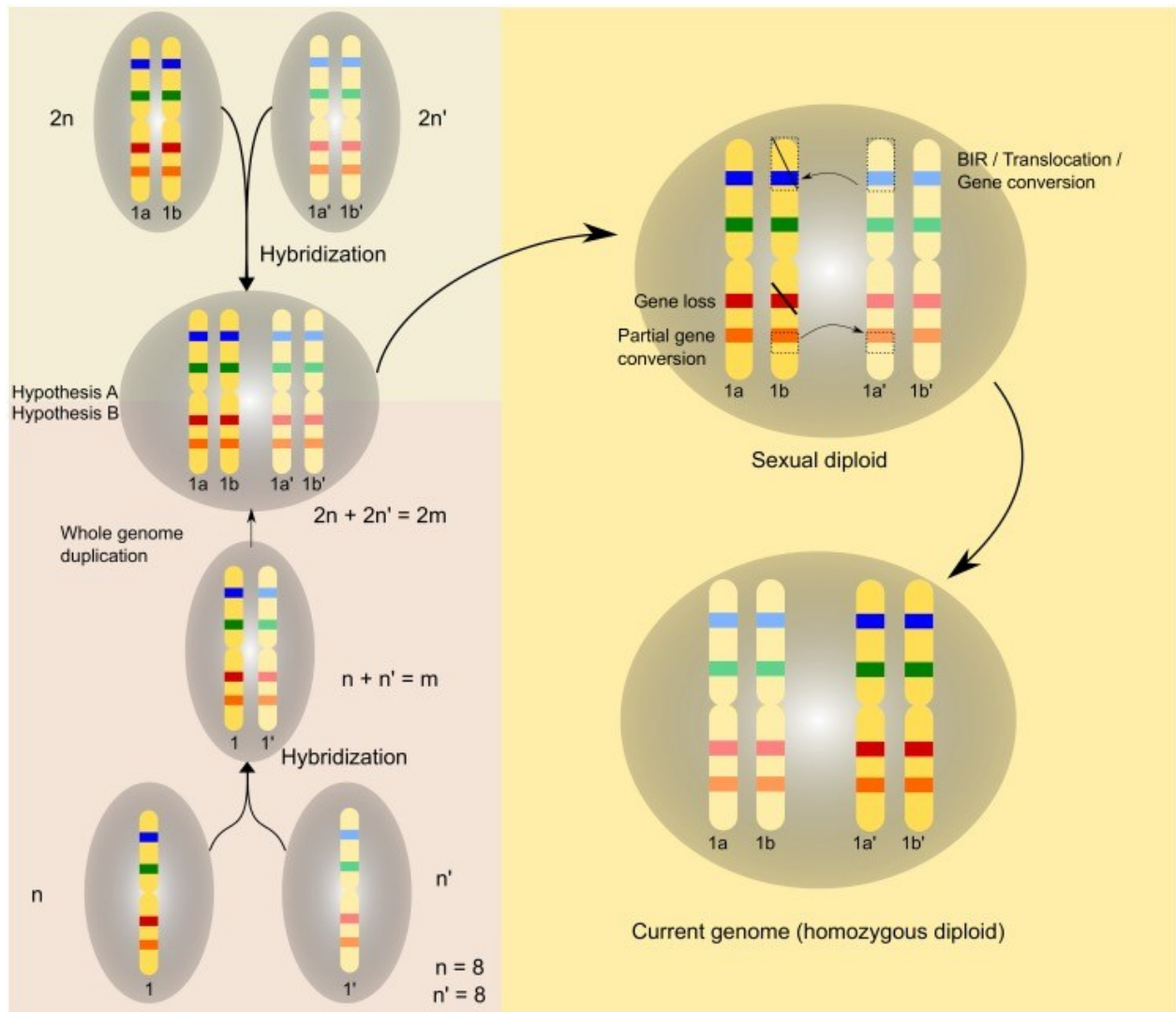


Figure 1.6 Schéma des scénarios de duplication du génome après le croisement entre deux espèces de levure.

Les bandes colorées sur les chromosomes représentent des gènes. Les paires de gènes de la même couleur sont des paralogues. Hypothèse A : Il y a fusion de deux cellules diploïdes pour former l'allotétraploïde. Hypothèse B : Il y a fusion de deux cellules haploïdes, formant un hybride diploïde. Par la suite, une duplication du génome entier génère l'allotétraploïde. La partie de droite représente les différentes modifications du génome (réplication induite par cassure (BIR), translocation, conversion totale ou partielle de gènes, perte de gènes) qui peuvent suivre l'hybridation en haut et le génome actuel (diploïde homozygote) de la levure en bas. Figure tirée de Marcet-Houben & Gabaldón (2015).

Selon l'hypothèse de Ohno (2013), la duplication du génome est l'une des sources principales de nouveauté évolutive. Lorsqu'un gène est dupliqué, il existe trois destins pour les paralogues qui sont

conservés dans le génome au cours de l'évolution : 1) Les deux copies peuvent conserver la même fonction, créant une redondance génétique; 2) Une copie peut conserver la fonction ancestrale pour que la deuxième en acquière une nouvelle à travers des mutations; 3) Si le gène ancestral avait plusieurs fonctions, chaque paralogue peut conserver et même optimiser une partie de ces fonctions. Des *ohnologues* sont des paralogues conservés suite à un événement de duplication du génome entier, mais pas après de plus petits événements de duplication (Wolfe, 2000). Les ohnologues sont fréquemment des gènes encodant des kinases, des facteurs de transcription et des protéines ribosomiques (Evangelisti & Conant, 2010). Les ohnologues appartiennent souvent à ces mêmes classes de gènes dans plusieurs organismes (Aury *et al.*, 2006; Blanc & Wolfe, 2004; Seoighe & Wolfe, 1999). Ils sont présents chez de nombreuses espèces. Notamment, chez l'humain, ils sont particulièrement associés à des maladies de dosage des gènes telles que le syndrome de Down (Makino & McLysaght, 2010).

Parmi les 59 paires de RPG de la levure, 38 génèrent des protéines légèrement différentes et 21 génèrent des séquences d'acides aminés identiques. Malgré cette apparente redondance génétique, la délétion de l'un ou l'autre des paralogues de RPG mène parfois à des phénotypes différents, suggérant une différence fonctionnelle. Par exemple, la localisation et la traduction de l'ARN messager du gène *ASH1* dépend de l'expression de certaines RP mais pas de leur paralogue (Komili *et al.*, 2007). La délétion de plusieurs RPG mais pas de leurs paralogues causent aussi des défauts du site de bourgeonnement (Ni & Snyder, 2001), de l'organisation de l'actine (Haarer *et al.*, 2007) et de la sporulation (Enyenihi & Saunders, 2003). Donc, l'avantage évolutif de posséder plusieurs copies de ces gènes n'est peut-être pas uniquement attribuable à l'augmentation du dosage génique, mais aussi à une néo-fonctionnalisation ou à une sous-fonctionnalisation de ces gènes par rapport au gène ancestral (Ohno, 2013). Toutefois, les mécanismes expliquant ces différences fonctionnelles n'ont pas encore été élucidés.

1.4.3 La régulation de l'expression des protéines ribosomiques

L'expression des protéines ribosomiques est étroitement régulée. La biogenèse des ribosomes, incluant la synthèse des ARNr et des protéines ribosomiques, est directement liée au cycle cellulaire et à la voie TOR (Warner, 1999). Dans une cellule en croissance, environ 50% de la transcription par l'ARN polymérase II est reliée aux gènes encodant des protéines ribosomiques (Warner, 1999). La transcription des RPG est une étape cruciale pour le contrôle de l'abondance des protéines ribosomiques. Dans la levure, tous les RPG sont transcrits de façon indépendante. La majorité de ces gènes possède un promoteur composé de deux sites de liaison pour la protéine Rap1 suivis d'un élément riche en T (Planta, 1997). Quelques RPG

ont un seul site de liaison pour la protéine Abf1 à la place des deux sites Rap1. Aucune corrélation n'a pu être établie entre ces deux types de promoteurs et l'abondance des transcrits (Petibon *et al.*, 2021).

La régulation post-transcriptionnelle joue également un rôle central dans l'expression des RPG. La longueur du 3'UTR et les sites de terminaison alternatifs ont été associés avec un contrôle de l'abondance des RP et surtout avec une hiérarchie d'expression des gènes dupliqués (Parenteau *et al.*, 2015). Les isoformes de protéines ribosomiques produites par deux gènes paralogues ne sont pas produites en quantités égales. Il y a généralement une forme majeure et une forme mineure (Ghulam *et al.*, 2020). Ces abondances différentes ne sont pas directement liées à l'architecture de leurs promoteurs ou à l'abondance de leurs transcrits respectifs (Petibon *et al.*, 2021). Une explication est que les RPG sont parfois régulés transcriptionnellement, post-transcriptionnellement et/ou post-traductionnellement (Ghulam *et al.*, 2020).

Les introns et les 3'UTR des gènes paralogues encodant des protéines ribosomiques sont souvent responsables de leur régulation différentielle (Petibon *et al.*, 2021). Les RPG contiennent près de 40% des introns de la levure, bien que ces gènes ne représentent que 2% du génome (Hooks *et al.*, 2014). Considérant l'abondance de leurs transcrits, les RPG sont responsables d'environ 90% des événements d'épissage (Warner, 1999). L'efficacité de l'épissage des RPG est variable et influence leur expression, mais les mécanismes qui expliquent ces différences ne sont pas encore entièrement connus (Petibon *et al.*, 2021).

Il existe plusieurs preuves de l'autorégulation de l'épissage des RPG. Par exemple, la protéine eL30 lie le site d'épissage 5' sur l'ARNm *RPL30*, bloquant ainsi l'assemblage du spliceosome et diminuant la production de cette même protéine (Macías *et al.*, 2008). Le même mécanisme d'autorégulation par inhibition de l'épissage est employé par plusieurs RPG et dans plusieurs organismes (Fewell & Woolford, 1999; Gabunilas & Chanfreau, 2016; Malygin *et al.*, 2007; Petibon *et al.*, 2016; Plocik & Guthrie, 2012). Dans le cas des RPG dupliqués, l'un des paralogues peut avoir un effet activateur ou inhibiteur sur l'autre ou sur lui-même, notamment par la présence de leurs introns respectifs (Parenteau *et al.*, 2011).

La régulation des RPG dépend aussi de leurs 3'UTR. Par exemple, la protéine uL6 (L9) en excès lie une structure dans le 3'-UTR du transcrit *RPL9B* et empêche la polyadénylation de son extrémité 3' (Gudipati *et al.*, 2012). De façon similaire, les RPG dupliqués qui ne contiennent pas d'introns ont des 3'UTR de tailles

différentes qui sont influencées par des sites de terminaison de la transcription alternatifs (Parenteau *et al.*, 2015).

1.5 La spécialisation des ribosomes

1.5.1 L'évolution du concept des ribosomes spécialisés

Les ribosomes ont été observés pour la première fois par microscopie électronique (Palade, 1955). Quelques années plus tard, l'hypothèse « un gène - un ribosome - une protéine » a été émise (Crick, 1958). Selon Crick, chaque protéine serait traduite par un ribosome unique, suggérant une spécialisation totale des ribosomes. Cette hypothèse a toutefois été abandonnée lorsque l'existence de l'ARN messager a été découverte (Brenner *et al.*, 1961). Depuis, les ribosomes sont typiquement décrits comme des machines uniformes qui peuvent traduire différents ARNm afin de synthétiser différentes protéines.

En 2002, l'hypothèse du « filtre ribosomique » a été proposée. Selon cette hypothèse, les sous-unités du ribosome agissent elles-mêmes comme des régulateurs de la traduction en s'associant préférentiellement à certains ARNm (Mauro & Edelman, 2002). L'idée du filtre ribosomique est que les ARNm sont tous en compétition pour l'initiation de la traduction. Les interactions issues des séquences d'ARNr complémentaires à l'ARNm ou des différences structurales entre les sous-unités ribosomiques de différents types cellulaires seraient à l'origine de cet effet de « filtre ».

Quelques années plus tard, l'hypothèse du « code des ribosomes » a été émise (Komili *et al.*, 2007). Selon cette hypothèse, la combinaison de protéines ribosomiques, d'ARNr et de leurs modifications respectives forment un «code» de façon analogue au code des histones qui régule l'expression de gènes au niveau de la transcription. La composition précise de chaque ribosome pourrait calibrer la traduction de sorte à ajouter une complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes.

Plus récemment, il a été proposé que des populations de ribosomes « spécialisés » seraient capables de moduler plusieurs aspects de la traduction de sous-ensembles d'ARNm (Gilbert, 2011; Xue & Barna, 2012). L'hétérogénéité fonctionnelle des ribosomes a été définie comme des variations dans la composition du ribosome qui influencent son activité et donc le résultat de la traduction (Ferretti & Karbstein, 2019).

Selon l'hypothèse de la spécialisation des ribosomes, similairement aux concepts de filtre ribosomique et du code des ribosomes, ceux-ci sont des éléments régulateurs de l'expression des gènes. La cellule pourrait

même modifier la composition de ses ribosomes (par exemple avec différentes protéines ribosomiques) pour réguler l'expression de ses gènes en réponse à un contexte particulier (tissus, processus développementaux, conditions de stress, etc.) (Norris *et al.*, 2021). Les changements dans divers aspects de la traduction par les ribosomes spécialisés auraient un impact direct sur le protéome.

L'hypothèse de la spécialisation des ribosomes a beaucoup évolué depuis 1958. De plus en plus de preuves de l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des ribosomes contribuent à une compréhension grandissante de cette machine cellulaire, mais le concept de la spécialisation des ribosomes est encore controversé (Barna *et al.*, 2022).

1.5.2 L'hétérogénéité structurale des ribosomes

De nombreuses preuves de l'hétérogénéité structurale des ribosomes ont été trouvées dans divers organismes au fil des années (Genuth & Barna, 2018). Plusieurs sources de variations dans la structure des ribosomes ont été identifiées (Figure 1.7).

Étant donné qu'il y a plusieurs répétitions d'ADNr dans tous les organismes, il est probable que des mutations modifiant la fonction du ribosome surviennent dans ces séquences (Ferretti & Karbstein, 2019). Il y a certainement une pression sélective contre les ribosomes non-fonctionnels mais pas nécessairement contre les ribosomes fonctionnellement différents (Ferretti & Karbstein, 2019). Des variations dans les séquences d'ARNr ou dans leurs modifications post-transcriptionnelles ont été trouvées dans plusieurs organismes. Par exemple, des séquences d'ARNr différentes ont été identifiées à différents stades du cycle de vie du parasite *Plasmodium berghei* responsable de la malaria chez les rongeurs (Gunderson *et al.*, 1987).

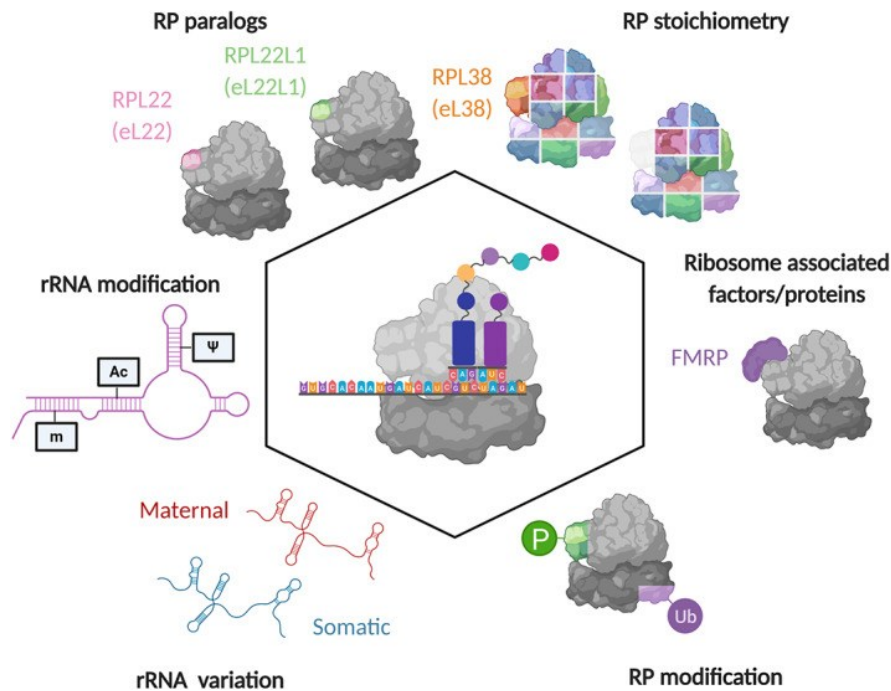


Figure 1.7 Les différentes sources d'hétérogénéité structurale des ribosomes.

L'hétérogénéité structurale des ribosomes peut être liée à leur composition en protéines ribosomiques (paralogues, stoichiométrie ou modifications post-traductionnelles), à des protéines associées au ribosome ou à leur composition en ARNr (séquence ou modifications post-transcriptionnelles). Figure tirée de Norris *et al.* (2021).

Les variations structurales entre les ribosomes sont majoritairement attribuées aux protéines ribosomiques et à leurs modifications (Genuth & Barna, 2018). Par exemple, les deux paralogues *RPL16A* et *RPL16B* encodant une protéine ribosomique de la grande sous-unité sont respectivement exprimés dans des tissus différents de la plante *Arabidopsis thaliana* (Williams & Sussex, 1995). Chez la levure, la dégradation des ARNm par la voie du *No-go-decay* nécessite la présence de la protéine non-essentielle Asc1 (Ikeuchi & Inada, 2016). Les ribosomes ne possédant pas cette protéine sont déficients dans ce mécanisme de contrôle de qualité des ARNm (Ferretti & Karbstein, 2019). De nombreuses protéines associées aux ribosomes sont aussi des sources d'hétérogénéité notamment chez les mammifères (Simsek *et al.*, 2017).

1.5.3 L'hétérogénéité fonctionnelle des ribosomes

Plusieurs observations suggèrent que l'hétérogénéité structurale mène à une spécialisation fonctionnelle. Par exemple, un défaut de pseudouridylation diminue la fidélité de la traduction et l'initiation de la traduction dépendante des IRES dans la levure (Jack *et al.*, 2011). La délétion de certains gènes encodant des protéines ribosomiques ou de leurs paralogues causent des phénotypes différents dans la levure (Komili *et al.*, 2007; Ni & Snyder, 2001). Or, les protéines ribosomiques ont des fonctions en dehors du ribosome qui pourraient expliquer ces différences. Ces phénotypes ne sont donc pas directement des preuves d'hétérogénéité fonctionnelle des ribosomes, ni de leur spécialisation.

Afin de vérifier l'impact direct de la composition des ribosomes sur la traduction, les ARNm activement traduits doivent être identifiés. Le fractionnement des polysomes combiné au séquençage d'ARN a permis de déterminer que l'acétylation de uL30b favorise la traduction d'ORF longs en condition de stress (Ghulam *et al.*, 2022). Le profilage ribosomique (Ribo-Seq) est une autre méthode qui permet de séquencer encore plus précisément les portions précises d'ARNm activement traduites (Ingolia *et al.*, 2009) et de déterminer si des types d'ARNm sont préférentiellement traduits par des ribosomes spécialisés ou si la vitesse d'élongation est modifiée selon la composition des ribosomes (Shi *et al.*, 2017). Ces méthodes permettront de trouver de plus en plus de preuves de spécialisation des ribosomes.

La spécialisation des ribosomes pourrait influencer la sélection des ORF traduits, la préférence pour certains ARNm ou l'efficacité de la traduction de certains codons (Ferretti & Karbstein, 2019). Toutefois, les mécanismes par lesquels la composition des ribosomes modulerait la traduction ne sont pas encore bien compris. Les mécanismes potentiels incluent des changements dans le recrutement de la sous-unité 40S au 5'-UTR de l'ARNm, la sélection du codon initiateur, la vitesse de l'élongation, la fidélité de la traduction et la reconnaissance du codon d'arrêt (Figure 1.8) (Genuth & Barna, 2018; Norris *et al.*, 2021).

Jusqu'à maintenant, seulement certains de ces mécanismes ont été validés par des preuves expérimentales (Norris *et al.*, 2021). Il a été démontré que la traduction peut être modulée par des ribosomes avec une préférence modifiée pour certains éléments *cis*-régulateurs, comme des *internal ribosome entry sites* (IRES) (Hertz *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2017). Les IRES sont des séquences d'ARN situées au 5'UTR qui peuvent recruter le complexe de pré-initiation de façon indépendante de la coiffe 5' (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Ils ont d'abord été découverts chez les virus à ARN, mais ces structures ont par la suite été trouvées dans les ARNm cellulaires (Xue & Barna, 2012). Environ 10% des ARNm

eucaryotes ont la capacité de faire initier leur traduction par des mécanismes alternatifs (Spriggs *et al.*, 2008). Il a été démontré que certaines protéines ribosomiques peuvent reconnaître des IRES. Par exemple, la protéine eS25 est requise pour lier des IRES et pour l'initiation de la traduction de certains ARN viraux tels que l'ARN du virus de l'hépatite C (Landry *et al.*, 2009).

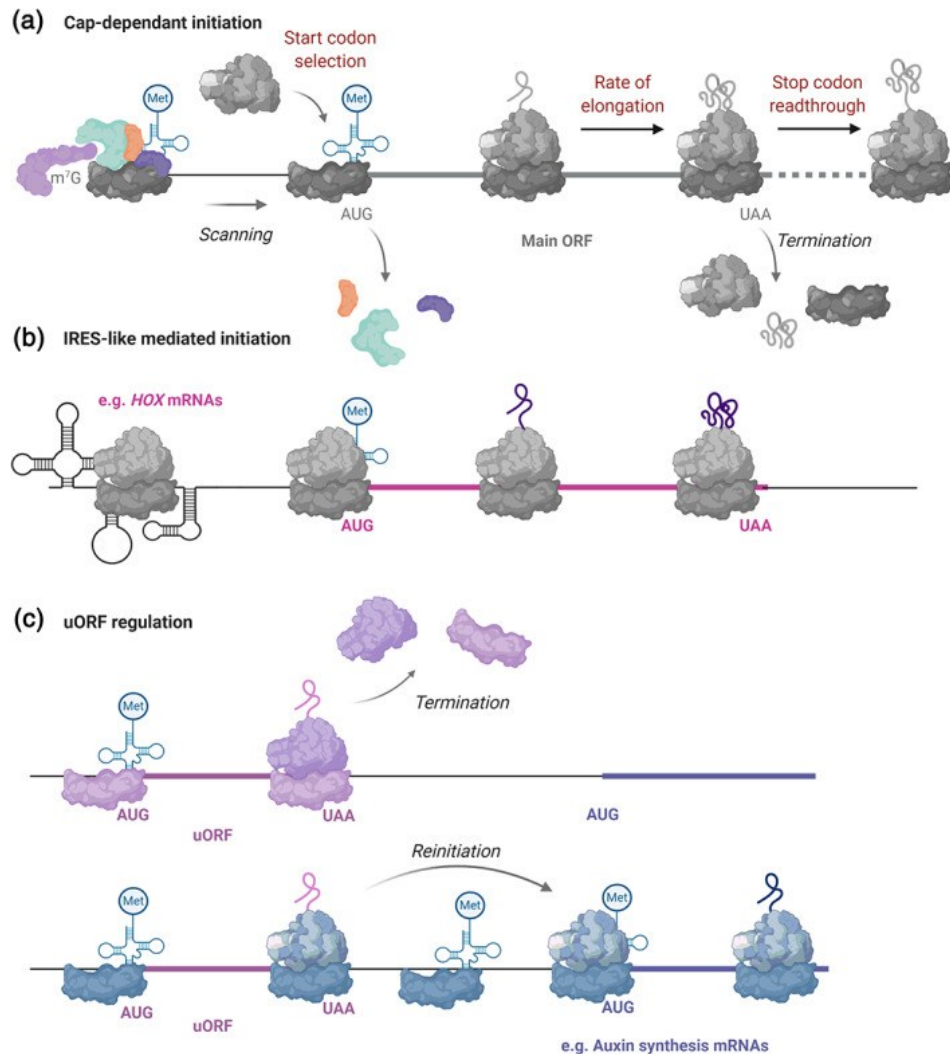


Figure 1.8 Mécanismes potentiels de régulation de la traduction par des ribosomes spécialisés.

Cette figure schématise (a) le recrutement de la sous-unité 40S au 5'UTR, la sélection du codon initiateur, le taux d'élongation, la reconnaissance du codon d'arrêt, (b) le recrutement des ribosomes par des IRES ou des structures similaires au 5'UTR, (c) la régulation de la traduction par un uORF. Figure tirée de Norris *et al.* (2021).

La régulation de la traduction par les uORF est également modifiée par la composition des ribosomes. Par exemple, la protéine eL24 améliore l'efficacité de la traduction chez la levure (Dresios *et al.*, 2000) et contribue à la réinitiation de la traduction des ORF subséquents sur un ARNm polycistronique dans la plante (Park *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'haploinsuffisance résultant de la délétion de l'un des paralogues encodant eL24 diminue la traduction d'un second ORF sans modifier l'initiation de la traduction de l'ORF qui le précède (Nishimura *et al.*, 2005).

1.6 Les gènes *RPS18A* et *RPS18B*

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes *RPS18A* et *RPS18B* sont des gènes paralogues qui encodent la protéine ribosomique uS13. Ils sont situés sur les chromosomes IV et XIII, respectivement (Goffeau *et al.*, 1996). Ces gènes sont essentiels à la survie et à la prolifération cellulaire. La délétion de l'un ou l'autre des paralogues est viable, mais la double délétion est létale.

Ces paralogues diffèrent principalement dans leurs régions régulatrices. Notamment, leurs promoteurs, leurs UTR (5' et 3') et leurs introns ont des séquences nucléotidiques différentes. Les séquences codantes de *RPS18A* et de *RPS18B* sont identiques à 95% (Figure 1.9). Les quelques substitutions qui se retrouvent dans ces deux ORF ne modifient pas l'acide aminé qui est incorporé. En effet, en raison de la dégénérescence du code génétique, la protéine produite par *RPS18A* (uS13a) et celle produite par *RPS18B* (uS13b) possèdent exactement la même séquence d'acides aminés (Figure 1.10).

<i>RPS18A</i>	ATGTCTTTAGTTGTCCAAGAACAAGGTTTCCTTCCAACACATTTTACGTTTGGTGAACACT	60
<i>RPS18B</i>	ATGTCTTTAGTTGTACAAGAACAAGGTTTCCTTCCAACACATTTTACGTTTGGTGAACACC	60

<i>RPS18A</i>	AACGTTGACGGTAACATTAAGATCGTTTACGCTTTGACCACTATCAAGGGTGGTGGTCGT	120
<i>RPS18B</i>	AATGTCGATGGTAACATTAATAATTGTTTACGCTTTGACCACTATTAAGGGTGGTGGTCGT	120
	** ** *	
<i>RPS18A</i>	CGTTACTCCAACCTGGTCTGTGAAGAAGGCTGATGTTGATTACACAAGAGAGCTGGTGAA	180
<i>RPS18B</i>	CGTTACTCCAACCTGGTCTGTGAAGAAGGCTGATGTTGATTGCACAAGAGAGCTGGTGAA	180

<i>RPS18A</i>	TTGACCCAAGAAGAATTGGAAAGAATTGTTCAAATTATGCAAAACCCAACCTACTACAAA	240
<i>RPS18B</i>	TTGACCCAAGAAGAATTGGAAAGAATTGTCCAAATCATGCAAAACCCAACCTATTACAAG	240

<i>RPS18A</i>	ATCCCAGCTTGGTCTTGAACCGTCAAAATGACATCACTGATGGTAAGGACTACCACACT	300
<i>RPS18B</i>	ATCCCAGCCTGGTCTTAAACCGTCAAAACGACATTACTGATGGTAAGGACTACCACACT	300

<i>RPS18A</i>	TTGGCTAACAAACGTCGAATCCAAATTGAGAGATGACTTGAAAGATTAAAGAAAATCAGA	360
<i>RPS18B</i>	TTGGCTAACAAACGTCGAATCCAAGTTGAGAGATGACTTGAAAGATTAAAGAAGATCAGA	360

<i>RPS18A</i>	GCTCATCGTGGTATCAGACACTTCTGGGGTTTGCCTGTTAGAGGTCAACACACCAAGACC	420
<i>RPS18B</i>	GCCCACCGTGGTATTAGACACTTCTGGGGTTTACGTGTTAGAGGTCAACACACCAAGACC	420
	** ** *	
<i>RPS18A</i>	ACTGGTAGAAGAAGAGCTTAA 441	
<i>RPS18B</i>	ACTGGTAGAAGAAGAGCTTAA 441	

Figure 1.9 Alignement des séquences codantes de *RPS18A* et *RPS18B*.

Les identités sont marquées d'une étoile. L'absence d'étoile signifie qu'il y a une substitution entre les deux séquences.

Malgré leur apparente redondance génétique, la délétion de l'un ou l'autre de ces gènes mène à des phénotypes différents. La perte de *RPS18A* ralentit davantage la croissance cellulaire que celle de *RPS18B* (Chiocchetti *et al.*, 2007; Steffen *et al.*, 2012). Le site de bourgeonnement est affecté par la délétion de *RPS18B* mais pas de son paralogue (Ni & Snyder, 2001). *RPS18B* est nécessaire pour la traduction localisée de l'ARNm de Ash1 (Komili *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que les paralogues *RPS18A* et *RPS18B* ont des fonctions légèrement différentes. Ces différences pourraient découler du rôle de la protéine ribosomique uS13 dans la biogenèse des ribosomes, dans la traduction, ou encore de fonctions à l'extérieur du ribosome.

uS13a MSLVVQE^QGSFQHILRL^LNTNVDGNIKIVYALT^TIKGVGRRYSNLVCKKADVDLHKRAGE
 ||

uS13b MSLVVQE^QGSFQHILRL^LNTNVDGNIKIVYALT^TIKGVGRRYSNLVCKKADVDLHKRAGE

uS13a LTQEELERIVQIMQN^PTHYKIPAWFLNRQNDITDGKDYHTLANNVESKLRDDLERLKKIR
 ||

uS13b LTQEELERIVQIMQN^PTHYKIPAWFLNRQNDITDGKDYHTLANNVESKLRDDLERLKKIR

uS13a AHRGIRHFWGLRVRGQHTKTTGRRRA
 ||||||||||||||||||||

uS13b AHRGIRHFWGLRVRGQHTKTTGRRRA

Les introns et UTR de ces deux gènes ont des tailles et des séquences différentes (Figure 1.11). La délétion de l'intron de *RPS18A* diminue la valeur sélective (*cell fitness*) alors que la délétion de l'intron du gène *RPS18B* améliore sa capacité à compétitionner avec des cellules de type sauvage (Parenteau *et al.*, 2011).

23

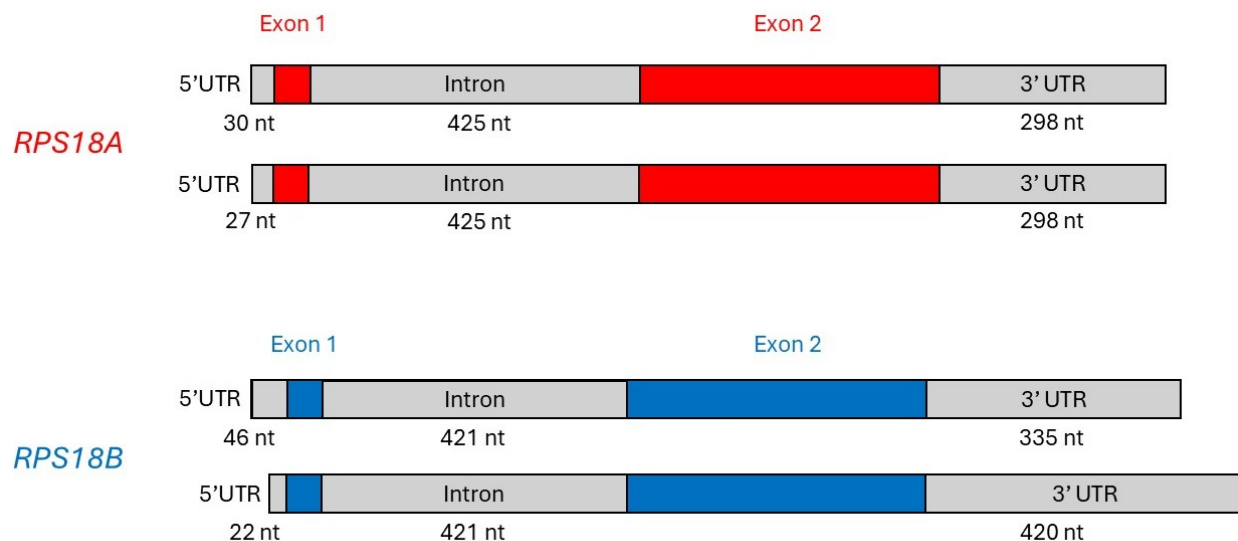


Figure 1.11 Structure des ARNm de *RPS18A* et *RPS18B*.

Il existe deux formes de transcrits pour chacun de ces gènes. Les exons des gènes *RPS18A* et *RPS18B* sont représentés en rouge et en bleu, respectivement. Les régions 5'UTR, introns et 3'UTR sont représentés (à l'échelle) en gris et leurs tailles respectives sont indiquées dessous. Numéros d'identification des transcrits SGD : S000288813, S000293760, S000291099 et S000295927 (Engel *et al.*, 2025).

1.7 Les protéines uS13a et uS13b

La protéine ribosomique uS13 est universellement conservée (Ban *et al.*, 2014). Cette composante essentielle de la petite sous-unité ribosomique est homologue aux protéines S18 chez les mammifères et S13 des bactéries (Jenner *et al.*, 2012; Planta & Mager, 1998). Le nom uS13 lui a été attribué afin de faciliter l'analogie avec ses homologues dans d'autres organismes (Ban *et al.*, 2014). La protéine uS13 de 146 acides aminés se trouve dans la tête de la sous-unité 40S, du côté de l'interface avec la sous-unité 60S (Figure 1.12).

Bien que les protéines uS13a et uS13b possèdent des séquences primaires identiques (Figure 1.10), des modifications post-traductionnelles pourraient expliquer leurs potentielles différences fonctionnelles. D'après les annotations retrouvées sur les bases de données *Saccharomyces* Genome Database (SGD), Uniprot et BioGRID, les protéines uS13a et uS13b auraient des modifications post-traductionnelles différentes, notamment plusieurs sites de phosphorylation (voir Tableau S.1, Annexe A).

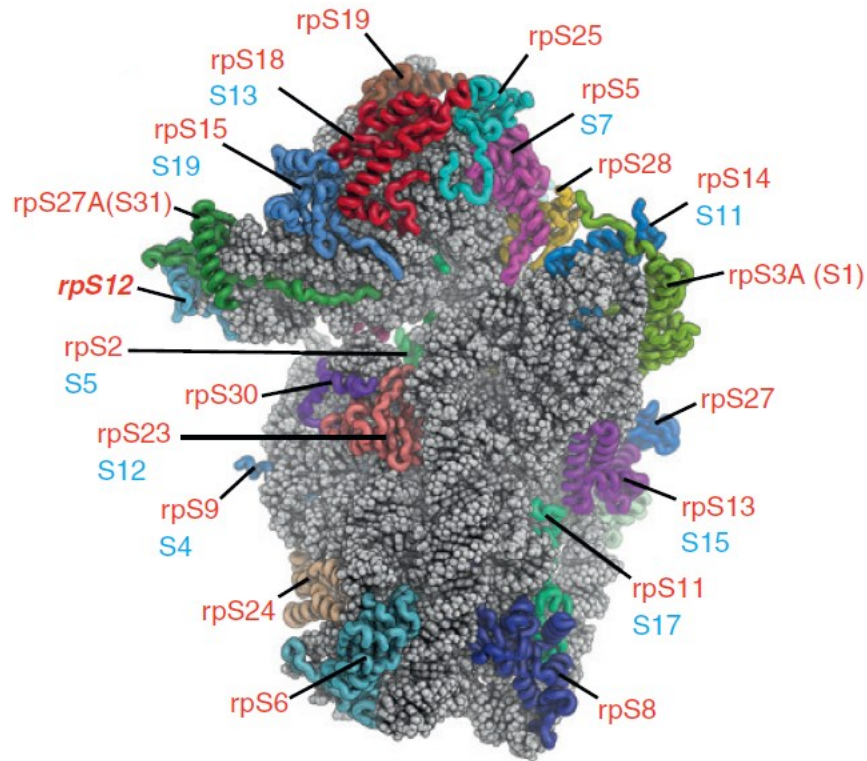


Figure 1.12 Sous-unité 40S du ribosome de *Tetrahymena thermophila*.

La protéine uS13 (rpS18) de la levure, homologue de S13 dans la bactérie, est colorée en rouge. PDB : 2XZM (Rabl *et al.*, 2011). Figure tirée de Klinge *et al.* (2012).

L'homologue bactérien de uS13 est une protéine de liaison secondaire pendant l'assemblage *in vitro* de la sous-unité 30S (Held *et al.*, 1974; Sykes & Williamson, 2009). Chez les eucaryotes, uS13 est présente dans le SSU processome (Figure 1.13) (Grandi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2016). La protéine uS13 est l'une des trois protéines ribosomiques (avec eS6 et uS23) qui adoptent des sites de liaison légèrement différents dans le SSU processome que leur conformation finale dans la sous-unité 40S mature (Barandun *et al.*, 2017). Ceci suggère que uS13 joue un rôle dans l'assemblage et la maturation de la sous-unité 40S en plus de sa fonction structurale dans la sous-unité mature. En effet, il a été démontré que la protéine uS13 de la levure est essentielle pour le clivage du pré-ARNr 35S au site A2 (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). La déplétion de uS13 cause aussi des défauts de clivage aux sites A0 et A1 (Léger-Silvestre *et al.*, 2004) mais pas au site D, dernière étape de maturation de l'ARNr 18S qui a lieu dans le cytoplasme (Tabb-Massey *et al.*, 2003). Cette protéine est donc nécessaire pour les étapes précoces de la maturation du pré-ARNr. De plus, l'absence de protéine uS13 empêche l'export nucléaire du précurseur 20S (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005;

Léger-Silvestre *et al.*, 2004). Cette protéine pourrait donc jouer un rôle dans la maturation nucléaire tardive de la sous-unité 40S ou dans une étape de contrôle de qualité précédant son transport au cytoplasme (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

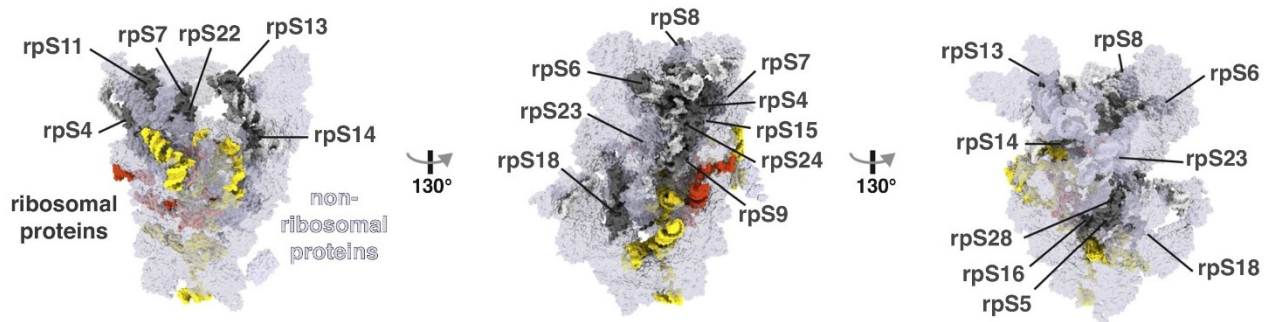


Figure 1.13 Structure du SSU processome de la levure.

Les protéines ribosomiques sont identifiées en gris foncé, les facteurs d'assemblage non-ribosomiques sont en gris transparent, le snoRNA U3 est en rouge, le pré-18S est en gris clair et le 5'ETS est en jaune. Figure tirée de Barandun *et al.* (2018).

Chez les procaryotes, la protéine uS13 (S18) forme le pont B1a avec l'hélice 38 de l'ARNr 23S (aussi appelée *A-site finger*) et les ponts B1b/c avec la protéine uL5 (L11) (Komoda *et al.*, 2006). Dans le ribosome eucaryote, le pont B1a dépend de l'interaction de uS13 avec uS19 (S15) plutôt qu'avec l'hélice 38 (Bowen *et al.*, 2015). Les ponts B1b/c qui relient les deux sous-unités restent formés par l'interaction entre uS13 et uL5 dans les ribosomes eucaryotes (Rhodin & Dinman, 2011). Les ponts B1b et B1c subissent un grand changement de conformation pour accommoder le mouvement de translocation du ribosome pendant l'étape d'élongation (Rhodin & Dinman, 2010). Les ponts B1 sont très conservés puisqu'ils ont le rôle essentiel de lier la tête de la petite sous-unité à la protubérance centrale de la grande sous-unité (Bowen *et al.*, 2015). Ces ponts, en plus de stabiliser la structure du ribosome, transmettent également de l'information entre des régions distales du ribosome comme le centre de décodage de la SSU et le centre peptidyl-transférase de la LSU (Rhodin & Dinman, 2011). Ainsi, la protéine ribosomique uS13 est non seulement essentielle pour la biogenèse des ribosomes, mais elle possède aussi une fonction majeure durant la traduction.

1.8 Hypothèses et objectifs

Les paralogues de protéines ribosomiques et leurs modifications post-traductionnelles sont des sources d'hétérogénéité importantes dans les ribosomes. *RPS18A* et *RPS18B* sont des gènes essentiels, c'est-à-dire qu'une cellule dépourvue de ces deux gènes ne peut pas survivre. Toutefois, la levure peut survivre et croître avec seulement l'un ou l'autre de ces paralogues. Des souches délétées pour l'un ou l'autre de ces gènes ont des phénotypes différents, suggérant qu'ils sont fonctionnellement différents (Chiocchetti *et al.*, 2007; Komili *et al.*, 2007; Ni & Snyder, 2001). **Notre hypothèse de départ est que l'incorporation de la protéine uS13a ou uS13b dans le ribosome lui confère une spécialisation fonctionnelle.** Dans cette perspective, nos objectifs sont de:

- Comparer les effets de la délétion de *RPS18A* ou de *RPS18B* sur la croissance cellulaire et sur l'assemblage des polysomes.
- Créer des outils moléculaires pour distinguer les protéines uS13a et uS13b.

Les gènes *RPS18A* et *RPS18B* sont issus de la duplication d'un gène ancestral, comme plusieurs paires de gènes encodant des protéines ribosomiques dans la levure. L'un des avantages évolutifs de maintenir deux gènes paralogues dans le génome d'un organisme est le dosage génique (Voordeckers & Verstrepen, 2015). Les gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont étroitement régulés et ils représentent une proportion importante de la transcription dans les cellules en croissance (Warner, 1999). **En ce sens, notre hypothèse est que le dosage génique naturel de *RPS18A* et *RPS18B* est avantageux pour la régulation de leur expression.** À cet effet, nos objectifs sont de:

- Évaluer l'effet du dosage génique sur la régulation de l'expression des paralogues *RPS18A* et *RPS18B*.
- Déterminer l'effet du dosage génique de *RPS18A* et *RPS18B* sur la croissance cellulaire.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches de bactéries et de levures

La souche bactérienne DH10B (F– *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* λ – *rpsL*(Str^R) *nupG*), dérivée de la souche K-12 MG1655 (Durfee *et al.*, 2008) a été utilisée pour le clonage et la réplication des plasmides recombinants.

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa* *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0), dérivée de S288C (Brachmann *et al.*, 1998), ainsi que les mutants *rps18a* Δ (BY4741, *rps18a::kanMX6*) et *rps18b* Δ (BY4741, *rps18b::kanMX6*) ont été utilisées pour les courbes de croissance et les gradients de densité de saccharose.

La souche de déplétion *P_{GAL}-RPS18A-rps18b* Δ (*rps18b* Δ , *P_{GAL1}-RPS18A::his3MX6*) (Lemay, 2013) a été utilisée pour les tests de complémentation avec *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*.

Pour obtenir la série de souches YFS18 $\Delta\Delta$ (BY4741, *rps18a::kanMX6*, *rps18b::his3MX6*), la souche de départ *rps18a* Δ a d'abord été complétée avec un premier plasmide porteur du gène *RPS18A*, puisque la double délétion (*RPS18A* et *RPS18B*) est létale. Par la suite, son gène *RPS18B* a été délété par recombinaison homologue avec l'insertion de la cassette His3MX6 au locus *RPS18B* (Longtine *et al.*, 1998). La souche YFS18 $\Delta\Delta$ a ensuite été transformée à l'aide d'autres plasmides pour créer les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9 (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Série de souches YFS18ΔΔ avec plasmides correspondants.

Nom	Plasmides	Notation abrégée
YFS18ΔΔ1	YCplac33-URA3- <i>HA-RPS18A</i> YCplac111-LEU2- <i>MYC-RPS18B</i>	AB
YFS18ΔΔ2	YCplac33-URA3 (vide) YCplac111-LEU2- <i>HA-RPS18A</i>	A
YFS18ΔΔ3	YCplac33-URA3- <i>HA-RPS18A</i> YCplac111-LEU2- <i>HA-RPS18A</i>	AA
YFS18ΔΔ4	YEplac195-URA3- <i>HA-RPS18A</i> YCplac111-LEU2- <i>HA-RPS18A</i>	AA*
YFS18ΔΔ5	YCplac33-URA3 (vide) YCplac111-LEU2- <i>MYC-RPS18B</i>	B
YFS18ΔΔ6	YCplac33-URA3- <i>MYC-RPS18B</i> YCplac111-LEU2- <i>MYC-RPS18B</i>	BB
YFS18ΔΔ7	YEplac195-URA3- <i>MYC-RPS18B</i> YCplac111-LEU2- <i>MYC-RPS18B</i>	BB*
YFS18ΔΔ8	YEplac195-URA3- <i>MYC-RPS18B</i> YCplac111-LEU2- <i>HA-RPS18A</i>	AB*
YFS18ΔΔ9	YEplac195-URA3- <i>HA-RPS18A</i> YCplac111-LEU2- <i>MYC-RPS18B</i>	BA*

Dans la notation abrégée, l'astérisque représente le plasmide multicopies YEplac195 porteur du paraglogue indiqué.

2.2 Milieux de culture

Les bactéries ont été cultivées dans le milieu LB (Luria-Bertani) (tryptone 1%, extrait de levure 0.5%, NaCl 85.6 mM) avec agar 1.5% pour les milieux solides et ampicilline 100 µg/mL au besoin.

Les levures ont été cultivées en milieu riche YPD ou YPGal (peptone 2%, extrait de levure 1%, dextrose ou galactose 2%) ou en milieu minimal synthétique SD composé de *yeast nitrogen base without amino acids* 0.17% (Wisent), (NH₄)₂SO₄ 0.5% et de dextrose 2%, le tout complémenté par un mélange d'acides aminés dépourvu de tryptophane (-Trp), histidine (-His), leucine (-Leu) et/ou uracile (-Ura) (Ausubel *et al.*, 1999). L'agar 2% a été ajouté pour les milieux solides et la généticine 200 µg/mL (Wisent) a été utilisée au besoin pour sélectionner les souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ*.

2.3 Préparation et transformation des cellules compétentes

Les bactéries *E. coli* DH10B chimiocompétentes ont été préparées selon la méthode de Hanahan (1983). Pour la transformation, 10 ng de plasmide ou 100 ng de produit de ligation ont été mélangés à 50 µL de bactéries chimiocompétentes. Le mélange a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique

de 90 secondes a été réalisé à 42°C. Le mélange a été refroidi sur glace pendant 5 minutes, puis 1 mL de milieu LB a été ajouté. Les bactéries ont ensuite été incubées 60 minutes à 37 °C. Par la suite, 200 µL du mélange ont été étalés sur une gélose sélective de LB-ampicilline et incubés à 37 °C jusqu'au lendemain (environ 16 heures).

Les levures compétentes ont été préparées et transformées selon la méthode à l'acétate de lithium de Gietz *et al.* (1992). Pour la transformation, 100 uL de levures compétentes ont été transformées avec 100 ng de plasmide. La procédure avec choc thermique de 15 minutes à 42 °C a été suivie (Gietz *et al.*, 1992). Finalement, 100 µL du produit de transformation ont été étalés sur la gélose sélective appropriée (SD dépourvu d'un ou de plusieurs nutriments) et incubés à 30 °C jusqu'à la formation de colonies (trois à cinq jours).

2.4 Courbes de croissance

Les levures (BY4741, *rps18a*Δ et *rps18b*Δ ou YFS18ΔΔ1 à 9) ont été incubées à 30 °C avec agitation à 225 rpm jusqu'à la phase exponentielle (A_{600} de 0,5-0,8). Des dilutions ont été réalisées lorsque nécessaire à l'aide de milieu de culture (YPD ou SD-Ura-Leu) préincubé à 30 °C afin de maintenir les cultures en phases exponentielle. La densité optique à 600 nm (DO_{600}) a été mesurée à chaque heure pour un total de 4 à 5 heures d'incubation. Le temps de doublement a été calculé selon le modèle de croissance exponentielle à l'aide du logiciel Graphpad Prism 8.

2.5 Mutagenèse dirigée et sous-clonage

Les plasmides pGEM-T (Promega) contenant les gènes *RPS18A* ou *RPS18B* et leurs régions flanquantes respectives (-500 pb et +300 pb) ont servi d'ADN modèle pour la mutagenèse dirigée. Les séquences encodant les étiquettes biologiques HA et Myc ont été introduites à la suite de l'ATG initiateur dans les gènes *RPS18A* et *RPS18B*, respectivement. Les paires d'amorces HA-RPS18A-F, HA-RPS18A-R et MYC-RPS18B-F, MYC-RPS18B-R (Tableau 2.2) ont été utilisées pour réaliser la mutagenèse dirigée à l'aide de la méthode *QuickChange* (Agilent Technologies).

Tableau 2.2 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée.

Nom	Séquence
HA-RPS18A-F	5'- <u>TATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTGGTGGT</u> TCTTTAGTTGTCCAAGAACAAGGTTCC-3'
HA-RPS18A-R	5'- <u>CCAGCATAATCTGGAACATCATATGCATATGGATA</u> CAT CTTTTATCCGCTCTTGTGTATACG-3'
MYC-RPS18B-F	5'- <u>GAACAAAAATTGATTTCTGAAGAAGATTTGGTGGT</u> TCTTTAGTTGTACAAGAACAAGGTTCTT-3'
MYC-RPS18B-R	5'- <u>ACCCAAATCTTCTTCAGAAATCAATTTTGTTC</u> CAT CTTTACCACTTTCTGCTCTATTGG-3'

Les séquences correspondant aux épitopes HA et Myc sont soulignés. Le codon CAT en gras correspondent à l'ATG initiateur sur le brin complémentaire.

Les plasmides pGEM-T-*HA-RPS18A* et pGEM-T-*MYC-RPS18B* obtenus par mutagenèse dirigée ont été validés par séquençage de Sanger. Les gènes *RPS18A* et *RPS18B* avec ou sans les étiquettes biologiques ont par la suite été sous-clonés dans les plasmides YCplac33, YCplac111 ou YEplac195 (Figure 2.1, Tableau 2.3) au site de restriction *Bam*HI. Les plasmides contenant les différentes constructions ont été validés par des digestion enzymatique, puis transformés dans la levure.

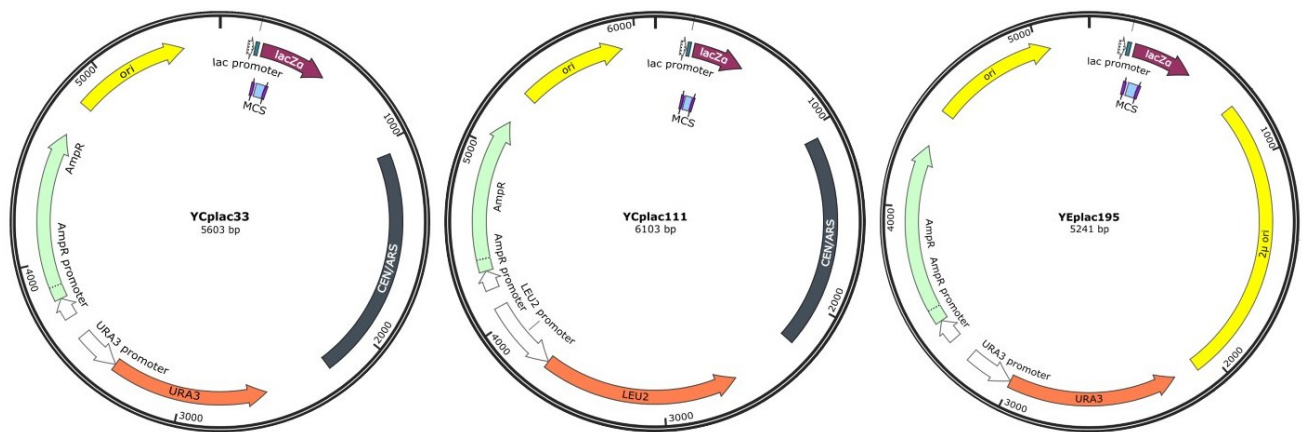


Figure 2.1 Plasmides YCplac33, YCplac111 et YEplac195.

Les constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont été insérées dans les plasmides YCplac33, YCplac111 et YEplac195 au site de restriction *Bam*HI (dans le MCS).

Tableau 2.3 Plasmides utilisés pour l'expression dans la levure et leurs caractéristiques.

Nom	Marqueur de sélection (levures)	Origine de réplication (levures)
YCplac33	<i>URA3</i>	Centromérique (CEN/ARS)
YCplac111	<i>LEU2</i>	Centromérique (CEN/ARS)
YEplac195	<i>URA3</i>	2 microns (2μ)

L'origine de réplication CEN/ARS permet aux levures de répliquer une copie du plasmide par cellule, contrairement à l'origine de réplication 2 microns (multicopies). Tous les plasmides présentés dans ce tableau possèdent également un marqueur de sélection bactérien Amp^r ainsi qu'une origine de réplication bactérienne.

2.6 Test de complémentation en milieu solide

La souche de déplétion *P_{GAL}-RPS18A-rps18bΔ* a été transformée à l'aide des différentes constructions dans le plasmide YCplac33. Les plasmides YCplac33 vide (contrôle négatif), YCplac33-*HA-RPS18A*, YCplac33-*RPS18A*, YCplac33-*MYC-RPS18B* ou YCplac33-*RPS18B* ont été utilisés. Les levures transformées et la souche sauvage BY4741 ont été cultivées en milieu liquide YPGal. Les cellules en phase exponentielle ont été lavées et remises en suspension dans l'eau stérile à une A₆₀₀ de 1. Quatre dilutions en série de facteur 10 ont été réalisées et 3 μL de chaque dilution ont été déposés sur des géloses YPGal et YPD. Celles-ci ont été incubées à 30 °C jusqu'à l'apparition de colonies.

2.7 Préparation de la souche YFS18ΔΔ

Les amorces F1-RPS18B et R1-RPS18B (Tableau 2.4) ont permis l'amplification de la cassette HIS3 à partir du plasmide pFA6a-His3MX6 (Longtine *et al.*, 1998). La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 50 μL à l'aide du *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermofisher). Un volume de 2 μL du produit de PCR a été prélevé pour valider l'amplification par électrophorèse et tout le produit de PCR restant (48 μL) a été précipité, puis remis en suspension dans 10 μL d'eau stérile. Les levures *rps18aΔ* complémentées avec un plasmide YCplac33-*HA-RPS18A* ont ensuite été transformées à l'aide de la totalité du produit de PCR remis en suspension et cultivées en milieu SD-His-Ura. Le gène *RPS18B* délété par recombinaison homologue est remplacé par le marqueur auxotrophe *HIS3*. L'ADN chromosomique a été extrait au phénol-chloroforme selon la procédure de Hoffman (1997). Les amorces de validation RPS18B-KOcheck-F et RPS18B-KOcheck-R (Tableau 2.4) ont été utilisées pour valider la délétion. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 μL à partir du *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermofisher) et avec 200 ng d'ADNg.

Tableau 2.4 Oligonucléotides utilisés pour la délétion du gène *RPS18B*.

Nom	Séquence
F1-RPS18B	5'-TAGTGAAAAACCGATCTTACGAAAAGCCAATAGAGCAGAAAGTGGTAAAG CGGATCC CCGGGTAAATTAA -3'
R1-RPS18B	5'- ATAAAAACGAAAATAGCGTACAATTATTACTGATAATTCCTTAATTGAT GAATTCGAGCT CGTTTAAAC -3'
RPS18B-KOcheck-F	5'-GCGCGGAACTGGTTGATGCCTG-3'
RPS18B-KOcheck-R	5'-GTACTTTCTACCCCGGTTGAGTGATG-3'

Les régions des amorces de délétion F1-RPS18B et R1-RPS18B complémentaires au plasmide pFA6-His3MX6 sont en gras. Le reste de la séquence est spécifique au gène *RPS18B*.

2.8 Rétrotranscription et PCR quantitative en temps réel

2.8.1 Extraction de l'ARN

Les souches de levures YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9 (Tableau 2.1) ont été utilisées pour les analyses d'expression génétique. Les levures ont été cultivées jusqu'à une A_{600} de 0.5-0.8. Les cellules ont ensuite été lavées avec de l'eau froide et conservées à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'ARN total a été extrait selon le protocole au phénol acide chaud de Collart & Oliviero (1993). Afin d'éviter toute contamination par l'ADN génomique, les échantillons ont été traités avec la *DNase I Amplification grade* (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

2.8.2 Rétrotranscription

La rétrotranscription (RT) a été réalisée à l'aide du *SensiFAST cDNA Synthesis Kit* (Meridian Bioscience) selon les instructions du fabricant. Pour chaque réaction de 10 μ L, 250 ng d'ARN ont été utilisés. L'ADNc a été dilué d'un facteur 100 dans l'eau et conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation pour la PCR.

2.8.3 PCR en temps réel

La PCR en temps réel (qPCR) a été réalisée à l'aide du *SensiFAST SYBR No-ROX Kit* (Meridian Bioscience) selon les instructions du fabricant. Un protocole de PCR en deux étapes suivant a été utilisé : 2

minutes de dénaturation initiale à 95 °C suivies de 35 cycles de 5 secondes à 95 °C et 20 secondes à 63 °C. La fluorescence a été lue après chaque cycle par le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad). À la suite des 35 cycles, une courbe de fusion de 65 °C à 95 °C a été complétée. L'acquisition des données et les calculs d'expression relative ont été faits à l'aide du logiciel CFX Maestro. L'efficacité des différentes paires d'amorces (Tableau 2.5) a été calculée dans le logiciel CFX Maestro à partir d'une courbe standard (voir Figure S.2, Annexe B). La spécificité des amorces a également été validée à l'aide de courbes de fusion et par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau 2.5 Oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR

Gène cible	Nom	Séquence	Efficacité (%)
<i>ACT1</i>	qPCR-ACT1.2-F	5'-AGAGTTGCCCCAGAAGAACACC-3'	105,1
	qPCR-ACT1.2-R	5'-GGCTTGGATGGAAACGTAGAAGG-3'	
<i>ALG9</i>	qPCR-ALG9.2-F	5'-TAAGCTGGCATGTGCTGCATTC-3'	106,9
	qPCR-ALG9.2-R	5'-TTTGCATGATTCGGTTGATTGG-3'	
<i>HA-RPS18A</i>	qPCR-HA-RPS18A-F	5'-GATGTTCCAGATTATGCTGGTGGT-3'	-
	qPCR-HA-RPS18A-int-R	5'- GTCATAGCTCACTAGTAATAATAAACATAC-3'	100,2
	qPCR-HA-RPS18A-ex1-2-R	5'- CAACGTTAGTGTTCAACAAACGTAAAATG-3'	100,8
<i>MYC-RPS18B</i>	qPCR-MYC-RPS18B-F	5'-CAAAAATTGATTTCTGAAGAAGATTTGGGT-3'	-
	qPCR-MYC-RPS18B-int-R	5'-TATCTGCACTGTACTCGTAAAACATAC-3'	102,2
	qPCR-MYC-RPS18B-ex1-2-R	5'-GTGTTCAACAAACGTAAATGTGTTGG-3'	102,9

Les amorces ciblant *ACT1* sont modifiées de Cankorur-Cetinkaya *et al.* (2012) et celles qui ciblent *ALG9* sont tirées de Mendoza-Ochoa *et al.* (2019). Les deux amorces antisens différentes ciblant le gène *HA-RPS18A* sont utilisées avec la même amorce sens (qPCR-HA-RPS18A-F). Les deux amorces antisens ciblant *MYC-RPS18B* sont utilisées avec l'amorce sens qPCR-MYC-RPS18B-F.

2.8.4 Analyse quantitative

Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois répliques biologiques pour chaque souche. Les moyennes ont été comparées à l'aide du test T non apparié. Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Le logiciel GraphPad Prism 8 a été utilisé pour les analyses statistiques.

2.9 Extraction et analyse des protéines par immunobuvardage

Les protéines ont été extraites dans le tampon de Laemmli suite à une lyse alcaline selon la procédure de Kushnirov (2000). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (acrylamide 15%) puis ont été transférées sur membrane de PVDF (Immobilon-P; MilliporeSigma). Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires et secondaire pendant une heure à température de la pièce avec agitation. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal de souris anti-HA (provenant du surnageant de l'hybridome 12CA5), l'anticorps monoclonal de souris anti-Myc (provenant du surnageant de l'hybridome 9E10) et l'anticorps monoclonal de souris anti-GAPDH (GA1R; MédiMabs). L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-IgG de souris couplé à l'enzyme HRP (Cytiva, NA931). Les membranes ont été traitées avec le *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (MilliporeSigma) et la chimiluminescence a été détectée à l'aide du système Fusion FX7.

2.10 Gradients de densité de saccharose

La procédure d'analyse des ribosomes et polysomes a été adaptée de Foiani *et al.* (1991). Les cultures de levure ont été incubées à 30 °C avec agitation jusqu'à la phase exponentielle (A_{600} de 0,5-0,8). De la cycloheximide a été ajoutée aux cultures pour les 15 dernières minutes d'incubation à une concentration finale de 100 µg/mL. L'équivalent de 30 unités A_{600} de cellules ont été lavées avec de l'eau contenant 100 µg/mL de cycloheximide et remises en suspension dans 300 µL du tampon d'extraction TMK100 froid (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM DTT) supplémenté avec de la cycloheximide 100 µg/mL et avec le cocktail inhibiteur de protéases cOmplete (Roche). Par la suite, 0,3 g de billes de verre (Sigma-Aldrich) ont été ajoutées aux suspensions. La lyse a été réalisée en alternant 45 secondes de vortex à vitesse maximale et 45 secondes sur glace pour un total de 7 répétitions de chacune des étapes. Les lysats ont été centrifugés à 5000 g à 4 °C pendant 5 minutes. L'équivalent de 8 unités A_{260} du surnageant ont été chargées sur un gradient linéaire de saccharose 7-47% préparé dans le même tampon (TMK100). Les gradients ont été centrifugés à 39 000 RPM à 4 °C pendant 2h45 (Kressler *et al.*, 1997). L'absorbance à 254 nm a été lue en continu à l'aide d'un détecteur UA-6 pour obtenir les profils de polysomes.

2.11 Immunoprécipitation et détermination des modifications post-traductionnelles

Les cultures de levure YFS18 $\Delta\Delta$ 1 ont été incubées à 30 °C avec agitation jusqu'à la phase exponentielle (A_{600} de 0,5-0,8) puis lavées avec de l'eau. Les cellules ont été conservées à -80°C jusqu'à l'extraction.

Pour l'extraction, l'équivalent de 50 unités A_{600} de cellules ont été remises en suspension dans 500 μ L de tampon d'extraction froid (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche) et PhosStop phosphatase inhibitor cocktail (Roche)). La lyse a été réalisée selon la même procédure décrite pour les gradients de saccharose. Les lysats ont été centrifugés à 5000 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant a été utilisé pour l'immunoprécipitation.

Les billes magnétiques anti-HA ou anti-MYC (MedChemExpress) ont été remises en suspension. Un volume de 20 μ L a été prélevé et les billes ont été lavées 3 fois 500 μ L du tampon TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20). Elles ont ensuite été incubées avec 500 μ L de l'extrait protéique pendant un minimum de deux heures à 4 °C avec agitation. Les billes ont ensuite été lavées 5 fois avec 500 μ L de TBST. Une partie des billes (1-2 % du volume total) a été prélevée et bouillie 5 minutes dans le tampon Laemmli pour une analyse par immunobuvardage. Le reste de l'échantillon a été remis en suspension dans 100 μ L de tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7.9) et a été envoyé au Centre d'analyses protéomiques avancées (CAPA) où les modifications post-traductionnelles ont été détectées par spectrométrie de masse.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Le gène *RPS18A* a une contribution majeure dans la cellule.

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les paralogues *RPS18A* et *RPS18B* encodent la protéine ribosomique uS13, une composante essentielle de la petite sous-unité (40S) du ribosome. Malgré leur apparente redondance génétique, la délétion de l'un ou l'autre de ces gènes a mené à l'observation de phénotypes différents (Chiocchetti *et al.*, 2007; Komili *et al.*, 2007; Ni & Snyder, 2001). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets de *RPS18A* et de *RPS18B* sur la croissance cellulaire et sur la biogenèse des ribosomes.

3.1.1 Le gène *RPS18A* contribue davantage à la croissance cellulaire que son paralogue *RPS18B*

Nous avons tout d'abord déterminé l'impact de la délétion de *RPS18A* ou de *RPS18B* sur la croissance de la levure (Figure 3.1). Pour ce faire, la densité optique à 600 nm a été mesurée à chaque heure pendant la phase de croissance exponentielle. Les souches délétées avaient toutes les deux une croissance ralentie par rapport à la souche parentale BY4741. La souche *rps18aΔ* montrait une croissance plus lente que la souche *rps18bΔ*.

Le temps de doublement de chaque souche a été calculé à partir des mêmes données de densité optiques. Le temps de doublement de la souche sauvage BY4741 était de 116 ± 10 minutes (Tableau 3.1). Lorsque le gène *RPS18A* était délété, le temps de doublement augmentait, passant à 149 ± 13 minutes, ce qui représente un ralentissement de 28,4%. La souche *rps18bΔ* avait un temps de doublement 135 ± 9 minutes, c'est-à-dire un ralentissement de 16,4% par rapport au type sauvage. Le ralentissement de croissance est donc plus important lorsque le gène *RPS18A* est éliminé plutôt que son paralogue *RPS18B*. Ce résultat suggère que, dans les conditions expérimentales utilisées, le gène *RPS18A* est plus important pour la croissance cellulaire que son paralogue *RPS18B*.

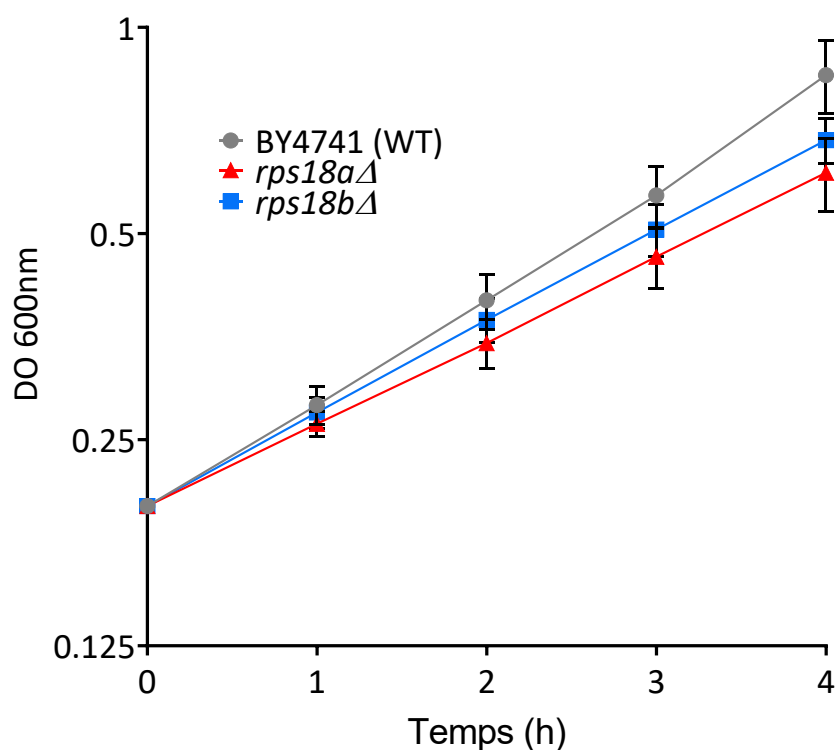


Figure 3.1 Ralentissement de croissance des souches *rps18a*Δ et *rps18b*Δ.

L'absorbance à 600 nm a été mesurée pendant la croissance exponentielle à 30 °C dans un milieu riche (YPD). La souche BY4741 et ses dérivées *rps18a*Δ et *rps18b*Δ ont été cultivées en parallèle. Les points correspondent à la moyenne de quatre répliques biologiques pour chaque souche. La densité optique à 600 nm est représentée selon une échelle logarithmique.

Tableau 3.1 Ralentissement de croissance des souches *rps18a*Δ et *rps18b*Δ.

Souche	Temps de doublement (min)	Écart-type (min)	Ralentissement (%)
BY4741	116	±10	-
<i>rps18a</i> Δ	149	±13	28,4
<i>rps18b</i> Δ	135	±9	16,4

Le temps de doublement et l'écart-type ont été calculés à partir de quatre expériences indépendantes. Le ralentissement a été calculé par rapport à la souche parentale BY4741.

3.1.2 Le gène *RPS18A* est plus important pour l'assemblage des ribosomes que son paralogue *RPS18B*.

Afin de poursuivre la comparaison des paralogues *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons examiné l'effet de leur délétion respective sur leurs profils de polysomes. Des extraits cellulaires de levures BY4741, *rps18aΔ* et *rps18bΔ* ont été fractionnés sur des gradients de saccharose (Figure 3.2). Le profil d'absorbance à 254 nm obtenu à partir de la souche BY4741 (WT) montre un pic marqué pour chacune des sous-unités (40S et 60S) et pour le ribosome entier (80S). Lors de la délétion de l'un ou l'autre des gènes encodant la protéine ribosomique uS13, il n'était plus possible de distinguer la sous-unité 40S du signal de fond. De plus, le pic correspondant à la sous-unité 60S est beaucoup plus important pour ces souches délétées que dans le profil de type sauvage. Cet effet d'accumulation de la sous-unité 60S est particulièrement marqué pour la souche *rps18aΔ*, dont le signal de la sous-unité 60S dépasse celui des monosomes (80S). Ce résultat suggère que le gène *RPS18A* est plus important pour l'assemblage de la sous-unité 40S.

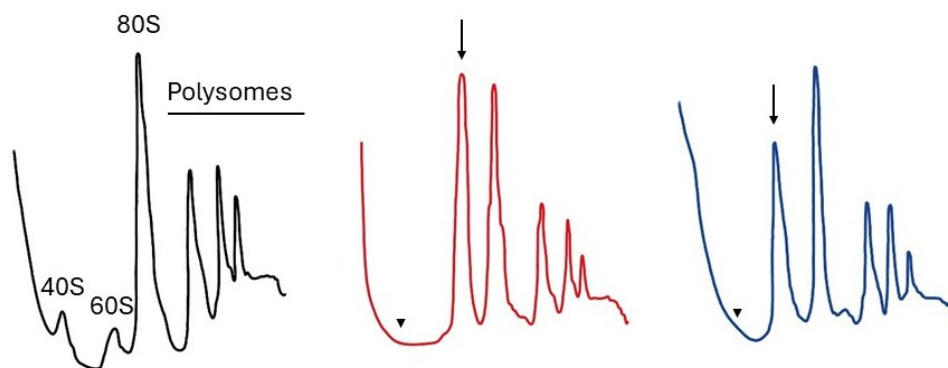


Figure 3.2 Défauts d'assemblage des ribosomes de souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ*.

Le profil correspondant à la souche BY4741 (WT) est en noir. Les profils des souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ* sont représentés en rouge et en bleu, respectivement. Le profil de sédimentation des souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ* révèle une diminution de la sous-unité 40S (pointe de flèche) et une accumulation importante de la sous-unité 60S (flèche) par rapport à la souche parentale BY4741.

3.2 Création d'outils moléculaires pour étudier les paralogues *RPS18A* et *RPS18B*.

Pour être en mesure de distinguer les protéines uS13 issues des gènes *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons créé une série d'outils moléculaires. Pour ce faire, les séquences codantes de chacun des gènes ainsi que leurs promoteurs naturels et séquences non-codantes ont d'abord été clonés dans un vecteur. Plus précisément, 500 paires de base en amont de l'ATG initiateur et 300 paires de bases en aval du codon d'arrêt des deux gènes ont été inclus dans toutes les constructions (Figure 3.3). Ces ajouts servent à utiliser les promoteurs

et terminateurs naturels qui distinguent les deux paralogues pour leur expression. Les introns des gènes *RPS18A* et *RPS18B* ont également été inclus dans ces constructions (Figure 3.3).

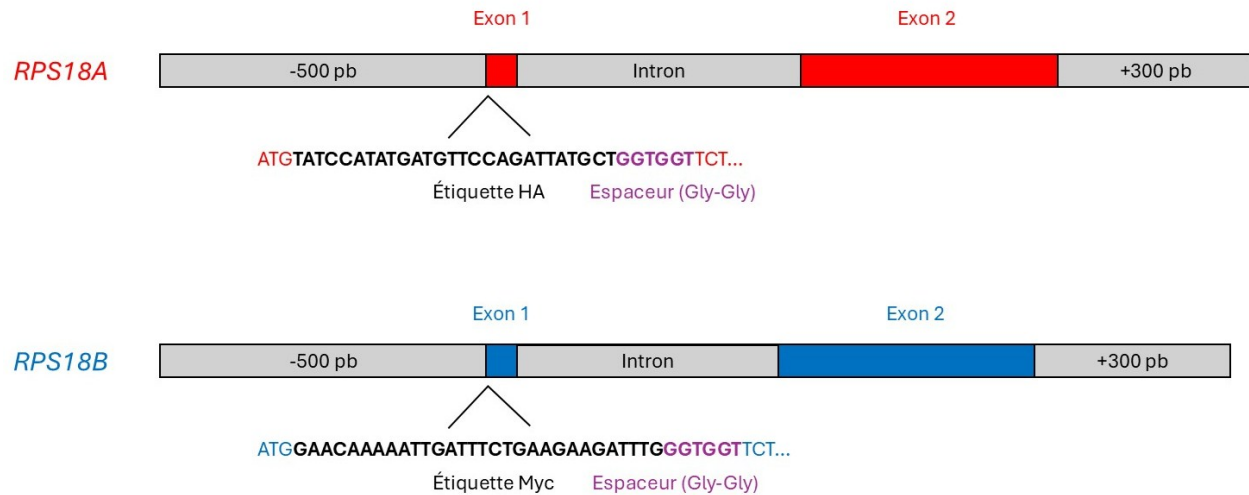


Figure 3.3 Constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*.

Les séquences (en noir) qui encodent les étiquettes biologiques HA et Myc ont été insérées à la suite des codons initiateurs de *RPS18A* et de *RPS18B*, respectivement suivies des séquences (en violet) encodant deux acides aminés glycine.

Les séquences nucléotidiques encodant les épitopes hémagglutinine (HA) et Myc ont été ajoutées par mutagenèse dirigée après l'ATG initiateur des gènes *RPS18A* et *RPS18B*, respectivement (Figure 3.3). Les constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont finalement été sous-clonés dans trois plasmides différents permettant leur expression dans la levure : YCplac33, YCplac111 et YEplac 195. Les deux épitopes (HA et Myc) se retrouvent en N-terminal de la protéine uS13. La protéine HA-uS13a débute donc avec les acides aminés MYPYDVPDYA(GG) et la protéine Myc-uS13b débute avec la séquence MEQKLISEEDL(GG). La méthionine initiale est normalement clivée post-traductionnellement (Arnold *et al.*, 1999). Les deux résidus glycine indiqués entre parenthèses correspondent à l'espaceur entre l'étiquette biologique et le premier acide aminé de uS13.

Les constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont été insérés dans les plasmides centromériques YCplac33 et YCplac111 possédant les marqueurs auxotrophes *URA3* et *LEU2*, respectivement (voir Figure 2.1). Le plasmide multicopies YEplac195 possède le marqueur auxotrophe *URA3*. Le site de restriction unique

*Bam*HI a été utilisé pour sous-cloner les différentes constructions dans les trois plasmides. Il est donc possible que les inserts se retrouvent dans l'une ou l'autre des orientations. Puisque les promoteurs et terminateurs naturels sont inclus dans les inserts, nous supposons que l'orientation de ces derniers dans les plasmides n'a pas d'impact sur l'expression des gènes.

Pour valider l'expression des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b à partir des plasmides, un test de complémentation a été réalisé. La souche $P_{GAL}\text{-}RPS18A\text{-}rps18b\Delta$ permet de valider l'expression de protéines uS13 fonctionnelles, car son gène *RPS18B* est délété et son gène *RPS18A* est contrôlé par le promoteur inducible *GAL1* (Figure 3.4). Ainsi, la croissance en présence de galactose active l'expression de *RPS18A* endogène. Par contraste, la croissance en YPD (dextrose) ne permet pas l'expression de *RPS18A* endogène. Ceci simule la délétion létale des deux paralogues *RPS18A* et *RPS18B* (Lemay, 2013). Dans ce contexte, la seule façon de restaurer la survie et la croissance cellulaire est la complémentation avec un gène encodant une protéine uS13 fonctionnelle. Les constructions avec et sans étiquettes biologiques ont été testées à l'aide de ce système.

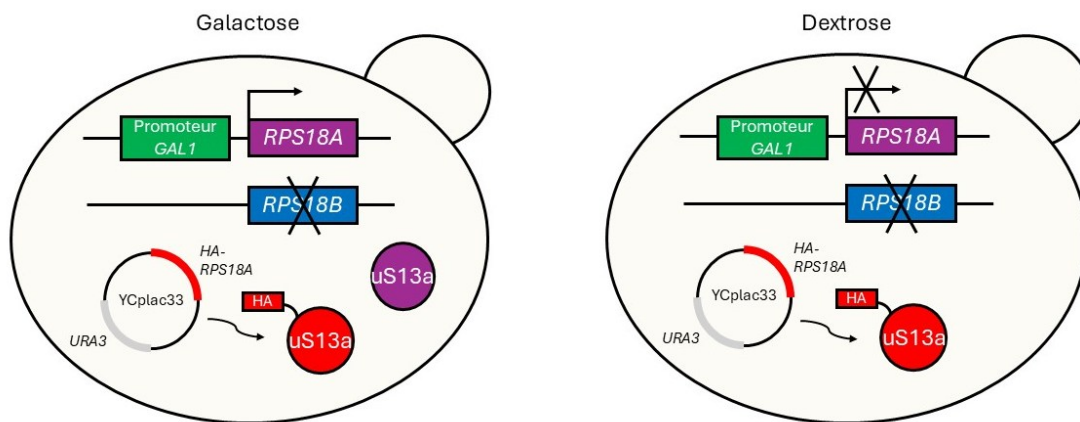


Figure 3.4 Souche de déplétion $P_{GAL}\text{-}RPS18A\text{-}rps18b\Delta$.

Le gène *RPS18B* est délété et l'expression du gène *RPS18A* endogène est contrôlée par le promoteur inducible *GAL1*. La protéine uS13a endogène (en violet) est uniquement produite en présence de galactose. Dans cet exemple, la souche $P_{GAL}\text{-}RPS18A\text{-}rps18b\Delta$ est complétée avec le plasmide YCplac33-*HA-RPS18A*, permettant la synthèse de HA-uS13a (en rouge).

Pour le test de complémentation en milieu solide, la souche de type sauvage BY4741 a servi de contrôle positif et la souche $P_{GAL}\text{-}RPS18A\text{-}rps18b\Delta$ contenant le vecteur YCplac33 vide a été utilisée comme contrôle négatif (Figure 3.5). La souche BY4741 croît dans les milieux YPGal et YPD, alors que la souche $P_{GAL}\text{-}RPS18A\text{-}$

rps18bΔ contenant le vecteur vide ne croît qu'en YPGal. La souche *P_{GAL}-RPS18A-rps18bΔ* a aussi été transformée avec les constructions *RPS18A*, *HA-RPS18A*, *RPS18B* ou *MYC-RPS18B*. Ces quatre plasmides ont permis la croissance sur la gélose de YPD. La croissance de toutes les souches complémentées était comparable à celle de la souche BY4741, car les colonies avaient des tailles similaires (Figure 3.5). Ainsi, toutes les constructions testées ont permis de compléter la souche de déplétion. Ce résultat confirme l'expression de la protéine uS13 à partir des plasmides et que toutes les versions de uS13, marquées ou non, sont fonctionnelles.

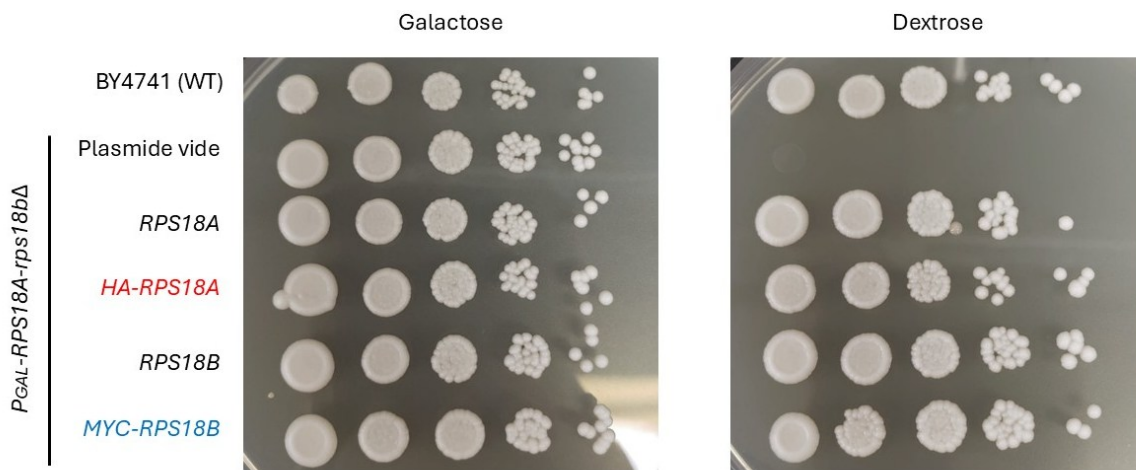


Figure 3.5 Test de complémentation en milieu solide.

La souche *P_{GAL}-RPS18A-rps18bΔ* a été complémentée avec les constructions *RPS18A*, *HA-RPS18A*, *RPS18B* et *MYC-RPS18B*. Les colonnes correspondent à des dilutions en séries de facteur 10 des mêmes cultures. La colonne de gauche est non-diluée et celle de droite correspond à une dilution de 10^{-4} . Galactose : milieu YPGal; Dextrose : milieu YPD.

L'expression des protéines HA-uS13a et MYC-uS13b a également été confirmée par immunobuvardage (Figure 3.6). La détection a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques anti-HA et anti-Myc, respectivement. Ce résultat confirme la présence des épitopes permettant la distinction des deux versions de uS13.

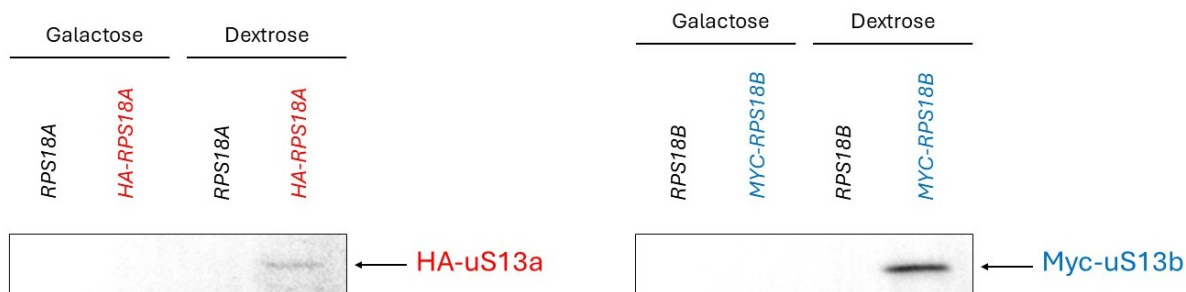


Figure 3.6 Détection des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b par immunobuvardage.

La souche *P_{GAL}-RPS18A-rps18bΔ* a été utilisée pour exprimer les constructions *RPS18A*, *HA-RPS18A*, *RPS18B* et *MYC-RPS18B*. Les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b n'ont pas pu être détectées lorsque les cellules étaient cultivées en présence de galactose (YPGal). Toutefois, elles ont été détectées dans les extraits de cultures en dextrose (YPD).

La complémentation a également été testée dans les souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ* à différentes températures (Figure 3.7). Le nombre de colonies pour chaque souche varie selon l'exécution des dilutions. Les colonies avaient la même taille lorsque les levures étaient transformées avec des plasmides portant *RPS18A* ou *HA-RPS18A* et ce à des températures de 16 °C, 22 °C, 30 °C et 37 °C. Le même résultat a été observé pour les levures possédant les gènes *RPS18B* ou *MYC-RPS18B*. Ce test de complémentation en milieu solide confirme que la présence des étiquettes biologiques à l'extrémité N-terminale de uS13 n'affecte pas la croissance cellulaire même en conditions de stress thermique.

La souche *rps18aΔ* préalablement complémentée avec la construction *HA-RPS18A* a été utilisée pour générer la souche YFS18ΔΔ. Pour ce faire, la cassette *HIS3* a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces contenant des extensions spécifiques au locus *RPS18B* (voir Tableau 2.4). Les levures ont été transformées à l'aide de ce produit de PCR et la cassette a été intégrée au génome par recombinaison homologue. Les levures ayant intégré la cassette ont été sélectionnées sur des géloses SD-His. L'élimination du gène *RPS18B* a par la suite été validée par PCR à partir de l'ADN génomique extrait des différents clones (voir Tableau 2.4). Le produit de PCR du locus *RPS18B* pour les clones 5 et 6 avait une taille d'environ 1200 pb, tout comme le contrôle négatif BY4741 (Figure 3.8). Cette taille correspond à la présence du gène *RPS18B*, ce qui suggère que la cassette *HIS3* a été intégrée ailleurs dans le génome. Le produit de PCR pour le clone 7 avait une taille plus grande, soit environ 1700 pb (Figure 3.8). Cette taille correspond à la présence du gène *HIS3* au locus *RPS18B*. Ce résultat confirme la délétion du gène *RPS18B*. Le clone 7 a été sélectionné pour générer les souches YFS18ΔΔ1 à 9.

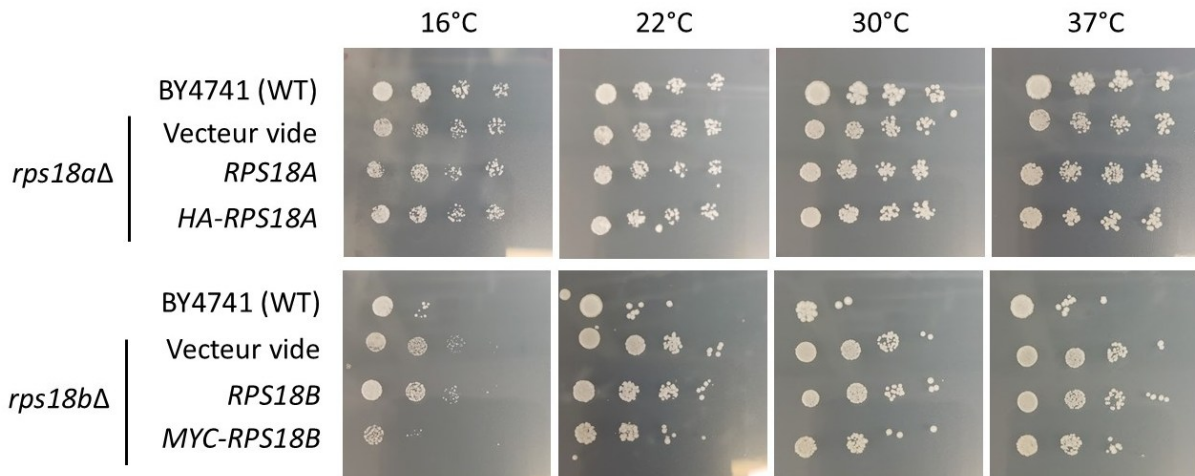


Figure 3.7 La température n'a pas d'impact sur la complémentation avec les constructions marquées.

Les colonnes correspondent à des dilutions en série de facteur 10 des mêmes cultures. La colonne de droite correspond à une dilution de 10^{-4} . Les levures ont été cultivées sur des géloses SD -Ura. La souche BY4741 a aussi été transformée avec un plasmide YCplac33 vide pour permettre sa croissance en milieu sélectif.

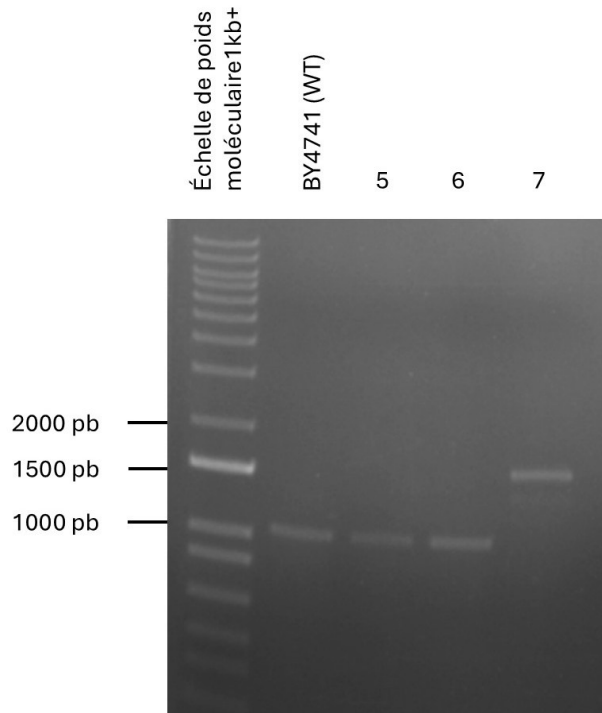


Figure 3.8 Vérification de la délétion du gène *RPS18B*.

La souche BY4741 (WT) a été utilisée comme contrôle négatif. L'ADN génomique de BY4741 et des clones 5, 6 et 7 a été amplifié par PCR à l'aide des amorces *RPS18B*-KOcheck-F et *RPS18B*-KOcheck-R. S'il n'y a pas eu de recombinaison au locus *RPS18B*, la taille de l'amplicon devrait être de 1237 pb. Si la cassette His3MX6 de 1403 pb (Longtine *et al.*, 1998) a été intégrée à ce locus, la taille de l'amplicon serait de 1798 pb.

La souche YFS18ΔΔ1 est complétée avec les plasmides YCplac33-*HA-RPS18A* et YCplac111-*MYC-RPS18B* (voir Tableau 2.1). Cette souche permet l'expression des protéines marquées HA-uS13a et Myc-uS13b à partir des plasmides sans contribution endogène. À l'aide de cet outil, nous avons réalisé des immunoprécipitations (Figure 3.9). Nos résultats confirment que les épitopes HA et Myc peuvent être utilisés pour précipiter spécifiquement HA-uS13a et Myc-uS13b à partir d'un extrait cellulaire.

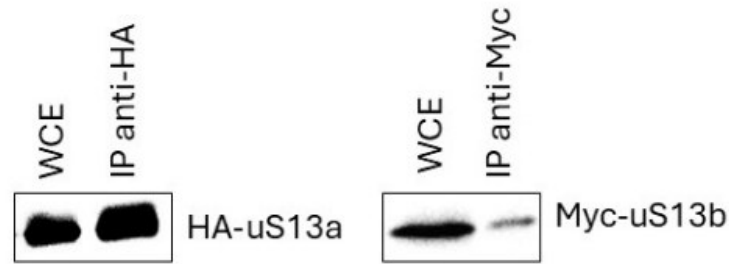


Figure 3.9 Immunoprécipitation des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b.

Les extraits cellulaires préparés à partir d'une culture en phase exponentielle de la souche YFS18ΔΔ1 ont été immunoprécipités à l'aide de billes magnétiques anti-HA ou anti-Myc. Les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b ont été détectées par immunobuvardages à l'aide d'anticorps anti-HA ou anti-Myc, respectivement. WCE : extrait cellulaire total.

3.3 Régulation intergénique des paralogues *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*.

Différentes combinaisons des plasmides YCplac33, YCplac111 et YEplac195 portant les gènes *HA-RPS18A* ou *MYC-RPS18B* ont été transformées dans la souche YFS18ΔΔ afin de produire les souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9. Ces levures possèdent différents dosages des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. Nous avons étudié l'impact du dosage de ces gènes sur leur expression en mesurant l'abondance relative de leurs ARNm respectifs par RT-qPCR.

La souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB) a un dosage génique normal, c'est-à-dire une copie du gène *HA-RPS18A* et une copie du gène *MYC-RPS18B*. L'abondance relative de ses transcrits a été normalisée à 1. L'expression relative des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* a d'abord été mesurée dans les souches YFS18ΔΔ2 (A) et YFS18ΔΔ5 (B), respectivement (Figure 3.10). Ces souches possèdent chacune une copie de l'un des deux paralogues, ce qui simule les souches *rps18bΔ* et *rps18aΔ*, respectivement. Dans les souches A et B, l'ARNm mature correspondant était environ deux fois plus abondant que dans la souche contrôle ($p = 0,0172$ et $p = 0,0476$).

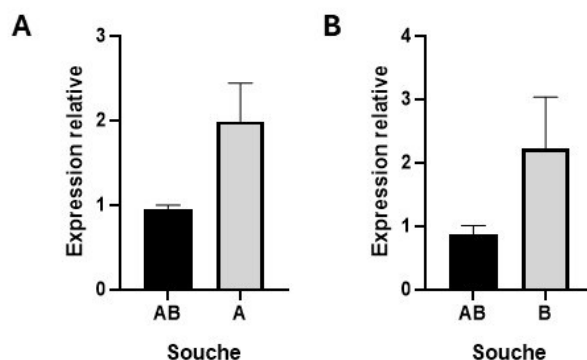


Figure 3.10 Surexpression des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* en absence de leur paralogue respectif.

L'abondance moyenne des transcrits pour trois répliques biologiques est normalisée aux gènes de référence *ACT1* (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012) et *ALG9* (Mendoza-Ochoa *et al.*, 2019) et comparée à la souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB) à l'aide de la méthode ΔΔCt. Les niveaux d'ARNm épissé du gène **(A)** *HA-RPS18A* dans la souche YFS18ΔΔ2 (A) et du gène **(B)** *MYC-RPS18B* dans la souche YFS18ΔΔ5 (B) sont représentés.

Ensuite, l'abondance relative des transcrits a été mesurée dans des souches qui possèdent de multiples copies de *HA-RPS18A* ou *MYC-RPS18B* (Figure 3.11). La présence d'un plasmide 2 microns (multi-copies) est représentée dans la notation abrégée des souches à l'aide d'un astérisque (Voir Tableau 2.1). Il a été estimé que les plasmides 2 microns sont répliqués en 40 à 60 copies par cellule (Chan *et al.*, 2013). L'augmentation du dosage génique de *HA-RPS18A* a mené à une augmentation de son expression d'environ 3,5 fois ($p = 0,0057$) par rapport à la souche contrôle (Figure 3.11A). Le gène *HA-RPS18A* est davantage surexprimé dans la souche YFS18ΔΔ4 (AA*) lorsque ce gène se trouve sur un plasmide 2 micron que dans la souche YFS18ΔΔ2 (A) qui n'en possède qu'une copie ($p = 0,0492$).

L'ARNm détecté dans la souche YFS18ΔΔ9 (BA*) montrait une surexpression comparable en présence d'une copie du gène *MYC-RPS18B* qu'en son absence, dans la souche YFS18ΔΔ4 (AA*) ($p = 0,6429$) (Figure 3.11A). Par contraste, l'augmentation du dosage génique de *MYC-RPS18B* a mené à une augmentation de son expression relative d'environ 5 fois ($p < 0,0001$) dans la souche YFS18ΔΔ7 (BB*) mais à une diminution d'environ 10 fois ($p = 0,0006$) en présence d'une copie de son paralogue *HA-RPS18A* dans la souche YFS18ΔΔ8 (AB*) (Figure 3.11C).

Afin de déterminer si cette régulation de *MYC-RPS18B* est transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, nous avons comparé l'abondance des pré-ARNm (possédant encore l'intron) de ce gène dans les différentes souches (Figure 3.11D). Tout comme avec le transcrit mature, le pré-ARNm de *MYC-RPS18B*

était surexprimé dans la souche multicopies YFS18ΔΔ7 (BB*). Or, dans la souche YFS18ΔΔ8 (AB*), le pré-ARNm *MYC-RPS18B* était environ 64 fois ($p = 0,0087$) plus abondant que dans la souche contrôle contrairement à l'ARNm mature qui était 10 fois moins abondant (AB*). Ce résultat suggère que la transcription n'est pas inhibée par la présence d'une copie de *HA-RPS18A* dans cette souche, mais que la régulation de *MYC-RPS18B* a lieu post-transcriptionnellement.

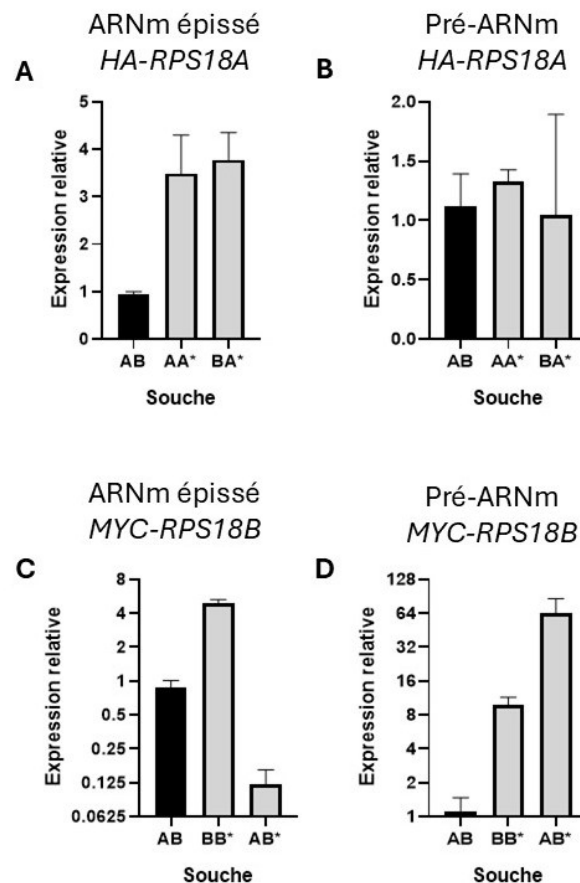


Figure 3.11 Régulation post-transcriptionnelle du gène *MYC-RPS18B*.

L'abondance moyenne des transcrits pour trois répliques biologiques est normalisée aux gènes de référence *ACT1* (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012) et *ALG9* (Mendoza-Ochoa *et al.*, 2019). L'abondance relative des transcrits des souches YFS18ΔΔ4 (AA*), YFS18ΔΔ7 (BB*), YFS18ΔΔ8 (AB*) et YFS18ΔΔ9 (BA*) a comparée à la souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB) à l'aide de la méthode $\Delta\Delta Ct$. L'astérisque indique des plasmides 2 microns (multi-copies) portant le paralogue indiqué. Les niveaux d'ARNm mature de **(A)** *HA-RPS18A* et **(C)** *MYC-RPS18B* et de pré-ARNm de **(B)** *HA-RPS18A* et **(D)** *MYC-RPS18B* sont représentés selon une échelle logarithmique.

La même expérience a été répétée avec les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 4 (AA*) et YFS18 $\Delta\Delta$ 9 (BA*) possédant de multiples copies de *HA-RPS18A*. Dans ces deux souches, l'abondance des pré-ARNm était comparable à la souche contrôle (AB) ($p = 0,2921$ et $p = 0,8865$) (Figure 3.11B). Ce résultat suggère que le gène *HA-RPS18A* est régulé transcriptionnellement et que la présence de son paralogue *MYC-RPS18B* n'a pas d'impact sur la maturation de son ARNm.

L'expression relative des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* a été comparée à l'aide de la méthode de RT-qPCR pour différents dosages géniques. Afin de vérifier si la quantité de protéines HA-uS13a et Myc-uS13b produites correspond à l'abondance des ARNm, des extraits protéiques ont été analysés par immunobuvardage (Figure 3.12). La souche BY4741 transformée avec les plasmides YCplac33 et YCplac111 vides a été utilisée comme contrôle négatif. Elle ne possède aucune version marquée de uS13 avec les étiquettes biologiques HA et Myc. Les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9 possédant différentes doses de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont été comparées. Les anticorps anti-HA et anti-Myc ont été utilisés pour détecter les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b, respectivement. L'anti-GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement (Wu *et al.*, 2012).

Les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 2 (A), YFS18 $\Delta\Delta$ 3 (AA) et YFS18 $\Delta\Delta$ 4 (AA*) ont un plus grand signal pour HA-uS13a que la souche contrôle YFS18 $\Delta\Delta$ 1 (AB), ce qui est cohérent avec la surexpression de *HA-RPS18A* en absence de son paralogue (Figures 3.10 et 3.11A). La souche YFS18 $\Delta\Delta$ 9 (BA*) a un signal pour HA-uS13a comparable à la souche contrôle (AB) alors que l'ARNm mature de *HA-RPS18A* était environ 3,5 fois plus exprimé dans cette souche (Figure 3.11A). Ce résultat pourrait être dû à une moins grande efficacité de traduction ou à de la dégradation protéique.

Les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 5 (B), YFS18 $\Delta\Delta$ 6 (BB), YFS18 $\Delta\Delta$ 7 (BB*) ont un signal plus fort que la souche contrôle YFS18 $\Delta\Delta$ 1 (AB) pour la protéine Myc-uS13b. Ce résultat est cohérent avec la surexpression de *MYC-RPS18B* en absence de son paralogue (Figures 3.10 et 3.11C). Le signal pour la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 6 (BB) possédant deux doses du gène *MYC-RPS18B* est le plus abondant pour la protéine Myc-uS13b. La souche YFS18 $\Delta\Delta$ 8 (AB*) n'avait aucun signal pour la protéine Myc-uS13b. Ce résultat est cohérent avec la diminution d'ARNm mature de *MYC-RPS18B* mesuré dans cette souche (Figure 3.11C). La protéine HA-uS13a a tout de même été détectée dans cette souche avec une intensité comparable au contrôle (AB).

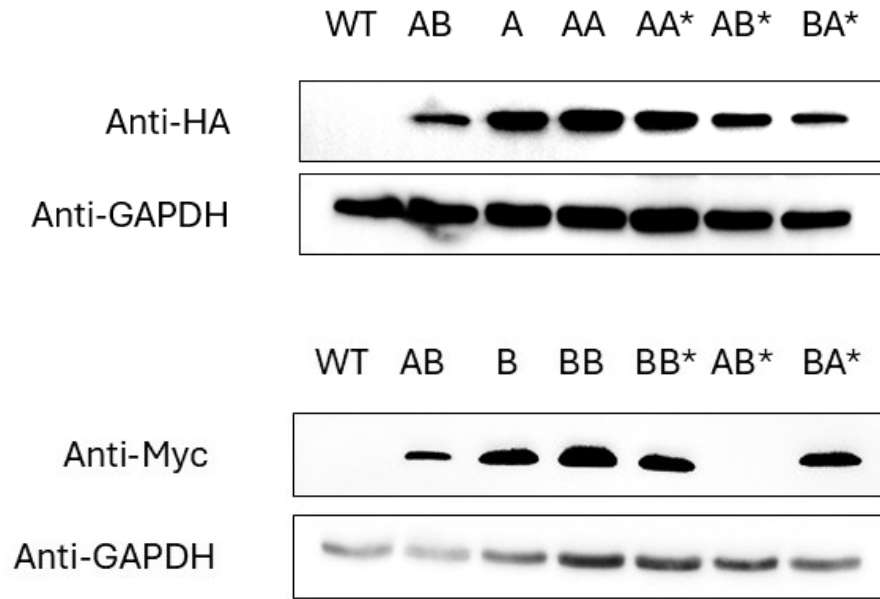


Figure 3.12 Immundétection des protéines HA-uS13A et Myc-uS13b dans les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9.

L'astérisque représente la présence du plasmide multicopies YEplac195 portant le paralogue indiqué. Les protéines ont été extraites de cultures faites en milieu SD-Ura-Leu. La souche BY4741 (WT) complémentée des vecteurs YCplac33 et YCplac111 vides a été utilisée comme contrôle négatif.

3.4 Le dosage génique affecte la croissance cellulaire de façon non-linéaire.

Les souches *rps18a* Δ et *rps18b* Δ ont été complémentées avec les constructions *RPS18A* et *RPS18B* (sans étiquette biologique). Un test de croissance en milieu solide SD-Ura a été réalisé (Figure 3.13). La souche BY4741 avait les plus grandes colonies. Les souches *rps18a* Δ et *rps18b* Δ (vecteur vide) avaient les plus petites colonies. La complémentation à l'aide des constructions *RPS18A* ou *RPS18B* augmentait la taille des colonies, particulièrement avec les plasmides multicopies. En somme, l'augmentation du nombre de copies de *RPS18A* et *RPS18B* semble avoir un effet bénéfique pour la croissance cellulaire en milieu solide.

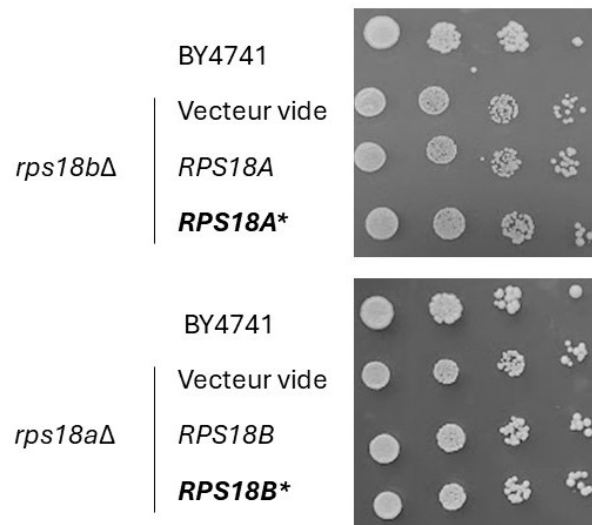


Figure 3.13 Effets du dosage génique des paralogues *RPS18A* et *RPS18B* sur la croissance cellulaire.

Les souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ* ont été complémentées avec les plasmides YCplac33-*RPS18A* et YCplac33-*RPS18B*, respectivement. L'astérisque signifie que le plasmide multicopies YEplac195 a été utilisé pour introduire les mêmes gènes. Les levures ont été cultivées sur des géloses SD-Ura. La souche BY4741 a aussi été transformée avec un plasmide YCplac33 vide pour permettre sa croissance dans ce milieu sélectif. Les colonnes correspondent à des dilutions en séries de facteur 10 des mêmes cultures. La colonne de droite correspond à une dilution de 10^{-4} .

Les souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 possèdent différents dosages de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. La croissance cellulaire des souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 cultivées en milieu liquide SD-Ura-Leu a été évaluée à partir de courbes de croissance et le temps de doublement moyen de chaque souche a été calculé. La souche YFS18ΔΔ1 (AB) est utilisée comme contrôle puisqu'elle possède une copie de *HA-RPS18A* et une copie de *MYC-RPS18B*, ce qui correspond au dosage génique du type sauvage. Cette souche avait un temps de doublement de $148,0 \pm 8,6$ minutes (Tableau 3.2).

Les souches YFS18ΔΔ2 (A) et YFS18ΔΔ5 (B) avaient des temps de doublement de $159,7 \pm 15,9$ minutes et de $150,5 \pm 15,5$ minutes, respectivement (Tableau 3.2). Ces levures ont des dosages géniques équivalents aux souches *rps18bΔ* et *rps18aΔ*. Leur ralentissement de 7,9% et de 1,7%, respectivement avec la souche contrôle suggère que la perte d'un gène encodant uS13 engendre un léger défaut de croissance. La souche YFS18ΔΔ2 (A) ne possédant pas le gène *MYC-RPS18B* a une croissance davantage ralentie par rapport au contrôle.

Tableau 3.2 Temps de doublement des souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 en milieu SD-Ura-Leu.

Souche	Notation abrégée	Temps de doublement (min)	Écart-type (min)	Modification (%)
YFS18ΔΔ1	AB	148,0	8,6	0,0
YFS18ΔΔ2	A	159,7	15,9	-7,9
YFS18ΔΔ3	AA	147,1	13,7	0,6
YFS18ΔΔ4	AA*	137,3	8,3	7,2
YFS18ΔΔ5	B	150,5	15,5	-1,7
YFS18ΔΔ6	BB	140,9	12,4	4,8
YFS18ΔΔ7	BB*	254,6	7,7	-72,1
YFS18ΔΔ8	AB*	186,9	15,0	-25,1
YFS18ΔΔ9	BA*	183,3	24,0	-27,9

L'astérisque correspond à la présence d'un plasmide multicopies portant le paralogue indiqué. Les temps de doublements moyens ont été calculés à partir de courbes de croissance tracées pour un minimum de trois expériences indépendantes. Le pourcentage de modification a été calculé par rapport à la souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB).

Les souches YFS18ΔΔ3 (AA) et YFS18ΔΔ6 (BB) avaient des temps de doublement de $147,1 \pm 13,7$ minutes et de $140,9 \pm 12,4$ minutes, respectivement (Tableau 3.2). Ces souches possèdent chacune deux copies d'un gène encodant uS13, tout comme la souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB), mais à la différence que c'est le même paralogue qui est présent en deux exemplaires. Leur croissance légèrement plus rapide que la souche contrôle (0,6% et 4,8%) suggère que la présence de l'un ou l'autre des gènes en deux copies compense pour l'absence de son paralogue.

Les souches YFS18ΔΔ4 (AA*) et YFS18ΔΔ7 (BB*) possèdent de multiples copies d'un des paragraphes et aucune de l'autre. De multiples copies de *HA-RPS18A* ont mené à un temps de doublement de $137,3 \pm 8,3$ minutes, ce qui représente une croissance 7,2% plus rapide que le contrôle (Tableau 3.2). Les levures possédant de multiples copies du gène *MYC-RPS18B* ont doublé après $254,6 \pm 7,7$ minutes, ce qui correspond à un ralentissement de 72,1% par rapport à la souche YFS18ΔΔ1 (AB) (Tableau 3.2). Ces résultats indiquent que l'augmentation du dosage de *HA-RPS18A* à des niveaux dépassant la dose naturelle a un effet bénéfique pour la croissance cellulaire, alors que l'augmentation de la dose de son paralogue

MYC-RPS18B à ce même niveau nuit à la croissance cellulaire. La croissance ralentie de la souche YFS18ΔΔ7 (BB*) suggère qu'une surdose de *MYC-RPS18B* peut avoir un effet toxique pour la cellule.

Les souches YFS18ΔΔ8 (AB*) et YFS18ΔΔ9 (BA*) possèdent une copie de l'un des paralogues et de multiples copies de l'autre. Leurs temps de doublement étaient de $186,9 \pm 15,0$ minutes et de $183,3 \pm 24,0$ minutes, respectivement (Tableau 3.2). Ces deux souches avaient une croissance ralentie (25,1% et 27,9%) par rapport à la souche contrôle (AB). Ce résultat montre que l'augmentation du dosage génique de l'un ou l'autre des paralogues nuit à la croissance cellulaire. La présence d'une copie de *MYC-RPS18B* a renversé l'effet positif du surdosage de *HA-RPS18A* observé dans la souche YFS18ΔΔ4 (AA*). À l'inverse, la présence d'une copie de *HA-RPS18A* a diminué l'impact négatif du surdosage de *MYC-RPS18B* observé dans la souche YFS18ΔΔ7 (BB*). Ceci suggère que les paralogues *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* modulent l'expression l'un de l'autre.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Contribution inégale des paralogues *RPS18A* et *RPS18B* dans la cellule

Les gènes paralogues encodant des protéines ribosomiques contribuent de façon inégale dans *Saccharomyces cerevisiae*, car la quantité de protéine produite par deux paralogues est asymétrique en conditions normales (Ghulam *et al.*, 2020). Les gènes *RPS18A* et *RPS18B* encodent respectivement les protéines uS13a et uS13b qui ont des séquences d'acides aminés identiques. Or, la délétion de *RPS18A* ou de *RPS18B* a mené à des phénotypes différents (Chiocchetti *et al.*, 2007; Komili *et al.*, 2007; Ni & Snyder, 2001).

4.1.1 Le gène *RPS18A* est plus important que *RPS18B* pour la croissance cellulaire.

Pour débiter notre étude des gènes paralogues *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons commencé par évaluer l'impact de la délétion respective de ces paralogues sur la croissance cellulaire. Les souches délétées ont toutes les deux une croissance ralentie par rapport à la souche de type sauvage BY4741. La souche *rps18aΔ* croît plus lentement que la souche *rps18bΔ* (Figure 3.1), ce qui correspond aux observations de Steffen *et al.* (2012) en milieu solide. La souche BY4741 avait un temps de doublement de 116 minutes (Tableau 3.1), ce qui est plus lent que la croissance attendue en conditions optimales. En effet, la levure de type sauvage, comme les souches S288C et BY4741, a normalement un temps de doublement d'environ 90 minutes lorsqu'elle croît dans un milieu riche (YPD) à 30 °C (Long *et al.*, 2024). Puisque le temps de doublement de la souche BY4741 était plus grand que 90 minutes, nous soupçonnons que les conditions expérimentales réelles n'étaient pas parfaitement optimales. Toutefois, toutes les souches ont été cultivées simultanément et dans les mêmes conditions. Les données recueillies pour les trois souches restent comparables entre elles pour ces conditions.

La souche *rps18aΔ* avait un ralentissement de croissance de 28,4% par rapport au type sauvage (Tableau 3.1). Ce résultat est comparable au ralentissement calculé par Chiocchetti *et al.* (2007) avec des levures cultivées à 24 °C dans le milieu YPD. Leurs observations ont montré que des levures *rps18aΔ* dérivées de la souche BY4742, une autre souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* similaire à BY4741, avaient un ralentissement de 27,68% par rapport à la souche parentale. Notre résultat confirme l'importance du gène *RPS18A* pour la croissance cellulaire dans de nouvelles conditions, c'est-à-dire à 30 °C.

La souche *rps18bΔ* avait une croissance ralentie de 16,4% par rapport à la souche BY4741 lorsque cultivée à 30 °C (Tableau 3.1). Ce résultat est similaire au ralentissement de 13,39% calculé par Chiocchetti *et al.* (2007) pour des cultures à 24 °C. Ensemble, ces résultats confirment que le gène *RPS18B* est important pour la croissance cellulaire de la levure, mais moins que son paralogue *RPS18A*.

4.1.2 Le gène *RPS18A* est plus important que *RPS18B* pour la biogenèse des ribosomes.

Faisant suite à nos résultats observés sur la croissance cellulaire, nous avons comparé l'impact de la délétion de *RPS18A* ou de *RPS18B* sur l'assemblage des ribosomes. L'élimination des gènes *RPS18A* ou de *RPS18B* causait un déséquilibre dans les sous-unités ribosomiques. En effet, lorsque l'un ou l'autre de ces gènes était délété, le signal des sous-unités 40S n'apparaissait plus sur les profils de sédimentation sur gradient de saccharose (Figure 3.2).

Les gènes *RPS18A* et *RPS18B* codent tous les deux pour la protéine ribosomique uS13 qui joue un rôle dans la biogenèse de la sous-unité 40S (Léger-Silvestre *et al.*, 2004; Tabb-Massey *et al.*, 2003). Le type de profil observé est attribuable au rôle de uS13 dans la maturation de la sous-unité 40S et/ou dans sa stabilité (Chiocchetti *et al.*, 2007). Les profils de sédimentation suggèrent que la délétion de l'un ou l'autre des paralogues encodant uS13 cause un déficit de sous-unités 40S libres.

De plus, le signal correspondant aux sous-unités 60S était plus fort lorsque *RPS18A* ou *RPS18B* était délété (Figure 3.2). L'augmentation du pic correspondant à la sous-unité 60S est cohérente avec une accumulation de la grande sous-unité libre, conséquence attendue d'un défaut de synthèse de la sous-unité 40S. En effet, si les sous-unités 40S libres ne sont pas disponibles, les sous-unités 60S ne peuvent pas s'y lier pour former un complexe de 80S. L'augmentation du signal correspondant aux sous-unités 80S est donc une conséquence de la diminution des ribosomes entiers (monosomes et polysomes). Ce résultat concorde avec des observations précédentes (Chiocchetti *et al.*, 2007; Komili *et al.*, 2007). Toutefois, l'accumulation de sous-unités 60S est plus marquée dans la souche *rps18aΔ*. Ce résultat suggère que la délétion du gène *RPS18A* cause un défaut plus important pour l'assemblage de la sous-unité 40S que la délétion de *RPS18B*. Cette observation correspond aux profils de sédimentation obtenus par Komili *et al.* (2007). Toutefois, Chiocchetti *et al.* ont rapporté une accumulation identique de la sous-unité 60S pour les souches *rps18aΔ* et *rps18bΔ* (2007). Cette différence pourrait résulter de la température de croissance de 24°C utilisée par Chiocchetti *et al.*. Nous avons répété l'expérience de sédimentation sur gradient de saccharose au moins trois fois pour chaque souche. Dans tous les réplicas, le défaut d'assemblage

ribosomique observé chez *rps18aΔ* était systématiquement plus marqué que celui de la souche *rps18bΔ*. Ceci démontre que le gène *RPS18A* joue un rôle plus important dans la biogenèse des ribosomes que son paralogue *RPS18B*.

En somme, nous avons validé que la délétion de *RPS18A* ralentit davantage la croissance cellulaire à 30 °C que la délétion de son paralogue *RPS18B*. Nous avons noté un défaut d'assemblage de la sous-unité 40S plus marqué pour la souche *rps18aΔ* que la souche *rps18bΔ*. Ensemble, ces résultats indiquent que le gène *RPS18A* a une contribution majeure dans la croissance cellulaire et l'assemblage des ribosomes. Ceci pourrait être expliqué par la production inégale de protéine uS13 à partir des deux paralogues qui l'encodent, comme cela a été démontré pour d'autres protéines ribosomiques (Ghulam *et al.*, 2020). Pour éventuellement vérifier si la protéine uS13a est produite en plus grande quantité que la protéine uS13b, il faut d'abord être en mesure de les distinguer. C'est pourquoi la création de nouveaux outils moléculaires est nécessaire à la progression de l'étude des paralogues *RPS18A* et *RPS18B*.

4.2 Création d'outils moléculaires pour distinguer uS13a et uS13b

Les protéines uS13a et uS13b ont des séquences d'acides aminés parfaitement identiques (voir Figure 1.10). Afin de les distinguer, nous avons introduit les séquences encodant les épitopes HA et Myc dans les gènes *RPS18A* et *RPS18B*, respectivement. Ces épitopes agissent comme des étiquettes biologiques détectables par des anticorps spécifiques. Les constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont été introduites dans des plasmides qui permettent leur expression dans la levure.

4.2.1 Expression et détection des protéines marquées

L'expression des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b fonctionnelles a été validée à l'aide d'un test de complémentation en milieu solide (Figure 3.5). La présence des épitopes HA ou Myc n'affectait pas la taille des colonies en absence d'expression de uS13 endogène, ce qui indique que l'ajout de ces étiquettes biologiques n'a aucun impact sur la fonction de uS13. De plus, la température d'incubation n'avait aucun effet sur la complémentation de souches *rps18aΔ* ou *rps18bΔ* (Figure 3.7). Ensemble, ces résultats indiquent que les constructions plasmidiques permettent l'expression de protéines uS13 fonctionnelles.

Afin de valider la présence des épitopes HA ou Myc dans les protéines, les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b ont été détectées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques anti-HA ou anti-Myc, respectivement (Figure 3.6). Toutefois, les protéines marquées ont seulement été détectées dans les

extraits de cellules cultivées en milieu YPD. Dans la souche de déplétion utilisée, le promoteur *GAL1* contrôle l'expression du gène *RPS18A* (Figure 3.4). En présence de galactose, ce promoteur est très actif et induit rapidement la surexpression du gène qu'il contrôle (Longtine *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2015). Lorsque les cellules étaient cultivées en milieu YPGal, les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b n'ont pas été détectées par immunobuvardage (Figure 3.6). Nos observations suggèrent que la surexpression de *RPS18A* à partir du promoteur *GAL1* bloque l'expression des versions marquées de uS13 à partir des plasmides. Les constructions plasmidiques utilisent les promoteurs constitutifs naturels de *RPS18A* et *RPS18B* pour exprimer les protéines marquées (Figure 3.3). Nous présumons qu'un mécanisme de rétro-inhibition contrôle la quantité totale de protéine uS13 produite dans la cellule. D'autres études seront nécessaires pour valider cette hypothèse et pour déterminer le mécanisme précis.

Lors des expériences d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage, le signal correspondant à la protéine Myc-uS13b était généralement plus faible que celui de HA-uS13a (Figure 3.9). Le signal faible pourrait être représentatif d'une plus faible expression du paralogue Myc-uS13b. Cette interprétation est cohérente avec la contribution majeure de *RPS18A* observée dans la croissance cellulaire et la biogenèse des ribosomes. Or, les deux protéines sont marquées à l'aide d'étiquettes biologiques différentes. Les anticorps anti-HA et anti-Myc utilisés pour l'immunoprécipitation et pour l'immunobuvardage peuvent avoir des efficacités différentes. Il est donc impossible de poser des conclusions sur l'abondance des protéines uS13a et uS13b à partir de ces résultats. Produire des constructions complémentaires *HA-RPS18B* et *MYC-RPS18A* pour inverser les étiquettes biologiques associées à chacun des paralogues éliminerait cette limite.

4.2.2 Constructions plasmidiques et contrôle du dosage génique

Les constructions *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* incluent les séquences chromosomiques qui se trouvent 500 pb en amont et 300 pb en aval des gènes ainsi que leurs introns naturels (Figure 3.3). Ainsi, la régulation de l'expression des versions plasmidiques de *RPS18A* et *RPS18B* se veut comparable à leur régulation dans le génome de la levure. Les plasmides YCplac33, YCplac111 et YEplac195 (voir Figure 2.1) ont été utilisés pour contrôler le dosage génique de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. Les différentes combinaisons de ces plasmides ont été utilisées pour compléter une souche dépourvue des deux gènes qui encodent uS13 (Figure 3.8), générant les souches YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9 (voir Tableau 2.1). Ces souches possèdent différentes quantités, ou doses, des gènes *HA-RPS18A* et/ou *MYC-RPS18B*. La souche YFS18 $\Delta\Delta$ 1 a deux plasmides centromériques, chacun portant l'un des paralogues. Cette souche possède donc une copie de

HA-RPS18A et une copie de *MYC-RPS18B*, ce qui correspond au dosage génique du type sauvage. Cette souche est utilisée comme contrôle pour la détermination des effets du dosage génique.

4.2.3 Système génétique pour étudier la spécialisation des ribosomes

La souche YFS18 $\Delta\Delta$ 1 (AB) permettra la réalisation de plusieurs analyses complémentaires futures. Par exemple, des expériences d'immunoprécipitations ont été effectuées pour caractériser les protéines uS13a et uS13b de façon indépendante (Figure 3.9).

Nous savons que les protéines peuvent être modifiées co-traductionnellement, particulièrement à leur extrémité N-terminale (Gamerding & Deuerling, 2024). Le ribosome sert de plateformes pour le contrôle spatial et temporel de ces modifications (Kramer *et al.*, 2009). Ces dernières sont guidées par des protéines associées aux ribosomes responsables du repliement et de modifications enzymatiques des polypeptides. De plus, la structure de l'ARN messager influence sa vitesse de traduction. La vitesse de la traduction a un impact sur l'accessibilité des sites de modifications post-traductionnelles de la protéine (Faure *et al.*, 2017). Ainsi, la séquence nucléotidique des transcrits influence les modifications post-traductionnelles de la protéine mature. Les protéines uS13a et uS13b pourraient subir des modifications post-traductionnelles différentes malgré leurs séquences d'acides aminés identiques, puisque leurs transcrits ont des séquences différentes. Il serait pertinent de comparer leurs modifications, puisque celles-ci pourraient influencer leur fonction dans le ribosome (Xue & Barna, 2012). Les bases de données SGD, BioGRID et UniprotKB répertorient plusieurs modifications post-traductionnelles pour uS13a et uS13b (voir Tableau S.1, Annexe A). Certaines de ces modifications ont été identifiées seulement pour une des deux versions de uS13. Des analyses préliminaires en spectrométrie de masse ont révélé la phosphorylation du résidu T62 de la protéine HA-uS13a (voir Figure S.1, Annexe A), une modification précédemment répertoriée seulement pour uS13b (voir Tableau S.1, Annexe A). D'autres modifications post-traductionnelles de chacune des versions de uS13 pourront être déterminées et comparées à l'aide du système génétique YFS18 $\Delta\Delta$ 1 avec des analyses plus approfondies en spectrométrie de masse.

Le profilage des ribosomes (Ribo-seq) permet de déterminer les séquences d'ARNm activement traduites par les ribosomes (Ingolia *et al.*, 2009). Si les protéines uS13a et uS13b ont des fonctions légèrement différentes, le profilage des ribosomes combiné à l'immunoprécipitation des complexes contenant l'une ou l'autre des versions de uS13 pourra révéler si ces ribosomes ont des fonctions spécialisées. La souche YFS18 $\Delta\Delta$ 1 est un bon outil pour réaliser cette analyse parce que les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b

peuvent être distinguées à l'étape d'immunoprécipitation grâce à leurs épitopes spécifiques alors qu'elles sont produites dans la même cellule.

En somme, la souche YFS18ΔΔ1 et les constructions plasmidiques *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* permettent de distinguer uS13a et uS13b à l'aide d'étiquettes biologiques spécifiques. Les souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 possédant différents dosages de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* ont été utilisées pour étudier la régulation de l'expression de ces gènes paralogues. Ces outils moléculaires pourront aussi servir à plusieurs analyses futures, telles que la quantification des protéines uS13a et uS13b, la détermination de leurs modifications post-traductionnelles respectives et le profilage des ribosomes qui contiennent l'une ou l'autre de ces protéines.

4.3 La régulation des paralogues *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* selon leur dosage génique

Dans le but de mieux comprendre comment les gènes *RPS18A* et *RPS18B* sont régulés, nous avons mesuré l'abondance relative de leurs transcrits dans les souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9. Ces souches possèdent différentes combinaisons de plasmides, permettant le contrôle du dosage des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. L'abondance relative a été déterminée par PCR en temps réel (RT-qPCR) à l'aide d'amorces spécifiques aux gènes d'intérêt (voir Tableau 2.5). Les gènes *ACT1* (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012) et *ALG9* (Mendoza-Ochoa *et al.*, 2019) ont été sélectionnés comme gènes de référence pour leur stabilité à travers les différentes souches. Les gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* sont surexprimés en absence de leur paralogue.

Lorsque la souche YFS18ΔΔ était complémentée avec un seul des paralogues, ce dernier était surexprimé. En effet, l'abondance relative de l'ARNm de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* était environ doublée dans les souches YFS18ΔΔ2 (A) et YFS18ΔΔ5 (B), respectivement, par rapport à la souche contrôle YFS18ΔΔ1 (AB) (Figure 3.10). Ceci peut être expliqué par un effet compensatoire, c'est-à-dire qu'un seul gène doit être deux fois plus exprimé pour produire autant de protéine uS13 totale que deux gènes (Dean *et al.*, 2008). Nous avons présumé jusqu'ici que les cellules contiennent une seule copie de chaque plasmide centromérique. Toutefois, nous savons que les cellules peuvent maintenir une à deux copies d'un plasmide centromérique (Clarke & Carbon, 1980). Par conséquent, le doublement de l'expression de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* dans les souches YFS18ΔΔ2 (A) et YFS18ΔΔ5 (B) pourrait être dû au doublement de leur dosage génique. Pourtant, malgré le doublement de l'expression de l'un des paralogues, la croissance

cellulaire demeurerait plus lente que la souche contrôle (Tableau 3.2). Ce résultat suggère que ces deux paralogues sont fonctionnellement différents.

La croissance cellulaire de la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 2 (A) était plus lente que celle de la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 5 (B) (Tableau 3.2). Ce résultat est opposé aux taux de croissance des souches *rps18a* Δ et *rps18b* Δ (Figure 3.1). Par exemple, la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 5 (B) possède un plasmide centromérique (une copie) avec la séquence *MYC-RPS18B* et ne possède aucun gène *RPS18A*. Ce dosage génique est équivalent à la délétion du gène *RPS18A* d'une souche de type sauvage. Or, cette souche avait une croissance ralentie de seulement 1,7% par rapport au contrôle YFS18 $\Delta\Delta$ 1 (AB) (Tableau 3.2). En comparaison, la souche *rps18a* Δ avait une croissance 28,4% plus lente que la souche parentale BY4741 (Tableau 3.1).

Plusieurs facteurs font en sorte que les souches YFS18 $\Delta\Delta$ complémentée par des plasmides ne soient pas parfaitement équivalentes aux souches possédant le même dosage génique dans leur génome. Premièrement, la nature plasmidique ou chromosomique de l'ADN peut influencer l'expression des gènes (Da Silva & Srikrishnan, 2012). De plus, les constructions utilisées incluent 500 pb en amont et 300 pb en aval des séquences codantes de *RPS18A* et *RPS18B*. Une des limites de ce système génétique est l'absence de régions distales dans l'ADN qui jouent un rôle régulateur tel que des amplificateurs ou *upstream activating sequences* (Petrasccheck *et al.*, 2005) et la forme la plus longue du 3'UTR ne soit pas incluse (Voir Figure 1.11). Deuxièmement, les souches BY4741 (WT), *rps18a* Δ et *rps18b* Δ ont été cultivées dans un milieu riche (YPD) alors que la série de souches YFS18 $\Delta\Delta$ 1 à YFS18 $\Delta\Delta$ 9 ont été cultivées dans un milieu synthétique (SD-Ura-Leu). De ce fait, la croissance cellulaire de la souche contrôle (AB) en milieu sélectif était déjà ralentie (temps de doublement de 148 minutes) par rapport à la souche BY4741 cultivée en milieu riche (temps de doublement de 116 minutes). Les souches avec différents dosages géniques peuvent avoir une sensibilité altérée à ces conditions de culture. Notamment, en réponse à un changement dans les conditions environnementales, l'expression des gènes encodant des protéines ribosomiques est sujette à des variations importantes (Levy *et al.*, 2007).

De plus, nous suspectons que les courbes de croissance pour la série YFS18 $\Delta\Delta$ ont été réalisées en déficit de bases azotées (0.043% à la place de 0.17%) et en surplus de sulfate d' (0.63% à la place de 0.5%) en raison d'une erreur de matériel. Un déficit d'azote contribuerait à la dégradation rapide des ribosomes (Huang *et al.*, 2015). Toutefois, la source principale d'azote retirée lors de ces expériences est le sulfate d'ammonium. Dans notre cas, le sulfate d'ammonium était potentiellement en léger surplus, ce qui ne

correspond pas aux conditions expérimentales d'un déficit d'azote. L'équilibre entre les bases azotées et le sulfate d'ammonium demeure important. Le sulfate d'ammonium devient toxique et cause l'arrêt complet de la croissance lorsqu'il est maintenu en concentration normale (0.5%) alors que les autres nutriments tels que les bases azotées sont en déficit (0.00034%) (Yusof *et al.*, 2021). Le sulfate d'ammonium ne semble pas toxique lorsque les bases azotées sont plus concentrées (0.0085% et 0.017%), mais la croissance cellulaire n'est toutefois pas optimale (Yusof *et al.*, 2021). Si les courbes de croissance ont été réalisées avec un déficit de bases azotées d'environ 25% par rapport aux conditions optimales, cela peut représenter un stress pour les cellules et ralentir la croissance cellulaire. Il est possible que les paralogues *RPS18A* et *RPS18B* contribuent différemment à la croissance dans des conditions de stress, comme c'est le cas pour d'autres paires de paralogues encodant des protéines ribosomiques (Ghulam *et al.*, 2022). Si *RPS18A* et *RPS18B* agissent de façon spécialisée pour moduler la traduction dans des conditions de stress, le milieu de culture pourrait avoir un impact important sur la croissance cellulaire mesurée pour les différentes souches.

La croissance des souches YFS18 $\Delta\Delta$ 3 (AA) et YFS18 $\Delta\Delta$ 6 (BB) était 0,6% et 4,8% plus rapide que la souche contrôle, respectivement (Tableau 3.2). Ce résultat suggère que la présence de deux gènes encodant uS13 est avantageuse pour la croissance cellulaire, même si ce sont deux fois le même paraglogue. Ceci supporte l'explication que le dosage génique est responsable du maintien des deux paralogues au cours de l'évolution et qu'ils ont des fonctions redondantes (Ohno, 2013). En somme, nous avons déterminé que l'élimination de l'un ou l'autre des paralogues encodant la protéine uS13a mène à la surexpression de l'autre gène. Cette surexpression correspond à une compensation pour la diminution du dosage génique total, mais ne permet pas une croissance optimale. La présence de deux gènes, identiques ou non, encodant uS13 est plus avantageuse qu'un seul pour la croissance cellulaire.

4.3.1 Le gène *HA-RPS18A* est régulé transcriptionnellement.

D'après nos observations par immunobuvardage (Figure 3.6), il semble qu'un mécanisme de rétro-inhibition empêchait la production de uS13 d'origine plasmidique lors de la surexpression artificielle de uS13 endogène. Pour mieux comprendre la régulation des paralogues *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons complété une souche dépourvue des deux paralogues avec des plasmides multicopies qui fournissent les gènes *HA-RPS18A* ou *MYC-RPS18B* en quantités beaucoup plus élevées que leur dosage génique naturel. La stabilité des niveaux de pré-ARNm et d'ARNm mature de *HA-RPS18A* lorsque son dosage génique était augmenté (Figures 3.11A et 3.11B) est représentative d'une régulation transcriptionnelle (Ponzio *et al.*,

2007). En comparaison, l'abondance relative du pré-ARNm *MYC-RPS18B* augmentait significativement lorsque le nombre de copies du gène était augmenté (Figure 3.11D). Ce résultat suggère que *MYC-RPS18B* n'est pas régulé de la même façon que son paralogue lors de la transcription.

4.3.2 Le gène *MYC-RPS18B* est régulé post-transcriptionnellement.

La souche YFS18ΔΔ8 (AB*) possédant de multiples copies de *MYC-RPS18B* et une copie de *HA-RPS18A* avait une accumulation importante de pré-ARNm *MYC-RPS18B* et une diminution importante de son transcrit mature contrairement à la souche YFS18ΔΔ7 (BB*) ne possédant que de multiples copies de *MYC-RPS18B* (Figures 3.11C et 3.11D). Ce résultat suggère que la présence du gène *HA-RPS18A* dans cette souche inhibe la maturation de l'ARNm de *MYC-RPS18B*.

Certaines protéines ribosomiques, comme eL30 et uS11, lorsqu'elles ne sont pas associées au ribosome ou sont en excès dans la cellule, inhibent l'épissage de leur propre transcrit (Fewell & Woolford, 1999; Vilardell & Warner, 1994). La régulation intergénique de *RPS18A* et *RPS18B* dépend de leurs introns (Parenteau *et al.*, 2011). Les tailles et séquences des introns de *RPS18A* et *RPS18B* sont différentes. Pour ces raisons, nous pensons que la régulation post-transcriptionnelle de *MYC-RPS18B* a lieu à l'étape de l'épissage. De plus, le complexe d'épissage, nommé spliceosome, a la capacité de distinguer les paires de gènes paralogues encodant des protéines ribosomiques (Pleiss *et al.*, 2007). Il semble donc que le processus d'épissage des ARNm de ces deux gènes paralogues soit régulé différemment. Puisque la présence du gène *HA-RPS18A* est requise pour bloquer la maturation du transcrit de *MYC-RPS18B*, nous supposons que les transcrits interagissent directement entre eux ou que la protéine uS13a interagit spécifiquement avec l'ARN messager de *MYC-RPS18B* afin de réguler sa maturation.

4.3.3 Effets de multiples copies de *HA-RPS18A* ou *MYC-RPS18B* sur la croissance cellulaire.

Les souches YFS18ΔΔ8 (AB*) et YFS18ΔΔ9 (BA*) avaient des croissances 25,1 % et 27,9 % plus lentes que la souche contrôle (AB) (Tableau 3.2). Ce résultat indique que la présence des plasmides multicopies est nuisible à la croissance cellulaire. Toutefois, bien que ces deux souches aient un ralentissement de croissance similaire, elles n'avaient pas le même profil d'expression des gènes *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. Le vecteur YEplac195 utilisé n'est pas en lui-même la source de ce défaut de croissance puisque les souches YFS18ΔΔ4 (AA*) et YFS18ΔΔ7 (BB*) possédant également des plasmides multicopies n'avaient pas le même ralentissement. En effet, la souche YFS18ΔΔ4 (AA*) avait une croissance 7,2 % plus rapide que la souche contrôle (AB) (Tableau 3.2). Il semble donc que la présence du gène *HA-RPS18A* en multiples copies

soit bénéfique pour la croissance cellulaire, mais uniquement en absence du gène *MYC-RPS18B*. Par contraste, la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 7 (BB*) avait une croissance 72,1 % plus lente que la souche contrôle (AB) (Tableau 3.2). Les cellules possédant de multiples copies de *MYC-RPS18B* avaient un grand défaut de croissance. La surexpression de Myc-uS13b pourrait être à l'origine de ce défaut de croissance (Figure 3.11C). Les protéines ribosomiques sont de petites protéines chargées positivement et qui lient des acides nucléiques. Leur surplus est dangereux pour la cellule lorsqu'elles ne sont pas associées au ribosome (Warner, 1999). Ensemble, ces résultats montrent qu'une augmentation du dosage génique n'est pas automatiquement favorable à la croissance cellulaire. D'une part, l'interaction entre les deux paralogues nuit à la croissance cellulaire lorsque l'un ou l'autre est présent en multiples copies. De plus, l'effet contraire de multiples copies de *HA-RPS18A* ou *MYC-RPS18B* suggère que les deux paralogues ne sont pas équivalents.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les paralogues de protéines ribosomiques et leurs modifications post-traductionnelles sont une des sources principales d'hétérogénéité structurale des ribosomes. Selon l'hypothèse des «ribosomes spécialisés», ces différences structurales peuvent mener à la traduction préférentielle de certains types d'ARNm (Xue & Barna, 2012). Les gènes paralogues *RPS18A* et *RPS18B* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* produisent respectivement les protéines uS13a et uS13b dont les séquences d'acides aminés sont identiques. Pourtant, la délétion de l'un ou l'autre de ces gènes entraîne des phénotypes distincts (Chiocchetti *et al.*, 2007; Komili *et al.*, 2007; Ni & Snyder, 2001).

Nous avons montré que la délétion de *RPS18A* cause un ralentissement de croissance plus marqué que la suppression de son paralogue *RPS18B*. Similairement, le défaut d'assemblage de la sous-unité 40S est plus sévère pour la souche *rps18aΔ* que pour la souche *rps18bΔ*. Ces observations indiquent que *RPS18A* a une contribution plus importante pour la biogenèse des ribosomes et la croissance cellulaire que son paralogue *RPS18B* dans les conditions testées. Il semble donc que le gène *RPS18A* soit le paralogue d'importance principale en conditions optimales. De futures études pourraient être réalisées dans des conditions de stress thermique, osmotique, de carence nutritionnelle et d'exposition à des antifongiques.

Nous avons développé plusieurs outils moléculaires tels que la série de souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 et les constructions plasmidiques *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B*. Nous avons démontré que les protéines HA-uS13a et Myc-uS13b marquées à leur extrémité N-terminale à l'aide d'épitopes spécifiques sont parfaitement fonctionnelles. De plus, les étiquettes biologiques HA et Myc permettent l'immunoprécipitation des protéines HA-uS13a et Myc-uS13b. Le système génétique YFS18ΔΔ1 sera utile pour de futures analyses complémentaires visant à caractériser l'impact fonctionnel des protéines uS13a et uS13b dans le ribosome. Par ailleurs, la série de souches YFS18ΔΔ1 à YFS18ΔΔ9 nous a permis d'évaluer l'effet du dosage génique de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* sur leur régulation respective et sur la croissance cellulaire.

Les analyses d'expression relative de *HA-RPS18A* et *MYC-RPS18B* par RT-qPCR ont révélé une surexpression compensatoire de chacun des gènes en absence de leur paralogue. La présence de deux gènes encodant uS13 restait tout de même nécessaire pour une croissance optimale dans les conditions testées. Il serait pertinent de faire de nouvelles analyses avec des cellules cultivées en conditions de stress.

L'abondance relative des pré-ARNm et ARNm matures a révélé que l'expression de *HA-RPS18A* semble principalement contrôlée au niveau transcriptionnel, tandis que le gène *MYC-RPS18B* est soumis à une régulation post-transcriptionnelle, probablement liée à l'épissage, et nécessitant la présence du gène *HA-RPS18A*. Les effets opposés de multiples copies de *HA-RPS18A* ou de *MYC-RPS18B* ainsi que les interactions entre les deux paralogues suggèrent qu'ils ne sont pas fonctionnellement équivalents.

Afin de mieux comprendre le rôle des introns dans la régulation de l'expression des gènes *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons créé des constructions sans introns. Nous prévoyons éventuellement interchanger les introns de ces deux gènes, c'est-à-dire intégrer l'intron de *RPS18B* dans le gène *RPS18A* et *vice versa*. Ainsi, nous pourrions vérifier si les introns sont responsables des différences de régulation entre les deux paralogues. Il sera également intéressant de comparer les effets de la délétion de *RPS18A* ou *RPS18B* sur la croissance cellulaire et la biogenèse des ribosomes lorsque leurs introns seront interchangés avec les résultats présentés ici. Les promoteurs et les UTR offrent également des pistes intéressantes pour explorer davantage la régulation de ces deux gènes.

Finalement, les outils moléculaires développés dans le cadre de cette recherche pourront servir à éclairer les rôles spécifiques de uS13a et uS13b dans la traduction. Nous pensons que uS13a et uS13b pourraient avoir des modifications post-traductionnelles différentes qui influencent leur fonction dans les ribosomes. L'immunoprécipitation de ces protéines à partir de la souche YFS18 $\Delta\Delta$ 1 et leur analyse par spectrométrie de masse permettront de comparer leurs modifications respectives. Par la suite, l'immunoprécipitation en combinaison avec la méthode de profilage des ribosomes permettra de déterminer si les ribosomes contenant l'une ou l'autre des versions de uS13 ont des fonctions spécialisées. Ces travaux contribueront à l'avancement des connaissances sur l'hétérogénéité des ribosomes en plus d'apporter un éclairage sur le phénomène évolutif de la duplication de nombreux RPG de la levure.

Les mutations dans des protéines ribosomiques sont responsables de défauts d'assemblage et de fonction des ribosomes, causant des maladies appelées ribosomopathies (Narla & Ebert, 2010). Ces maladies ont des manifestations cliniques distinctes qui peuvent être attribuées à la spécialisation des ribosomes dans les différents tissus de l'organisme (McCann & Baserga, 2013). En comprenant mieux l'hétérogénéité et la spécialisation des ribosomes, nos travaux pourront guider de futures recherches pour l'éventuel traitement de ces maladies génétiques.

ANNEXE A

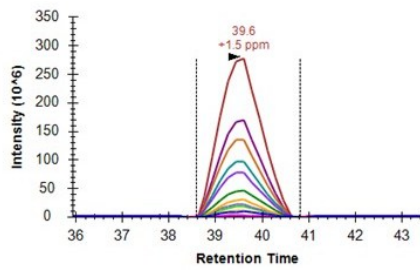
Modifications post-traductionnelles répertoriées de uS13

Tableau S.1 Modifications post-traductionnelles répertoriées des protéines uS13a et uS13b de *Saccharomyces cerevisiae*

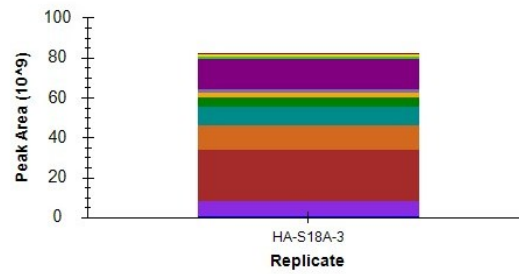
Acide aminé	Position	Modification	Paralogue	Bases de données	Références
Méthionine	1	Clivage	A et B	UniprotKB	(Arnold <i>et al.</i> , 1999)
Sérine (S)	2	Phosphorylation	B	SGD	(Lanz <i>et al.</i> , 2021)
Sérine (S)	2	Acétylation	A et B	UniprotKB	(Arnold <i>et al.</i> , 1999)
Lysine (K)	27	Ubiquitination	A et B	BioGRID	(Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007)
Thréonine (T)	33	Phosphorylation	A	SGD	(Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	36	Acétylation	A	SGD	(Henriksen <i>et al.</i> , 2012)
Lysine (K)	36	Ubiquitination	A	SGD, BioGRID, UniprotKB	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007; Starita <i>et al.</i> , 2012; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	36	Succinylation	A	SGD	(Weinert <i>et al.</i> , 2013)
Sérine (S)	43	Phosphorylation	A	SGD, BioGRID	(Holt <i>et al.</i> , 2009; MacGilvray <i>et al.</i> , 2020; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	48	Sumoylation	B	SGD	(Bhagwat <i>et al.</i> , 2021)
Lysine (K)	48	Méthylation	A et B	SGD, UniprotKB	(Couttas <i>et al.</i> , 2012)
Lysine (K)	48	Ubiquitination	A et B	BioGRID	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	49	Sumoylation	B	SGD	(Bhagwat <i>et al.</i> , 2021)
Lysine (K)	49	Ubiquitination	A et B	BioGRID, UniprotKB	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; lesmantavicius <i>et al.</i> , 2014; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007; Starita <i>et al.</i> , 2012; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	56	Ubiquitination	A et B	BioGRID	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007)
Thréonine (T)	62	Phosphorylation	B	SGD	(Lanz <i>et al.</i> , 2021)
Lysine (K)	80	Ubiquitination	A et B	BioGRID, UniprotKB	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007; Starita <i>et al.</i> , 2012; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	96	Ubiquitination	A et B	SGD, BioGRID, UniprotKB	(Back <i>et al.</i> , 2019; Beltrao <i>et al.</i> , 2012; lesmantavicius <i>et al.</i> , 2014; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007; Starita <i>et al.</i> , 2012; Swaney <i>et al.</i> , 2013)
Lysine (K)	96	Sumoylation	B	SGD	(Bhagwat <i>et al.</i> , 2021)
Sérine (S)	107	Phosphorylation	A	BioGRID	(Gnad <i>et al.</i> , 2009; Soufi <i>et al.</i> , 2009)
Lysine (K)	108	Sumoylation	B	SGD	(Bhagwat <i>et al.</i> , 2021)
Lysine (K)	108	Ubiquitination	A et B	BioGRID	(Beltrao <i>et al.</i> , 2012; lesmantavicius <i>et al.</i> , 2014; Mayor <i>et al.</i> , 2005, 2007)
Lysine (K)	117	Sumoylation	B	SGD	(Bhagwat <i>et al.</i> , 2021)

Identifiants SGD et BioGRID : YDR450W et YML026C. Identifiants UniprotKB : POCX55 et POCX56. Les bases de données ont été consultées en janvier 2024.

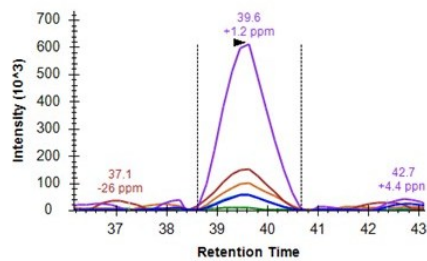
R.AGELTQEELER.I [69, 79]



R.AGELTQEELER.I [69, 79]



R.AGELT[Phospho (ST)]QEELER.I [69, 79]



R.AGELT[Phospho (ST)]QEELER.I [69, 79]

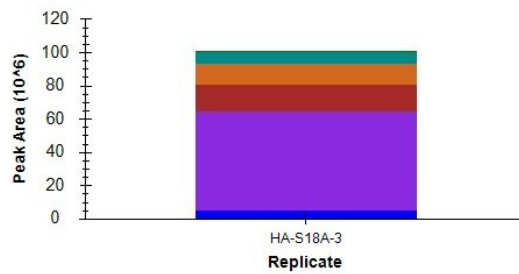


Figure S.1 Phosphorylation de la Thr62 de la protéine uS13a.

La protéine HA-uS13a a été immunoprécipitée à l'aide des billes magnétiques anti-HA (MedChemExpress) tel que recommandé par le fabricant. Les billes ont été envoyées au Centre d'analyses protéomiques avancées (CAPA) pour la détection des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation du résidu T62 a été détectée dans deux échantillons préparés indépendamment à l'aide d'une approche ciblée (bas). Cette forme est la plus abondante (normalisée à 100%). La forme non phosphorylée du peptide a également été détectée, avec une abondance d'environ 85% par rapport à la forme phosphorylée (haut).

ANNEXE B

Courbe standard des réactions de qPCR

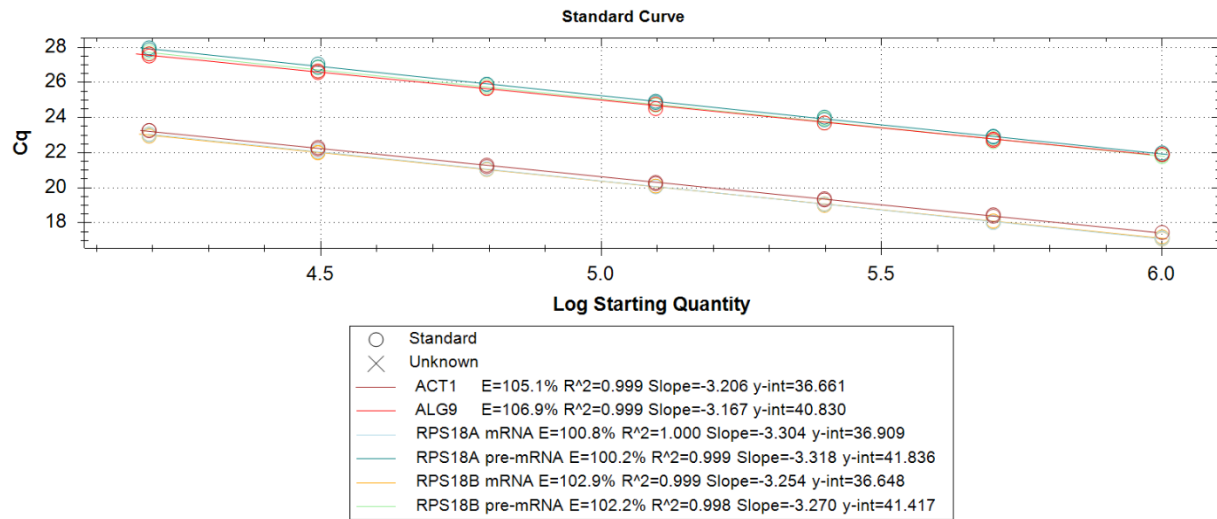


Figure S.2 Courbe standard de l'efficacité des réactions de qPCR.

La courbe standard a été réalisée avec des dilutions en série d'un «pool» d'échantillons d'ADNc représentatif. L'efficacité des réactions de PCR avec les différentes amorces a été calculée à l'aide du logiciel CFX Maestro.

RÉFÉRENCES

- Arnold, R. J., Polevoda, B., Reilly, J. P., & Sherman, F. (1999). The action of N-terminal acetyltransferases on yeast ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37035-37040. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37035>
- Aury, J.-M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B. M., Ségurens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N., Arnaiz, O., Billaut, A., Beisson, J., Blanc, I., Bouhouche, K., Câmara, F., Duhaucourt, S., Guigo, R., Gogendeau, D., ... Wincker, P. (2006). Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*, 444(7116), 171-178. <https://doi.org/10.1038/nature05230>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology* (4^e éd.). John Wiley & Sons.
- Back, S., Gorman, A. W., Vogel, C., & Silva, G. M. (2019). Site-specific K63 ubiquitinomics provides insights into translation regulation under stress. *Journal of proteome research*, 18(1), 309-318. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00623>
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., ... Yusupov, M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current opinion in structural biology*, 24, 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.002>
- 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 (New York, N.Y.)*, 289(5481), 905-920. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>
- Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Molloy, K. R., Chait, B. T., & Klinge, S. (2017). The complete structure of the small-subunit processome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(11), 944-953. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3472>
- Barandun, J., Hunziker, M., & Klinge, S. (2018). Assembly and structure of the SSU processome—A nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Current Opinion in Structural Biology*, 49, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.008>
- Barna, M., Karbstein, K., Tollervey, D., Ruggero, D., Brar, G., Greer, E. L., & Dinman, J. D. (2022). The promises and pitfalls of specialized ribosomes. *Molecular Cell*, 82(12), 2179-2184. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.035>
- Basu, I., Gorai, B., Chandran, T., Maiti, P. K., & Hussain, T. (2022). Selection of start codon during mRNA scanning in eukaryotic translation initiation. *Communications Biology*, 5(1), 587. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03534-2>
- Beltrao, P., Albanèse, V., Kenner, L. R., Swaney, D. L., Burlingame, A., Villén, J., Lim, W. A., Fraser, J. S., Frydman, J., & Krogan, N. J. (2012). Systematic functional prioritization of protein post-translational modifications. *Cell*, 150(2), 413-425. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.036>

- 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 (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1524-1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330(6008), 1203-1209. <https://doi.org/10.1126/science.1194294>
- Berghöfer-Hochheimer, Y., Zurek, C., Wölfl, S., Hemmerich, P., & Munder, T. (1998). L7 protein is a coregulator of vitamin D receptor-retinoid X receptor-mediated transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 69(1), 1-12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19980401\)69:1%253C1::AID-JCB1%253E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980401)69:1%253C1::AID-JCB1%253E3.0.CO;2-X)
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E. G., Mitchell, B. M., Granneman, S., & Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1619-1626. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1619-1626.2004>
- Bhagwat, N. R., Owens, S. N., Ito, M., Boinapalli, J. V., Poa, P., Ditzel, A., Kopparapu, S., Mahalawat, M., Davies, O. R., Collins, S. R., Johnson, J. R., Krogan, N. J., & Hunter, N. (2021). SUMO is a pervasive regulator of meiosis. *eLife*, 10, e57720. <https://doi.org/10.7554/eLife.57720>
- Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* Evolution. *The Plant Cell*, 16(7), 1679-1691. <https://doi.org/10.1105/tpc.021410>
- Bowen, A. M., Musalgaonkar, S., Moomau, C. A., Gulay, S. P., Mirvis, M., & Dinman, J. D. (2015). Ribosomal protein uS19 mutants reveal its role in coordinating ribosome structure and function. *Translation*, 3(2), e1117703. <https://doi.org/10.1080/21690731.2015.1117703>
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C : A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)*, 14(2), 115-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2%253C115::AID-YEA204%253E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2%253C115::AID-YEA204%253E3.0.CO;2-2)
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190, 576-581. <https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser : Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*, 15(10), 1456-1461. <https://doi.org/10.1101/gr.3672305>
- Cankorur-Cetinkaya, A., Dereli, E., Eraslan, S., Karabekmez, E., Dikicioglu, D., & Kirdar, B. (2012). A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. *PloS One*, 7(6), e38351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038351>
- Chaker-Margot, M. (2018). Assembly of the small ribosomal subunit in yeast : Mechanism and regulation. *RNA*, 24(7), 881-891. <https://doi.org/10.1261/rna.066985.118>

- Chan, K.-M., Liu, Y.-T., Ma, C.-H., Jayaram, M., & Sau, S. (2013). The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* : A miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid*, 70(1), 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.001>
- Chiocchetti, A., Zhou, J., Zhu, H., Karl, T., Haubenreisser, O., Rinnerthaler, M., Heeren, G., Oender, K., Bauer, J., Hintner, H., Breitenbach, M., & Breitenbach-Koller, L. (2007). Ribosomal proteins Rpl10 and Rps6 are potent regulators of yeast replicative life span. *Experimental Gerontology*, 42(4), 275-286. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.11.002>
- Clarke, L., & Carbon, J. (1980). Isolation of the centromere-linked *CDC10* gene by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 2173-2177. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.4.2173>
- Collart, M. A., & Oliviero, S. (1993). Preparation of Yeast RNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, 23(1), 13.12.1-13.12.5. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1312s23>
- Couttas, T. A., Raftery, M. J., Padula, M. P., Herbert, B. R., & Wilkins, M. R. (2012). Methylation of translation-associated proteins in *Saccharomyces cerevisiae* : Identification of methylated lysines and their methyltransferases. *Proteomics*, 12(7), 960-972. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100570>
- Cowling, V. H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal*, 425(Pt 2), 295-302. <https://doi.org/10.1042/BJ20091352>
- Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12, 138-163.
- Da Silva, N. A., & Srikrishnan, S. (2012). Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 12(2), 197-214. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x>
- Danilova, N., & Gazda, H. T. (2015). Ribosomopathies : How a common root can cause a tree of pathologies. *Disease Models & Mechanisms*, 8(9), 1013-1026. <https://doi.org/10.1242/dmm.020529>
- de la Cruz, J., Karbstein, K., & Woolford, J. L. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes *in vivo*. *Annual review of biochemistry*, 84, 93-129. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033917>
- Dean, E. J., Davis, J. C., Davis, R. W., & Petrov, D. A. (2008). Pervasive and persistent redundancy among duplicated genes in yeast. *PLoS Genetics*, 4(7), e1000113. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000113>
- Deisenroth, C., Franklin, D. A., & Zhang, Y. (2016). The evolution of the ribosomal protein–MDM2–p53 pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(12), a026138. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026138>
- Dever, T. E., & Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), a013706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>

- Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., & Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970. <https://doi.org/10.1038/nature00769>
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.-N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., & Dahl, N. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics*, 21(2), 169-175. <https://doi.org/10.1038/5951>
- Dresios, J., Derkatch, I. L., Liebman, S. W., & Synetos, D. (2000). Yeast ribosomal protein L24 affects the kinetics of protein synthesis and ribosomal protein L39 improves translational accuracy, while mutants lacking both remain viable. *Biochemistry*, 39(24), 7236-7244. <https://doi.org/10.1021/bi9925266>
- Dunbar, D. A., Wormsley, S., Agentis, T. M., & Baserga, S. J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 5803-5812. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.10.5803>
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B : Insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597-2606. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-07>
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F. H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., Kutok, J. L., & Ebert, B. L. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, 117(9), 2567-2576. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295238>
- Engel SR, Aleksander S, Nash RS, Wong ED, Weng S, Miyasato SR, Sherlock G, Cherry JM (2025) *Saccharomyces* Genome Database: Advances in Genome Annotation, Expanded Biochemical Pathways, and Other Key Enhancements. *Genetics*. 2024 Nov 12:iyae185. doi: 10.1093/genetics/iyae185
- Enyenihi, A. H., & Saunders, W. S. (2003). Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 163(1), 47-54. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.47>
- Evangelisti, A. M., & Conant, G. C. (2010). Nonrandom survival of gene conversions among yeast ribosomal proteins duplicated through genome doubling. *Genome Biology and Evolution*, 2, 826-834. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq067>
- Fancello, L., Kampen, K. R., Hofman, I. J. F., Verbeeck, J., & Keersmaecker, K. D. (2017). The ribosomal protein gene *RPL5* is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*, 8(9), 14462-14478. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14895>
- Faure, G., Ogurtsov, A. Y., Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2017). Adaptation of mRNA structure to control protein folding. *RNA Biology*, 14(12), 1649-1654. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1349047>

- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., & Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Molecular Cell*, 20(2), 263-275. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.005>
- Ferretti, M. B., & Karbstein, K. (2019). Does functional specialization of ribosomes really exist? *RNA*, 25(5), 521-538. <https://doi.org/10.1261/rna.069823.118>
- Fewell, S. W., & Woolford, J. L. (1999). Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to *RPS14B* pre-mRNA and to 18S rRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 826-834. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.826>
- Filbin, M. E., & Kieft, J. S. (2009). Towards a structural understanding of IRES RNA function. *Current opinion in structural biology*, 19(3), 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.03.005>
- Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J., Harashima, S., & Hinnebusch, A. G. (1991). GCD2, a translational repressor of the *GCN4* gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3203-3216. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.6.3203>
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313, 17-42. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00629-2)
- Gabunilas, J., & Chanfreau, G. (2016). Splicing-Mediated Autoregulation Modulates Rpl22p Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 12(4), e1005999. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005999>
- Gamerding, M., & Deuerling, E. (2024). Cotranslational sorting and processing of newly synthesized proteins in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 49(2), 105-118. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.10.003>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Gerbi, S. A., Borovjagin, A. V., & Lange, T. S. (2003). The nucleolus : A site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(3), 318-325. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00049-8)
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1183>
- Ghulam, M. M., Catala, M., Reulet, G., Scott, M. S., & Abou Elela, S. (2022). Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance. *Nature Communications*, 13, 4938. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32717-y>
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 20(6), 1425. <https://doi.org/10.1093/nar/20.6.1425>

- Gilbert, W. V. (2011). Functional Specialization of Ribosomes? *Trends in biochemical sciences*, 36(3), 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.12.002>
- Gnad, F., de Godoy, L. M. F., Cox, J., Neuhauser, N., Ren, S., Olsen, J. V., & Mann, M. (2009). High-accuracy identification and bioinformatic analysis of *in vivo* protein phosphorylation sites in yeast. *Proteomics*, 9(20), 4642-4652. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900144>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546, 563-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gordon, J. L., Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2009). Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Genetics*, 5(5), e1000485. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000485>
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A.-C., & Hurt, E. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular Cell*, 10(1), 105-115. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00579-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00579-8)
- Gudipati, R. K., Neil, H., Feuerbach, F., Malabat, C., & Jacquier, A. (2012). The yeast *RPL9B* gene is regulated by modulation between two modes of transcription termination. *The EMBO Journal*, 31(10), 2427-2437. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.81>
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P., & McCutchan, T. F. (1987). Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4829), 933-937. <https://doi.org/10.1126/science.3672135>
- Guo, S., & Lin, S. (2021). mRNA alternative polyadenylation (APA) in regulation of gene expression and diseases. *Genes & Diseases*, 10(1), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.09.005>
- Guthrie, C., Nashimoto, H., & Nomura, M. (1969). Studies on the assembly of ribosomes in vivo. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 34, 69-75. <https://doi.org/10.1101/SQB.1969.034.01.011>
- Haarer, B., Viggiano, S., Hibbs, M. A., Troyanskaya, O. G., & Amberg, D. C. (2007). Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome : Actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes & Development*, 21(2), 148-159. <https://doi.org/10.1101/gad.1477507>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., & Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(10), 3103-3111.

- Henriksen, P., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Sharma, S., Bačinskaja, G., Rehman, M., Juffer, A. H., Walther, T. C., Lisby, M., & Choudhary, C. (2012). Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 11(11), 1510-1522. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017251>
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalski, E., Kearsey, S., & Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *The EMBO Journal*, 13(10), 2452-2463. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06530.x>
- Hertz, M. I., Landry, D. M., Willis, A. E., Luo, G., & Thompson, S. R. (2013). Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Molecular and Cellular Biology*, 33(5), 1016-1026. <https://doi.org/10.1128/MCB.00879-12>
- Hoffman, C. S. (1997). Preparation of Yeast DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, 39(1), 13.11.1-13.11.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1311s39>
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villén, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5948), 1682. <https://doi.org/10.1126/science.1172867>
- Hooks, K. B., Delneri, D., & Griffiths-Jones, S. (2014). Intron evolution in Saccharomycetaceae. *Genome Biology and Evolution*, 6(9), 2543-2556. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu196>
- Huang H, Kawamata T, Horie T, Tsugawa H, Nakayama Y, Ohsumi Y, Fukusaki E. (2015) Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *The EMBO Journal*, 34(2), 154-68. doi: 10.15252/embj.201489083
- Iesmantavicius, V., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2014). Convergence of ubiquitylation and phosphorylation signaling in rapamycin-treated yeast cells. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 13(8), 1979-1992. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.035683>
- Ikeuchi, K., & Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Scientific Reports*, 6, 28234. <https://doi.org/10.1038/srep28234>
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S. (2009). Genome-wide *analysis in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 324(5924), 218-223. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
- Jack, K., Bellodi, C., Landry, D. M., Niederer, R., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A. M., Thompson, S. R., Ruggero, D., & Dinman, J. D. (2011). rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Molecular cell*, 44(4), 660-666. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.017>
- 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>

- Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(6), 759-767. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.07.013>
- Kampen, K. R., Sulima, S. O., Vereecke, S., & De Keersmaecker, K. (2020). Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Research*, 48(3), 1013-1028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz637>
- Kang, J., Brajanovski, N., Chan, K. T., Xuan, J., Pearson, R. B., & Sanij, E. (2021). Ribosomal proteins and human diseases : Molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 323. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00728-8>
- Keersmaecker, K. D., Atak, Z. K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., Lahortiga, I., Lucà, R., Yan, J., Hulselmans, G., Vranckx, H., Vandepoel, R., Sweron, B., Jacobs, K., Mentens, N., ... Cools, J. (2013). Exome sequencing identifies mutation in *CNOT3* and ribosomal genes *RPL5* and *RPL10* in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 45(2), 186-190. <https://doi.org/10.1038/ng.2508>
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428(6983), 617-624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., & Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(5), 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.007>
- 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>
- Komoda, T., Sato, N. S., Phelps, S. S., Namba, N., Joseph, S., & Suzuki, T. (2006). The A-site finger in 23 S rRNA acts as a functional attenuator for translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32303-32309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607058200>
- Koš, M., & Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Molecular Cell*, 37(6), 809-820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.024>
- Kouba, T., Dányi, I., Gunišová, S., Munzarová, V., Vlčková, V., Cuchalová, L., Neueder, A., Milkereit, P., & Valášek, L. S. (2012). Small ribosomal protein RPS0 stimulates translation initiation by mediating 40S-binding of eIF3 via its direct contact with the eIF3a/TIF32 subunit. *PLoS ONE*, 7(7), e40464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040464>
- Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K., Semrad, K., Schroeder, R., & Tompa, P. (2009). Janus chaperones : Assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Letters*, 583(1), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.049>
- Kozak, M. (1984). Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes : Effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Research*, 12(9), 3873-3893. <https://doi.org/10.1093/nar/12.9.3873>

- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 589-597. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>
- Kressler, D., de la Cruz, J., Rojo, M., & Linder, P. (1997). Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12), 7283-7294. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.12.7283>
- Kressler, D., Hurt, E., & Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1803(6), 673-683. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.10.009>
- Kruiswijk, T., Planta, R. J., & Krop, J. M. (1978). The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 517(2), 378-389. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90204-6](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90204-6)
- Kufel, J., Dichtl, B., & Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA*, 5(7), 909-917. <https://doi.org/10.1017/s135583829999026x>
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 16(9), 857-860. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000630\)16:9%253C857::AID-YEA561%253E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000630)16:9%253C857::AID-YEA561%253E3.0.CO;2-B)
- Landry, D. M., Hertz, M. I., & Thompson, S. R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the *Dicistroviridae* and hepatitis C viral IRESs. *Genes & Development*, 23(23), 2753-2764. <https://doi.org/10.1101/gad.1832209>
- Lanz, M. C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E. J., Faça, V. M., Vega, S., Joiner, A. M. N., Fromme, J. C., Yu, H., & Smolka, M. B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Reports*, 22(2), e11121. <https://doi.org/10.15252/embr.202051121>
- Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., & Gleizes, P.-E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *The EMBO Journal*, 23(12), 2336-2347. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600252>
- Lemay, V. (2013). *Étude fonctionnelle de la petite ribonucléoprotéine nucléolaire SNR30 et ses protéines associées* [Thèse de doctorat]. Université du Québec à Montréal.
- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(3), 158-174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>
- Levy, S., Ihmels, J., Carmi, M., Weinberger, A., Friedlander, G., & Barkai, N. (2007). Strategy of transcription regulation in the budding yeast. *PLoS ONE*, 2(2), e250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000250>

- Lim, Y. H., Charette, J. M., & Baserga, S. J. (2011). Assembling a protein-protein interaction map of the SSU processome from existing datasets. *PLoS ONE*, 6(3), e17701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017701>
- Lindström, M. S. (2009). Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 167-170. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.083>
- Long, Y., Han, X., Meng, X., Xu, P., & Tao, F. (2024). A robust yeast chassis : Comprehensive characterization of a fast-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio*, 15(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.03196-23>
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 14(10), 953-961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10%253C953::AID-YEA293%253E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10%253C953::AID-YEA293%253E3.0.CO;2-U)
- MacGilvray, M. E., Shishkova, E., Place, M., Wagner, E. R., Coon, J. J., & Gasch, A. P. (2020). The phosphoproteome response to dithiothreitol reveals unique versus shared features of *Saccharomyces cerevisiae* stress responses. *Journal of proteome research*, 19(8), 3405-3417. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00253>
- Macías, S., Bragulat, M., Tardiff, D. F., & Vilardell, J. (2008). L30 Binds the Nascent *RPL30* Transcript to Repress U2 snRNP Recruitment. *Molecular Cell*, 30(6), 732-742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.002>
- Makino T, McLysaght A. (2010) Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9270-4. doi: 10.1073/pnas.0914697107
- Malygin, A. A., Parakhnevitch, N. M., Ivanov, A. V., Eperon, I. C., & Karpova, G. G. (2007). Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucleic Acids Research*, 35(19), 6414-6423. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm701>
- Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2015). Beyond the whole-genome duplication : Phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *PLoS Biology*, 13(8), e1002220. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002220>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12031-12036. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>
- Mayor, T., Graumann, J., Bryan, J., MacCoss, M. J., & Deshaies, R. J. (2007). Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6(11), 1885-1895. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700264-MCP200>
- Mayor, T., Lipford, J. R., Graumann, J., Smith, G. T., & Deshaies, R. J. (2005). Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple

- proteasome targets. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 4(6), 741-751.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M400220-MCP200>
- McCann, K. L., & Baserga, S. J. (2013). Mysterious Ribosomopathies. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 849-850. <https://doi.org/10.1126/science.1244156>
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells : Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 560-567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>
- Mendoza-Ochoa, G. I., Barrass, J. D., Terlouw, B. R., Maudlin, I. E., de Lucas, S., Sani, E., Aslanzadeh, V., Reid, J. A. E., & Beggs, J. D. (2019). A fast and tuneable auxin-inducible degron for depletion of target proteins in budding yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 36(1), 75-81.
<https://doi.org/10.1002/yea.3362>
- Miller, O. L., & Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science (New York, N.Y.)*, 164(3882), 955-957. <https://doi.org/10.1126/science.164.3882.955>
- Nakhoul, H., Ke, J., Zhou, X., Liao, W., Zeng, S. X., & Lu, H. (2014). Ribosomopathies : mechanisms of disease. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 7, 7-16.
<https://doi.org/10.4137/CMBD.S16952>
- Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies : Human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), 3196-3205. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-178129>
- Ni, L., & Snyder, M. (2001). A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 12(7), 2147-2170.
<https://doi.org/10.1091/mbc.12.7.2147>
- Nishimura, T., Wada, T., Yamamoto, K. T., & Okada, K. (2005). The *Arabidopsis* STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *The Plant Cell*, 17(11), 2940-2953. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036533>
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5481), 920-930.
<https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>
- Norris, K., Hopes, T., & Aspden, J. L. (2021). Ribosome heterogeneity and specialization in development. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 12(4), e1644. <https://doi.org/10.1002/wrna.1644>
- Ohno, S. (2013). *Evolution by Gene Duplication*. Springer Science & Business Media.
- Osheim, Y. N., French, S. L., Keck, K. M., Champion, E. A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S. J., & Beyer, A. L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 16(6), 943-954. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.031>
- Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1(1), 59-68. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.1.59>

- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J.-F., Wellinger, R. J., Chabot, B., & Abou Elela, S. (2011). Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell*, 147(2), 320-331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.044>
- Parenteau, J., Lavoie, M., Catala, M., Malik-Ghulam, M., Gagnon, J., & Abou Elela, S. (2015). Preservation of gene duplication increases the regulatory spectrum of ribosomal protein genes and enhances growth under stress. *Cell Reports*, 13(11), 2516-2526. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.033>
- Park, H. S., Himmelbach, A., Browning, K. S., Hohn, T., & Ryabova, L. A. (2001). A plant viral « reinitiation » factor interacts with the host translational machinery. *Cell*, 106(6), 723-733. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00487-1)
- Peng, B., Williams, T. C., Henry, M., Nielsen, L. K., & Vickers, C. E. (2015). Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift : A comparison of yeast promoter activities. *Microbial Cell Factories*, 14, 91. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0278-5>
- Pérez-Fernández, J., Román, Á., De Las Rivas, J., Bustelo, X. R., & Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 27(15), 5414-5429. <https://doi.org/10.1128/MCB.00380-07>
- Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 410-414. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.410>
- Petibon, C., Malik Ghulam, M., Catala, M., & Abou Elela, S. (2021). Regulation of ribosomal protein genes : An ordered anarchy. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 12(3), e1632. <https://doi.org/10.1002/wrna.1632>
- Petibon, C., Parenteau, J., Catala, M., & Elela, S. A. (2016). Introns regulate the production of ribosomal proteins by modulating splicing of duplicated ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3878-3891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw140>
- Petrascheck M, Escher D, Mahmoudi T, Verrijzer CP, Schaffner W, Barberis A. (2005) DNA looping induced by a transcriptional enhancer in vivo. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3743-50. doi: 10.1093/nar/gki689
- Petrov, A. S., Gulen, B., Norris, A. M., Kovacs, N. A., Bernier, C. R., Lanier, K. A., Fox, G. E., Harvey, S. C., Wartell, R. M., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2015). History of the ribosome and the origin of translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50), 15396-15401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509761112>
- Phipps, K. R., Charette, J. M., & Baserga, S. J. (2011). The SSU processome in ribosome biogenesis – progress and prospects. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(1), 1-21. <https://doi.org/10.1002/wrna.57>
- Planta, R. J. (1997). Regulation of ribosome synthesis in yeast. *Yeast*, 13(16), 1505-1518. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199712\)13:16%253C1505::AID-YEA229%253E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:16%253C1505::AID-YEA229%253E3.0.CO;2-I)

- Planta, R. J., & Mager, W. H. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(5), 471-477. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980330\)14:5%253C471::AID-YEA241%253E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5%253C471::AID-YEA241%253E3.0.CO;2-U)
- Pleiss, J. A., Whitworth, G. B., Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2007). Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biology*, 5(4), e90. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050090>
- Plocik, A. M., & Guthrie, C. (2012). Diverse forms of *RPS9* splicing are part of an evolving autoregulatory circuit. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002620. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002620>
- Ponzio, T. A., Yue, C., & Gainer, H. (2007). An intron-based real-time PCR method for measuring vasopressin gene transcription. *Journal of neuroscience methods*, 164(1), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.04.012>
- 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 (New York, N.Y.)*, 331(6018), 730-736. <https://doi.org/10.1126/science.1198308>
- Ramaswamy, P., & Woodson, S. A. (2009). Global stabilization of rRNA structure by ribosomal proteins S4, S17 and S20. *Journal of molecular biology*, 392(3), 666-677. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.032>
- Rhodin, M. H. J., & Dinman, J. D. (2010). A flexible loop in yeast ribosomal protein L11 coordinates P-site tRNA binding. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8377-8389. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq711>
- Rhodin, M. H. J., & Dinman, J. D. (2011). An extensive network of information flow through the B1b/c intersubunit bridge of the yeast ribosome. *PLoS ONE*, 6(5), e20048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020048>
- Rodríguez-Molina, J. B., & Turtola, M. (2022). Birth of a poly(A) tail : Mechanisms and control of mRNA polyadenylation. *FEBS Open Bio*, 13(7), 1140-1153. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13528>
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation : From protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(6), 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.003>
- Semrad, K., Green, R., & Schroeder, R. (2004). RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA*, 10(12), 1855-1860. <https://doi.org/10.1261/rna.7121704>
- Seoighe, C., & Wolfe, K. H. (1999). Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5), 548-554. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00015-6)
- 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.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>
- Shoji, S., Dambacher, C. M., Shajani, Z., Williamson, J. R., & Schultz, P. G. (2011). Systematic chromosomal deletion of bacterial ribosomal protein genes. *Journal of Molecular Biology*, 413(4), 751-761. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.004>

- Simoff, I., Moradi, H., & Nygård, O. (2009). Functional characterization of ribosomal protein L15 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 55(2), 111-125. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0228-z>
- Simsek, D., Tiu, G. C., Flynn, R. A., Byeon, G. W., Leppek, K., Xu, A. F., Chang, H. Y., & Barna, M. (2017). The mammalian ribo-interactome reveals ribosome functional diversity and heterogeneity. *Cell*, 169(6), 1051-1065.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.022>
- Sondalle, S. B., & Baserga, S. J. (2014). Human diseases of the SSU Processome. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(6), 758-764. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.004>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes : Mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Soufi, B., Kelstrup, C. D., Stoeck, G., Fröhlich, F., Walther, T. C., & Olsen, J. V. (2009). Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics. *Molecular bioSystems*, 5(11), 1337-1346. <https://doi.org/10.1039/b902256b>
- 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. <https://doi.org/10.1042/BC20070098>
- Stansfield, I., Jones, K. M., Herbert, P., Lewendon, A., Shaw, W. V., & Tuite, M. F. (1998). Missense translation errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 282(1), 13-24. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1976>
- Starita, L. M., Lo, R. S., Eng, J. K., Von Haller, P. D., & Fields, S. (2012). Sites of ubiquitin attachment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics*, 12(2), 236-240. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100166>
- Steffen, K. K., McCormick, M. A., Pham, K. M., MacKay, V. L., Delaney, J. R., Murakami, C. J., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 107-118. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136549>
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N. J., & Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation crosstalk in protein degradation. *Nature methods*, 10(7), 10.1038/nmeth.2519. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2519>
- Sykes, M. T., & Williamson, J. R. (2009). A Complex Assembly Landscape for the 30S Ribosomal Subunit. *Annual review of biophysics*, 38, 197-215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133615>
- Synetos, D., Frantziou, C. P., & Alksne, L. E. (1996). Mutations in yeast ribosomal proteins S28 and S4 affect the accuracy of translation and alter the sensitivity of the ribosomes to paromomycin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1309(1-2), 156-166. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(96\)00128-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(96)00128-5)
- Tabb-Massey, A., Caffrey, J. M., Logsden, P., Taylor, S., Trent, J. O., & Ellis, S. R. (2003). Ribosomal proteins Rps0 and Rps21 of *Saccharomyces cerevisiae* have overlapping functions in the

- maturation of the 3' end of 18S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 31(23), 6798-6805.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg899>
- Valášek, L., Mathew, A. A., Shin, B.-S., Nielsen, K. H., Szamecz, B., & Hinnebusch, A. G. (2003). The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome *in vivo*. *Genes & Development*, 17(6), 786-799. <https://doi.org/10.1101/gad.1065403>
- Vilardell, J., & Warner, J. R. (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes & Development*, 8(2), 211-220. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.211>
- Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2015). Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 28, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.018>
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 437-440. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01460-7)
- Weinert, B. T., Schölz, C., Wagner, S. A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J. A., & Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Reports*, 4(4), 842-851.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.024>
- Williams, M. E., & Sussex, I. M. (1995). Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 8(1), 65-76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1995.08010065.x>
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonnrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327-339. <https://doi.org/10.1038/35030006>
- Wolfe, K. H. (2000). Robustness—It's not where you think it is. *Nature Genetics*, 25(1), 3-4.
<https://doi.org/10.1038/75560>
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the yeast whole-genome duplication. *PLoS Biology*, 13(8), e1002221.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002221>
- Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387(6634), 708-713. <https://doi.org/10.1038/42711>
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643-681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>
- Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, Li Z, Wang Z, Zhang C. (2012) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Analytical Biochemistry*, 423(1), 15-22. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.012
- 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.
<https://doi.org/10.1038/nrm3359>

- Yusof TY, Lian MQ, Ong EBB, Teh AH (2021). Enhancing yeast growth with carboxylates under multiple nutrient limitations. *3 Biotech*, 11(9), 409. doi: 10.1007/s13205-021-02955-w
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., & Ye, K. (2016). Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes & Development*, 30(6), 718-732. <https://doi.org/10.1101/gad.274688.115>
- Zhou, X., Liao, W.-J., Liao, J.-M., Liao, P., & Lu, H. (2015). Ribosomal proteins : Functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(2), 92-104. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>