



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R Sciences et Techniques Biologiques

E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement

D.F.D. Biologie Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université

en Biologie Forestière

par **Jérémy COUTURIER**

Etude de quelques mécanismes de transport impliqués dans
l'absorption et la remobilisation de l'azote chez le peuplier

Soutenance publique le 9 novembre 2007

Membres du jury :

Président :	M. Francis Martin	Directeur de Recherches, INRA, Nancy
Rapporteurs :	M. Thierry Améglio	Directeur de Recherches, INRA, Clermont-Ferrand
	M. Soulaïman Sakr	Professeur, Université d'Angers, Angers
Examineurs :	M. Michel Chalot	Professeur, Nancy-Université, Nancy
	Mme Dominique Gérant	Maître de Conférences, Nancy-Université, Nancy
	M. Daniel Wipf	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

*A ma famille, avec toute ma reconnaissance et mon affection.
Mes parents, Yoann, Stéphanie, Loïc et Baptiste.*

Sans vous je ne serais pas arrivé là où j'en suis aujourd'hui.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, M. Thierry Améglio, M. Soulaïman Sakr, M. Francis Martin, M. Daniel Wipf et Mme Dominique Gérant d'avoir accepté de juger mon travail.

Les trois dernières années ont été très riches et ont passé à une vitesse folle. Je tiens à vous remercier en premier lieu, Michel et Damien, pour la confiance accordée et les conseils dispensés tout au long de ces trois années. Merci pour tout.

La réussite d'une thèse est le fruit d'un travail personnel mais également collectif. Je tiens donc à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer plus ou moins longtemps depuis mes débuts. Je pense tout d'abord à tous les membres du labo. Une petite pensée à ceux qui sont partis, notamment à l'aventurier Régis, au Magnum luxembourgeois Marc et à la bella italienne Barbara.

Mélanie, maman rayonnante, tu es revenue parmi nous après un séjour doré dans le sud. Je suis sûr que les bonbons te manquaient !!!!! Un grand merci pour ta gentillesse, ton soutien et tes précieux conseils. Merci pour tout.

Aude, ma photographe préférée, toujours à la recherche du scoop. Merci beaucoup pour tout ce que tu as fait au cours de ces trois ans. Prends bien soin de tes petits et courage, la dernière ligne droite approche.

Chantal, je ne peux résister à vous appeler mon poussin une dernière fois. Je n'oublierai pas vos petites crises de nerfs dues aux crédits et vos tapements de pieds. Allez j'arrête de vous taquiner, merci pour tout et ne vous inquiétez pas la retraite arrivera bien un jour.

Frédéric, complice de tant de rigolades lors des prélèvements. Enumérer tous les services rendus serait trop long et j'ai peur d'en oublier. Un grand merci donc au spécialiste de la perche télescopique.

Annick, merci pour les suggestions pertinentes sur mes travaux, très utiles pour la remise en question et l'avancement de mon projet.

Claire, merci pour ta gentillesse et l'intérêt pour mon travail.

Didier, Eva, Loïc, les dernières recrues, le plus dur est à venir, courage ça en vaut vraiment la peine.

Monsieur Botton, merci de l'intérêt constant que vous avez porté à mon travail.

Jean-Pierre, plus qu'un directeur tu es devenu un véritable ami. Merci pour tout ce que tu m'as apporté bolludo, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je vais essayer de progresser en vélo et promis je ne casserai plus de chaîne !!!!

Nico, tu es comme un grand frère pour moi. Tu m'as donné l'envie de faire de la recherche et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Et comme le dit l'expression on remet ça quand tu veux, où tu veux !!!!

Elisabeth, miss cambium, merci pour ces riches discussions sur les mystères des éléments conducteurs des arbres. Il faut que tu reviennes je suis en manque de chocolat au lait !!!!

Filipe, le seul à comprendre mon admiration pour le phénomène « Juan Roman ». Je vais essayer de m'entraîner pour contrer ton flip-flap portugais !!!!

Eric, mister zen, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, dommage que tu sois si réticent à l'idée de dire du bien de l'OM !!!!

Je n'oublie pas les deux « suédois » Kamel et Nico2, merci pour votre bonne humeur et bonne chance pour la suite.

Veronica, la spécialiste du phosphate, merci pour tous les services rendus.

Sébastien, merci pour les infos concernant la transfo de peuplier.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes, en particulier les différentes équipes de l'UMR1136, qui ont croisé mon chemin au cours de ces trois années et qui ont ainsi participé à la réussite de mes recherches.

Abréviations

AAP	amino acid permease
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMT	ammonium transporter
ANT	aromatic and neutral amino acid transporter
APC	amino acid polyamine choline
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ATF	amino acid transporter superfamily
BSP	bark storage protein
CAT	cationic amino acid transporter
cpm	coups par minute
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
dNTP	désoxynuléoside 5' triphosphate
DO	densité optique
EST	expressed sequence tag
ETDA	éthylène diamine tétra acétate
GABA	acide gamma-amino butyrique
GAT	GABA transporter
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
GDH	glutamate déshydrogénase
GOGAT	glutamate synthase
GS	glutamine synthétase
kb	kilopaires de bases
LHT	lysine histidine transporter
MFS	major facilitator superfamily
NH ₄ ⁺	ammonium
NO ₃ ⁻	nitrate
ORF	open reading frame
pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
ProT	proline transporter
rpm	rotation par minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodécyl sulfate
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
UV	ultraviolet

Section 1 Synthèse bibliographique	1
1. Origines et devenir de l'azote dans les plantes	1
1.1. Généralités - Azote dans le sol	3
1.2. Origines et devenir de l'ammonium	3
1.2.1. Généralités	3
1.2.2. Origines	5
1.2.3. Toxicité de l'ammonium chez les plantes	7
1.3. Origines et devenir des acides aminés	7
1.3.1. Absorption de l'azote organique à partir du sol	9
1.3.2. Rôles des acides aminés	9
1.3.3. Cycles saisonniers de l'azote chez les espèces pérennes	11
1.3.3.1. Généralités	11
1.3.3.2. Sénescence automnale et remobilisation azotée	13
1.3.3.3. Remobilisation printanière de l'azote	15
2. Mécanismes de transport de l'ammonium chez les plantes	17
2.1. Caractérisation biochimique du transport de l'ammonium	17
2.1.1. Le système de transport HATS	17
2.1.2. Le système de transport LATS	19
2.2. Caractérisation moléculaire	19
2.2.1. Famille AMT1	19
2.2.2. Famille AMT2	23
2.2.3. Famille AMT chez les arbres	25
2.2.4. Structure et résolution tridimensionnelle des AMT	25
2.2.5. Autres systèmes de transport de l'ammonium	27
2.3. Transferts d'ammonium dans les symbioses	27
2.3.1. Transport dans la symbiose fixatrice d'azote	27
2.3.2. Transport dans la symbiose mycorhizienne	29
3. Mécanismes de transport des acides aminés chez les plantes	31
3.1. Caractérisation biochimique et moléculaire	31
3.2. La superfamille ATF	33
3.2.1. Généralités	33
3.2.2. La famille AAP	35
3.2.2.1. Les membres AAP d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.2.2.2. Les membres AAP des autres plantes	39
3.2.3. Famille LHT	39
3.2.4. La famille ProT/GAT	41
3.2.5. La famille ANT	43
3.2.6. La famille AUX	43
3.2.7. Les autres membres ATF	43
3.3. La superfamille APC	45
3.3.1. Généralités	45

3.3.2. La famille CAT.....	45
3.4. Les autres familles de transporteurs d'acides aminés	47
3.4.1. La superfamille MFS.....	47
3.4.2. Les transporteurs au niveau des organites.....	49
3.4.2.1. Transport au niveau des chloroplastes.....	49
3.4.2.2. Transport au niveau des mitochondries.....	51
4. Le peuplier.....	51
4.1. Généralités.....	51
4.2. Nutrition azotée et cycle saisonnier de l'azote.....	55
5. Classification des transporteurs : le système TC.....	57
Objectifs.....	58
Section 2 Matériels et Méthodes.....	62
6. Analyses bioinformatiques.....	64
7. Matériel biologique.....	66
7.1. Matériel végétal.....	66
7.1.1 Le peuplier.....	66
7.1.1.1. Clone utilisé.....	66
7.1.1.2. Culture <i>in vitro</i>	66
7.1.1.3. Culture hydroponique du peuplier.....	66
7.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
7.2. Matériel fongique.....	68
7.2.1. Souche utilisée.....	68
7.2.2. Conditions de culture.....	68
7.3. Production de plants de peuplier mycorhizés par <i>P. involutus</i>	70
7.4. <i>Escherichia coli</i>	70
7.4.1. Souche utilisée.....	70
7.4.2. Conditions de culture.....	70
7.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
7.5.1. Souches utilisées.....	70
7.5.2. Conditions de culture.....	72
7.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	72
7.7. Les plasmides.....	72
7.7.1. Plasmides pour <i>E. coli</i>	72
7.7.2. Plasmides navette <i>S. cerevisiae</i> - <i>E. coli</i>	74
7.7.3. Plasmides navette Plante- <i>E. coli</i>	74
8. Méthodes.....	76
8.1. Extraction des acides aminés.....	76
8.2. Analyse par GC-MS des acides aminés.....	78
8.3. Extraction des sucres solubles.....	78
8.4. Extraction des protéines solubles.....	78
9. Techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques.....	80
9.1. Extraction des acides nucléiques.....	80
9.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	80

9.1.2. Extraction de l'ADN génomique de Peuplier.....	80
9.1.3. Extraction des ARN totaux.....	80
9.2. Analyse des taux de transcrits par RT-PCR.....	82
9.3. Techniques d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction).....	82
9.3.1. Généralités.....	82
9.3.2. Les amorces nucléotidiques.....	84
9.3.3. Composition de l'essai.....	84
9.3.4. Conditions d'amplification	86
9.3.5. Séquençage de l'ADN.....	86
9.4. Techniques de clonage.....	86
9.4.1. Préparation du vecteur.....	86
9.4.1.1. Clonage dans le vecteur pFL61.....	88
9.4.1.2. Clonage dans les vecteurs pYES2, pYES2GFP, pART7GFP et pBI101.3.....	88
9.4.1.3. Clonage dans le vecteur pART27.....	90
9.4.2. Préparation du fragment à cloner.....	90
9.4.3. Ligation.....	92
9.4.4. Transformation des bactéries.....	92
9.4.4.1. Par électroporation.....	92
9.4.4.1.1. Préparation des bactéries compétentes.....	92
9.4.4.1.2. Transformation des cellules compétentes.....	94
9.4.4.2. Par choc thermique.....	94
9.4.4.2.1. Préparation des bactéries compétentes.....	94
9.4.4.2.2. Transformation des cellules compétentes.....	94
9.4.5. Transformation d' <i>A. tumefaciens</i> par électroporation.....	96
9.4.5.1. Préparation des cellules compétentes.....	96
9.4.5.2. Transformation des cellules compétentes	96
<u>10. Expression hétérologue dans <i>S. cerevisiae</i>.....</u>	<u>98</u>
10.1. Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	98
10.1.1. Préparation des cellules.....	98
10.1.2. Transformation.....	98
10.2. Test de complémentation.....	100
10.2.1. Principe.....	100
10.2.2. Complémentation de la souche 31019b.....	100
10.2.3. Complémentation de la souche 22574d.....	100
10.2.4. Complémentation de la souche 22ΔAA.....	102
10.3. Cinétiques d'absorption de [¹⁴ C] méthylamine dans <i>S. cerevisiae</i>	102
10.3.1. Préparation des cellules.....	102
10.3.2. Marquage des échantillons.....	102
10.3.3. Expression des résultats.....	104
<u>11. Expression transitoire des fusions protéines-GFP chez <i>A. thaliana</i>.....</u>	<u>104</u>
11.1. Préparation des protoplastes	104
11.2. Transformation des protoplastes.....	106
<u>12. Génération de plants transgéniques d'<i>A. thaliana</i> exprimant les fusions PtrAMT1.2-GFP et PtrAMT1.6-GFP.....</u>	<u>106</u>
<u>13. Expression transitoire dans des cellules de mésophylle de tabac.....</u>	<u>108</u>

14. Transformation du Peuplier 717-1B4.....	108
14.1. Préculture d' <i>A. tumefaciens</i> et préparation des explants de peuplier.....	108
14.2. Trempage.....	110
14.3. Coculture.....	110
14.4. Sélection des transformants.....	110
14.5. Régénération des transformants.....	110
14.6. Localisation histochimique de l'expression des gènes par fusion promoteur du gène d'intérêt- gène rapporteur GUS.....	112
 Section 3 Résultats.....	 113
1. Le génome du peuplier <i>Populus trichocarpa</i> (Torr. & Gray).....	115
2. La famille des transporteurs d'ammonium chez le peuplier.....	127
3. L'azote et la sénescence automnale du peuplier.....	143
4. Expression spécifique d'un transporteur putatif d'acides aminés dans les cellules de protoxylème du peuplier.....	173
 Section 4 Conclusions et Perspectives.....	 198
 Section 5 Références bibliographiques.....	 211

Section 1 – Synthèse bibliographique

1. Origines et devenir de l'azote dans les plantes

1.1. Généralités - Azote dans le sol

Dans les écosystèmes forestiers des régions tempérées, l'azote et le phosphore sont avec l'eau, les éléments limitant la productivité forestière (Attiwill et Adams, 1993). L'azote joue un rôle critique dans la biochimie des plantes supérieures, puisqu'il est un constituant essentiel de nombreux composés, incluant les acides aminés et les protéines, les chlorophylles et les bases des acides nucléiques ; tous ces composés étant essentiels aux processus de croissance et de développement des plantes. L'azote est aussi essentiel pour l'utilisation du carbone, la croissance et le développement des racines, ainsi que pour le transport d'autres nutriments.

Dans les sols, l'azote, bien que présent en quantités importantes est l'un des principaux éléments limitant la croissance des plantes car il se trouve sous des formes non directement assimilables par les végétaux supérieurs. En effet, une grande partie de l'azote du sol est stockée sous forme organique (protéines, acides nucléiques, peptides, acides aminés) qui peut représenter jusqu'à 90% de l'azote soluble total (Haynes, 1986). Les plantes assimilent principalement l'azote inorganique (NH_4^+ , NO_3^-), qui représente 1% (10 à 100 μM) de l'azote du sol (Marschner et Dell, 1994). Dans la plupart des sols, la concentration en ammonium est 10 à 1000 fois inférieure à la concentration en nitrate et excède rarement 50 μM (Marschner, 1995). Par ailleurs, dans certains terrains comme les sols forestiers non perturbés, bien que le pH soit généralement acide, la nitrification de l'ammonium est très active. Les nitrates ainsi produits sont aussitôt utilisés et mobilisés par la microflore du sol et de ce fait, l'ammonium représente la principale source d'azote inorganique pour les plantes, le rapport $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ dans la solution du sol étant généralement voisin de 10/1 (Marschner et Dell, 1994).

1.2. Origines et devenir de l'ammonium

1.2.1. Généralités

L'ammonium et le nitrate sont les principales sources d'azote pour la croissance des plantes. Ils sont requis en plus grande quantité que les autres éléments minéraux. Les différences de concentration entre nitrate et ammonium dans les sols ne reflètent pas la préférence des plantes pour l'une ou l'autre forme d'azote. Beaucoup de plantes absorbent préférentiellement l'ammonium, même lorsque celui-ci est présent en concentrations

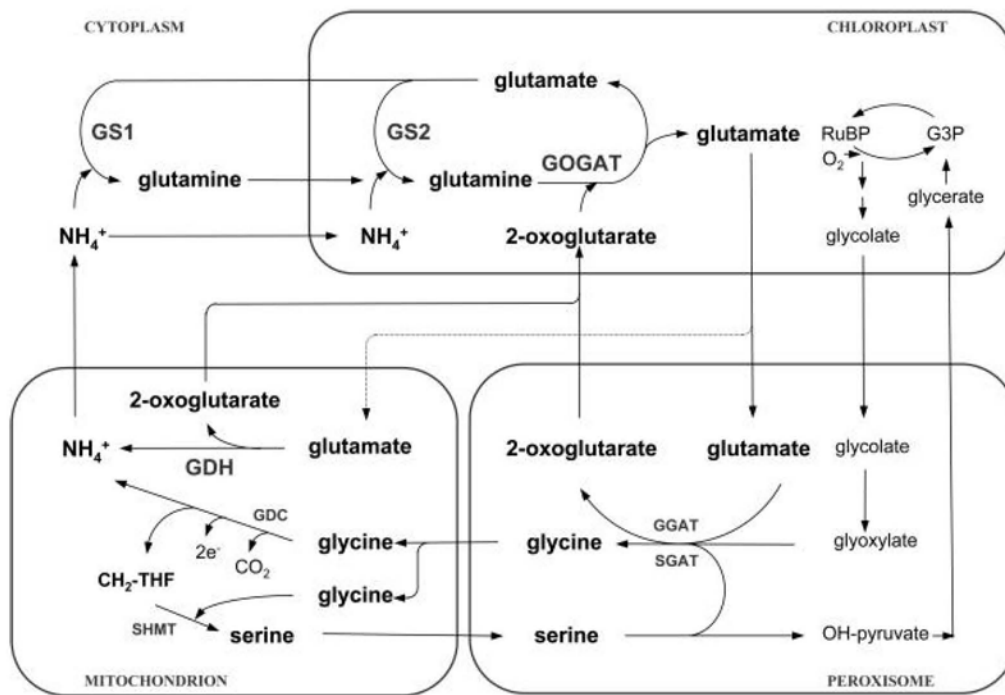


Figure 1 : Hypothèse du cycle de l'azote lors de la photorespiration impliquant la libération d'ammonium et de 2-oxoglutarate entre trois compartiments subcellulaires (d'après Masclaux-Daubresse et al. 2006). L'ammonium peut être produit durant la photorespiration par la désamination du glutamate sous l'action de la GDH. L'ammonium peut ensuite être assimilé via le cycle impliquant la GS et la GOGAT.

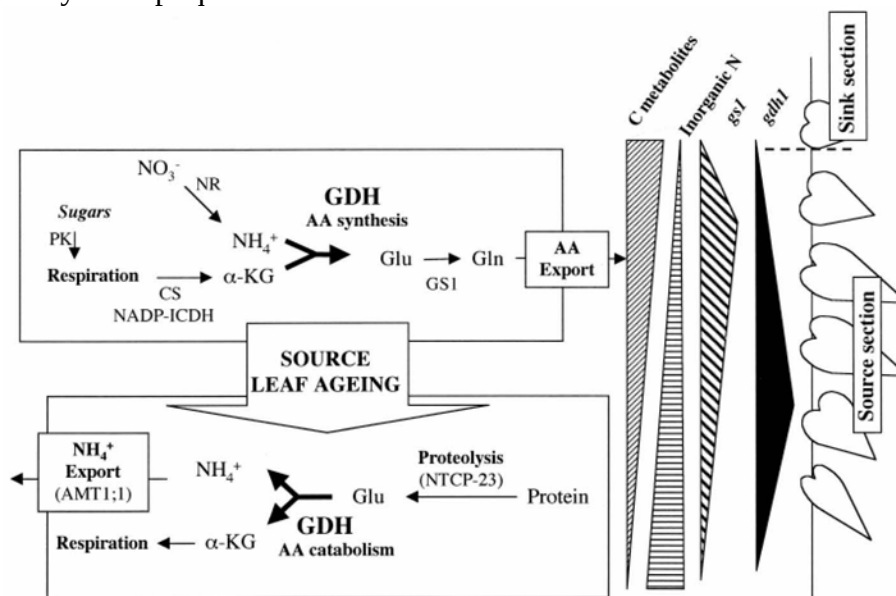


Figure 2 : Hypothèse de l'évolution de l'assimilation de l'azote avec l'âge de la feuille et implication de la GDH (glutamate deshydrogénase) dans ce changement (d'après Masclaux-Daubresse et al., 2002).

inférieures aux concentrations en nitrate (Clarkson et al., 1996 ; Botella et al., 1994 ; Gazzarrini et al., 1999). En effet, l'assimilation du nitrate requiert sa réduction en nitrite puis ammonium, un processus parmi les plus coûteux en énergie chez la plante. Cependant, d'autres impératifs comme le maintien du pH lors de l'assimilation de l'azote résultent d'une utilisation simultanée de l'ammonium et du nitrate dans les conditions normales (Smith et Raven, 1979). Toutefois les plantes présentent généralement une croissance optimale lorsque les deux formes sont présentes (Bloom et al., 1993). Les plantes possèdent un nombre important de transporteurs leur permettant d'importer efficacement l'ammonium et le nitrate sur une large gamme de concentrations.

1.2.2. Origines

L'ammonium est un intermédiaire central généré lors de différents processus comme la réduction du nitrate, la photorespiration, le métabolisme des phényl-propanoïdes, le catabolisme protéique (Figures 1 et 2) (Joy, 1988). Il est notamment importé par les cellules via des transporteurs d'ammonium localisés au niveau de la membrane plasmalemmique, et distribué dans les compartiments intracellulaires comme les chloroplastes, les mitochondries, les vacuoles probablement par l'intermédiaire de transporteurs différents dans chaque cas. L'ammonium n'est généralement pas utilisé pour le transport à longue distance de l'azote à l'intérieur de la plante (Howitt et Udvardi, 2000). En effet, la majorité de l'ammonium transporté au niveau des cellules est assimilée localement par l'intermédiaire des glutamine synthétases situées dans le cytoplasme et les chloroplastes. Dans les racines, l'incorporation de l'ammonium en glutamine est réalisée principalement par la GS cytoplasmique bien que le gène codant l'isoforme plastidique s'exprime également (Ireland et Lea, 1999). Au niveau des feuilles, l'isoforme plastidique et plus particulièrement chloroplastique est prédominante. Elle apparaît jouer un rôle important dans le recyclage de l'ammonium généré lors de la photorespiration, après son transfert des mitochondries vers les chloroplastes (Lam et al., 1996) (Figure 1). Ceci doit être interprété avec précaution puisque de récentes études ont démontré que la GS chloroplastique pouvait être également adressée à la mitochondrie (Taira et al., 2004). L'ammonium peut également être généré *de novo* à partir de la molécule de diazote par les bactéries fixatrices d'azote, comme le rhizobium au niveau des nodules des légumineuses, et au moins un transporteur d'ammonium est impliqué dans le transfert de l'ammonium entre les bactéries et le cytoplasme des cellules de la plante hôte (Kaiser et al., 1998).

1.2.3. Toxicité de l'ammonium chez les plantes

Lorsque l'ammonium est fourni comme seule source d'azote, les plantes présentent un défaut de croissance tant au niveau racinaire que des parties aériennes, ceci étant dû à l'acidification de la rhizosphère provoquée par l'excrétion de protons issus de l'assimilation de l'ammonium. De plus, une nutrition exclusivement ammoniacale diminue la concentration en cytokinines (Walch-Liu et al., 2000) et augmente la concentration en acide abscissique (Peuke et al., 1998) dans le xylème, ce qui contribue à un fort ralentissement de la croissance. D'autres effets toxiques de l'ammonium ont été spéculés ; le remplacement de cations essentiels comme K^+ ou Mg^{2+} ou le détournement de quantités importantes de squelettes carbonés nécessaires à son assimilation, au détriment d'autres processus physiologiques (Gerendas et al., 1997).

Un autre effet toxique indirect de l'ammonium résulte de la perte d'énergie nécessaire aux plantes pour assurer son excrétion et ainsi maintenir leur potentiel de membrane. Toutefois toutes les plantes ne se comportent pas de la même façon. Certaines sont très sensibles comme *Hordeum vulgare* qui utilise jusqu'à 40% de sa respiration cellulaire afin de fournir l'énergie nécessaire à l'excrétion de l'ammonium, il en résulte une forte diminution de la croissance. D'autres sont insensibles comme *Oryza sativa* qui laisse entrer l'ammonium jusqu'à l'équilibre (Britto et al., 2001 ; Kronzucker et al., 2001).

1.3. Origines et devenir des acides aminés

L'azote est quantitativement le nutriment le plus important pour la croissance et la productivité des plantes. Ces dernières ont mis en place des stratégies diverses et complexes pour l'acquisition, l'assimilation et la répartition de l'azote dans leurs différents tissus. L'absorption d'azote inorganique et organique à partir du sol, ainsi que le transport de l'azote organique synthétisé au niveau des organes « source » (feuilles et racines), vers les organes « puits » (jeunes feuilles, fleurs, graines), constituent des mécanismes essentiels à la physiologie et au développement des plantes. D'autre part, la remobilisation de l'azote stocké sous forme de protéines de réserve est importante au cours de divers processus comme la sénescence foliaire, la germination des graines ou la croissance hivernale des espèces pérennes (Rentsch et al., 2007).

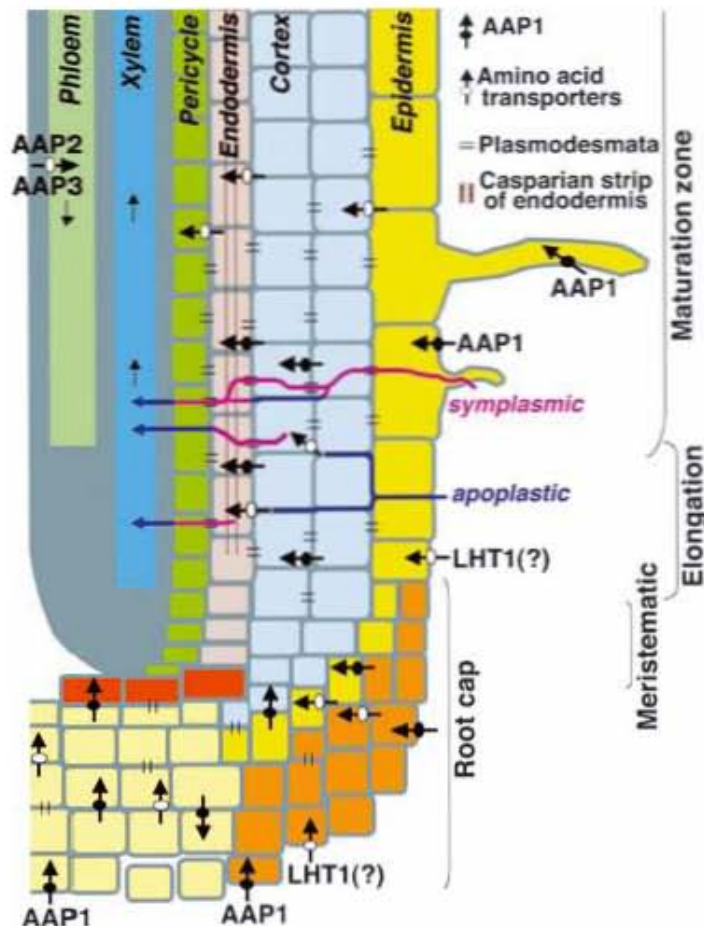


Figure 3 : Modèle du transport des acides aminés au niveau des racines d'*A. thaliana* (d'après Lee et al., 2007)

Le transport des acides aminés dans les racines s'effectuerait selon un mécanisme apoplastique jusqu'à ce que les composés organiques atteignent le cadre de Caspari au niveau de l'endoderme, ce cadre empêchant le flux apoplastique. Pour être transféré, l'azote organique doit alors être chargé par un mécanisme symplastique, probablement par des transporteurs, incluant AtAAP1, qui sont localisés au niveau de la membrane plasmalemmique des cellules du cortex racinaire et/ou de l'endoderme. Après avoir franchi l'endoderme, les acides aminés sont transférés dans le cylindre vasculaire puis vers les parties aériennes via le xylème. Les acides aminés sont aussi probablement chargés dans le phloème pour fournir en azote les extrémités des racines en développement. AtAAP2 et AtAAP3 sont probablement responsables de ce mécanisme de transport (Hirner et al., 1998 ; Okumoto et al., 2004). De plus, le transport des acides aminés peut également être de type symplastique après import des acides aminés dans les cellules de l'épiderme racinaire, les poils absorbants et les cellules de la coiffe racinaire. Deux transporteurs d'acides aminés, AtAAP1 et AtLHT1, pourraient fonctionner dans ce processus de transport des acides aminés (Lee et al., 2007 ; Hirner et al., 2006).

1.3.1. Absorption de l'azote organique à partir du sol

L'azote organique est présent en quantités considérables dans les sols des écosystèmes naturels mais aussi agricoles. Toutefois, les composés azotés organiques sont généralement considérés comme étant plutôt une source d'azote pour les microorganismes du sol que pour les plantes. Cependant, il est reconnu depuis de nombreuses années que les plantes peuvent absorber directement les acides aminés du sol et pourraient même préférer cette source d'azote organique aux autres formes d'azote inorganique (Chapin et al., 1993 ; Kielland, 1994 ; Raab et al., 1999). Ceci constitue une caractéristique des plantes vivant dans des écosystèmes froids comme la toundra, où les taux de minéralisation sont généralement faibles (Fisk and Schmidt, 1996). Les concentrations en acides aminés mesurées à partir de solutions de sol varient de 0,01 à 1000 μM , et les acides aminés peuvent représenter de 1 à 25% des composés azotés solubles du sol. De plus, il a été proposé que la glycine pourrait être une source azotée importante pour les plantes dû au fait de sa plus grande mobilité dans le sol comparée aux autres acides aminés (Raab et al., 1999), mais aussi au fait que cet acide aminé constitue un pauvre substrat pour la croissance microbienne (Lipson et al., 1999).

Un système de haute affinité et un système de basse affinité ont été suggérés pour l'absorption des acides aminés du sol. Bien que plusieurs transporteurs d'acides aminés soient exprimés dans les racines, à ce jour, un rôle direct dans l'absorption de l'azote organique a seulement été démontré pour AtAAP1 et AtLHT1 (Lee et al., 2007 ; Hirner et al., 2006) (Figure 3).

1.3.2. Rôles des acides aminés

Les acides aminés jouent des rôles fondamentaux dans une multitude de processus métaboliques incluant notamment la synthèse protéique, le métabolisme hormonal, la croissance cellulaire, la production d'énergie, la synthèse de nucléobases et la biosynthèse de l'urée (Coruzzi et Zhou, 2001). Il a également été suggéré récemment que le glutamate et le GABA pourraient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire (Qi et al., 2006 ; Bouché et Fromm, 2004). Certains acides aminés peuvent aussi permettre l'adaptation à des changements environnementaux. Ceci est notamment le cas de la proline qui joue un rôle d'osmoticum pour lutter contre les effets du stress hydrique (Rentsch et al., 1996). Enfin chez les plantes, les acides aminés sont également impliqués dans la sénescence et la germination des graines (Ortiz-Lopez et al., 2000). Les plantes sont aussi capables d'absorber les acides

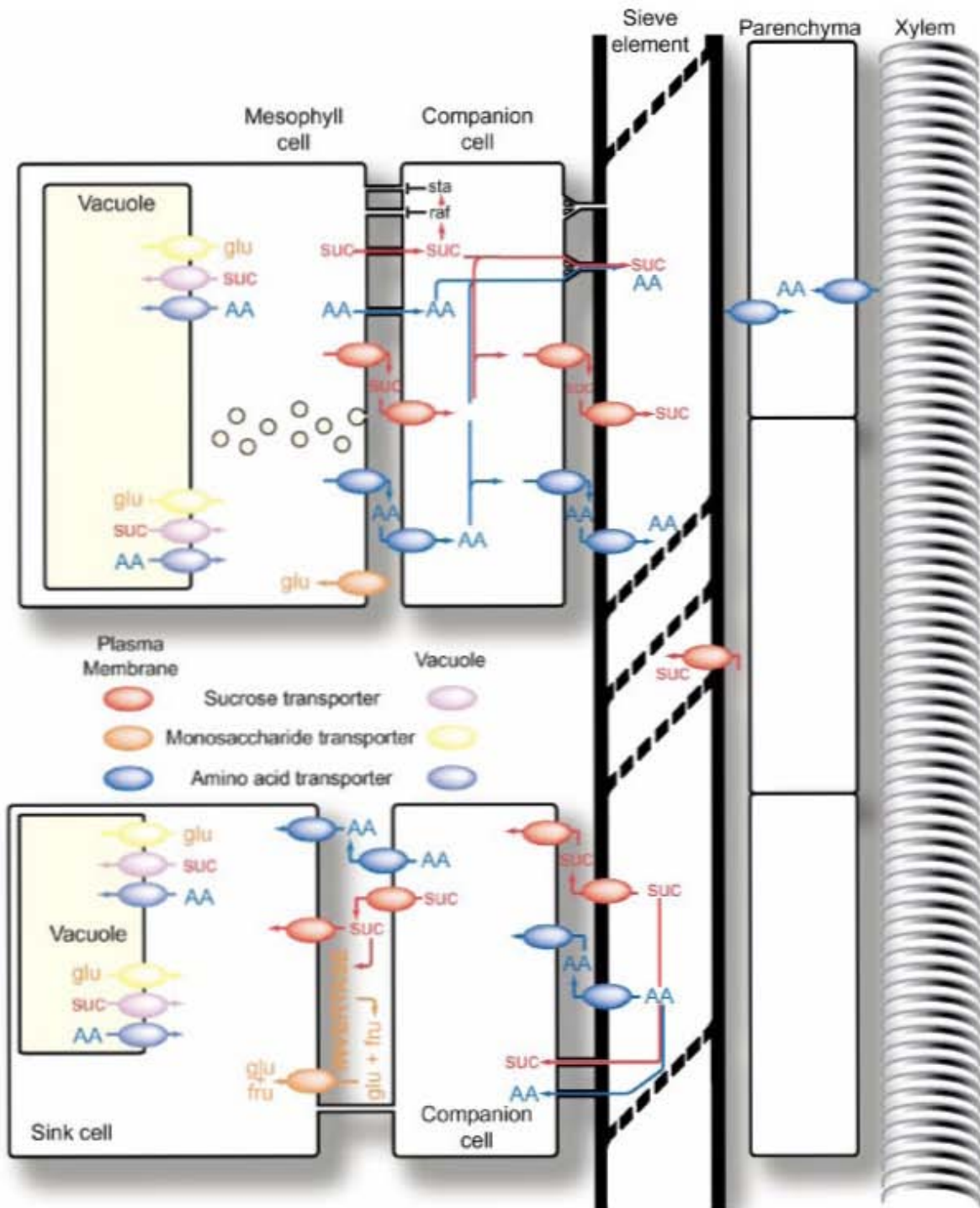


Figure 4 : Distribution intracellulaire et intercellulaire des acides aminés et des sucres chez les plantes. Les abréviations utilisées correspondent à acides aminés (AA), fructose (fru), glucose (glu), raffinose (raf), stachyose (sta) et saccharose (suc) (d'après Lalonde et al., 2004).

aminés, mais ceux-ci représentent surtout la principale forme de transport à longue distance de l'azote organique. Les acides aminés protéogéniques s'accumulent dans la sève élaborée (100-200 mM) et dans la sève brute (à des taux environ dix fois inférieurs aux taux de la sève élaborée), où les amines, asparagine et glutamine, ainsi que les acides aminés acides, aspartate et glutamate, prédominent. Globalement, le transport à longue distance des acides aminés doit être au moins aussi complexe que le transport des sucres étant donné la grande diversité des substrats incluant les 20 acides aminés protéogéniques ainsi qu'une variété d'analogues aux acides aminés, comme le GABA par exemple. D'autre part, contrairement au saccharose, les acides aminés sont transportés via les vaisseaux du phloème mais aussi via les vaisseaux du xylème, ce qui requiert des mécanismes d'échanges complexes entre le phloème et le xylème (Atkins, 2000) (Figure 4).

1.3.3. Cycles saisonniers de l'azote chez les espèces pérennes

1.3.3.1. Généralités

La capacité des arbres forestiers à stocker et à redistribuer les ressources azotées est un élément fondamental de l'économie d'azote des arbres forestiers et des autres espèces pérennes. Le cycle « interne de l'azote » peut ainsi se décomposer en quatre grandes phases (Cook et Weih, 2005) :

- (1) Transfert des composés azotés issus de l'assimilation primaire des organes « sources » vers les organes « puits » au cours de la saison de croissance.
- (2) Réallocation des ressources azotées résultant du recyclage métabolique de l'azote au cours de la saison de croissance.
- (3) Transfert de l'azote des tissus sénescents vers les tissus pérennes au cours de la sénescence automnale.
- (4) Remobilisation printanière de l'azote à partir des tissus pérennes vers les tissus en croissance.

Tandis que les espèces annuelles et les espèces pérennes ont toutes les deux la capacité de stocker, de remobiliser et de recycler l'azote durant la saison de croissance, le cycle saisonnier de l'azote représente une part essentielle de la vie des espèces pérennes (Staswick, 1994 ; Stepien et al., 1994). Ce cycle est une adaptation importante permettant aux espèces pérennes de survivre pendant les périodes hivernales. Il constitue également un déterminant de l'état de santé de la plante (May et Killingbeck, 1992), particulièrement chez les arbres forestiers qui doivent être capables de faire face à des variations inter et intra-saisonnières dans la

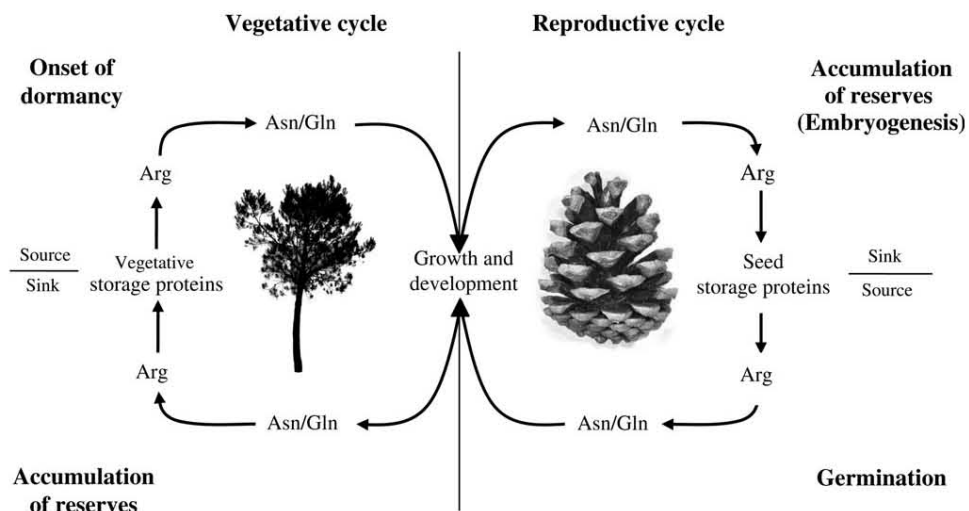


Figure 5 : Interconversion de l'arginine, de la glutamine et de l'asparagine durant les cycles reproductif et végétatif chez le pin (d'après Canovas et al., 2007).

disponibilité de l'azote avant d'être capables de se reproduire sexuellement. L'importance du phénomène de remobilisation de l'azote peut par exemple être illustré par le fait que chez le peuplier, environ 80% de l'azote foliaire total est récupéré durant la sénescence automnale (Keskitalo et al., 2005).

Chez les conifères, le cycle d'interconversion de l'arginine et des amides (Figure 5), joue un rôle central dans le métabolisme azoté et sa régulation est critique pour maintenir l'économie d'azote chez ces plantes pérennes (Canovas et al., 2007).

Outre les acides aminés riches en azote, les protéines VSPs (Vegetative Storage Proteins) ont aussi un rôle important dans le cycle saisonnier de l'azote puisqu'elles représentent la forme majeure de stockage de l'azote réduit dans les tissus des plantes annuelles et pérennes (Staswick, 1994 ; Stepien et al., 1994). Même si cela reste encore controversé, la Rubisco peut être considérée comme une protéine de stockage non conventionnelle de part sa contribution à la formation de réserves azotées durant l'été mais aussi au recyclage de l'azote durant l'automne (Chapin et al., 1990 ; Millard, 1993).

Les protéines VSPs ont été caractérisées chez plusieurs espèces et notamment des arbres forestiers (Wetzel et al., 1989 ; Wetzel et Greenwood, 1991a ; DeWald et al., 1992 ; Berger et al., 1995 ; Avice et al., 2003).

1.3.3.2. Sénescence automnale et remobilisation azotée

Durant l'automne, les acides aminés riches en azote et d'autres nutriments mobiles sont transportés via le phloème des feuilles sénescentes vers les tissus pérennes, où ils seront utilisés pour la synthèse des protéines (Sauter et al., 1989 ; Hörtensteiner et Feller, 2002 ; Geßler et al., 2004).

Les enzymes du métabolisme azoté et plus particulièrement celles impliquées dans les interconversions des acides aminés jouent aussi un rôle important dans la remobilisation de l'azote durant la sénescence foliaire (Masclaux et al., 2001). Des études portant sur des espèces variables, incluant des espèces pérennes comme *Vitis vinifera* ont démontré que la glutamate deshydrogénase (GDH) et la glutamine synthétase (GS1) cytosolique sont surexprimées dans les tissus sénescents (Brugière et al., 2000 ; Paczek et al., 2002). La présence de ces enzymes dans les cellules compagnes du phloème des tissus sénescents suggère qu'elles participent à la translocation de l'azote à partir de ces tissus sénescents (Paczek et al., 2002). Chez le tabac, il a récemment été conclu que le cycle GS-GOGAT avait lieu dans les cellules vasculaires pour la biosynthèse de glutamine et de glutamate préalables

aux cycles des autres acides aminés. De plus, les auteurs ont également conclu que la GDH ne jouait pas de rôle dans la fourniture de glutamate, même dans les feuilles âgées de tabac, où l'enzyme était pourtant induite (Masclaux-Daubresse et al., 2006).

Au cours de l'automne, on assiste à un changement au niveau du métabolisme azoté foliaire, avec une diminution de l'assimilation primaire au profit de la remobilisation et de l'export de l'azote vers les tissus pérennes pour un stockage de l'azote au cours de la période hivernale.

1.3.3.3. Remobilisation printanière de l'azote

Au printemps suivant, les réserves azotées accumulées au niveau des racines et des tiges sont dégradées et les acides aminés résultants sont fournis aux jeunes tissus pendant le débourrement des bourgeons et au début de la période de croissance (Bollmark et al., 1999). La dégradation des protéines de stockage est initiée avant le débourrement (Langheinrich, 1993) et conduit à la libération d'acides aminés au niveau du xylème. La remobilisation de l'azote stocké est utilisée par beaucoup d'arbres pour augmenter la fourniture en nutriments provenant du sol (Millard, 1996). Cette source d'azote est souvent la première, voire même la seule dans certains cas pour la croissance printanière de l'arbre (Millard et Proe, 1991 ; Neilsen et al., 1997 ; Weinbaum et van Kessel, 1998 ; Dyckmans et Flessa, 2001). Chez le peuplier, la mobilisation des protéines BSPs s'accompagne d'un important influx d'acides aminés dans la sève du xylème (Sauter et van Cleve, 1992). La glutamine est d'ailleurs l'acide aminé majeur de cet influx printanier, indiquant que la conversion des acides aminés issus des BSPs a lieu avant l'export (Sauter et van Cleve, 1992). Chez le bouleau, *Betula pendula*, il a été démontré que la remobilisation printanière de l'azote menait à une augmentation d'un facteur 10 de la concentration en citrulline et en glutamine de la sève du xylème (Millard et al., 1998). De façon similaire, une augmentation du taux d'acides aminés dans le xylème a été mesurée chez le pommier, *Malus domestica*, au cours du printemps. Chez le pommier, lors de la remobilisation printanière, les acides aminés majoritaires retrouvés au niveau du xylème sont l'asparagine, la glutamine, le glutamate et l'aspartate (Malaguti et al., 2001). Chez le merisier, *Prunus avium* L., les auteurs ont également observé que la glutamine, l'asparagine et l'aspartate étaient fortement présents dans le xylème au cours du printemps (Grassi et al., 2002). Toutefois, les auteurs émettaient l'hypothèse que la glutamine correspondait plutôt à l'azote remobilisé tandis que l'asparagine reflétait plutôt l'azote issu de l'assimilation racinaire (Grassi et al., 2002). Les variations dans la composition de la sève du xylème au

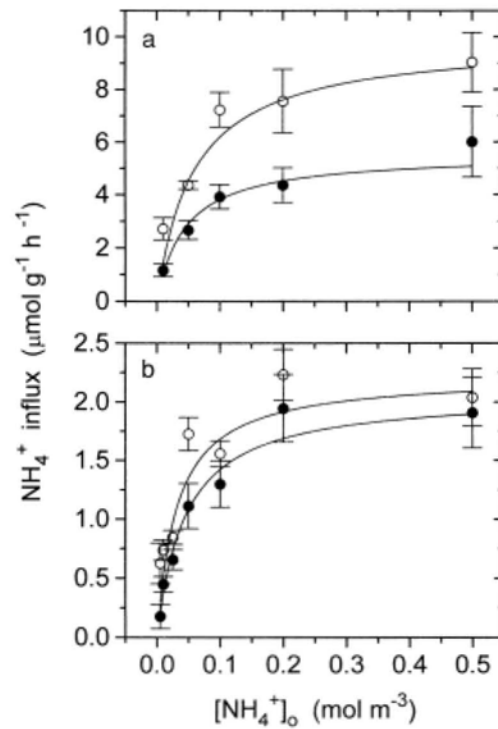


Figure 6 : Absorption d'ammonium par le système HATS des racines de jeunes pousses pré-traitées (o) ou non (●) avec 0,1 mM d'ammonium. Deux types de plantes ont été utilisés : le peuplier-tremble (a) et le pin loblolly (b) (d'après Min et al., 2000).

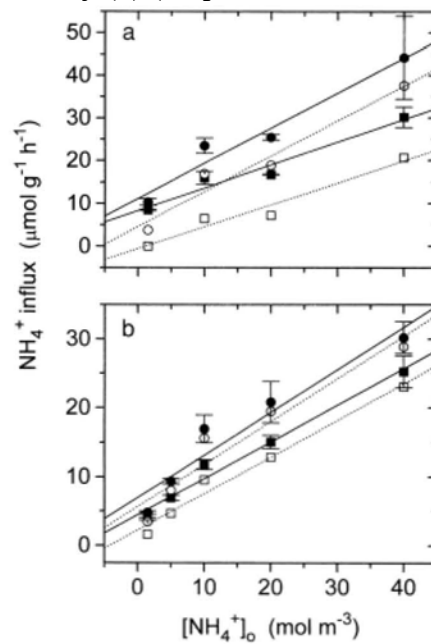


Figure 7 : Absorption d'ammonium par le système LATS des racines de jeunes pousses pré-traitées (o) ou non (●) avec 0,1 mM d'ammonium. Deux types de plantes ont été utilisés : le peuplier-tremble (a) et le pin loblolly (b) (d'après Min et al., 2000).

cours du printemps reflètent l'origine de l'azote qui peut être issu soit de la remobilisation des réserves internes, soit de l'assimilation racinaire. Les acides aminés correspondant à la remobilisation des réserves azotées pourraient donc au moins différer partiellement de ceux utilisés pour le transport de l'azote issu de l'assimilation au niveau des racines (Grassi et al., 2002).

2. Mécanismes de transport de l'ammonium chez les plantes

2.1. Caractérisation biochimique du transport de l'ammonium

L'étude du transport de l'ammonium chez les plantes possède une très longue histoire puisque les premiers travaux concernant l'étude du transport de l'ammonium par le maïs date de 1956 (Becking, 1956). Il a longtemps été considéré que la forme non chargée NH_3 pénétrait dans la plante par diffusion passive au travers des membranes. Cependant l'utilisation de traceurs isotopiques (^{15}N , ^{13}N , ou $[^{14}\text{C}]$ méthylamine) a montré l'existence de systèmes d'entrée d'ammonium saturables, actifs aux faibles concentrations d'ammonium. Les premiers travaux réalisés dans ce sens par Ulrich et al. (1984) ont montré que le transport de l'ammonium par *Lemna minor* présente une cinétique biphasique en fonction de la concentration en ammonium. Le transport est de type actif, saturable lorsque la concentration est inférieure à 67 μM , linéaire et de type diffusif lorsque la concentration est supérieure. Depuis, de nombreux travaux ont démontré l'existence de ces deux systèmes de transport chez les plantes : HATS et LATS.

2.1.1. Le système de transport HATS

Le système de transport HATS (High-Affinity Transport System) fonctionne lorsque la concentration en ammonium est inférieure à 1 mM (Figure 6). La cinétique de transport est de type mickaelienne. Le K_m varie suivant les espèces de 10 à 170 μM (Glass et Siddiqi, 1995). Le transport d'ammonium via ce système est accompagné d'une forte dépolarisation membranaire. Ce résultat, couplé à l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques montre que ce transport est de type uniport énergie dépendant, ou symport proton dépendant (Ulrich et al., 1984 ; Wang et al., 1994). Le statut azoté de la plante réprime ce système de transport par un mécanisme de feedback contrôlé par l'ammonium (von Wiren et al., 1997 ; Gazzarrini et al., 1999 ; Cerezo et al., 2001). Ce mécanisme de régulation ne perdure que quelques jours

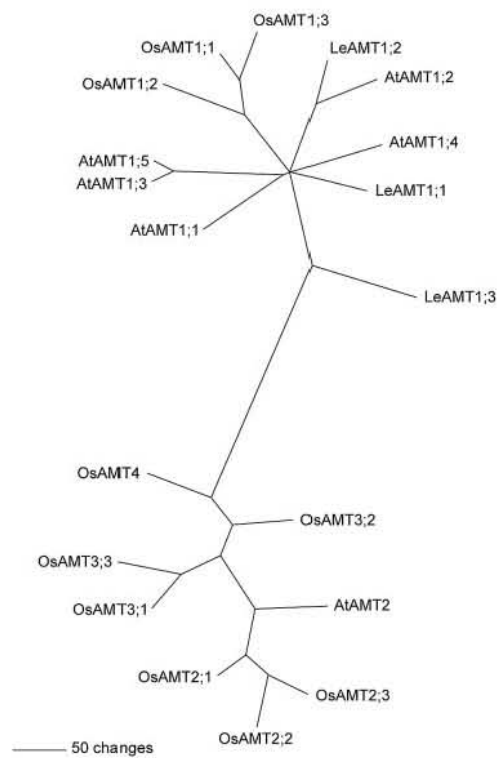


Figure 8 : Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs d'ammonium (AMT) d'*A. thaliana*, du riz et de la tomate. (d'après Loqué et von Wiren, 2004).

(Morgan et Jackson, 1988 ; Clarkson et Lüttge, 1991 ; Gazzarrini et al., 1999 ; Lejay et al., 1999).

2.1.2. Le système de transport LATS

Le système de transport LATS (Low-Affinity Transport System) fonctionne lorsque la concentration en ammonium est supérieure à 1 mM (Figure 7). La cinétique de transport est non saturable (Glass et Siddiqi, 1995). Le transport d'ammonium via ce système n'entraîne pas de dépolarisation membranaire et ne semble pas énergie dépendant, suggérant qu'il facilite la diffusion passive de l'ammoniaque. La régulation de ce système est différente suivant les espèces étudiées. Chez le pin, il semble que ce système soit régulé de la même façon que le système de transport HATS (Kronzucker et al., 1996). Par contre, il a été démontré chez le riz ou *Citrus sp.*, que l'ammonium active ce système de transport (Wang et al., 1993 ; Cerezo et al., 2001).

2.2. Caractérisation moléculaire

Les premiers transporteurs d'ammonium ont été identifiés chez la levure (Marini et al., 1994) et chez *Arabidopsis* (Ninnemann et al., 1997) par complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure déficient pour le système de transport HATS de l'ammonium. Chez les plantes, la famille AMT peut être subdivisée en deux sous familles (Loqué et von Wiren, 2004) (Figure 8). Les membres de la sous famille AMT1 ne présentent pas d'introns, excepté *LjAMT1;1* (Salvemini et al., 2001), tandis que les membres de la sous famille AMT2 présentent plusieurs introns au niveau de leur séquence génomique. Chez le riz, la sous famille AMT2 peut être divisée en trois clades (Suenaga et al., 2003).

2.2.1. Famille AMT1

Plusieurs membres de la sous famille AMT1, incluant des homologues d'*Arabidopsis thaliana* (AtAMT1;1, AtAMT1;2, AtAMT1;3 : Ninnemann et al., 1994, Gazzarrini et al., 1999), *Brassica napus* (BnAMT1;2 : Pearson et al., 2002), *Lotus japonicus* (LjAMT1;1, LjAMT1;2, LjAMT1;3 : Salvemini et al., 2001, D'Apuzzo et al., 2004), *Lycopersicon esculentum* (LeAMT1;1, LeAMT1;2, LeAMT1;3 : Lauter et al., 1996, von Wiren et al., 2000b, Becker et al., 2002, Ludewig et al., 2002) ou *Oryza sativa* (OsAMT1;1, OsAMT1;2,

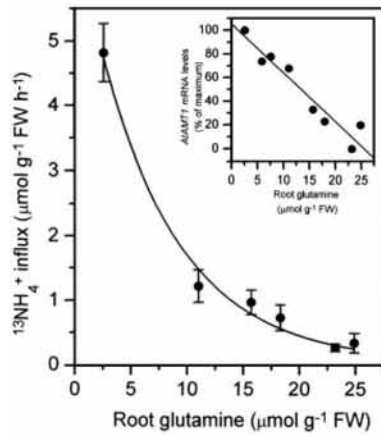


Figure 9 : Corrélation entre l'expression de *AtAMT1;1* et la concentration de glutamine dans des racines d'*A. thaliana* (d'après Rawat et al., 1999)

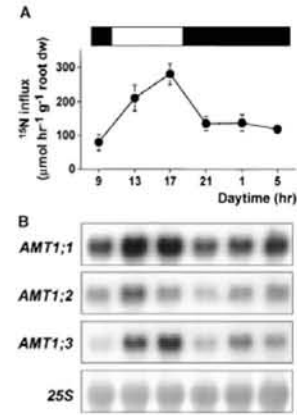


Figure 10 : Relations entre la lumière et l'expression des *AMTs* chez *Arabidopsis*. Suivi journalier du flux au niveau des racines d'*A. thaliana* (A). Suivi journalier de l'expression de différents *AMTs* dans les racines d'*A. thaliana* (d'après Gazzarrini et al., 1999).

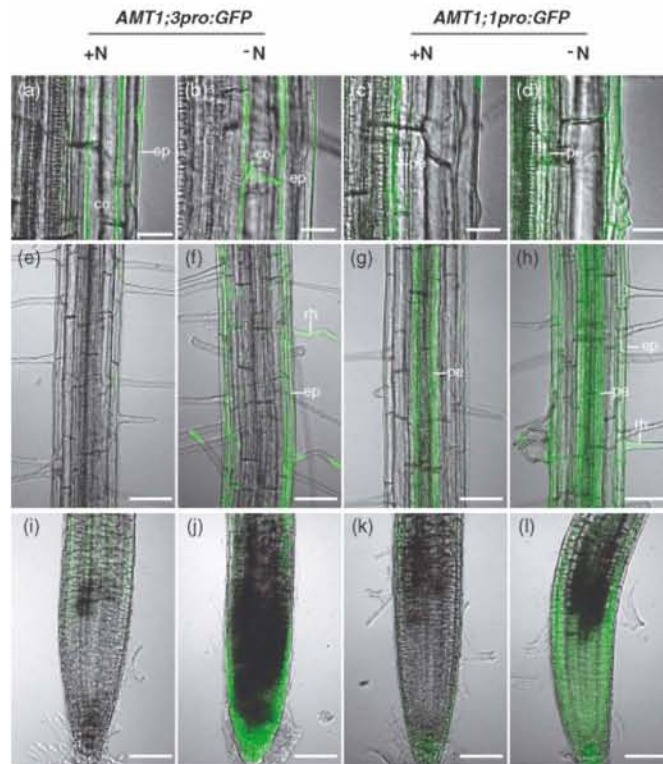


Figure 11 : Localisation de l'expression de *AtAMT1;1* et *AtAMT1;3* en présence et en absence d'azote. Les images correspondent à la partie supérieure (a-d) et à la partie inférieure (e-h) de la zone racinaire présentant des poils absorbants ; et à la pointe racinaire (i-l). Les abréviations utilisées correspondent à cortex (co), épiderme (ep), péricycle (pe), et rhizoderme (rh) (d'après Loqué et al., 2006).

OsAMT1;3 : Sonoda et al., 2003) ont été caractérisés dans la levure ou les ovocytes de Xénope. *AtAMT1;1* code pour un transporteur de haute affinité avec une valeur de K_m inférieure à 0,5 μM et est exprimé dans les racines et dans les feuilles tandis que *AtAMT1;2* et *AtAMT1;3* codent pour des transporteurs de plus faible affinité (valeurs de K_m entre 25 et 40 μM) principalement exprimés dans les racines (Gazzarrini et al., 1999). Exprimé dans le mutant de levure pour le système HATS de transport de l'ammonium, *AtAMT1;2* présente une cinétique biphasique (K_m de 36 μM et 3 mM) de l'absorption de méthylammonium (Shelden et al., 2001).

L'expression des *AMTs* a été étudiée en détails chez *Arabidopsis* et le riz. Les résultats obtenus démontrent une étroite relation entre l'expression de *AtAMT1;1* et *AtAMT1;3* et les concentrations respectives de glutamine (Rawat et al., 1999) (Figure 9) et de sucres (Figure 10) (Gazzarrini et al., 1999 ; Rawat et al., 1999). De récentes études portant sur l'activité des promoteurs de ces deux gènes ont mis en évidence le rôle particulier de ces deux transporteurs dans l'absorption d'ammonium en fonction de la disponibilité en azote du milieu. En effet, *AtAMT1;3* est principalement exprimé au niveau des cellules du rhizoderme, incluant les poils absorbants ainsi que les cellules corticales de cette zone racinaire (Loqué et al., 2006) (Figure 11). De plus, il a été démontré que l'induction de ce gène au niveau du rhizoderme par une carence azotée coïncidait avec une forte augmentation de l'influx d'ammonium dépendant du transporteur *AtAMT1;3*. En considérant la localisation plasmalemmique de ce transporteur, il apparaît que *AtAMT1;3* joue un rôle dans l'absorption d'ammonium dans des conditions suffisantes et déficientes en azote (Loqué et al., 2006).

Contrairement à *AtAMT1;3*, *AtAMT1;1* est exprimé dans les cellules du rhizoderme et les poils absorbants uniquement en situation de carence azotée (Figure 11). Dans des conditions de culture où l'azote est suffisant, *AtAMT1;1* est exprimé dans les cellules du péricycle plutôt que dans les cellules corticales ou rhizodermiques (Figure 11). Ces résultats suggèrent que *AtAMT1;1* représente un système de soutien pour l'absorption de l'ammonium au niveau des racines (Loqué et al., 2006). D'autre part, il a également été démontré que la régulation post-transcriptionnelle du transporteur *AtAMT1;1* était dépendante de l'azote et que cette régulation pouvait se faire indépendamment dans les racines et dans les organes aériens (Yuan et al., 2006).

Concernant *AtAMT1;2*, de récents travaux ont mis en évidence une expression préférentielle au niveau de la membrane plasmalemmique des cellules de l'endoderme racinaire (Figure 12). Au niveau des cellules de l'endoderme, le transport apoplastique trans-cellulaire est bloqué par la cadre de Caspari. Ainsi *AtAMT1;2* permet le transfert de

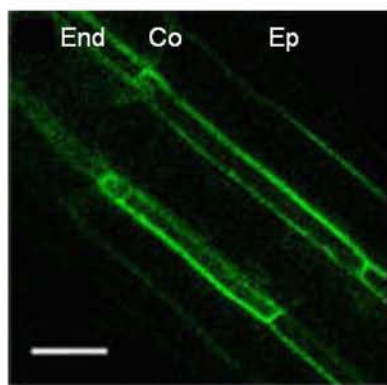


Figure 12 : Expression préférentielle de *AtAMT1;2* dans les cellules de l'endoderme racinaire. Les abréviations utilisées sont cortex (Co), endoderme (End)

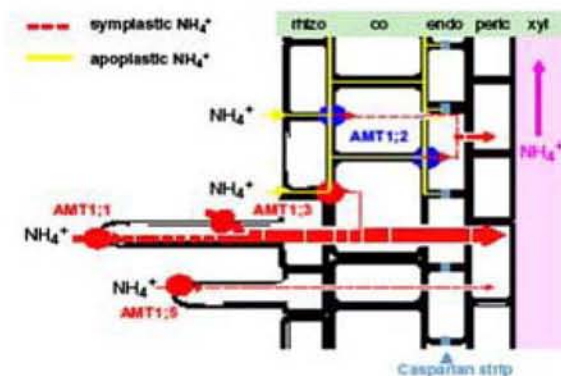


Figure 13 : Rôles des AMTs dans l'absorption et le transfert de l'ammonium au niveau des racines d'*A. thaliana*. Les abréviations utilisées sont cortex (co), endoderme (endo), péricycle (peric), rhizoderme (rhizo) et xylème (xyl) (d'après Yuan et al., 2007).

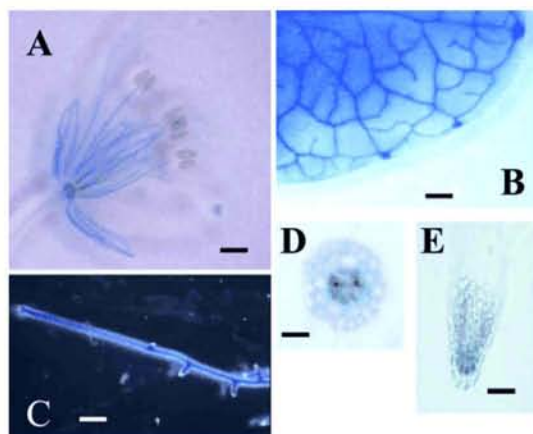


Figure 14 : Localisation de l'expression de *AtAMT2* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS dans différents organes de plants d'*A. thaliana* : fleurs (A), feuille (B), racine (C), coupe transversale de racine (D), pointe racinaire (E) (d'après Sohlenkamp et al., 2002).

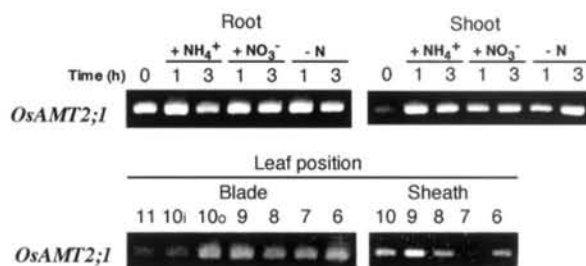


Figure 15 : Analyse de l'expression par RT-PCR des transporteurs *OsAMT2;1* et *OsAMT3;1* dans les racines et les feuilles de jeunes plants de riz ayant poussé en présence d'ammonium, de nitrate ou en absence d'azote (d'après Suenaga et al., 2003).

l'ammonium de l'apoplaste des couches cellulaires externes vers le cytoplasme des cellules de l'endoderme avant un transfert dans la stèle racinaire (Neuhäuser et al., 2007).

AtAMT1;5 est à ce jour le dernier membre de la famille AMT1 caractérisé chez *A. thaliana*. Les transcrits de *AtAMT1;5* s'accumulent au niveau des racines lors d'une carence azotée. De plus, il a également été démontré que *AtAMT1;5* est exprimé dans les cellules du rhizoderme et les poils absorbants (Yuan et al., 2007). *AtAMT1;5* aurait un rôle dans l'absorption de l'ammonium externe au niveau des cellules du rhizoderme et serait responsable de l'absorption résiduelle azote-dépendante de l'ammonium (Yuan et al., 2007). La caractérisation des différents transporteurs d'ammonium présents au niveau des racines d'*A. thaliana* permet de définir le rôle de chaque protéine dans l'absorption et le transfert de l'ammonium entre les différents tissus constituant une racine (Figure 13).

2.2.2. Famille AMT2

Plus récemment, une seconde sous famille de transporteurs d'ammonium (AMT2) avec des caractéristiques biochimiques distinctes a été identifiée chez plusieurs plantes comme *A. thaliana* (Sohlenkamp et al., 2000 ; Sohlenkamp et al., 2002), *L. japonicus* (Simon-Rosin et al., 2003) et *O. sativa* (Suenaga et al., 2003). Les membres de la sous famille AMT2 sont plus fortement reliés aux transporteurs d'ammonium des procaryotes qu'aux transporteurs de la sous famille AMT1. Alors que les membres de la sous famille AMT1 sont préférentiellement exprimés dans les racines, excepté *LeAMT1;3* (von Wiren et al., 2000b), *LjAMT1;1* et *LjAMT1;2* (D'Apuzzo et al., 2004), *AtAMT2* présente une expression plus élevée dans les parties aériennes comparée aux racines (Sohlenkamp et al., 2002) (Figure 14) et *OsAMT2* présente une expression constitutive aussi bien dans les parties aériennes que dans les parties racinaires (Suenaga et al., 2003) (Figure 15).

Les différents motifs d'expression supportent l'idée que les membres de la famille AMT seraient impliqués dans l'absorption d'ammonium au niveau des racines, mais également dans le recyclage de l'ammonium issu de la photorespiration et au moment de la sénescence foliaire (Howitt et al., 2000 ; von Wiren et al., 2000a). L'existence de multiples transporteurs d'ammonium pourrait assurer une spécialisation à l'échelle de l'organe, de la cellule, du tissu, ou de l'organe, en plus de permettre aux cellules de s'adapter à une large gamme de concentrations en ammonium (D'Apuzzo et al., 2004).

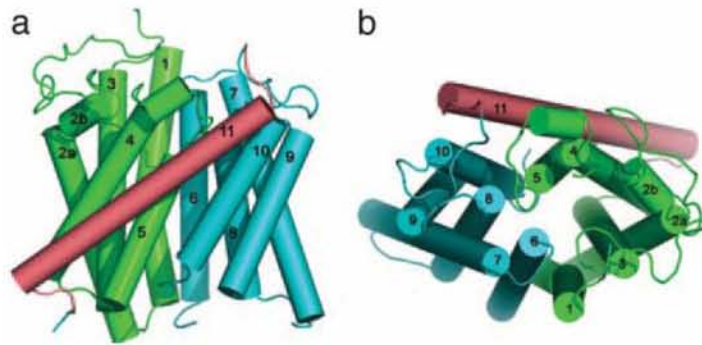


Figure 16 : Représentation topologique d'un monomère de AmtB d'*E. coli* (d'après Zheng et al., 2004)

- (a) Vue de côté (face membranaire)
- (b) Vue de dessus (face extracellulaire)

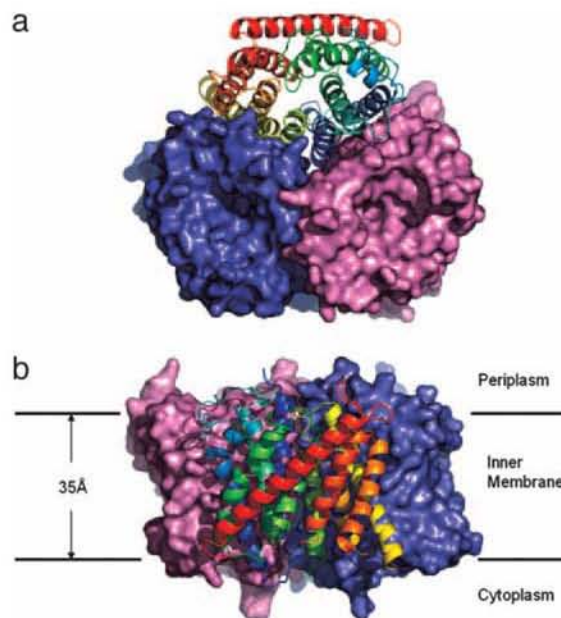


Figure 17 : Structure globale d'un trimère de AmtB d'*E. coli* (d'après Zheng et al., 2004).

- (a) Vue du côté extracellulaire
- (b) Vue de la surface moléculaire

2.2.3. Famille AMT chez les arbres

Le premier transporteur isolé chez un arbre fut le transporteur PttAMT1;2 du peuplier (Selle et al., 2005) qui est un transporteur de haute affinité pour l'ammonium (K_m de 52 μM). L'expression spécifique de *PttAMT1;2* au niveau des racines est dépendante de la nutrition azotée mais aussi plus forte au niveau de la symbiose ectomycorhizienne entre *P. tremula* x *P. tremuloides* et *Amanita muscaria*, suggérant une capacité plus élevée d'absorption de l'ammonium au niveau des racines mycorhizées de peuplier (Selle et al., 2005).

2.2.4. Structure et résolution tridimensionnelle des AMT

Tous les AMTs clonés chez les plantes présentent la même structure secondaire in silico, à 9-11 domaines transmembranaires avec une extrémité N terminale cytosolique et C terminale intracytosolique (Thomas et al., 2000a). Bien que la structure primaire des membres de la famille AMT2 diffère de celle des membres de la famille AMT1, ils présentent la même structure secondaire.

Le transport membranaire de l'ammonium est réalisé par l'intermédiaire de transporteurs d'ammonium présents dans la plupart des organismes (von Wiren et Merrick, 2004). Des premières études avaient mis en évidence des processus d'homo et d'hétéro-oligomérisation des transporteurs d'ammonium chez la tomate (Ludewig et al., 2003). De récentes études de cristallographie par rayons X ont permis de révéler une architecture similaire du transporteur d'ammonium AmtB d'*Escherichia coli* et de son homologue Amt-1 d'*Archaeoglobus fulgidus* (Khademi et al., 2004 ; Zheng et al., 2004, Andrade et al., 2005). Ces protéines sont des homo-trimères où chaque monomère présente un pore en son centre (Figures 16 et 17). Il a été proposé que ces protéines fonctionnent comme des canaux conduisant l'ammoniaque plutôt que comme des transporteurs de l'ion ammonium. Etant donnée la forte homologie observée entre les membres de la famille AMT, il semble vraisemblable que tous les membres de la famille AMT présentent la même structure tertiaire voir quaternaire que les protéines AmtB et Amt-1. Toutefois, plusieurs études de structure des transporteurs LeAMT1;1 et AtAMT1;1 (Mayer et al., 2006 ; Wood et al., 2006) tendent à démontrer un mécanisme différent de transport de l'ammonium chez les plantes. Ainsi, chez les plantes, les transporteurs d'ammonium pourraient transporter spécifiquement l'ammonium ou co-transporter l'ammoniaque et un proton. A l'intérieur d'une même famille, les transporteurs peuvent fonctionner selon différents mécanismes. Ce cas de figure est par

exemple bien illustré chez la famille ClC canaux/transporteurs d'anion. L'homologue de cet famille présent chez *E. coli* fonctionne comme un rapide antiport Cl⁻/H⁺ plutôt qu'un canal à Cl⁻ (Accardi et Miller, 2004). Les différences entre les transporteurs d'ammonium bactériens et végétaux pourraient être une évolution adaptative aux besoins azotés importants des plantes (Ludewig, 2006). De plus il a également été démontré que l'extrémité cytosolique C terminale du transporteur AtAMT1;1 joue un rôle de régulateur de trans-activation allostérique essentiel pour la fonction de transport (Loqué et al., 2007 ; Neuhäuser et al., 2007) (Figure 18). Des modifications par phosphorylation de ce domaine de trans-activation seraient responsables de l'activité régulatrice de ce domaine (Loqué et al., 2007). Des travaux analogues portant sur AtAMT1;2 confirment le rôle régulateur de ce domaine C terminal sur l'activité de transport de l'ammonium (Neuhäuser et al., 2007). Les deux études concluent que la disruption de l'extrémité C terminale d'un seul monomère est suffisante pour inactiver le trimère d'AMTs responsable du transport d'ammonium (Loqué et al., 2007 ; Neuhäuser et al., 2007).

2.2.5. Autres systèmes de transport de l'ammonium

Il est de plus en plus évident que l'ammonium s'accumule dans la vacuole des cellules (Wood et al., 2006 ; Soupene et al., 2001). Des protéines vacuolaires TIP (Tonoplast Intrinsic Protein) capables de transporter l'ammonium et la méthylamine ont été identifiées chez le blé et *Arabidopsis* (Loqué et al., 2005 ; Jahn et al., 2004). Ces protéines appartiennent à la sous famille TIP2 dont les membres sont connus pour transporter l'eau et de petites molécules non chargées. Ceci a d'ailleurs été confirmé pour AtTIP2;1 et AtTIP2;3 qui transportent les formes NH₃ et méthylamine non chargées (Loqué et al., 2005). Les protéines TIPs pourraient donc permettre l'accumulation de l'ammonium dans la vacuole (Figure 19). D'autre part, d'autres aquaporines pourraient aussi faciliter les flux d'ammonium au niveau de la membrane périarbusculaire des plantes endomycorhizées (Uehlein et al., 2007).

2.3. Transferts d'ammonium dans les symbioses

2.3.1 Transport dans la symbiose fixatrice d'azote

La symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique permet aux légumineuses de survivre lorsque les sols sont pauvres en azote (Day et Udvardi, 1992). Durant la formation des nodules, les bactéries se différencient en bactéroïdes ; la division cellulaire s'arrête et le métabolisme azoté passe à un état basé sur la réduction de l'azote

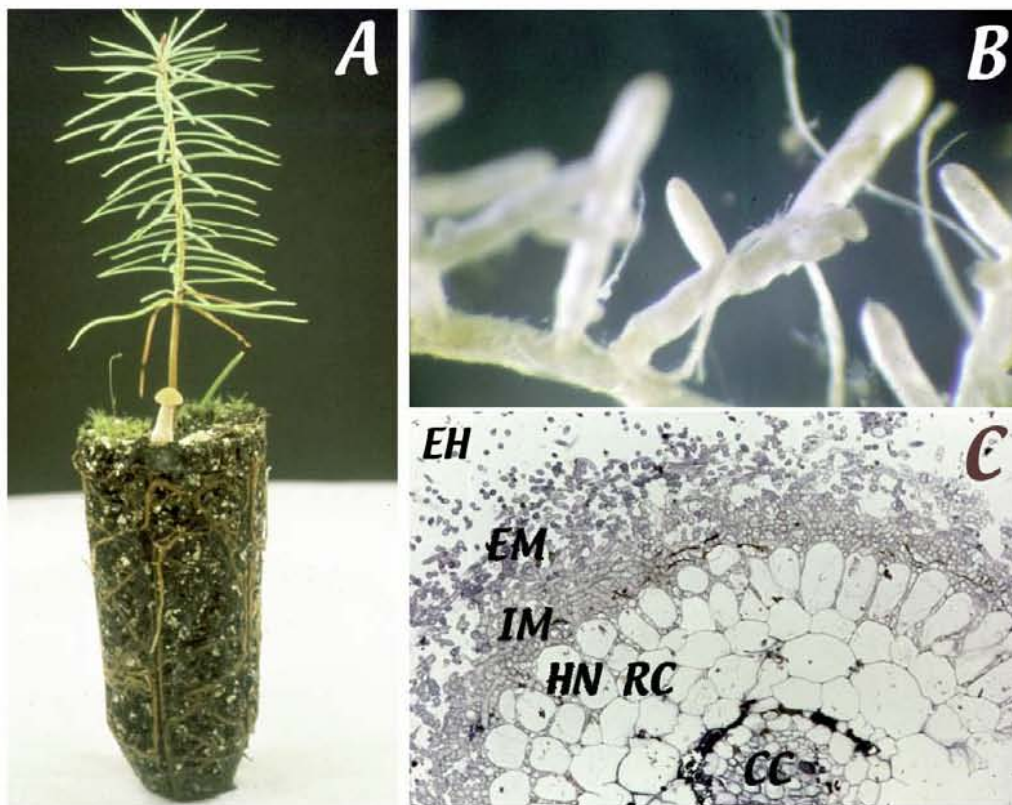


Figure 20 : Morphologie et anatomie des ectomycorhizes.

A : Association de pin Douglas / *Laccaria bicolor*

B : Ectomycorhizes de pin Douglas / *Laccaria bicolor*

C : Coupe transversale d'un apex mycorhizien (EH : hyphes extramatricielles, EM : manteau externe, IM : manteau interne, HN : réseau de Hartig, RC : cellules corticales racinaires, CC : cylindre central)

atmosphérique en ammonium, lequel serait alors exporté hors de la cellule. Ces bactéroïdes se retrouvent dans les racines, au sein des cellules des nodules, où ils sont entourés d'une membrane dérivée de la plante, la membrane pér bactéroïdienne. Au travers de cette membrane, la plante reçoit l'azote fixé en échange de carbone réduit (Udvardi et al., 1986). Il a été proposé que l'azote fixé serait exporté par diffusion passive sous forme réduite NH_3 au travers de la membrane bactéroïdienne (Glenn et Dilworth, 1984). Dans l'espace pér bactéroïdien, le pH acide favoriserait alors la formation de la forme chargée NH_4^+ , ensuite incorporée par la plante. La technique du patch-clamp a permis de mettre en évidence l'existence d'un canal à NH_4^+ dans la membrane pér bactéroïdienne lors de la symbiose entre le soja et *Bradyrhizobium japonicum* (Tyerman et al., 1995). Ce canal jouerait un rôle important dans l'incorporation par la plante de l'ammonium délivré par le bactéroïde. Il a été aussi proposé que l'alanine pourrait contribuer aux échanges d'azote dans la symbiose et non l'ammonium (Waters et al., 1998).

Chez le soja (*Glycine max*) en symbiose avec la bactérie *Bradyrhizobium japonicum*, le gène *SAT1*, cloné par complémentation de levure déficiente en transporteur d'ammonium, a tout d'abord été présenté comme un canal à ammonium préférentiellement exprimé au niveau de la membrane pér bactéroïdienne (Kaiser et al., 1998). Toutefois, il a été montré qu'il s'agissait en fait d'un facteur de transcription homologue au facteur de la famille bHLH, qui, exprimé dans la levure, aurait une action sur Mep3 (Marini et al., 2000c).

Il a aussi été démontré que le transporteur racinaire *LeAMT1;2* est induit chez la tomate lors de l'établissement de la symbiose avec *Azospirillum brasilense*. Les auteurs ont montré que la bactérie excrète de l'ammonium qui induit, via un mécanisme de sensing non caractérisé, l'expression de *LeAMT1;2*, ce qui permet à la plante d'absorber l'ammonium produit par la bactérie (Becker et al., 2002).

2.3.2 Transport dans la symbiose mycorhizienne

Les mycorhizes sont des structures mixtes formées par un champignon et un végétal supérieur. Cette association est qualifiée de symbiotique puisqu'elle est basée sur des échanges réciproques entre les deux partenaires. Il en existe plusieurs types distincts selon leur structure et les espèces végétales et fongiques concernées.

Les ectomycorhizes sont formées par l'association d'un champignon de l'ordre des Basidiomycètes, Ascomycètes ou Zygomycètes, et d'un partenaire végétal appartenant aux Angiospermes ou Gymnospermes (Figure 20). L'organe symbiotique est constitué de trois

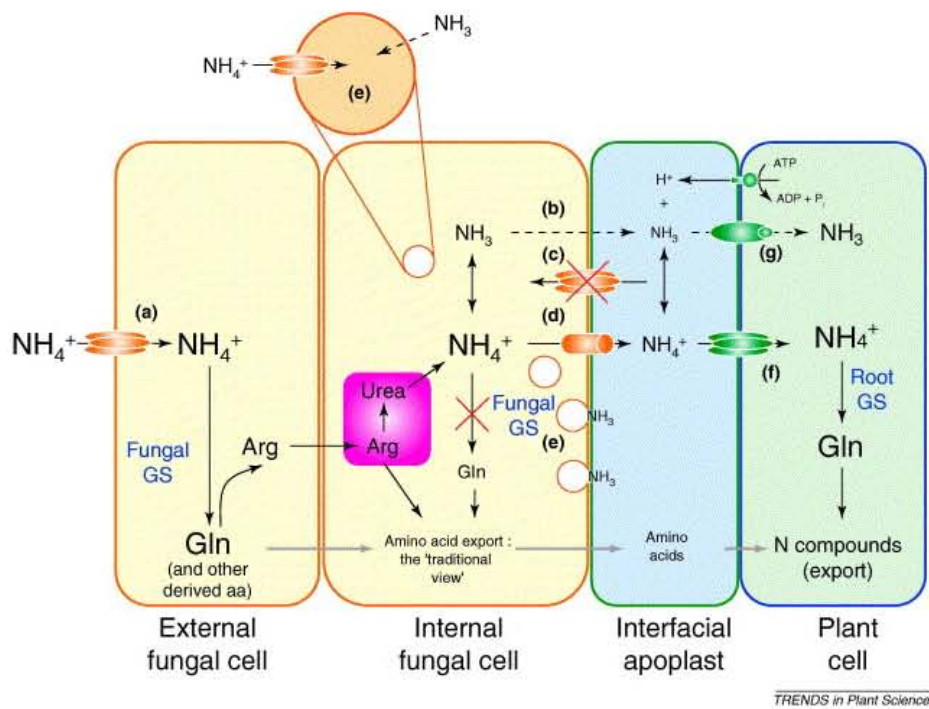


Figure 21 : Transfert d'ammonium et d'acides aminés entre le partenaire fongique et le partenaire végétal au sein de la symbiose mycorhizienne (d'après Chalot et al., 2006). L'ammonium du sol est absorbé par les transporteurs d'ammonium présents au niveau de la membrane plasmalemmique des hyphes externes (a). Le transfert d'azote sous forme d'acides aminés ou d'ammonium, entre le champignon et la plante s'effectue au niveau de l'interface apoplastique (b, c, d). Le transfert de l'ammonium de l'interface apoplastique vers le cytoplasme des cellules du partenaire végétal impliquerait des transporteurs d'ammonium (f) ou des canaux non spécifiques (g). Les abréviations utilisées sont : Arg, arginine; Gln, glutamine; GS, glutamine synthétase.

parties : un réseau d'hyphes (réseau de Hartig) qui s'insinuent entre les cellules corticales de la racine sans les pénétrer, un manteau qui forme une sorte de manchon autour de la racine et un réseau d'hyphes extramatricielles qui assurent le lien entre le sol et le manteau de l'ectomycorhize et par conséquent, la racine.

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules sont formées par l'association d'un champignon de l'ordre des Glomales et une grande variété de partenaires végétaux incluant les Bryophytes, presque que tous les groupes de Ptéridophytes, les Gymnospermes et certains Angiospermes. A la différence des ectomycorhizes, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules racinaires et forme des structures intracellulaires, les arbuscules et les vésicules. L'efficacité de la symbiose repose sur les capacités du champignon à transférer les éléments nutritifs à la plante (Hobbie et Colpaert, 2003). La nature chimique de l'azote transféré au niveau de l'interface champignon/plante hôte est encore à ce jour matière à débat.

Communément, il était admis que les acides aminés étaient transférés du champignon vers la plante hôte (Smith et Read, 1997 ; Chalot et Brun 1998 ; Javelle et al., 2004). Cependant, le transfert d'azote sous forme d'acides aminés a été remis en cause par Bago et al. (2001). D'après leurs observations, l'arginine, élément clé des systèmes de translocation vacuolaires, pourrait être transportée des hyphes extracellulaires vers les hyphes intracellulaires du champignon et être catabolisée via le cycle de l'urée en ammonium. D'autre part, des études concernant le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* suggèrent que l'ammonium est exporté par les hyphes intraradiculaires au niveau de la symbiose arbusculaire (Govindarajulu et al., 2005 ; Jin et al., 2005). D'autres études portant sur des transporteurs d'ammonium au sein de la symbiose ectomycorhizienne *P. tremula* x *P. tremuloides*/*Amanita muscaria* laissent penser à un transfert d'ammonium entre les deux partenaires (Selle et al., 2005 ; Willmann et al., 2007). L'ammonium pourrait être une forme majeure d'azote délivré à la plante par le champignon au niveau de la symbiose mycorhizienne (Chalot et al., 2006) (Figure 21).

3. Mécanismes de transport des acides aminés chez les plantes

3.1. Caractérisation biochimique et moléculaire

Des études physiologiques portant sur des tissus entiers, des cellules individuelles ou sur des vésicules membranaires indiquaient que le transport des acides aminés chez les plantes s'effectue grâce à des transporteurs ayant des spécificités communes, couplant le gradient potentiel électrochimique de protons H^+ à une accumulation active secondaire des

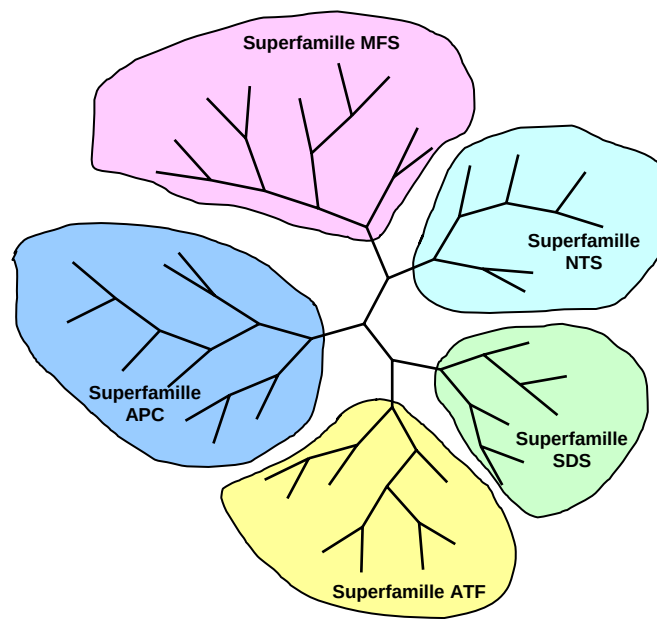


Figure 22 : Arbre phylogénétique des cinq superfamilles de transporteurs d'acides aminés répertoriés chez les animaux, les champignons et les plantes.

acides aminés (Bush, 1993 ; Fischer et al., 1998). Au cours des dernières années, de grands progrès ont été réalisés en élucidant l'identité moléculaire des protéines et en soulignant leurs activités physiologiques. Les premiers transporteurs d'acides aminés des plantes ont été identifiés à l'aide de mutants de levure déficients dans le transport de certains acides aminés. Par la suite, les systèmes d'expression hétérologue tels que les ovocytes de *Xénope* et les mutants de levure ont permis l'identification d'un grand nombre de transporteurs d'acides aminés au niveau de la membrane plasmalemmique pour les différents règnes eucaryotes (Wipf et al., 2002).

En prenant en compte la complexité de la compartimentation du métabolisme azoté à l'intérieur d'une cellule, ainsi que la multiplicité des types cellulaires impliqués dans le système de transport à longue distance, l'hypothèse de multiples gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés peut être envisagée (Fischer et al., 1998). En considérant les trois règnes vivants que constituent les animaux, les champignons et les plantes, les transporteurs d'acides aminés connus peuvent être répartis en cinq superfamilles (Figure 22). Deux superfamilles de transporteurs couplés préférentiellement au sodium, SDS (Sodium Dicarboxylate Symporter family) et NTS (NeuroTransmitter Superfamily) ne sont pas représentées chez les champignons et les plantes. Les membres des autres superfamilles incluant la superfamille APC (Amino acid Polyamine Choline), la superfamille ATF (Amino acid Transporter superfamily) et la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily) fonctionnent souvent comme des systèmes couplés aux protons et sont présents dans tous les génomes examinés. Des superfamilles additionnelles existent pour le transport au niveau des organites, incluant les transporteurs mitochondriaux et plastidiques. Les transporteurs d'acides aminés jouent un grand rôle chez tous les organismes vivants, ce qui explique leur nombre important supposé chez certaines espèces : 24 chez *Saccharomyces cerevisiae*, 46 chez *Homo sapiens* et 53 chez *Arabidopsis thaliana* (Wipf et al., 2002). Chez les végétaux, en omettant les transporteurs spécifiques aux organites, les transporteurs d'acides aminés appartiennent aux superfamilles ATF et APC.

3.2. La superfamille ATF

3.2.1. Généralités

La première superfamille de transporteurs d'acides aminés représentée chez les plantes est la superfamille ATF (Figure 23). Alors que les autres superfamilles de transporteurs d'acides aminés ont d'abord été décrites chez les autres règnes eucaryotes, les membres ATF

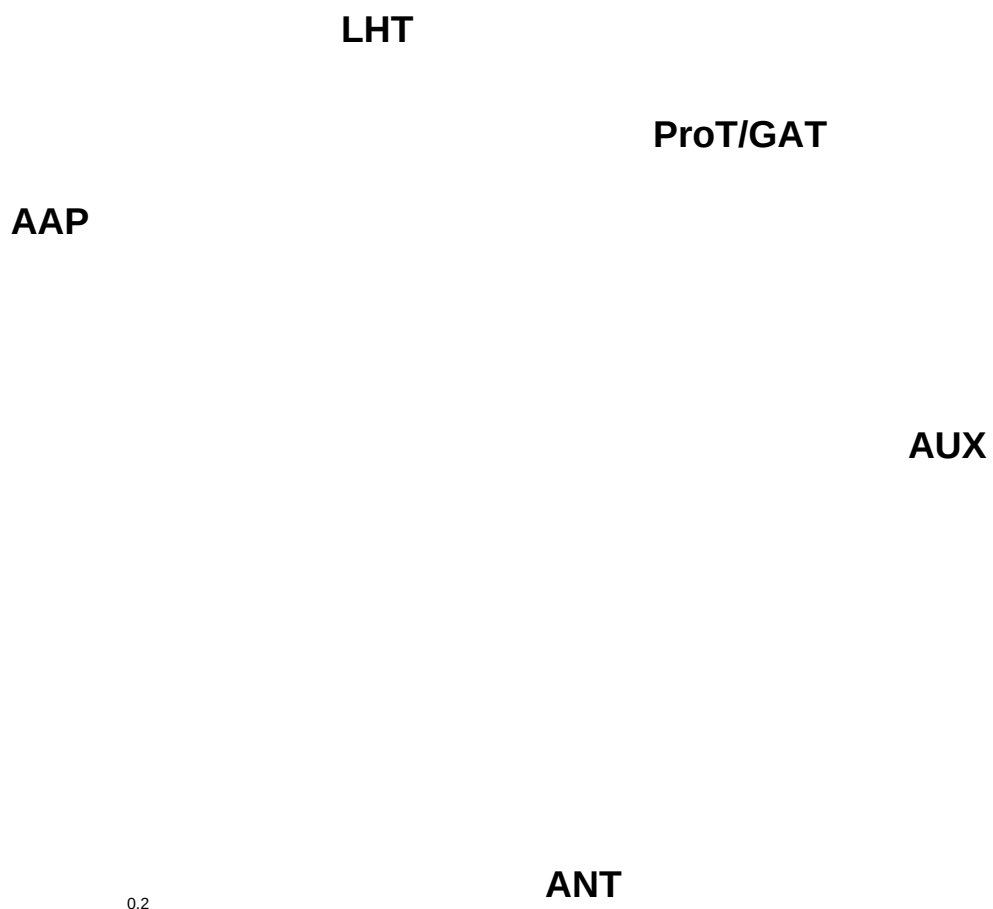


Figure 23 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining (NJ) de la superfamille ATF de transporteurs d'acides aminés chez les plantes.

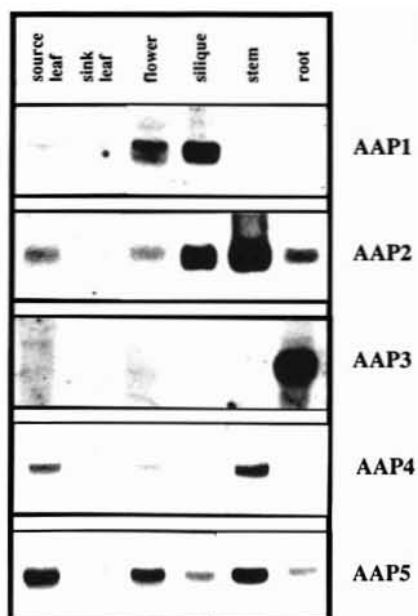


Figure 24 : Expression de membres de la famille AAP dans différents organes chez *A. thaliana* (d'après Fischer et al., 1995).

ont été décrits en premier lieu chez les plantes (Hsu et al., 1993). Les homologues ATF des mammifères sont fortement reliés aux gènes des plantes qui n'ont pas encore été caractérisés, cependant, dans leur fonctionnement dans la prise cellulaire des acides aminés, ils ressemblent aux transporteurs des plantes. La principale différence se situe au niveau du mécanisme de couplage, les homologues ATF des animaux couplant le transport des acides aminés aux gradients de sodium alors que les homologues ATF des plantes fonctionnent comme des protons / acides aminés symport.

La majorité des transporteurs d'acides aminés caractérisés chez les plantes appartient à la superfamille ATF. Les membres ATF possèdent entre 9 et 11 domaines transmembranaires putatifs avec une extrémité N terminale cytosolique et une extrémité C terminale extracellulaire (Chang et Bush, 1997). Chez *Arabidopsis*, la superfamille ATF peut se diviser au moins en cinq familles de transporteurs d'acides aminés (Figure 23) : la famille AAP (Amino Acid Permeases) (Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993), la famille LHT (Lysine/Histidine Transporters) (LHT) (Chen et Bush, 1997), la famille ProT (Proline Transporters) (Rentsch et al., 1996), la famille ANT (Aromatic and Neutral amino acid Transporters) (Chen et al., 2001) et la famille AUX (Auxin Transporters) (Bennett et al., 1996).

3.2.2. La famille AAP

3.2.2.1. Les membres AAP d'*Arabidopsis thaliana*

La famille AAP est la famille de transporteurs d'acides aminés la mieux étudiée (Boorer et al., 1995 ; Boorer et Fischer, 1997 ; Fischer et al., 1995, 2002 ; Okumoto et al., 2002, 2004). Les membres de cette famille sont préférentiellement exprimés dans les tissus vasculaires, fonctionnent grâce au gradient de protons et transportent un large spectre d'acides aminés (Fischer et al., 2002). La large spécificité des transporteurs d'acides aminés est unique chez les plantes et pourrait représenter une adaptation aux multiples conditions où le spectre entier des produits protéolytiques doit être mobilisé comme lors de la germination ou la sénescence (Frommer et al., 1995).

Chez *A. thaliana*, les membres de la famille AAP se distinguent notamment par leur spécificité d'expression tissulaire. *AtAAP1* est exprimé uniquement au niveau des graines alors que *AtAAP2* est exprimé dans la majorité des tissus (Hirner et al., 1998) (Figures 24 et 25). De plus, il a été démontré que chez des plantes carencées en azote, l'expression de

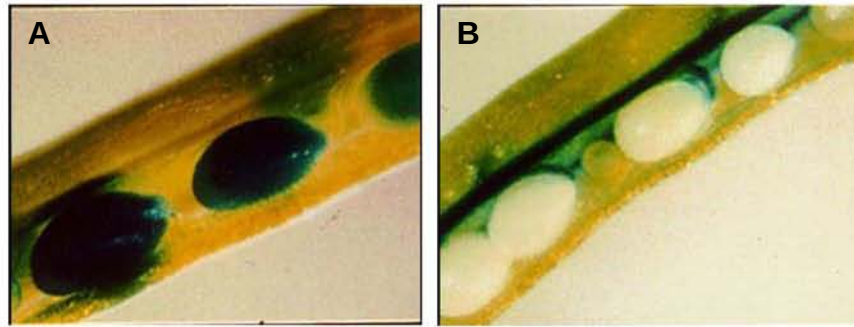


Figure 25 : Localisation de l'expression des gènes *AtAAP1* et *AtAAP2* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS dans les siliques d'*A. thaliana* (d'après Hirner et al., 1998).

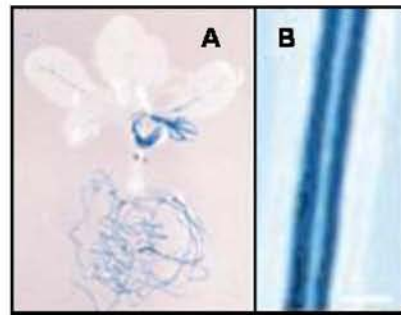


Figure 26 : Localisation de l'expression du gène *AtAAP3* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtAAP3* est exprimé au niveau des racines (A), notamment dans les tissus vasculaires (B) (d'après Okumoto et al., 2004).

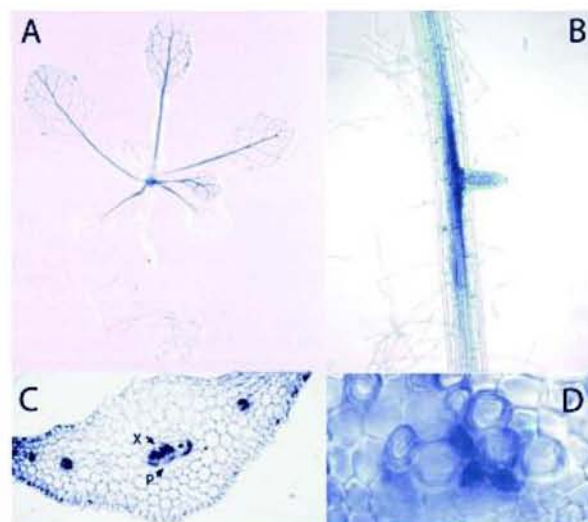


Figure 27 : Localisation de l'expression du gène *AtAAP6* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtAAP6* est exprimé au niveau des vaisseaux des feuilles (A), et des racines (B). Des coupes transversales de pétiole révèlent une expression localisée dans les cellules adjacentes au xylème (C et D) (d'après Okumoto et al., 2002).

AtAAP1 est induite par le nitrate au bout de 30 min (Ortiz-Lopez et al., 2000) et que cette induction n'est pas affectée par un inhibiteur de la nitrate réductase, suggérant que le nitrate constitue la molécule signal pour la régulation de l'expression de *AtAAP1* (Guo, 2004). *AtAAP1* est aussi surexprimé en présence de 30 mM de saccharose ou de glucose (Guo, 2004). Des analyses d'expression par micro-array ont également mis en évidence que l'expression de *AtAAP2* était induite par le glutamate (Guo, 2004). *AtAAP1* est localisé au niveau de la membrane plasmalemmique des cellules de l'épiderme racinaire mais aussi des poils absorbants et des cellules de la pointe racinaire (Lee et al., 2007) et il présente une affinité particulière pour le glutamate, l'histidine et les acides aminés neutres comme la phénylalanine. Ce transporteur a un rôle important dans l'utilisation des ressources azotées présentes au niveau de la rhizosphère (Lee et al., 2007).

AtAAP2 jouerait un rôle important dans le transport à longue distance des acides aminés (Hirner et al., 1998 ; Ortiz-Lopez et al., 2000). L'expression de *AtAAP3* est restreinte aux racines et aux pétales, laissant penser que ce transporteur pourrait être impliqué dans l'absorption d'acides aminés provenant du phloème et du sol (Fischer et al., 1998) (Figure 24 et 26). De plus, l'expression de *AtAAP3* a également été observée pendant une courte période au niveau du tissu connectif des étamine avant la déhiscence (Okumoto et al., 2004). *AtAAP5* serait impliqué dans le chargement du phloème au niveau des tissus « sources » (Hsu et al., 1993 ; Fischer et al., 1995 ; Hirner et al., 1998) et dans le transport des acides aminés vers l'embryon en développement (Ortiz-Lopez et al., 2000) (Figure 24). L'expression de *AtAAP6* était principalement détectée au niveau des racines et des feuilles « puits » (Fischer et al., 1995) (Figure 27). *AtAAP6* est un transporteur à haute affinité pour la plupart des acides aminés neutres et acides (Fischer et al., 2002). De plus, il a aussi été montré que *AtAAP6* était exprimé dans les cellules du parenchyme du xylème, suggérant que *AtAAP6* pourrait prendre en charges des acides aminés provenant du xylème. En effet, étant donnée la faible concentration en acides aminés dans la sève du xylème, la présence d'un transporteur à haute affinité semble nécessaire (Okumoto et al., 2002). D'autre part, des analyses d'expression par micro-array ont démontré que la glutamine réprimait l'expression de *AtAAP6* (Guo, 2004). Le dernier membre caractérisé de cette famille, *AtAAP8*, est notamment exprimé dans les jeunes siliques et les graines en développement (Okumoto et al., 2002) (Figure 28). Récemment il a été démontré que *AtAAP8* est un transporteur de haute affinité pour l'aspartate et le glutamate et qu'il joue un rôle important dans le transfert d'acides aminés vers l'endosperme et dans l'approvisionnement de l'embryon au début de l'embryogénèse (Schmidt et al., 2007).

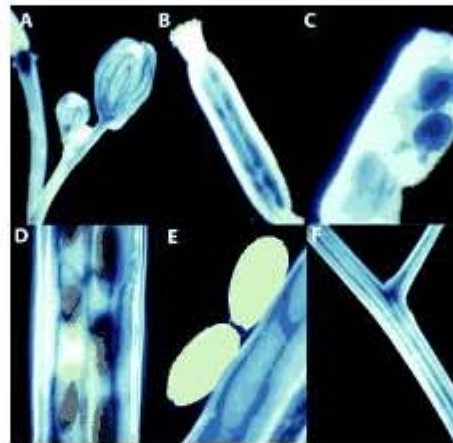


Figure 28 : Localisation de l'expression du gène *AtAAP8* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtAAP8* est exprimé au niveau des vaisseaux des jeunes fleurs et du pédoncule (A), et des graines en formation, 4 jours après pollinisation (B et C). *AtAAP8* est également exprimé au niveau des vaisseaux des gousses 7 à 9 jours après pollinisation (D, E et F) (d'après Okumoto et al., 2002).

3.2.2.2. Les membres AAP des autres plantes

D'autres membres de la famille AAP ont été isolés chez d'autres espèces végétales. Les différentes études ont par ailleurs montré que ces transporteurs présentaient des propriétés biochimiques comparables à celles des transporteurs AAP caractérisés d'*A. thaliana*. Ceci suggère que la fonction des transporteurs d'acides aminés est conservée chez les plantes supérieures (Rentsch et al., 2007). Cependant des différences de spécificité cellulaire et de taux d'expression ont été observées entre orthologues (Liu et Bush, 2006). Par exemple, le transporteur RcAAP3 présente un spectre d'affinité similaire à celui d'AtAAP3, orthologue le plus proche d'*A. thaliana*. Toutefois, AtAAP3 est principalement exprimé au niveau des racines tandis que RcAAP3 est exprimé aussi bien dans les tissus « source » que les tissus « puits » (Neelam et al., 1999). PsAAP1 et VfAAP1 ont plutôt un rôle dans l'import des acides aminés au niveau de la graine et des cotylédons (Tegeder et al., 2000 ; Miranda et al., 2001 ; Rolletschek et al., 2005). Il peut également être noté que l'expression de VfAAP1 est réprimée chez les cotylédons cultivés en présence de glutamine et de cystéine (Miranda et al., 2001). Quant à StAAP1, il aurait un rôle dans le transfert des acides aminés au niveau de l'interface entre les cellules compagnes et les éléments conducteurs du phloème pour le transfert à longue distance vers les tissus « puits » (Koch et al., 2003). En effet, il a été démontré que la répression anti-sens de ce transporteur spécifique des feuilles matures conduisait à une réduction de la teneur en acides aminés des tubercules (Koch et al., 2003).

3.2.3. Famille LHT

AtLHT1 fut le premier membre caractérisé de cette famille de transporteurs d'acides aminés. L'expression de ce gène a été mise en évidence au niveau de racines de jeunes plantules ainsi que dans le pollen, suggérant un rôle dans les transferts des acides aminés du sol mais aussi dans les tissus « puits » (Chen and Bush, 1997). Plus récemment, il a été démontré que AtLHT1 était également exprimé au niveau du rhizoderme et du mésophylle d'*A. thaliana* (Hirner et al., 2006). D'autre part, l'expression de AtLHT1 dans des mutants lht1 contrebalançait les défauts de croissance de ces mutants sur un sol fertilisé. AtLHT1 aurait donc deux fonctions majeures : l'absorption d'acides aminés au niveau des racines et l'approvisionnement du mésophylle foliaire avec des acides aminés provenant du xylème (Hirner et al., 2006).

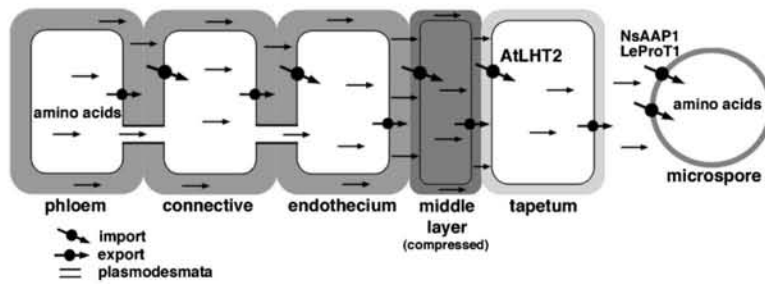


Figure 29 : Hypothèse de transfert des acides aminés et rôle de AtLHT2 dans les anthères matures d'*A. thaliana* (d'après Lee et Tegeder, 2004). AtLHT2 serait responsable du transfert des acides aminés neutres et acides vers les cellules du tapetum.

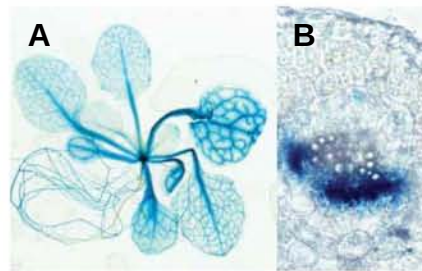


Figure 30 : Localisation de l'expression du gène *AtProT1* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtProT1* est exprimé dans le phloème et les parenchymes de l'ensemble de la plante (A et B) (d'après Grallath et al., 2005).

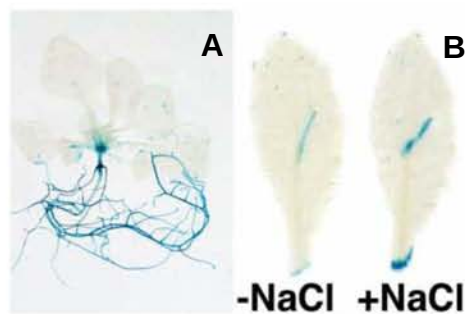


Figure 31 : Localisation de l'expression du gène *AtProT2* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtProT2* est principalement exprimé dans les parties racinaires (A) mais également dans les feuilles, notamment lors d'un stress salin (B) (d'après Grallath et al., 2005).

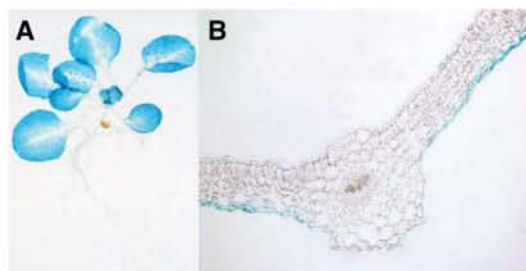


Figure 32 : Localisation de l'expression du gène *AtProT3* par fusion promoteur-gène rapporteur GUS chez *A. thaliana*. *AtProT3* est principalement exprimé dans les parties aériennes (A) et notamment les feuilles (B) (d'après Grallath et al., 2005).

Un autre membre de cette famille a également été caractérisé chez *A. thaliana*. L'expression de *AtLHT2* a été spécifiquement détectée dans les cellules du tapetum. *AtLHT2* est un transporteur de haute affinité pour la proline et l'aspartate qui joue un rôle important dans le cloisonnement des acides aminés pour les microspores (Lee et Tegeder, 2004) (Figure 29).

3.2.4. La famille ProT/GAT

Chez *A. thaliana*, l'expression de trois transporteurs de proline a été mise en évidence (Rentsch et al., 1996 ; Grallath et al., 2005). Outre la proline, ces trois transporteurs peuvent également prendre en charge d'autres composés comme la glycine bêtaïne et l'acide γ -aminobutyrique (GABA). En effet, ces transporteurs possèdent une affinité variant de 0,4 à 1 mM pour la proline ; 0,1 à 0,3 mM pour la glycine bêtaïne et 4 à 5 mM pour le GABA, chez *A. thaliana* (Grallath et al., 2005). *AtProT1* est exprimé dans le phloème et les parenchymes de l'ensemble de la plante (Figure 30). D'autre part, *AtProT1* est localisé au niveau de la membrane plasmalemmique des cellules. Ce transporteur plutôt impliqué dans le transfert à longue distance via le phloème et le transfert entre xylème et phloème (Grallath et al., 2005). *AtProT2* est exprimé au niveau de l'épiderme et du cortex racinaire mais aussi au niveau des feuilles mais seulement après blessure (Grallath et al., 2005). D'autre part, le stress salin engendre une augmentation du taux de transcrits de ce gène lors d'un stress salin. *AtProT2* est localisé au niveau de la membrane plasmalemmique et serait impliqué dans la réponse aux stress hydrique et salin chez *A. thaliana* (Rentsch et al., 1996 ; Grallath et al., 2005) (Figure 31). La surexpression de transporteurs de proline en réponse à des stress salin et hydrique a également été mise en évidence chez d'autres plantes (Ueda et al., 2001, Shen et al., 2002). *AtProT3* est principalement exprimé dans les parties aériennes de la plante et notamment dans les feuilles et les organes floraux (Figure 32). Il pourrait être impliqué dans le trafic intracellulaire de la proline. En effet, des expériences de localisation de cette protéine fusionnée à la GFP ont révélé une localisation plasmalemmique et au niveau des organites (Grallath et al., 2005).

Le génome d'*A. thaliana* contient deux autres membres de la superfamille ATF présentant un fort degré d'homologie avec les gènes codant pour des transporteurs de proline. Un de ces deux membres a été récemment caractérisé, il s'agit de *AtGAT1* (Meyer et al., 2006). Ce gène code pour un transporteur de haute affinité pour le GABA localisé au niveau de la membrane plasmalemmique des cellules. Contrairement aux trois transporteurs de

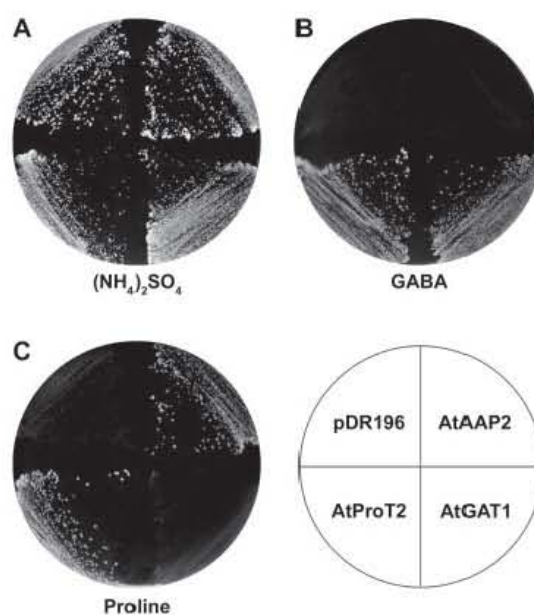


Figure 33 : Complémentation fonctionnelle de la souche de levure 22574d, déficiente pour l'absorption de proline et de GABA par AtGAT1. Les cellules exprimant AtGAT1, AtProT2, AtAAP2 ainsi que les cellules transformées avec le vecteur vide pDR196 sont cultivées sur un milieu contenant soit du sulfate d'ammonium à 5g/l (A), soit du GABA (B) ou de la proline (C) à 1g/l comme seule source d'azote (d'après Meyer et al., 2006).

proline décrits précédemment, AtGAT1 ne prend pas en charge la proline et la glycine bêtaïne (Figure 33). *AtGAT1* est fortement exprimé dans les fleurs et dans des conditions où le GABA est présent en forte concentration, comme lors des phénomènes de blessure et de sénescence (Meyer et al., 2006).

3.2.5. La famille ANT

A ce jour, un seul membre de cette famille a été caractérisé, il s'agit d'AtANT1. Ce gène est exprimé dans tous les organes de la plante, avec une expression très forte au niveau des fleurs et des feuilles (Chen et al., 2001). AtANT1 transporte préférentiellement les acides aminés aromatiques et neutres mais aussi d'autres composés analogues comme l'acide 3 indol-acétique et l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (Chen et al., 2001).

3.2.6. La famille AUX

Les membres de la famille AUX sont reliés à des transporteurs putatifs d'auxine. Basé sur le phénotype du mutant *aux1* d'*A. thaliana*, un rôle d'AtAUX1 dans le transport de l'auxine qui est structurellement relié au tryptophane, a longtemps été postulé (Bennett et al., 1996). Toutefois, le transport de l'acide-3-indol-acétique a seulement été démontré récemment (Yang et al., 2006)

3.2.7. Les autres membres ATF

A ce jour, chez les plantes, un nombre non négligeable de la superfamille ATF n'a pas encore été caractérisé. Les analyses phylogénétiques semblent indiquer que certains de ces membres sont reliés aux transporteurs AVT présents chez la levure (Wipf et al., 2002). Les transporteurs AVT sont responsables du transport des acides aminés vers et en dehors des vacuoles (Rusnak et al., 2001). AVT1 est un proton-antiport qui intervient dans la compartimentation des acides aminés neutres dans la vacuole tandis que l'export des acides aminés de la vacuole est plutôt réalisé par AVT3, AVT4 et AVT6 qui fonctionnent probablement comme des protons cotransporteurs (Rusnak et al., 2001).

Hormis un rôle dans le transport des acides aminés au niveau plasmique, certains membres ATF fonctionnent dans l'import ou l'export de solutés dans les vésicules intracellulaires et les vacuoles. Chez les animaux, les acides aminés sont concentrés dans des

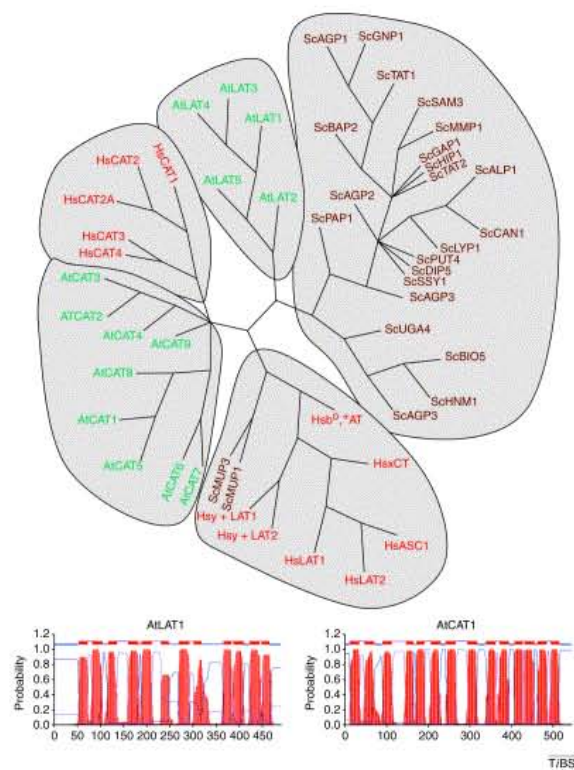


Figure 34 : Arbre phylogénétique de la superfamille APC des transporteurs d'acides aminés présents chez les plantes, les animaux et la levure (d'après Wipf et al., 2002).

vésicules intracellulaires par un proton symport. Chez la levure, des transporteurs permettent le transport des acides aminés vers et hors des vacuoles (Rusnak *et al.*, 2001). En résumé une multitude de mécanismes de transport est réalisée par les membres de la superfamille ATF qui sont impliqués dans la prise et la redistribution des acides aminés entre les organes et les compartiments intracellulaires.

3.3. La superfamille APC

3.3.1 Généralités

La deuxième superfamille de transporteurs d'acides aminés représentée chez les plantes est la superfamille APC (Figure 34). Des analyses phylogénétiques montrent que les membres APC peuvent être répartis dans trois groupes reflétant les trois règnes, champignons, plantes et animaux. D'autre part, des homologues APC ont également été identifiés chez les bactéries (Jack *et al.*, 2000). Les membres APC appartenant au règne des animaux et des végétaux peuvent être répartis dans deux sous groupes. Les membres de la famille des transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) possèdent 14 domaines transmembranaires putatifs. Chez les mammifères, les transporteurs d'acides aminés cationiques n'utilisent pas le sodium pour le transport de ces acides aminés, comme leurs homologues chez les plantes (AtCAT1, Frommer *et al.*, 1995), et présentent une forte affinité pour les acides aminés cationiques (arginine, histidine, lysine). Le second sous groupe est constitué de protéines composées de 12 domaines transmembranaires. Il regroupe les membres APC de la levure, les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés des mammifères mais aussi les membres de la famille LAT présente chez les plantes (Wipf *et al.*, 2002). A ce jour, 5 membres de la famille LAT ont été identifiés chez *A. thaliana* mais aucun n'a encore été caractérisé.

3.3.2. La famille CAT

L'étude de la séquence génomique d'*A. thaliana* a mis en évidence la présence de 9 gènes appartenant à la famille CAT. Les différentes études effectuées sur ces gènes ont montré que chaque membre de cette famille possède une expression plus ou moins spécifique d'un tissu ou d'un organe (Frommer *et al.*, 1995 ; Su *et al.*, 2004 ; Hammes *et al.*, 2006) (Figure 35). *AtCAT1* est exprimé dans les feuilles, les fleurs et les graines en formation, avec une expression localisée au niveau des vaisseaux (Frommer *et al.*, 1995). D'autre part, *AtCAT1* est un transporteur à haute affinité prenant en charge principalement les acides

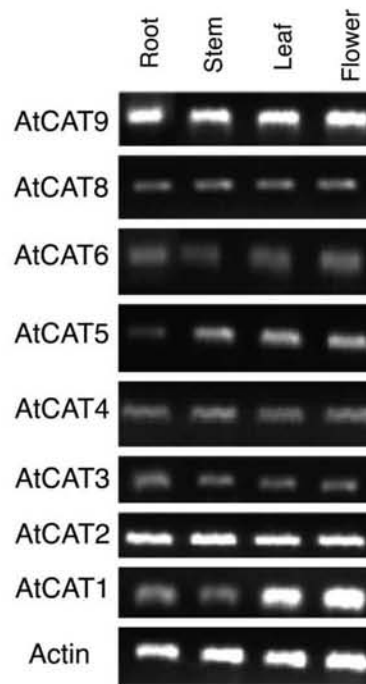


Figure 35 : Analyse de l'expression par RT-PCR des membres *CAT* dans les racines, feuilles, tiges et fleurs d'*A. thaliana* (d'après Su et al., 2004).

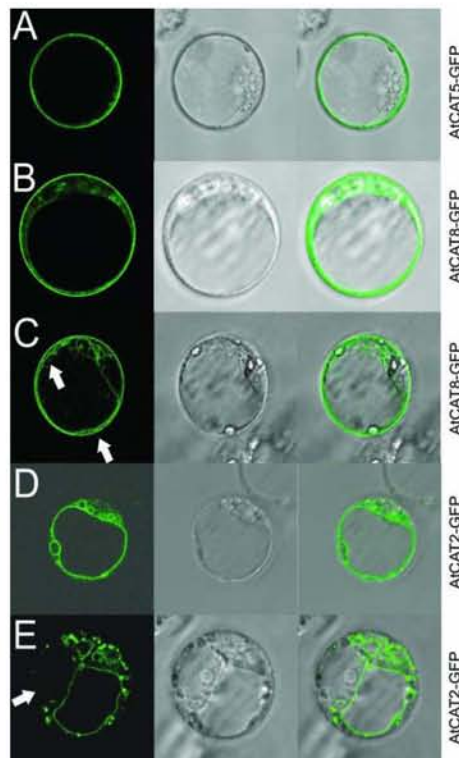


Figure 36 : Localisation subcellulaire de AtCAT5-GFP (A), AtCAT8-GFP (B et C), et AtCAT2-GFP (D et E) (d'après Su et al., 2004).

aminés cationiques (Frommer et al., 1995). AtCAT1 pourrait jouer de multiples rôles dans la physiologie du phloème, notamment dans le transfert des acides aminés vers les embryons en développement. AtCAT2 est probablement localisé au niveau du tonoplaste des cellules et aurait donc un rôle dans le transport vacuolaire (Su et al., 2004) (Figure 36). AtCAT5 est également un transporteur de haute affinité pour les acides aminés cationiques et il a été démontré comme étant localisé au niveau de la membrane plasmalemmique (Figure 36). Les profils d'expression de ce gène suggèrent que AtCAT5 fonctionnerait dans la réabsorption d'acides aminés perdus au niveau foliaire (Su et al., 2004). AtCAT6 est aussi un transporteur de haute affinité pour les acides aminés, mais il transporte également les acides aminés neutres. Ce transporteur jouerait un rôle dans le transfert des acides aminés vers les organes « puits » et dans les tissus infectés par les nématodes (Hammes et al., 2006). AtCAT8 est exprimé dans les jeunes tissus et dans les tissus se divisant rapidement comme les jeunes feuilles et le méristème apical racinaire. AtCAT8 est également localisé au niveau de la membrane plasmalemmique (Su et al., 2004) (Figure 36).

Etant donné le grand nombre de transporteurs d'acides aminés chez les plantes, il semble clair que les transporteurs diffèrent selon leur spécificité de substrat, leur spécificité d'expression cellulaire et tissulaire mais aussi selon leur activité dépendante du stade de développement et de l'environnement. Les différentes études portant sur les transporteurs d'acides aminés chez les plantes ont montré que tous ces facteurs définissent le rôle de chaque transporteur pris individuellement (Liu et Bush, 2006).

3.4. Les autres familles de transporteurs d'acides aminés

3.4.1. La superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily)

Il existe une troisième superfamille de transporteurs d'acides aminés chez les plantes : la superfamille MFS, la plus importante au sein des génomes. Certains transporteurs d'acides aminés sont représentés dans deux sous familles MFS et sont reliés aux protons-monocarboxylate transporteurs ainsi qu'aux transporteurs de phosphate. Par exemple TAT1 responsable du transport spécifique des acides aminés aromatiques (Kim *et al.*, 2001) fait partie de la sous famille des transporteurs MCT. Les transporteurs vésiculaires de glutamate (VGT) sont eux reliés aux transporteurs de phosphate inorganique (Aihara *et al.*, 2000). Chez la levure, une famille de transporteurs vacuolaires des acides aminés basiques (VBA) a été

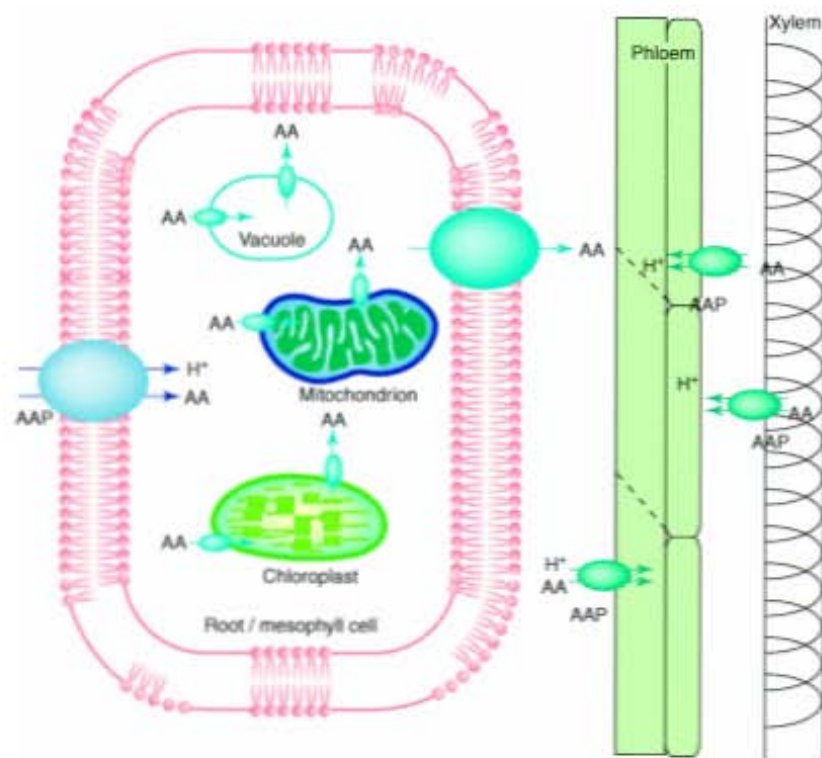


Figure 37 : Représentation schématique des transferts d'acides aminés entre les différents organites d'une cellule (d'après Wipf et al., 2002).

identifiée (Shimazu et al., 2005). Toutefois, il n'a pas encore été mis en évidence que des membres MFS soient impliqués dans le transport des acides aminés chez les plantes.

3.4.2. Les transporteurs au niveau des organites

Jusqu'à présent les transporteurs décrits se situent au niveau de la membrane plasmalemmique. Il ne faut pas oublier le rôle des organites dans le fonctionnement cellulaire, ceci impliquant notamment des échanges, notamment d'acides aminés, au niveau des membranes des organites (Figure 37).

Les plastes constituent des compartiments clés pour la synthèse des acides aminés. Certains acides aminés, comme la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et la lysine, apparaissent comme étant synthétisés uniquement à l'intérieur des plastes. D'autres acides aminés, comme la proline et l'asparagine, sont produits au niveau du cytosol tandis que d'autres, comme la glutamine, l'aspartate et la sérine, sont synthétisés dans de multiples compartiments. Des transporteurs facilitant le passage des acides aminés du cytosol à travers l'enveloppe des chloroplastes ont été identifiés.

3.4.2.1. Transport au niveau des chloroplastes

Les acides aminés traversent l'enveloppe externe via des protéines OEP (outer envelope protein) qui forment des canaux de haute conductance sélectifs pour les cations, perméables aux amines et aux amides (Pohlmeyer *et al.*, 1997 ; Pohlmeyer *et al.*, 1998). Deux types de protéines OEP non phylogénétiquement reliées ont été mis en évidence : OEP16 et OEP24. La famille OEP16 est également appelée famille PRAT (preprotein and amino acid transport) (Murcha et al., 2007). Les acides aminés traversent également l'enveloppe interne des chloroplastes. A ce jour, un seul transporteur d'acides aminés opérant au niveau de l'enveloppe interne a été identifié. Il s'agit du transporteur de dicarboxylates Dit2.1 appartenant à la famille DASS (Divalent Anion Sodium Symporter). Dit2.1 fonctionne dans l'échange glutamate/malate essentiel pour la photorespiration (Renné et al., 2003).

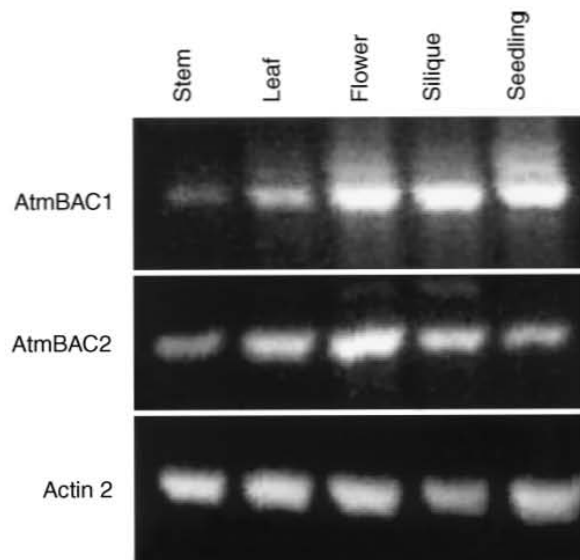


Figure 38 : Analyse de l'expression par RT-PCR des gènes *AtmBAC1* et *AtmBAC2* dans différents organes d'*A. thaliana* (d'après Hoyos et al., 2003).

3.4.2.2. Transport au niveau des mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle important dans le métabolisme des acides aminés et nécessitent donc de multiples systèmes de transport au niveau de leurs membranes. Des porines situées au niveau de la membrane externe permettent le passage d'un large spectre de composés incluant les acides aminés. Les transporteurs au niveau de la membrane interne comprenant six domaines transmembranaires appartiennent à la famille MCF (Mitochondrial Carrier Family). Au niveau de la membrane mitochondriale, les systèmes de transport des acides aminés jouent un rôle important pour la synthèse des protéines mitochondriales mais aussi pour la dégradation de certains acides aminés, comme l'arginine, la proline et le GABA. Des transporteurs mitochondriaux d'acides aminés ont été mis en évidence chez les plantes et font partie de la famille MCF. A ce jour, seulement deux transporteurs d'acides aminés basiques ont été identifiés chez *A. thaliana*, il s'agit d'AtmBAC1 et AtmBAC2 (Catoni et al., 2003 ; Hoyos et al., 2003) (Figure 38). Ces deux transporteurs possèdent des spectres d'affinité équivalents à ceux des protéines humaines. Reconstitués dans des liposomes, AtmBAC1 et AtmBAC2 transportent l'arginine, la lysine, l'ornithine et l'histidine par un mécanisme d'échange. De plus, AtmBAC2 possède une sélectivité plus large que AtmBAC1 puisqu'il transporte également les isomères de forme D de l'arginine et de la lysine (Palmieri et al., 2006). Enfin, d'autres transporteurs mitochondriaux d'aspartate-glutamate et de glutamate appartenant à la famille MCF ont été mis en évidence chez la levure et l'homme. L'existence d'homologues chez les membres de la famille MCF des plantes n'est pas à exclure (Picault et al., 2004).

4. Le peuplier

4.1. Généralités

Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en six sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques (Eckenwalder, 1996 ; Figure 39). Les sections *Aigeros*, *Tacahama* et *Populus* sont les plus importantes. La section *Aigeros* comprend notamment *Populus deltoides* et *Populus nigra*, la section *Tacahama*, *Populus trichocarpa* et la section *Populus*, *Populus alba*. Les espèces de peuplier issues de la section *Aigeros* poussent principalement dans l'Est de l'Amérique du Nord (*P. deltoides*) et autour de la Méditerranée (*P. nigra*). Le peuplier est



Populus deltoides

Populus nigra

Populus trichocarpa

Populus alba

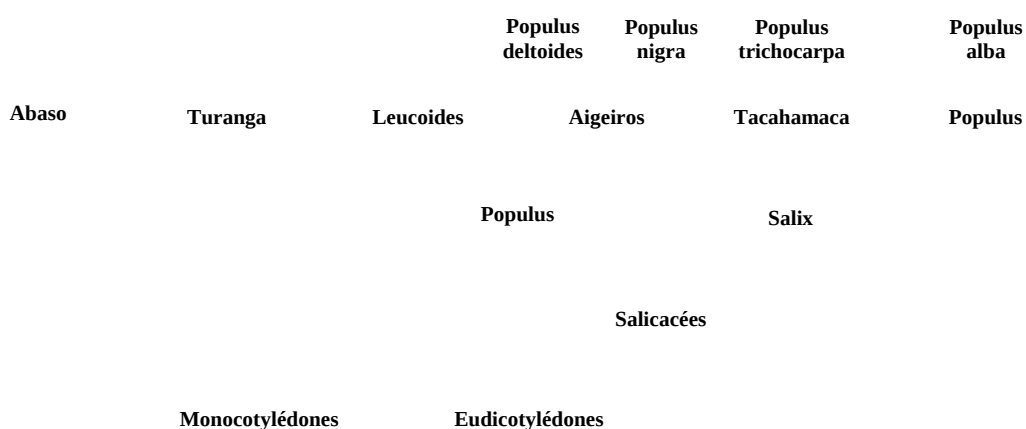


Figure 39 : Les différentes espèces de peuplier. Le peuplier appartient avec le genre *Salix* à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en 6 sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques. Les 4 espèces de peuplier les plus populaires sont indiquées au sein des populations auxquelles elles appartiennent (d'après Eckenwalder, 1996).

une espèce plantée dans les vallées, souvent à proximité d'un cours d'eau. En France, le peuplier noir (d'origine iranienne) s'est répandu à partir de 1749 sur les bords du canal de Briare via l'Italie. Des boutures de *P. deltoides* provenant de l'Est de l'Amérique du Nord ont été introduites en Angleterre et en France aux 17^{ème} et 18^{ème} siècles. Les variétés les plus importantes de *P. deltoides* sont le peuplier de Caroline (variété 'Angulata' = 'Carolin') et le peuplier de Virginie (variété 'Monilifera' = *P. canadensis*). Des hybridations naturelles entre des femelles de *P. deltoides* et des mâles de *P. nigra* ont généré de nombreux clones *P. canadensis* (anciennement *P. euramericana*), comme 'Serotina', 'Robusta' ou encore 'I-214'. L'hybridation entre *P. deltoides* et *P. nigra* ne se fait que dans un sens. De même, certaines hybridations entre espèces ne sont pas possibles, comme par exemple l'hybridation entre *P. trichocarpa* et *P. grandidentata* (Eckenwalder, 1996, Rinaldi, 2007).

Ces dernières années, le peuplier est devenu un arbre commercialisé à grande échelle. Les croisements génétiques ont pour objectif d'obtenir de meilleurs individus aptes à être domestiqués et exploités abondamment dans l'industrie. Afin de mieux sélectionner les individus destinés à l'industrie forestière, il est nécessaire de connaître les processus impliqués dans la formation du bois, les mécanismes d'adaptation à l'environnement et les mécanismes de résistance mis en place par le peuplier face aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, le peuplier est devenu le modèle d'étude de nombreux laboratoires nationaux et internationaux (Bradshaw et al., 2000 ; Taylor, 2002 ; Brunner et al., 2004).

Le peuplier est un arbre à croissance rapide, avec une floraison au bout de 4 à 5 ans. Cette caractéristique permet d'effectuer des croisements génétiques avec des résultats à court terme. Ainsi plusieurs cartes génétiques ont été établies pour plusieurs espèces de peuplier à la fois pour des individus mâles et femelles géniteurs de populations d'intérêt pour la sélection génétique. De nombreux Quantitative Trait Loci (QTL) de croissance et de résistance à divers agents pathogènes sont identifiés et disponibles (Taylor, 2002). L'aire de croissance naturelle du peuplier s'étend sur tout l'hémisphère Nord. La variabilité génétique naturelle qui en découle, facilite l'étude de l'adaptation physiologique de l'arbre à son environnement (Brunner et al., 2004).

Le peuplier est également facilement manipulable par génie génétique. Le peuplier transformé par agrotransformation est micro-propagé in vitro en deux mois (Noiël et al., 2002) et l'expression du transgène est stable dans le temps au sein des populations cultivées in vitro, en serre et en plein champ (Hawkins et al., 2003).

Le peuplier possède un génome diploïde de petite taille 485 ± 10 Mb, qui se répartit sur 19 chromosomes (Tuskan et al., 2006). Son génome a ainsi une taille semblable à celle du

génomique du riz, mais 4 fois plus importante que la taille du génome d'*Arabidopsis thaliana*. Par comparaison, sa taille est 6,5 fois inférieure à celle du génome humain et 40 fois plus petite que celle du génome du pin. De plus le genre *Populus* regroupe une collection de plus de 376500 Expressed Sequence Tag (ESTs) disponibles dans les bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), correspondant à plus de 10 000 unigènes (Nanjo et al., 2004 ; Tuskan et al., 2006). En 2001, le Joint Genome Institute (Department of Energy, USA, <http://genome.jgi-psf.org/>) avec le concours de l'International Poplar Genome Consortium (IPGC, <http://www.ornl.gov/sci/ipgc>) a entrepris le séquençage du génome du peuplier. Le peuplier est ainsi devenu le premier arbre et le seul à cette date dont le génome est entièrement séquencé et accessible à la communauté scientifique (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html> ; Tuskan et al., 2006).

4.2. Nutrition azotée et cycle saisonnier de l'azote

Le peuplier est une espèce très intéressante dans l'optique d'étudier l'impact de la nutrition azotée sur la croissance de l'arbre, du fait notamment de sa capacité à croître sur de faibles et de fortes concentrations en nitrate et en ammonium (Min et al., 2000). Chez le peuplier, plusieurs études ont montré une réduction de la hauteur et du diamètre basal de l'arbre après fertilisation azotée (DesRochers et al., 2006 ; van der Driessche et al., 2003). Ce manque de réponse positive du peuplier à la fertilisation azotée a également été observée en conditions naturelles (van der Driessche et al., 2005). De plus, il a été démontré que le nitrate d'ammonium, utilisé comme engrais, se comportait comme une source d'azote contenant seulement du nitrate (DesRochers et al., 2003). Sur des sols à pH élevé, les peupliers utiliseraient préférentiellement l'ammonium plutôt que le nitrate ou le nitrate d'ammonium comme source d'azote pour leur croissance (DesRochers et al., 2003 ; Choi et al., 2005). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'absorption d'ammonium était plus rapide que celle du nitrate dans le cas de cultures hydroponiques de peuplier (Min et al., 2000).

L'absorption d'azote inorganique et organique à partir du sol, ainsi que le transport de l'azote organique synthétisé au niveau des organes « source » (feuilles et racines), vers les organes « puits » (jeunes feuilles, fleurs, graines), constituent des mécanismes essentiels à la physiologie et au développement des plantes. D'autre part, chez les espèces pérennes, la remobilisation de l'azote stocké sous forme de protéines de réserve est importante notamment au cours de divers processus comme la sénescence foliaire et la croissance hivernale. Outre

Tableau 1 : Classification selon le système TC des familles de transporteurs répertoriées chez les plantes. Cette classification est consultable à l'adresse suivante : <http://plantst.genomics.purdue.edu/plantst/html/classification.shtml>.

Numéro TC	Famille	Numéro TC	Famille
1.A.1	Voltage Gated Ion Channel (VIC)	2.A.40	The Nucleobase:Cation Symporter-2 (NCS2) Family
1.A.4	Transient Receptor Potential Ca ²⁺ Channel (TRP-CC) Family	2.A.44	The Formate-Nitrite Transporter (FNT) Family
1.A.8	The Major Intrinsic Protein (MIP) Family	2.A.47	The Divalent Anion:Na ⁺ Symporter (DASS) Family
1.A.10	The Glutamate-gated Ion Channel (GIC) Family	2.A.49	The Ammonium Transporter (Amt) Family
1.A.11	The Chloride Channel (ClC) Family	2.A.50	The Glycerol Uptake (GUP) Family
1.A.13	The Epithelial Chloride Channel (E-ClC) Family	2.A.53	The Sulfate Permease (SulP) Family
1.A.14	The Non-selective Cation Channel-1 (NSCC1) Family	2.A.54	The Mitochondrial Tricarboxylate Carrier (MTC) Family
1.A.15	The Non-selective Cation Channel-2 (NSCC2) Family	2.A.55	The Metal Ion (Mn ²⁺ -iron) Transporter (Nramp) Family
1.A.16	The Yeast Stretch Activated Ca ²⁺ Channel (Mid1) Family	2.A.57	The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT) Family
1.A.17	The Chloroplast Outer Envelope Solute Channel (CSC) Family	2.A.59	The Arsenical Resistance-3 (ACR3) Family
1.A.18	The Chloroplast Envelope Anion Channel-forming (Tic110) Family	2.A.60	The Organo Anion Transporter (OAT) Family
1.A.20	The Cytochrome b558 (CytB) H ⁺ -channel Family	2.A.66	The Multi Antimicrobial Extrusion (MATE) Family
1.A.31	The Annexin (Annexin) Family	2.A.67	The Oligopeptide Transporter (OPT) Family
1.A.35	The CorA Metal Ion Transporter (MIT) Family	2.A.69	The Auxin Efflux Carrier (AEC) Family
1.B.8	The Mitochondrial and Plastid Porin (MPP) Family	2.A.71	The Folate-Biopterin Transporter (FBT) Family
1.B.28	The Plastid Outer Envelope Porin of 24kDa (OEP24) Family	2.A.72	The K ⁺ Uptake Permease (KUP) Family
1.C.6	The Yeast Killer Toxin (YKT-K1) Family	3.A.1	The ATP-Binding Cassette (ABC) Superfamily
1.C.35	The Amoebapore (Amoebapore) Family	3.A.2	The F-type, V-type and A-type ATPase (F-ATPase) Superfamily
1.C.40	The Bactericidal Permeability-Increasing Protein (BPIP) Family	3.A.3	The P-Type ATPase (P-ATPase) Superfamily
1.C.44	The Plant Thionin (PT) Family	3.A.5	The Type II (General) Secretory Pathway (IISP) Family
2.A.1	Major Facilitator (MFS) Superfamily	3.A.8	The Mitochondrial Protein Translocase (MPT) Family
2.A.2	The Glycoside-Pentoside-Hexuronide (GPH) Symporter Family	3.A.10	The H ⁺ -Translocating Pyrophosphatase (H ⁺ -PPase) Family
2.A.3	The Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family	8.A.5	The Voltage Gated K ⁺ Channel β -subunit (VIC-Beta) Family
2.A.4	The Cation Diffusion Facilitator (CDF) Family	8.A.6	The Auxiliary Nutrient Transporter (ANT) Family
2.A.5	The ZIP (ZRT IRT-like Protein) Family	9.A.9	The Low Affinity Fe ²⁺ Transporter (FeT) Family
2.A.6	The Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) Superfamily	9.A.10	The Oxidase-dependent Fe ²⁺ Transporter (OFeT) Family
2.A.7	The Drug/Metabolite Transporter(DMT) Superfamily	9.A.11	The Copper Transporter-1 (Ctr1) Family
2.A.9	The Cytochrome Oxidase Biogenesis (Oxa1) Family	9.A.12	The Copper Transporter-2 (Ctr2) Family
2.A.12	The ATP:ADP Antiporter (AAA) Family	9.B.1	The Metal Homeostasis Protein (MHP) Family
2.A.16	The Telurite-resistance/Dicarboxylate Transporter (TDT) Family	9.B.2	The Ca ²⁺ Homeostasis (CHP) Family
2.A.17	The Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) Family	9.B.11	The Mitochondrial mRNA Splicing-2 Protein (MRS2) Family
2.A.18	The Amino Acid/Auxin Permease (AAP) Family	9.B.12	The Stress-Induced Hydrophobic Peptide (SHP) Family
2.A.19	The Ca ²⁺ :Cation Antiporter (CaCA) Family	9.B.17	The Putative Fatty Acid Transporter (FAT) Family
2.A.20	The Inorganic Phosphate Transporter (PiT) Family	9.B.19	The Mn ²⁺ Homeostasis Protein (MnHP) Family
2.A.21	The Solute:Sodium Symporter (SSS) Family	9.B.26	The PF27 (PF27) Family
2.A.28	The Bile Acid:Na ⁺ Symporter (BASS) Family	9.B.33	The YaaH (YaaH) Family
2.A.29	The Mitochondrial Carrier (MC) Family		
2.A.30	The Cation-Chloride Cotransporter (CCC) Family		
2.A.31	The Anion Exchanger (AE) Family		
2.A.36	The Monovalent Cation:Proton Antiporter-1 (CPA1) Family		
2.A.37	The Monovalent Cation:Proton Antiporter-2 (CPA2) Family		
2.A.38	The K ⁺ Transporter (Trk) Family		
2.A.39	The Nucleobase:Cation Symporter-1 (NCS1) Family		

les acides aminés riches en azote, les protéines VSPs (Vegetative Storage Proteins) ont aussi un rôle important dans le cycle saisonnier de l'azote puisqu'elles représentent la forme majeure de stockage de l'azote réduit dans les tissus des plantes annuelles et pérennes (Staswick, 1994 ; Stepien et al., 1994). Chez le peuplier, la majorité des protéines VSPs est constituée par la famille des protéines BSPs (Bark Storage Proteins). Ces protéines ont été identifiées grâce à leur motif d'accumulation en automne et de disparition au cours du printemps dans les organes pérennes tels que l'écorce, le bois et les racines (Wetzel et al., 1989 ; Sauter et van Cleve, 1990 ; Langheinrich et Tischner, 1991). Durant l'automne, les acides aminés riches en azote et d'autres nutriments mobiles sont transportés via le phloème des feuilles sénescentes vers les tissus pérennes, où ils seront utilisés pour la synthèse des protéines (Sauter et al., 1989 ; Hörtensteiner et Feller, 2002 ; Geßler et al., 2004).

Au printemps suivant, les réserves azotées accumulées au niveau des racines et des tiges sont dégradées et les acides aminés résultants sont fournis aux jeunes tissus. Chez le peuplier, la mobilisation des protéines BSPs s'accompagne d'un important influx d'acides aminés dans la sève du xylème (Sauter et van Cleve, 1992). La glutamine est d'ailleurs l'acide aminé majeur de cet influx printanier, indiquant que la conversion des acides aminés issus des BSPs a lieu avant l'export (Sauter et van Cleve, 1992).

5. Classification des transporteurs : le système TC

Une classification simple des systèmes de transport a été développée (Saier, 2000, Busch and Saier, 2002) et approuvée par le comité « International Union of Biochemistry and Molecular Biology ». La nomenclature de ce système de classification TC (Transport Commission) est homologue au système de classification enzymatique EC (Enzyme Commission) déjà établi en 1992. Comme le système EC, la classification TC prend en compte les données concernant la fonction des transporteurs mais également des informations phylogénétiques ; il est désigné par quatre chiffres et une lettre. Ce système de classification est consultable sur le site internet <http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/> (Saier et al., 2006).

Les systèmes de transport sont classés selon cinq critères, chacun de ces critères correspondant à un des cinq chiffres ou lettres. Le premier chiffre désigne la classe du transporteur, suivi d'une lettre qui désigne la sous classe. Les trois derniers chiffres désignent la famille, la sous famille et le substrat transporté. Le Tableau 1 présente les différentes familles de transporteurs actuellement répertoriées chez les végétaux.

Objectifs

Bien qu'il se trouve en quantité importante dans les sols, l'azote est un des éléments principaux limitant la croissance des plantes, puisqu'il se trouve majoritairement sous des formes non directement assimilables par les plantes. L'ammonium et le nitrate constituent les principales sources d'azote pour la croissance des plantes même s'ils ne représentent qu'une très faible partie de l'azote du sol. Au niveau des sols forestiers, l'ammonium représente la principale source d'azote inorganique pour les plantes (Marschner et Dell, 1994). Toutefois, les plantes présentent généralement une croissance optimale lorsque le nitrate et l'ammonium sont présents. Un nombre important de transporteurs permettant d'importer efficacement l'ammonium et le nitrate sur de larges gammes de concentrations a été mis en évidence chez différentes plantes. D'autre part, l'ammonium constitue également un intermédiaire central généré lors de différents processus comme la réduction du nitrate, la fixation de l'azote atmosphérique, la photorespiration et le catabolisme protéique (Joy, 1988). En situation extrême, les plantes sont également capables d'absorber les acides aminés (Persson et al., 2003), mais ceux-ci représentent surtout la principale forme de transport à longue distance de l'azote organique. Les acides aminés jouent par ailleurs des rôles fondamentaux dans une multitude de processus métaboliques incluant la synthèse protéique, la croissance cellulaire, la signalisation cellulaire, l'adaptation à certains changements environnementaux, la germination et la sénescence (Ortiz-Lopez et al., 2002). L'existence d'un nombre important de transporteurs d'acides aminés est suggérée par la complexité du métabolisme azoté intracellulaire et la multiplicité des types cellulaires impliqués dans le transport à longue distance.

L'absorption d'azote organique et inorganique, ainsi que le transport de l'azote organique synthétisé au niveau des organes « source » vers les organes « puits », constituent des mécanismes essentiels à la physiologie et au développement des plantes. Ceci est d'autant plus vrai chez les espèces pérennes qui présentent des variations saisonnières au niveau du contenu en azote dans leurs tissus, notamment au cours de la sénescence automnale et de la remobilisation printanière. Les précédentes études ont principalement portées sur la mise en réserve de l'azote sous forme de protéines de stockage au cours de l'hiver et sur la remobilisation sous forme d'acides aminés de cet azote stocké au cours de l'hiver. Ces deux périodes ont été principalement étudiées en se focalisant sur les flux printaniers d'acides aminés et la synthèse puis la dégradation des protéines de réserves. En ce qui concerne les aspects moléculaires de ces phénomènes et notamment les mécanismes de transfert et de translocation au niveau des différents tissus de l'arbre, peu de données existent.

Les principales études portant sur la caractérisation moléculaire des transporteurs d'ammonium et d'acides aminés chez les plantes se sont focalisées sur des espèces herbacées et plus particulièrement *Arabidopsis thaliana* qui fût la première plante dont le génome a été entièrement séquencé. Le récent séquençage du génome du peuplier permet à présent de mieux appréhender les mécanismes de transport d'une espèce pérenne, et en particulier ceux de l'ammonium et des acides aminés.

Les études réalisées au cours de mon travail de thèse s'inscrivent dans un contexte plus global d'études de la physiologie des arbres en interactions avec leurs milieux biotiques et abiotiques.

L'objectif général de mon travail de thèse a consisté à étudier certains mécanismes de transport impliqués dans l'absorption et la remobilisation de certaines sources d'azote, l'ammonium et les acides aminés, chez le peuplier.

Au travers de la participation à l'annotation du génome séquencé de peuplier, mais également par l'étude des séquences EST disponibles, le premier objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier les gènes modèles impliqués dans le transport de composés azotés mais également dans l'assimilation de l'azote inorganique.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse, a été de caractériser les gènes candidats impliqués dans l'absorption et le transport de l'ammonium chez le peuplier. Des études d'expression et de caractérisation fonctionnelle ont notamment permis de mettre en évidence certaines particularités liées au mode de vie pérenne du peuplier.

Le troisième objectif a été d'étudier la sénescence automnale du peuplier en conditions naturelles, en se focalisant plus particulièrement sur les flux d'acides aminés entre les feuilles et les organes pérennes comme les tiges et les protéines potentiellement responsables de ces flux.

Le quatrième objectif, en relation avec le précédent, a été d'étudier la remobilisation printanière de l'azote au travers de l'un des phénomènes les plus visibles de cette remobilisation, le débourrement des bourgeons. Ce travail s'est notamment attaché à caractériser un transporteur putatif d'acides aminés principalement exprimé au niveau du bourgeon.

Section 2 – Matériels et Méthodes

6. Analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques réalisées tout au long du travail présenté dans ce manuscrit ont principalement portées sur l'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes d'intérêt. Pour ce travail, différents programmes informatiques ont été utilisés et la plupart de ces programmes est hébergée sur les serveurs (<http://www.infobiogen.fr> et <http://www.expasy.org/tools>). Les comparaisons de séquences protéiques et nucléotidiques ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search Tool) version 2.0 (Altschul et al., 1994 ; Altschul et al., 1997). Le programme utilisé (blastx) compare les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possible avec les séquences présentes dans les bases de données. Les banques de données consultées sont des banques non redondantes de séquences nucléotidiques et protéiques du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La caractérisation des protéines résultantes de la traduction de la séquence nucléotidique est réalisée à l'aide d'outils répertoriés dans les serveurs (<http://www.infobiogen.fr> et <http://molbiols-tools.ca/>).

Les bases de données biologiques PROSITE (<http://www.expasy.org/tools>), ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), regroupant les motifs, les signatures et les profils caractéristiques de protéines connues ont été utilisées pour obtenir des compléments d'informations. La base de données ARAMEMNON regroupe tout particulièrement les données disponibles concernant les protéines possédant des domaines membranaires chez les plantes. Ces outils permettent de formuler des hypothèses quant à la fonction d'une protéine issue de la traduction d'une séquence nucléotidique nouvellement séquencée.

La recherche des domaines transmembranaires et les prédictions de topologie sont réalisées à partir des algorithmes TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Sonhammer et al., 1998) ; TMPred (Hofmann and Stoffel, 1992), HMMTOP (Tusnady and Simon, 2001).

Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant la méthode ClustalW (Thompson et al., 1994). Les analyses phylogénétiques et d'évolution moléculaire ont été conduites à l'aide du logiciel MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées selon la méthode Neighbor-Joining (NJ) du logiciel MEGA version 3.1 en utilisant les options suivantes : pairwise deletion et Poisson correction. Les tests de « bootstrap » concernant les arbres phylogénétiques ont également été réalisés afin de renforcer ces analyses. Les séquences « signature » des différentes familles protéiques étudiées ont été établies à l'aide de Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks et al., 2004)). Le

Tableau 2 : Composition du milieu de culture Murashige and Skoog ½ gélosé.

Composés	Quantité
Solution de macroéléments 10X (Sigma)	50 ml
Solution de microéléments 100X (Sigma)	100 ml
*Vitamines	10 ml
*L-Glutamine	200 mg
Myo-inositol	100 mg
Saccharose	20 g
Agar	7 g
H ₂ O qsp	1 l
Le pH est ajusté à 6 puis le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Les composés précédés de * sont ajoutés après filtration dans le milieu autoclavé et refroidi à 50°C.	

Composition de la solution de vitamines (100 ml)

Composés	Quantité
Acide nicotinique	10 mg
Pyridoxine	10 mg
Thiamine	10 mg
Panthothénate de calcium	10 mg
L-cystéine chlorhydrate	10 mg
Biotine (5 mg/50 ml)	1 ml

peuplier est le premier arbre dont le génome est entièrement séquencé et accessible à la communauté scientifique (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html). Les séquences correspondant à gènes de peuplier sont issues de cette banque de données.

7. Matériel biologique

7.1. Matériel végétal

7.1.1 Le peuplier

7.1.1.1. Clone utilisé

Le clone de peuplier utilisé classiquement au laboratoire est le clone 717 1-B4 fourni par G. Pilate et J.C. Leplé (Amélioration des arbres forestiers, INRA Orléans). Il s'agit de l'hybride *P. x canescens* Sm. (*P. tremula* L. x *P. alba* L.). Cette essence est maintenue au laboratoire par bouturage à partir de plants mère cultivés en conditions stériles dans des tubes de culture (Sigma).

7.1.1.2. Culture *in vitro*

Les boutures de peuplier, constituées d'un fragment de tige contenant un entre-nœud, sont prélevées sur des plants mère et la feuille est éliminée. Elles sont ensuite plantées dans 15 ml d'un milieu gélosé dont la composition est donnée dans le Tableau 2 préalablement introduit dans les tubes. Les jeunes boutures sont ensuite placées dans la chambre de culture climatisée [température : 22°C le jour et 18°C la nuit, hygrométrie : 80% de saturation le jour et 60% la nuit, photopériode : 16 heures, avec une intensité lumineuse de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ dans la bande des radiations visibles (400-700 nm)].

7.1.1.3. Culture hydroponique du peuplier

Pour l'étude de différents phénomènes comme la carence azotée ou l'effet de la lumière, des cultures hydroponiques de plants de peuplier ont été utilisées. Les plants croient en culture hydroponique pendant deux mois dans la solution suivante : 0,75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,7 mM KNO_3 , 5,15 mM NH_4NO_3 , 0,375 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mM KH_2PO_4 , 100 μM H_3BO_3 , 5 μM KI , 100 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM CoCl_2 , 100 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à 5,6-5,8 avec KOH 1M. La solution nutritive est renouvelée toutes les semaines.

Tableau 3 : Composition du milieu de culture de Melin-Norkrans gélosé (modifié d'après Marx, 1969).

Composés	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	500 mg/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	250 mg/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	150 mg/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	50 mg/l
NaCl	25 mg/l
Thiamine	100 µg/l
FeCl ₃	1 mg/l
Glucose	10g/l
Agar	15g/l
Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avant autoclavage. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.	

Pour les expériences de carence azotée, les plantes sont transférées sur une solution nutritive dépourvue d'azote. KCl (2,36 mM) et K₂SO₄ (1,17 mM) se substituent à KNO₃ pour maintenir constante la concentration en potassium K⁺.

7.1.2. *Arabidopsis thaliana*

L'écotype d'*Arabidopsis thaliana* utilisé classiquement au laboratoire est l'écotype Columbia. Les graines sont semées en pot et les plantes sont cultivées en chambre de culture.

7.2. Matériel fongique

7.2.1. Souche utilisée

La souche Pi01 de *Paxillus involutus* (n°87.017 dans la mycothèque du Département d'Ecologie Microbienne de l'Université de Lund en Suède, n°200175 dans l'ATCC) a été originellement isolée en Ecosse (Midlothian) à partir de carpophores associés à des bouleaux (*Betula pendula* Roth.) âgés de 15 à 30 ans. C'est un Basidiomycète qui appartient à l'ordre des Bolétales, famille des Paxillacées.

7.2.2. Conditions de culture

L'entretien de la souche est assuré par repiquages successifs à partir des souches mères conservées à 25°C et à l'obscurité. Ces dernières sont cultivées pendant 10 jours sur milieu de Melin-Norkrans modifié gélosé (MMN) (Marx, 1969). La composition du milieu est donnée dans le Tableau 3.

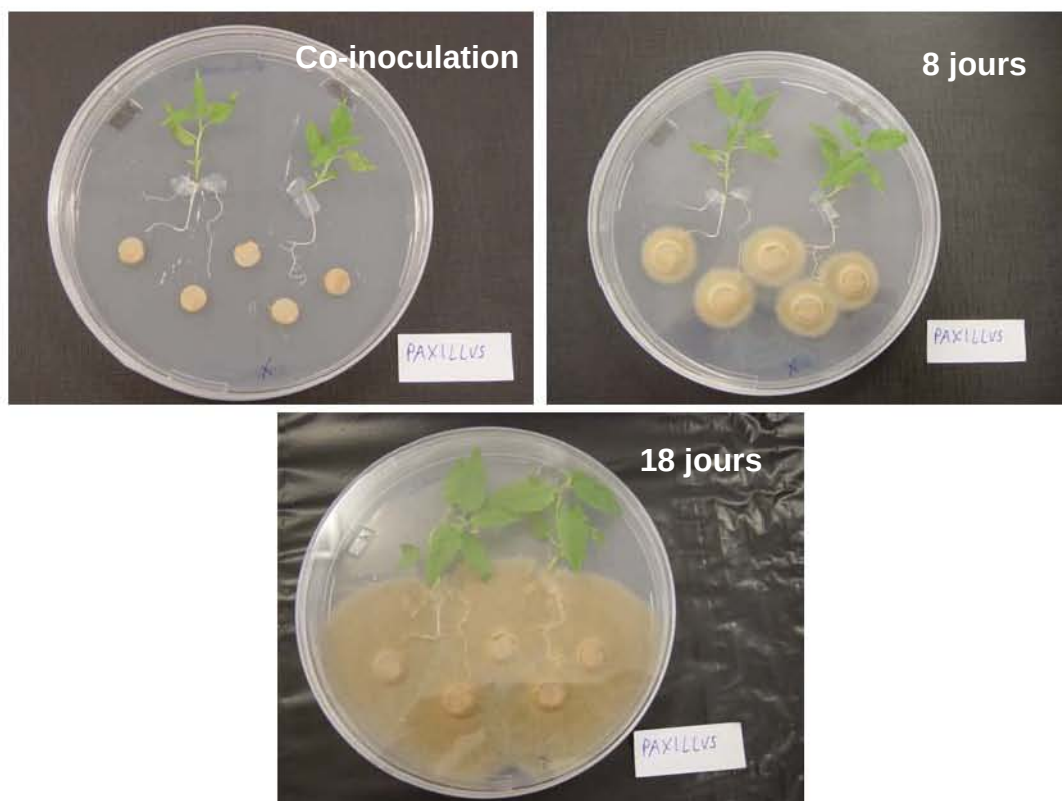


Figure 40 : Système axénique de synthèse de mycorhizes entre *Populus tremula* x *Populus alba* et *Paxillus involutus*.

Tableau 4 : Composition du milieu de culture Murashige and Skoog modifié pour la synthèse axénique de mycorhizes.

Composés	Quantité
Solution de macroéléments 10X (Sigma)	100 ml
Solution de microéléments 100X (Sigma)	50 ml
Glucose	1 g
Agar	1 g
H ₂ O qsp	1l

Le pH est ajusté à 5,8 puis le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Tableau 5 : Composition des milieux de culture Luria Bertani (LB), SOB et SOC pour la culture de bactéries.

Composés	LB	SOB	SOC
Bactotryptone	10 g/l	20 g/l	20 g/l
Extrait de levure	5 g/l	5 g/l	5 g/l
NaCl	10g/l	0,5g/l	0,5g/l
KCl	-	0,2g/l	0,2g/l
MgSO ₄ 1M	-	-	10 ml
MgCl ₂ 1M	-	-	10 ml
Glucose 20%	-	-	10 ml

7.3. Production de plants de peuplier mycorhizés par *P. involutus*

Les mycorhizes de l'association *P. tremula* x *P. alba*/*P. involutus* sont produites en conditions axéniques (Figure 40). Les boutures de *P. tremula* x *P. alba* sont cultivées dans les conditions décrites au §7.1.1.2. Agées de deux semaines, elles sont transférées sur des boîtes de Pétri, co-inoculées avec le champignon ectomycorhizien *P. involutus*, sur un milieu MS modifié (Murashige and Skoog, 1962) (Tableau 4) supplémenté avec du glucose 0,1% et de l'agar 1,5%. *P. involutus* est cultivé préalablement pendant 10 jours sur milieu de Melin-Norkrans modifié comme décrit par Selle et al., (2005). Les boîtes, scellées par du Parafilm, sont placées en chambre de culture. Les racines mycorhizées et non mycorhizées témoin sont récoltées un mois après contact entre les deux partenaires.

7.4. *Escherichia coli*

7.4.1. Souche utilisée

DH5αF' : F', *hsdR17* ($r_K^- m_K^+$), *supE44*, $\Delta(lacIZYA-argF)U169$, *deoR*, ($\Phi80$ *dlacΔ* (*lacZ*) M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

Cette souche a été utilisée pour les transformations de routine. Elle permet la synthèse d'un grand nombre de copies de plasmides, son taux de transformation est élevé. Elle permet également le criblage blanc-bleu.

7.4.2. Conditions de culture

La souche d'*E. coli* a été cultivée à 37°C sous agitation. La composition des différents milieux de culture utilisés est détaillée dans le Tableau 5.

7.5. *Saccharomyces cerevisiae*

7.5.1. Souches utilisées

Les souches de levures déficientes utilisées sont des mutants de *S. cerevisiae*. Elles sont conservées au laboratoire à -70°C. Leur génotype est présenté dans le Tableau 6. Les différentes souches de *S. cerevisiae* déficientes en transporteur sont réactivées sur milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) gélosé. Toutes les expériences nécessitant une culture en milieu YPD liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance à

Tableau 6 : Géotypes des souches de levure utilisées.

Souche	Géotype	Référence
23344c	MATa ura3	Grenson, non publié
31019b	MATa ura3 mep1Δ mep 2Δ::LEU2 mep3Δ::KanMX2	Marini et al., 1997
22574d	MATα ura3 gap1 put4 uga4	Jauniaux et al., 1987
22Δ8AA	MATα ura3 alp1 can1 dip5 gap1 hip1 lyp1 put4 uga4	Fischer et al., 2002

Tableau 7 : Composition du milieu de culture YPD pour levures.

Composés	Liquide	Solide
Bactotryptone	20 g/L	20 g/L
Extrait de levure	10 g/L	10 g/L
Glucose	20 g/L	20 g/L
Agar		20 g/L
Le pH du milieu est ajusté à 5,5 avant stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.		

29°C. La composition du milieu YPD est présentée dans le Tableau 7. En fonction de la souche de levure déficiente utilisée, le milieu de culture dans les conditions de restriction n'est pas le même. Deux types de milieu sont utilisés, l'un dépourvu d'uracile pour la sélection des transformants, l'autre pour la recherche du phénotype.

7.5.2. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en aérobiose, à 29°C. Toutes les expériences nécessitant une culture liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance (Wiame et al., 1985).

7.6. *Agrobacterium tumefaciens*

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sont conservées au laboratoire à -70°C. Les différentes souches d'*A. tumefaciens* ont été cultivées dans du milieu LB contenant les antibiotiques appropriés, à 27°C sous agitation.

La souche C58/pMP90 est une souche désarmée issue de la souche nopaline C58 (Koncz et Schell, 1986). Elle présente une résistance à deux antibiotiques, la rifampicine et la gentamicine. Cette souche a été utilisée pour la transformation du clone 717 1B-4 de peuplier. La souche GV3101/pMP90 est également une souche désarmée qui présente une résistance à la rifampicine et à la gentamicine (Koncz et Schell, 1986). Cette souche a été utilisée pour la transformation de plants d'*A. thaliana* et de tabac.

7.7. Les plasmides

7.7.1. Plasmides pour *E. coli*

pGEM[®]-T easy (3 kb)

Le plasmide pGEM[®]-T easy (3015 pb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication du phage f1 et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZα* (Figure 41). Il a été utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase Advantage 2 (Clontech). Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP aux

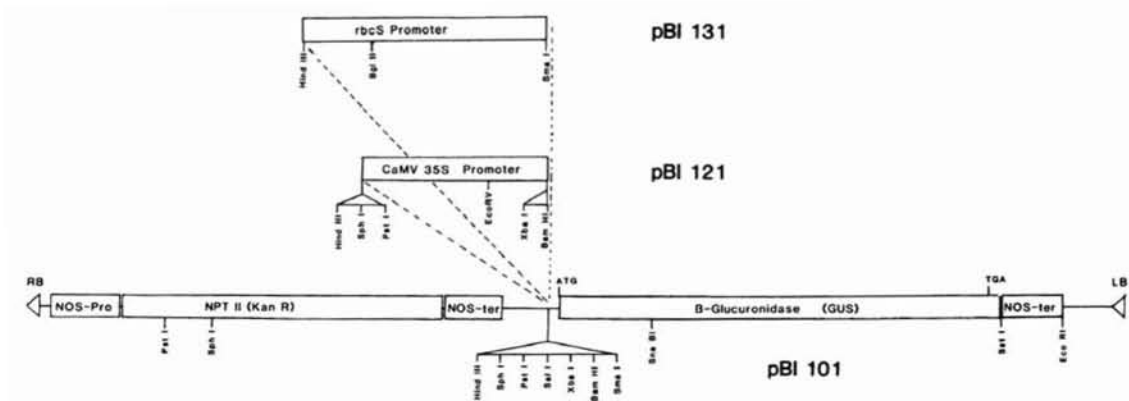
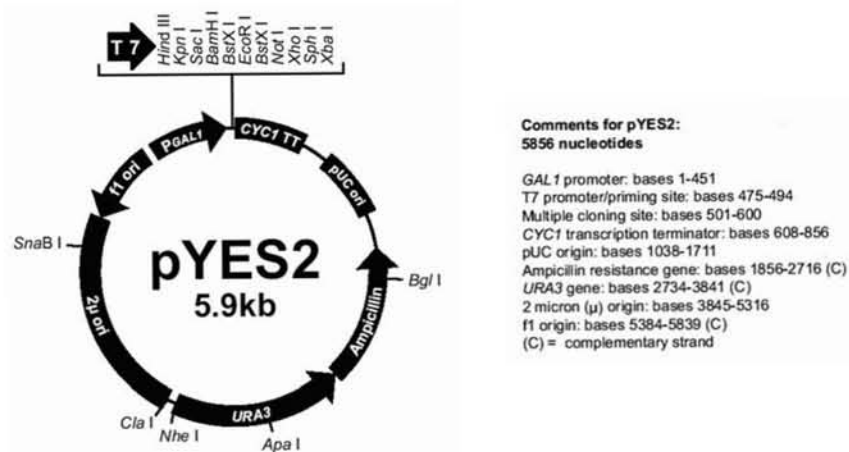
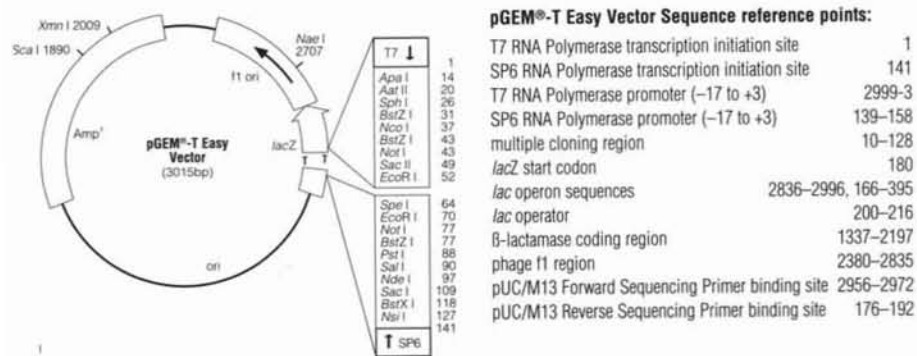


Figure 41 : Cartes de restriction de quelques plasmides utilisés.

extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère. Les amorces SP6 et T7 encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son insertion.

7.7.2. Plasmides navette *S. cerevisiae*-*E. coli*

Les plasmides utilisés sont de la famille YE_p, dits épisomiques. Ils contiennent l'origine de réplication du plasmide 2 μ m. Ces plasmides sont présents à raison de 20 à 30 copies par levure.

pFL61 (5,4 kb)

Le plasmide pFL61 (Minet et al., 1992) possède le gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage unique *NotI* en aval du promoteur de la phosphoglycerokinase de *S. cerevisiae*. Les amorces L2 et R2 (désignées par A. Brun UMR IaM) encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son orientation. Il est pourvu du gène marqueur *URA3*. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les transporteurs dans la levure.

pYES2 (5,9 kpb) (Invitrogen)

Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur dont l'induction est galactose dépendante. Il est également pourvu du gène marqueur *URA3* (Figure 41). Il a été utilisé pour les tests de complémentation de levures déficientes.

pYES2GFP (6,5 kpb)

Ce plasmide est dérivé du plasmide pYES2 dans lequel a été inséré l'ADNc codant la GFP (S65T) grâce aux sites de restriction *XbaI* (Blaudez et al., 2003).

7.7.3. Plasmides navette Plante-*E. coli*

pART7GFP (5,7 kb)

Ce plasmide est dérivé du plasmide pART7 (Gleave, 1992) dans lequel a été inséré l'ADNc codant la GFP (mGFP5) grâce aux sites de restriction *BamHI* (Peiter et al., 2005). Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un multisite de clonage sous le

contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Ce plasmide a été utilisé pour les études de localisation cellulaire des transporteurs

pART27 (10,9 kb)

Le plasmide pART27 (Gleave, 1992) possède deux origines de réplication, RK2 pour le maintien dans *Agrobacterium* et ColE1 pour un fort taux de réplication dans *E. coli*. Ce plasmide port également le gène de résistance à la spectinomycine. Ce plasmide a été utilisé pour les études de localisation cellulaire des transporteurs

pBI 101.3 (11 kb environ)

Ce plasmide fait partie de la série de plasmides pBI 101. Les plasmides pBI 101.2 et pBI 101.3 résultent du plasmide pBI 101.1 et offrent deux autres phases de lecture du gène GUS par rapport aux sites polylinker (Figure 41). Le plasmide pBI 101.3 dérive du plasmide binaire pBin19 déleté de la séquence promotrice de la séquence codante du gène *GUS* (Jefferson et al., 1987). C'est un vecteur à faible nombre de copies avec l'origine de réplication RK2. Le plasmide pBI 101.3 possède le gène de résistance à la kanamycine. Il présente un multisite de clonage en amont de la séquence codante du gène *GUS*. Ce plasmide a été utilisé pour les études d'expression de promoteurs via le gène rapporteur *GUS*.

8. Méthodes

8.1. Extraction des acides aminés

Les acides aminés sont extraits après lyophilisation d'environ 100 mg de masse fraîche. Le matériel végétal lyophilisé est ensuite réduit en poudre (broyeur vibrant MM300, RETSCH). Les acides aminés sont extraits deux fois à l'éthanol froid 70% (V/V). Les surnageants sont regroupés. Le surnageant total est évaporé à sec sous flux d'azote. Les acides aminés sont repris dans 2 fois 200 µl d'HCl 0,1N et purifiés sur colonne par chromatographie échangeuse de cations Dowex 50WX-8, Forme H⁺, 100-200 mesh. 20 µl de solution de standards acide et basique à 2,5 mM sont aussi purifiés de la même manière. La colonne est lavée deux fois à l'eau ultrapure et les acides aminés sont élués avec 4 ml de NH₃ 4,5N. 400 µl sont ensuite évaporés à sec pour l'étape de dérivation préalable à une analyse par CG-SM des acides aminés.

Tableau 8 : Tampon d'extraction utilisé pour l'extraction des protéines solubles

Composés	Concentration
Tris-HCl pH 8	50 mM
PMSF	1 mM
β mercaptoéthanol	50 mM

8.2. Analyse par CG-SM des acides aminés

Les acides aminés extraits sont dérivatisés avec 41,7 µl de MTBSTFA (*N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide) et 8,3 µl de DMF (diméthylformamide) et injectés dans l'appareil. La CG-SM est un appareil Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 5973 HP MS qui combine un chromatographe en phase gazeuse (modèle 6890 HP GC), un autosampler (modèle 7673) et un spectromètre de masse (SM) (modèle 5989A). La colonne de capillarité (30 m x 0,25 mm HP5'MS ; Hewlett Packard) est initialement maintenue à 110°C. Après 2 minutes, la température atteint 260°C ce qui permet l'élution successive des acides aminés qui sont ensuite injectés dans le SM. L'identification des acides aminés se fait grâce à la comparaison des spectres de masse avec ceux qui sont présents dans une base de données.

8.3. Extraction des sucres solubles

Les sucres solubles sont extraits à partir de 100 mg de masse fraîche. Le matériel végétal est réduit en poudre et extrait avec 1,1 ml de méthanol froid 70% (V/V). Les extraits sont centrifugés pendant 10 min à 14000 g et à 4°C. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des sucres solubles par la colorimétrie à l'aide d'une solution d'anthrone (Miller, 1959). Pour cela, 100 µl du surnageant obtenu sont mis en présence de 1,5 ml d'anthrone. La réaction se déroule à 40°C pendant 20 min. Le taux de sucres est déterminé en mesurant l'absorbance à 620 nm. La concentration de sucres solubles de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en glucose de 0 à 10 mg.

8.4. Extraction des protéines solubles

Les protéines solubles sont extraites à partir de 100 mg de masse fraîche environ. Le matériel végétal est réduit en poudre dans l'azote liquide et extrait avec 2 ml de tampon d'extraction dont la composition est donnée dans le Tableau 8. Les extraits sont placés à 4°C sous agitation forte (150-200 rpm) pendant 30 min puis centrifugés pendant 10 min à 14000 rpm et à 4°C. Le surnageant obtenu est ensuite utilisé pour une précipitation à l'acétone (concentration finale 80%) pendant 2H à -20°C. 100 µl sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min. Le culot de protéines est repris dans 50 µl de SDS 0,2% qui sont ensuite utilisés pour déterminer la quantité de protéines de l'extrait.

Tableau 9 : Composition d'un gel SDS-PAGE 15%

Composés	Gel de concentration	Gel de séparation 15%
Tris-HCl 1M pH 6,8	0,75 ml	-
Tris-HCl 1M pH 8,9	-	1,875 ml
Acrylamide 40%	399 µl	2,81 ml
SDS 20%	15 µl	37,5 µl
APS (100 mg/ml)	27 µl	45 µl
TEMED	4,8 µl	11 µl
H ₂ O	1,77 ml	2,68 ml

Tableau 10 : Composition des solutions utilisées pour l'électrophorèse de protéines, la coloration et la décoloration des gels SDS-PAGE.

Composés	Solution de dissociation	Solution de migration pH 8,8	
Tris 1M pH 6,8	250 µl	Tris 25 mM	3 g
β mercaptoéthanol	50 µl	Glycine 122 mM	14,4 g
SDS 20%	100 µl	SDS 0,1%	1 g
Glycérol	100 µl	H ₂ O	1000 ml
BBP 2%	2 µl		

Composés	Solution de coloration	Solution de décoloration
Acide acétique	100 ml	75 ml
Ethanol	500 ml	50 ml
H ₂ O	500 ml	850 ml
Bleu de coomassie R250	2,75 g	-

Les 50 µl d'extrait protéique sont ajoutés à 1 ml de réactif de dosage issu du kit « the bicinchoninic acid (BCA) colorimetric assay » (Interchim). Après 30 min d'incubation à 37°C, la densité optique est lue au spectrophotomètre à 562 nm contre un témoin sans protéine. La quantité de protéines de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en sérum albumine bovine de 0 à 25 µg/ml de mélange réactionnel.

La composition de l'extrait protéique peut être analysée en déposant des quantités de protéines allant de 10 à 20 µg sur gel SDS-PAGE 15% (Tableaux 9 et 10). De plus, par comparaison avec un marqueur de masse moléculaire, les masses moléculaires des différentes protéines composant l'extrait peuvent être déterminées.

9. Techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques

9.1. Extraction des acides nucléiques

9.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique d'*E.coli*

La préparation de l'ADN plasmidique est réalisée à partir du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Biorad) à partir de 5 ml de culture bactérienne en milieu LB en fin de phase exponentielle de croissance. Le volume final d'ADN est de 100 µl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 600 ng/µl. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8 % où il doit apparaître sous forme de trois bandes correspondant aux trois formes d'enroulement du plasmide.

9.1.2. Extraction de l'ADN génomique de Peuplier

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit « Dneasy Plant Mini Kit » (Qiagen) à partir de 100 mg de tissu congelé. Le volume final est de 200 µl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 200 ng/µl. La qualité est contrôlée sur gel d'agarose à 0,8% où il doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kpb.

9.1.3. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont préparés à partir de plantules s'étant développées dans différentes conditions, en utilisant le kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen). Le matériel congelé

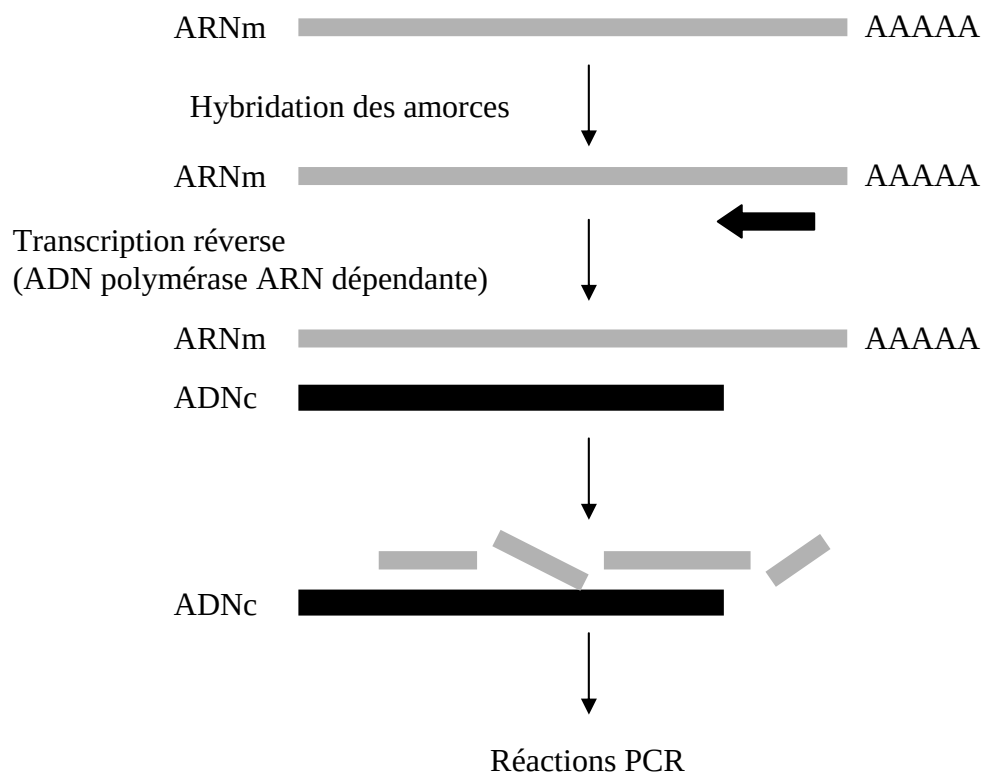


Figure 42 : Synthèse du premier brin d'ADNc par l'enzyme Reverse Transcriptase.

(environ 100 mg) est broyé grâce à un broyeur (modèle MM 300 RETSCH) et repris dans 450 µl d'un tampon contenant de l'isothiocyanate de guanidine ou de l'hypochlorure de guanidine, du β-mercaptoéthanol (10 µl/ml) et additionné de PEG 6000 (20 mg/ml) pour les tissus à teneur élevée en métabolites secondaires. Une première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation permet de fixer les ARNs sur la matrice d'une colonne, ARNs ensuite élués avec 50 µl d'eau ultrapure stérile traitée au DEPC. La qualité des ARNs totaux est contrôlée sur gel d'agarose à 1% où les ARNr 25S et 18S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 25S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 18S. La quantité des ARNs totaux est déterminée par spectrophotométrie, 1 unité de DO à 260 nm correspondant à 40 µg/ml d'ARNs. Afin d'éliminer les éventuelles traces d'ADN génomique, qui parasiteraient alors les réactions PCR, les échantillons sont soumis à un traitement à la DNase I (Qiagen).

9.2. Analyse des taux de transcrits par RT-PCR

Entre 300 ng et 1 µg d'ARN totaux préalablement extraits, sont rétrotranscrits en utilisant le kit « Omniscript RT » (Qiagen) ou le kit « cMaster RT System » (Eppendorf) selon les protocoles décrits par les fournisseurs. Les ARNs totaux sont rétrotranscrits grâce à l'action d'une enzyme multifonctionnelle, la reverse transcriptase, qui possède trois activités distinctes : ADN polymérase ARN dépendante, exoribonucléase hybride dépendante et ADN polymérase ADN dépendante (Figure 42). Pour la rétrotranscription *in vitro*, les deux premières activités de l'enzyme sont utilisées pour générer un ADNc simple brin. Pour un volume réactionnel de 20 µl, sont ajoutés 2 µl d'oligodT15 (10 µM), 2 µl de dNTP (5 mM), 2 µl de tampon 10X et 1 µl de reverse transcriptase (4U/µl). La réaction se déroule à 37°C pendant une heure et 0,5 µl des ADNc ainsi produits sont amplifiés par PCR. Afin d'éviter une saturation de l'amplification, un gradient de cycles est réalisé. A chaque nombre de cycles déterminé, pouvant aller de 28 à 37 cycles, 5 µl de mélange réactionnel sont prélevés et analysés sur gel d'électrophorèse.

9.3. Techniques d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

9.3.1. Généralités

La technique PCR utilisée est celle décrite par Saiki et al., (1985). Elle repose sur la capacité

de synthèse d'un fragment d'ADN déterminé in vitro à l'aide d'une polymérase thermostable : la Taq polymérase. Pour catalyser cette synthèse, cette enzyme a besoin d'une amorce : un fragment oligonucléotidique complémentaire à une région de l'ADN à amplifier. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : une dénaturation thermique des brins d'ADN matriciel, une hybridation des amorces à leur séquence cible et une élongation à partir des amorces par l'action de la Taq polymérase.

9.3.2. Les amorces nucléotidiques

La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité d'hybridation entre les amorces oligonucléotidiques et leur séquence cible sur l'ADN matriciel. Pour cela différents critères ont été définis dans le choix des amorces : une longueur minimale en dessous de laquelle l'hybridation n'est plus fiable (20 nucléotides) ; une absence de complémentarité entre les amorces ; un T_m théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le T_m est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle les deux brins d'ADN sont associés par 50% de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du T_m est la suivante : $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Chaque couple d'amorces utilisé pour l'amplification de chaque gène est testé préalablement sur l'ensemble des gènes appartenant à la même famille afin de s'assurer de la bonne spécificité des amorces utilisées.

9.3.3. Composition de l'essai

La composition de l'essai pour un volume réactionnel de 25 μ l est la suivante : 5 à 25 ng d'ADN cible sont mis au contact de 0,2 μ M de chaque amorce nucléotidique et de 200 μ M de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTPs). La composition du tampon de réaction est : Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ; KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM ; gélatine 0,01% lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) fournie par Sigma et est additionnée à raison de 1 U. La composition du tampon de réaction est : Tris-HCl 20 mM, pH 8,8 ; KCl 10 mM, MgSO₄ 2 mM ; 10 mM (NH₄)₂SO₄ ; TritonX-100 0,1% lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* fournie par New England BioLabs et est additionnée à raison de 1 U.

Dans les cas où les produits de PCR serviront de matrice aux réactions de séquençage, ou bien seront clonés dans des vecteurs d'expression, l'«Advantage 2 Polymerase Mix » ou la *Pfu* polymérase seront préférées à l'ADN polymérase fournie par Sigma.

L'«Advantage 2 Polymerase Mix » est un mélange de deux ADN polymérases commercialisées par Clontech qui permet d'amplifier de longs fragments d'ADN avec une grande fidélité. Elle est fournie en solution concentrée 50 fois et fonctionne dans son tampon de réaction dont la composition est la suivante : Tricine-KOH 40 mM, pH 8,7 ; KOAc 15 mM ; Mg(OAc)₂ 3,5 mM ; BSA 3,75 µg/ml ; Tween-20 0,005% ; Nonidet-P40 0,005%.

La *Pfu* ADN polymérase est une enzyme thermostable avec une grande fidélité de synthèse, isolée à partir de *Pyrococcus furiosus* DSM3638 (Lundberg et al., 1991). La composition de son tampon de réaction est la suivante : Tris-HCl 20 mM, pH 8,8 ; KCl 10 mM ; (NH₄)₂SO₄ 10 mM ; MgSO₄ 2 mM ; BSA nuclease-free 0,1 mg/ml ; Triton[®] X-100 0,1%.

9.3.4. Conditions d'amplification

L'amplification est réalisée dans un appareil automatisé (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Les conditions de dénaturation sont de 3 min à 94°C pour le premier cycle et de 30 sec pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation sont de 45 sec à des températures comprises entre 54 et 60°C, cette valeur étant fonction des T_m de chaque amorce. Les conditions d'élongation sont de 1 à 2 min 30 sec à 72°C, cette valeur étant fonction de la longueur du fragment d'ADN à amplifier. Le mélange est soumis à un nombre de cycles d'amplification variant de 28 à 37 dans les conditions décrites puis un dernier cycle d'élongation de 6 à 10 min.

9.3.5. Séquençage de l'ADN

Pour l'obtention de séquences d'ADN de grande taille (>1kb), les échantillons ont été séquencés par le programme « Eco Read Fast » de la société Genome express (France).

9.4. Techniques de clonage

9.4.1. Préparation du vecteur

Le plasmide pGEM[®]-T easy utilisé pour le clonage des fragments PCR est fourni dans le kit « pGEM[®]-T easy Vector Systems » (Promega) prêt à l'emploi.

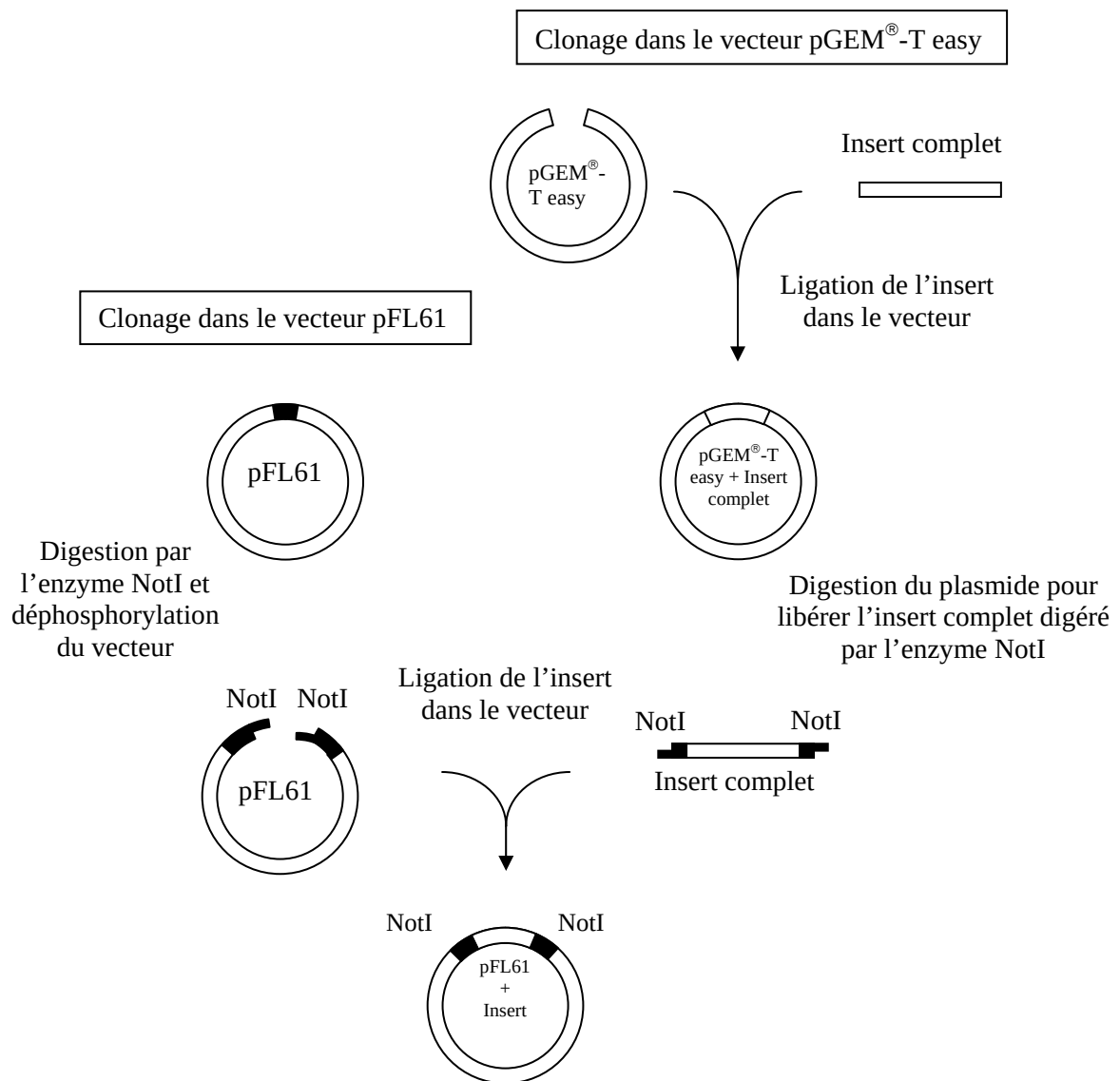


Figure 43 : Clonage dans les vecteurs pGEM®-T easy et pFL61.

Concernant les autres vecteurs pFL61, pYES2, pYES2GFP, pART7GFP, pART27 et pBI101.3, ceux-ci sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis déphosphorylés afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même.

9.4.1.1. Clonage dans le vecteur pFL61

Trois à quatre µg de plasmide pGEM[®]-T easy portant les fragments d'ADNc d'intérêt sont digérés par l'enzyme de restriction NotI afin de libérer des fragments d'ADNc bordés de chaque côté par le site NotI (Figure 43). Ces fragments sont purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech), seront ensuite ligués dans le vecteur pFL61 digéré par la même enzyme de restriction NotI.

Le vecteur digéré est ensuite déphosphorylé par hydrolyse des groupements phosphate situés à ses extrémités 5' protubérantes à l'aide d'une phosphatase alcaline (Calf Intestine alkaline Phosphatase (Promega)). Cette étape est nécessaire afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même. Le plasmide ainsi traité est isolé par électrophorèse en gel d'agarose et purifié à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech). Les ADNc pleine longueur digérés sont clonés dans le vecteur pFL61 ouvert et déphosphorylé selon un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. Le mélange de ligation ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes d'*E. coli* souche DH5αF'. Les transformants positifs, vérifiés par PCR, sont alors sélectionnés et les plasmides bactériens sont extraits à l'aide du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad), selon le protocole proposé par le fournisseur.

9.4.1.2. Clonage dans les vecteurs pYES2, pYES2GFP, pART7GFP et pBI101.3

Les vecteurs sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis déphosphorylé afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même. Deux à trois microgrammes de plasmide sont digérés pendant 3 à 4 h dans un volume de 40 µl, puis le tampon 10X de la phosphatase et l'enzyme sont ajoutés au mélange pour un volume final de 60 µl. La réaction se déroule à 37°C pendant 1 h. Le vecteur digéré et déphosphorylé est alors purifié à l'aide du kit « GFX[™] PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech).

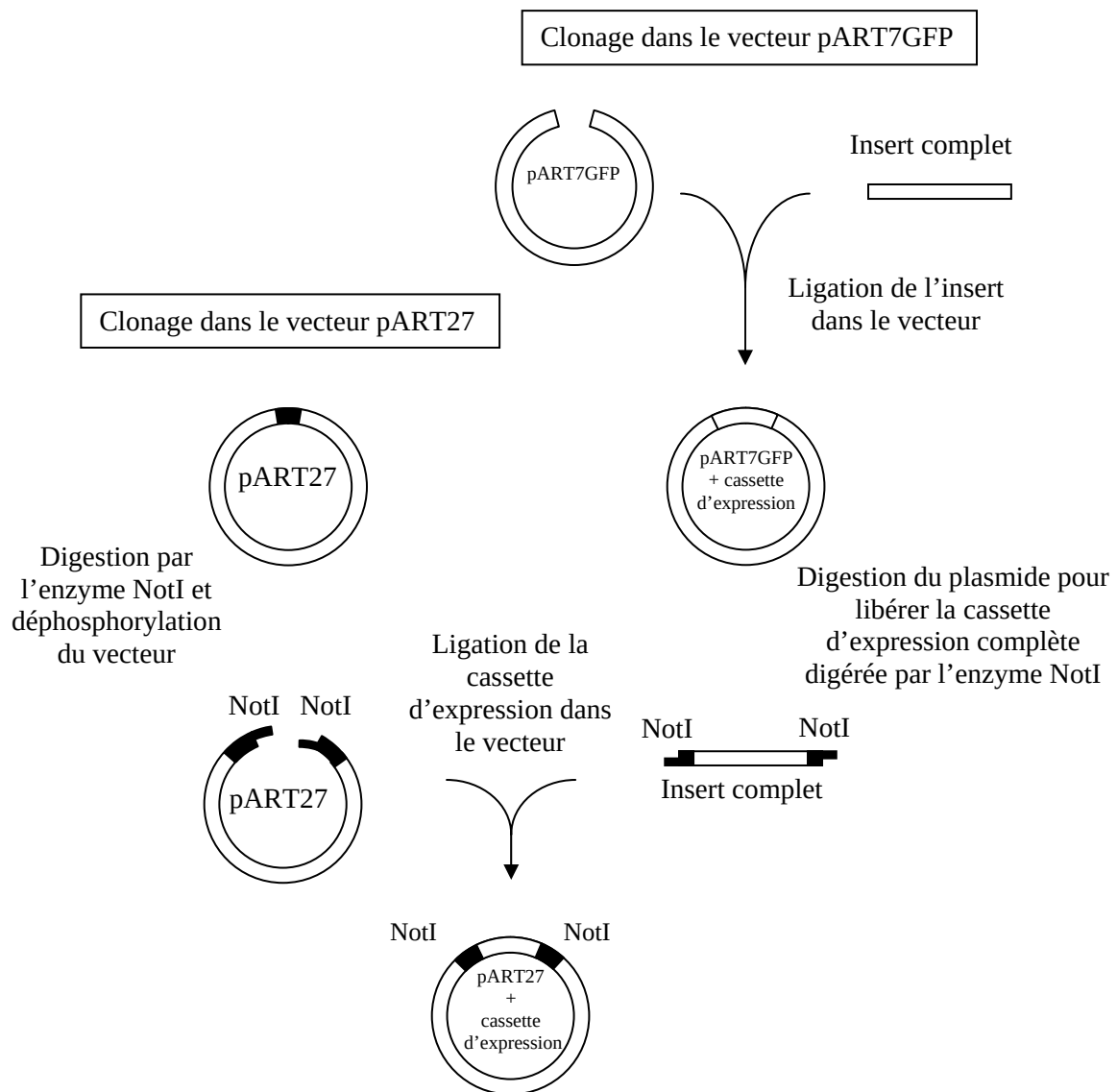


Figure 44 : Clonage dans les vecteurs pART7GFP et pART27.

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysé(s) par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s). L'étape de ligation s'effectue selon un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. Le mélange de ligation ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes d'*E. coli* souche DH5αF'. Les transformants positifs, vérifiés par PCR, sont alors sélectionnés et les plasmides bactériens sont extraits à l'aide du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad), selon le protocole proposé par le fournisseur.

9.4.1.3. Clonage dans le vecteur pART27

Trois à quatre µg de plasmide pART7GFP portant les fragments d'ADNc d'intérêt sont digérés par l'enzyme de restriction NotI afin de libérer la cassette d'expression portant le gène d'intérêt fusionné au gène codant pour la GFP (Figure 44). Ces fragments sont purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit « GFX™ PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech), seront ensuite ligués dans le vecteur pART27 digéré par la même enzyme de restriction NotI.

Le vecteur digéré est ensuite déphosphorylé par hydrolyse des groupements phosphate situés à ses extrémités 5' protubérantes à l'aide d'une phosphatase alcaline (Calf Intestine alkaline Phosphatase (Promega)). Cette étape est nécessaire afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même. Le plasmide ainsi traité est isolé par électrophorèse en gel d'agarose et purifié à l'aide du kit « GFX™ PCR DNA and gel band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech). Les fragments digérés sont clonés dans le vecteur pART27 ouvert et déphosphorylé selon un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. Le mélange de ligation ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes d'*E. coli* souche DH5αF'. Les transformants positifs, vérifiés par PCR, sont alors sélectionnés et les plasmides bactériens sont extraits à l'aide du kit « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad), selon le protocole proposé par le fournisseur.

9.4.2. Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans le vecteur pGEM®-T easy, sont purifiés après séparation sur gel d'agarose, à l'aide du kit « GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification » (Amersham Pharmacia Biotech).

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs autres que pGEM[®]-T easy sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysés par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s).

9.4.3. Ligation

Les ligations sont généralement effectuées avec un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3/1. La quantité d'insert requis est alors calculée à partir de la formule suivante :

$$\frac{(\text{ng de vecteur}) \times (\text{taille de l'insert})}{\text{taille du vecteur}} \times \frac{\text{mole d'insert}}{\text{mole de vecteur}} = \text{ng d'insert}$$

Cette étape de ligation se déroule pendant une nuit à 4°C dans un volume final de 10 µl contenant 10 à 50 ng de vecteur, 20 à 100 ng de fragment à cloner, 1 unité de T₄ ADN ligase dans le tampon de réaction préconisé par le fournisseur (Fermentas). Dans le cas d'une transformation par électroporation, le mélange de ligation est ensuite dialysé 20 min sur membrane 0,022 µm (Millipore) afin d'en éliminer les sels qui gênent la transformation.

9.4.4. Transformation des bactéries

9.4.4.1. Par électroporation

9.4.4.1.1. Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries sont cultivées dans 1 l de milieu LB (Luria-Bertani) (Tableau 5) jusqu'à une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 1 (phase exponentielle de croissance). La culture est alors refroidie dans la glace et centrifugée à 5000 rpm à 4°C pendant 15 min. Les cellules sont lavées à trois reprises dans 1 l d'eau ultrapure stérile et remises en suspension dans 20 ml de glycérol 10%. Après une nouvelle sédimentation, le culot est repris dans 5 ml de glycérol 10%. Cette suspension bactérienne est répartie par fractions de 40 µl qui sont ensuite congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C. Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C en milieu LB solide ou liquide avec agitation.

Tableau 11 : Composition du tampon TB (500 ml) pour la transformation chimique des bactéries.

Composés	Quantité
HEPES	1,19 g
CaCl ₂	1,1 g
KCl	9,32 g
Ajuster le pH à 6,7 avec KOH	
MnCl ₂	5,44 g

La solution est stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore) prérincé à l'eau distillée.

9.4.4.1.2. Transformation des cellules compétentes

Le mélange de ligation obtenu est utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* DH5 α F'. La transformation est effectuée par électroporation. Le mélange bactéries compétentes et plasmides est placé dans une cuve d'électroporation composée de deux électrodes séparées de 2 mm. Une décharge électrique de 2800 V est envoyée pendant 5 millisecondes et crée des micropores dans les parois et les membranes cytoplasmiques bactériennes, laissant l'ADN plasmidique pénétrer le temps de la décharge. Immédiatement après électroporation, 1 ml de milieu LB est ajouté et l'ensemble est placé à 37°C pendant 1 heure.

Le mélange de transformation est ensuite étalé sur boîtes de LB agar en présence de l'antibiotique adéquate pour sélectionner les bactéries ayant intégré des plasmides. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes.

9.4.4.2. Par choc thermique

9.4.4.2.1. Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries sont cultivées dans 5 ml de milieu LB à 37°C pendant 24 h. Une partie de cette préculture (50 μ l) est utilisée pour ensemencer 100 ml de milieu SOB (Tableau 5). Les bactéries sont cultivées sous forte agitation à une température comprise entre 18 et 20°C jusqu'à une DO à 600 nm de 0,6 (phase exponentielle de croissance). La culture est alors refroidie dans la glace et centrifugée à 3000 rpm à 4°C pendant 10 min. Les cellules sont lavées dans du tampon TB froid (Tableau 11), refroidies, puis centrifugées à 3000 rpm à 4°C pendant 10 min avant d'être remises en suspension dans 8 ml de tampon TB auquel on ajoute du DMSO pour une concentration finale de 7%. Après refroidissement, cette suspension bactérienne est répartie par fractions de 50 μ l qui sont ensuite congelées immédiatement par immersion dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

9.4.4.2.2. Transformation des cellules compétentes

5 μ l de mélange de ligation sont ajoutés à 50 μ l de bactéries compétentes, le tout étant placé dans la glace pendant 30 min. Ensuite les tubes sont placés dans un bain-marie à 42°C pendant 30 à 45 secondes. Immédiatement après ce choc thermique, 400 μ l de milieu LB ou SOC (Tableau 5) sont ajoutés dans les tubes et l'ensemble est placé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Le mélange de transformation est ensuite étalé sur boîtes de LB agar en

présence de l'antibiotique adéquate pour sélectionner les bactéries ayant intégré des plasmides. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes.

9.4.5. Transformation d'*A. tumefaciens* par électroporation

9.4.5.1. Préparation des cellules compétentes

La veille au soir, 5 ml de LB comportant les antibiotiques appropriés à la souche cultivée sontensemencés. La préculture est placée toute la nuit sous agitation modérée à 180 rpm à 27°C. Le lendemain matin, 2,5 ml de préculture sont utilisés pour ensemencer 500 ml de LB additionnés également des antibiotiques de sélection appropriés à la souche. Les cellules sont cultivées sous forte agitation à 225 rpm et à 27°C jusqu'à ce que la DO à 600nm de la culture atteigne 0,5-0,6. La culture est alors placée dans la glace pendant 15 min puis les cellules sont transférées dans des tubes de centrifugation préalablement refroidis. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 4200 rpm à 2°C et lavées dans 250ml d'eau ultrapure stérile froide puis remises en suspension dans 20 ml de glycérol 10% froid. Après une nouvelle centrifugation pendant 10 min à 4200 rpm à 2°C, le culot est repris dans un volume équivalent de glycérol 10% froid. La suspension est répartie par fractions de 50 µl qui sont ensuite congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

9.4.5.2. Transformation des cellules compétentes

Les plasmides pART27 et pBI101.3, portant respectivement le gène d'intérêt et le promoteur d'intérêt sont utilisés pour transformer les différents souches d'*A. tumefaciens*. Le plasmide pART27 est utilisé pour transformer la souche GV3101/pMP90 alors que le plasmide pBI101.3 est utilisé pour transformer la souche C58/pMP90. Dans chaque cas de figure, la transformation est effectuée par électroporation. Le mélange bactéries compétentes et plasmide est placé dans une cuve d'électroporation composée de deux électrodes séparées de 2 mm. Une décharge électrique de 2800 V est envoyée pendant 5 millisecondes et crée des micropores dans les parois et les membranes cytoplasmiques bactériennes, laissant l'ADN plasmidique pénétrer le temps de la décharge. Immédiatement après électroporation, 1 ml de milieu LB est ajouté et l'ensemble est placé à 37°C pendant 1 heure.

Le mélange de transformation est ensuite étalé sur boîtes de LB agar en présence de l'antibiotique adéquate pour sélectionner les bactéries ayant intégré des plasmides. Les boîtes

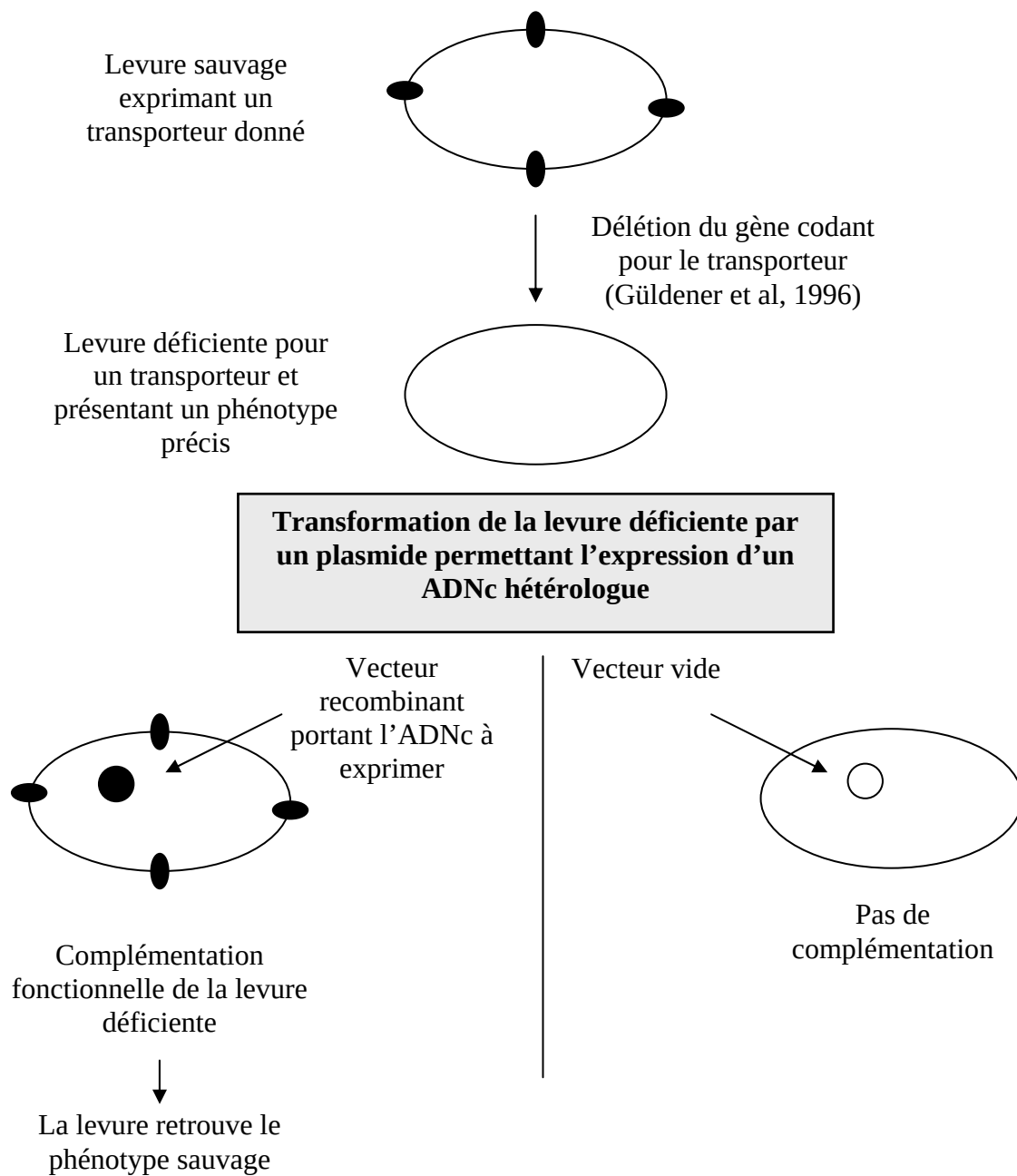


Figure 45 : Principe de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes.

sont incubées à 29°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes. Les transformants positifs sont vérifiés par PCR puis utilisés pour la transformation des plants de peuplier, d'*Arabidopsis* et de tabac.

10. Expression hétérologue dans *S. cerevisiae*

10.1. Transformation de *S. cerevisiae*

La transformation des cellules de levure par des plasmides d'expression est réalisée d'après la technique de Gietz *et al.* (1992) après traitement des cellules à l'acétate de lithium (AcLi) (Ito *et al.*, 1983).

10.1.1. Préparation des cellules

Une culture de levures (50 ml) en milieu riche YPD (Tableau 7) à DO 0,6 est centrifugée 5 min à 4000 rpm afin de récolter les cellules. Elles sont ensuite lavées deux fois dans 1 ml d'eau stérile. Les cellules sont ensuite lavées dans 1 ml d'un tampon TE (0,01 M Tris-base ; EDTA 0,001 M ; pH 7,5) / AcLi (0,1 M ; pH 7,5) puis reprises dans 0,5 ml du même tampon. Les cellules sont alors compétentes.

10.1.2. Transformation

A 50 µl de cellules sont ajoutés, 5 µl d'ADN "carrier" de sperme de saumon soniqué (10 mg/ml), 1 µg d'ADN à transformer (vecteur + insert correspondant à un transporteur ou vecteur vide) et 300 µl d'une solution PEG 4000 40% / TE / AcLi. Le mélange est incubé 30 min à 30°C sous agitation puis un choc thermique est réalisé pendant 15 min à 42°C. Les cellules sont rapidement lavées dans 1 ml d'eau stérile et étalées sur milieu de sélection gélosé spécifique de la souche utilisée. Les clones positifs apparaissent après quelques jours à 29°C. Un témoin (sans ADN) est réalisé et nous permet de nous assurer de la spécificité de la transformation.

Tableau 12 : Composition du milieu de culture utilisé pour la sélection des transformants de la souche de levure 31019b.

Composés	Concentration
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,4 g/l
NaCl	0,5 g/l
K ₂ SO ₄	1,0 g/l
Acide citrique	10,5 g/l
KOH	9,0 g/l
Agarose	8,0 g/l
Autoclaver 20 min à 120°C	
Solution de métaux	2 ml
Solution de vitamines	10 ml
Solution de glucose à 30%	100 ml
Solution de glutamine à 0,1 M	10 ml

Tableau 13 : Composition des solutions utilisées pour le milieu de culture utilisé pour recherche du phénotype des transformants de la souche de levure 31019b.

Composés	Concentration
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,4 g/l
NaCl	0,5 g/l
K ₂ SO ₄	1,0 g/l
Acide citrique	10,5 g/l
KOH	9,0 g/l
Agarose	8,0 g/l
Autoclaver 20 min à 120°C	
Solution de métaux	2 ml
Solution de vitamines	10 ml
Solution de glucose à 30%	100 ml
Solution de sulfate d'ammonium à 1 M	0 à 10 mM

Les solutions de vitamines, de métaux et de glutamine sont préparées, filtrées puis ajoutées après autoclavage.

Composition de la solution de vitamines (100 ml)

Composés	Quantité
Biotine	25 µg
Thiamine	10 mg
Inositol	0,1 g
Panthoténate	20 mg
Pyridoxine	10 mg

10.2. Test de complémentation

10.2.1. Principe

Le principe de la complémentation fonctionnelle de levure déficiente par un plasmide permettant l'expression d'un ADNc hétérologue est décrit sur la Figure 45. Les différents milieux, fonction de la souche déficiente, utilisés pour les tests de complémentation sont présentés ultérieurement.

10.2.2. Complémentation de la souche 31019b

La souche 31019b est déficiente pour les trois transporteurs d'ammonium Mep1, Mep2 et Mep3 (Marini et al., 1997). Elle est incapable de croître à des concentrations en ammonium inférieures à 10 mM. Le test de complémentation s'effectue sur milieu minimum gélosé, dépourvu d'uracile en présence de faibles concentrations d'ammonium permettant de visualiser la restauration de croissance de la souche déficiente. La souche sauvage correspondante 23344c transformée par le vecteur vide est utilisée comme témoin positif alors que la souche déletée transformée également par le vecteur vide sert de témoin négatif puisqu'elle ne pourra croître qu'en présence de 10 mM d'ammonium. Les différents milieux de culture utilisés sont indiqués dans les Tableaux 12 et 13.

10.2.3. Complémentation de la souche 22574d

La souche 22574d porte des mutations dans le transporteur général d'acides aminés (gap1), dans les proline (put4) et GABA (uga4) permeases. Elle est incapable de croître sur la citrulline, la proline ou le GABA comme seule source d'azote (Jauniaux et al., 1987). Le test de complémentation s'effectue sur un milieu dépourvu d'uracile et d'azote, supplémenté avec 20 mg/ml de glucose et 1 mg/ml de proline ou de GABA. La souche sauvage correspondante 23344c transformée par le vecteur vide est utilisée comme témoin positif alors que la souche déletée transformée également par le vecteur vide sert de témoin négatif. Les différents milieux de culture utilisés sont indiqués dans les Tableaux 14 et 15.

Composition de la solution de métaux (100 ml)

Composés	Quantité
H ₃ BO ₃	1 mg
CuSO ₄ 7H ₂ O	0,1 mg
KI	0,2 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,4 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,4 mg
MnSO ₄	40 mg
FeCl ₃	500 mg

Tableau 14 : Composition du milieu de culture SD-URA de sélection des transformants des souches de levure 22574d et 22Δ8AA.

Composés	Concentration
YNB (Sigma)	1,7 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
Yeast synthetic drop-out	
Supplement without uracil	1,92 g/l
Glucose	20,0 g/l
Ajuster pH à 5,8	
Agar	20,0 g/l

Tableau 15 : Composition des milieux de culture utilisés pour recherche du phénotype des transformants des souches de levure 22574d et 22Δ8AA.

Composés	Concentration
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,4 g/l
NaCl	0,5 g/l
K ₂ SO ₄	1,0 g/l
Acide citrique	10,5 g/l
KOH	9,0 g/l
Agarose	8,0 g/l
Autoclaver 20 min à 120°C	
Solution de métaux	2 ml
Solution de vitamines	10 ml
Solution de glucose à 30%	100 ml
Solution de l'acide aminé testé à 120 mM	1 à 6 mM

Les compositions des solutions de vitamines et de métaux sont identiques à celles présentées Tableau 14.

10.2.4. Complémentation de la souche 22ΔAA

La souche 22Δ8AA est déficiente pour huit transporteurs d'acides aminés situés au niveau de la membrane plasmalemmique. Elle est incapable de croître sur un milieu contenant la citrulline, la proline, le GABA, l'arginine, l'aspartate, ou le glutamate comme seule source d'azote (Fischer et al., 2002). Le test de complémentation s'effectue sur milieu minimum gélosé, dépourvu d'uracile, supplémenté avec un acide aminé présent à des concentrations de 1, 3 ou 6 mM. Les différents acides aminés testés sont l'aspartate, le glutamate, l'arginine, la proline et la citrulline. La souche sauvage correspondante 23344c transformée par le vecteur vide est utilisée comme témoin positif alors que la souche délétée transformée également par le vecteur vide sert de témoin négatif. Les différents milieux de culture utilisés sont indiqués dans les Tableaux 14 et 15.

10.3. Cinétiques d'absorption de [^{14}C] méthylamine dans *S. cerevisiae*

10.3.1. Préparation des cellules

Une culture de levures (25 ml) en milieu proline à DO 0,6 est centrifugée 5 min à 4000 rpm afin de récolter les cellules. Elles sont ensuite lavées et resuspendues dans du tampon phosphate pH7 20 mM de sorte que la DO finale soit égale à 8. Les cellules sont alors prêtes pour les expériences de marquage

10.3.2. Marquage des échantillons

100 μl de cellules préalablement préparées sont placées dans un bain agitant à 30°C en présence de glucose à une concentration finale de 3%. Au bout de 5 min, 100 μl de [^{14}C] méthylammonium, à diverses concentrations, sont ajoutés aux cellules. Des échantillons de 40 μl sont prélevés à 15, 30 et 60 secondes, dilués dans 4 ml de tampon phosphate pH7 20 mM méthylammonium froid 100 mM. Le tout est filtré (filtre GF/C, Whatmann) et lavés deux fois avec 4 ml d'eau. Les filtres sont ensuite placés dans du liquide de scintillation et la radioactivité est mesurée dans un compteur (TRI CARB 1900 TR, Packard).

Tableau 16 : Composition du tampon de plasmolyse.

Composés	Concentration
Mannitol	500 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
MES-KOH pH 5,6	10 mM

Tableau 17 : Composition de la solution enzymatique.

Composés	Concentration
Cellulysine	1%
Macerase	0,3%
Mannitol	400 mM
KCl	20 mM
MES-KOH pH 5,6	20 mM
Incuber 10 min à 55°C pour inactiver les protéases et augmenter la solubilité des enzymes. Refroidir la solution à température ambiante.	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
BSA	0,1%
Filtrer (filtre 0,45 µm) dans une boîte de Pétri	

Tableau 18 : Composition de la solution W5.

Composés	Concentration
CaCl ₂ , 2H ₂ O	125 mM
NaCl	154 mM
MES-KOH pH 5,6	2 mM
Glucose	5 mM
KCl	5 mM

Tableau 19 : Composition de la solution MaMg.

Composés	Concentration
Mannitol	400 mM
MgCl ₂ , 7H ₂ O	15 mM
MES-KOH pH 5,6	5 mM

Tableau 20 : Composition de la solution PEG-CMS.

Composés	Quantité
PEG 4000	1 g
Mannitol 1 M	500 µl
Ca(NO ₃) ₂	250 µl
H ₂ O	875 µl

10.3.3. Expression des résultats

La radioactivité incorporée est donnée en cpm. Connaissant la radioactivité spécifique de la solution utilisée et les DO à 600 nm des cultures cellulaires, les résultats peuvent être exprimés en nmol/min/ 10^8 cellules

11. Expression transitoire des fusions protéines-GFP chez *A. thaliana*

11.1. Préparation des protoplastes

Les protoplastes utilisés pour l'expression transitoire de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP sont préparés à partir de feuilles bien développées de plants d'*A. thaliana* âgés de 3 à 4 semaines.

Six à huit feuilles sont coupées en morceaux très fins de 0,5 à 1 mm, en présence de tampon de plasmolyse (Tableau 16). Les tissus ainsi obtenus sont ensuite transférés dans la solution enzymatique (Tableau 17) contenant les différentes enzymes qui vont dégrader les parois cellulaires. Le tout est placé sous vide pendant 5 min afin que la solution enzymatique pénètre bien dans l'ensemble des tissus. Les tissus ainsi infiltrés sont placés à l'obscurité à 23°C pendant 3 heures.

La solution obtenue est ensuite filtrée à travers une maille de nylon afin d'éliminer les débris cellulaires et de ne garder que les protoplastes.

4,5 ml de CaCl_2 200 mM sont ajoutés à la suspension de protoplastes. Les protoplastes sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 700 rpm puis repris à froid dans 10 ml de solution W5 (Tableau 18).

Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une chambre de Neubauer. L'intégrité des cellules est également vérifiée. Les protoplastes sont à nouveau centrifugés pendant 1 min à 700 rpm et repris à froid avec la solution W5 de façon à obtenir une concentration de l'ordre de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. La suspension cellulaire est alors refroidie pendant 30 min à l'obscurité avant d'être centrifugée pendant 1 min à 700 rpm. Les protoplastes sont alors resuspendus dans une solution MaMg (Tableau 19) de manière à obtenir une concentration de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ cellules/ml.

Tableau 21 : Composition du milieu de culture des protoplastes.

Composés	Concentration
MS salts + vitamins (Sigma M0404)	4,4g/l
Mannitol	350 mM
Glucose	50 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	3 mM
Ajuster le pH à 5,8 avec 30 µl KOH 1M	
Chloramphenicol	1 mg/l
Filtrer (filtre 0,22 µm)	

11.2. Transformation des protoplastes

100 µl de la suspension de protoplastes, c'est-à-dire environ $5 \cdot 10^4$ cellules/ml sont mis en présence de 10 µl d'ADN (vecteur pART7GFP portant l'ADNc sans codon STOP du gène d'intérêt fusionné au gène codant pour la GFP), correspondant environ à une quantité totale d'ADN de 10 à 15 µg. 110 µl sont de solution PEG-CMS (Tableau 20) sont ensuite ajoutés. L'ensemble est placé à l'obscurité, à 23°C pendant 30 min.

Des volumes croissants (0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml et 2 ml) de solution W5 sont progressivement ajoutés sur une période de 20 min. Les protoplastes sont de nouveau centrifugés pendant 2 min à 700 rpm, lavés avec 3 ml de milieu de culture avant d'être resuspendus au final dans 0,5 ml de milieu de culture de protoplastes (Tableau 21). Les protoplastes sont déposés dans des plaques de culture cellulaire dont les puits ont été préalablement traités au sérum afin d'éviter toute agrégation des protoplastes. Le tout est incubé toute une nuit, à l'obscurité et à 23°C. La fluorescence produite par la GFP est visualisée après 16 à 24 h d'incubation.

12. Génération de plants transgéniques d'*A. thaliana* exprimant les fusions PtrAMT1.2-GFP et PtrAMT1.6-GFP

Des plants sauvages d'*A. thaliana* sont utilisés pour l'expression constitutive de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP. La transformation s'effectue à l'aide de la souche GV3101/pMP90 d'*A. tumefaciens*

Pour surexprimer les fusions PtrAMT-GFP dans des plants d'*A. thaliana*, les cassettes d'expression présentes dans pART7GFP sont isolées après digestion par l'enzyme de restriction NotI. Les fragments purifiés sont ensuite insérés dans le vecteur pART27 (Gleave, 1992) préalablement digéré par NotI. Les plasmides résultants sont utilisés pour transformer la souche GV3101/pMP90 d'*A. tumefaciens*. Les transformants sont sélectionnés pour leur résistance à la spectinomycine et utilisés pour transformer les plants d'*A. thaliana* par la méthode dite des bourgeons floraux (Clough et Bent, 1998).

Une culture d'*A. tumefaciens* (500 ml) en milieu LB sélectif à DO 0,8-1 est centrifugée 5 min à 4000 rpm à 15°C afin de récolter les cellules. Elles sont ensuite reprises dans une solution de Triton 100X 0,05% et saccharose 5% de manière à ce que la DO à 600 nm soit environ de 0,8. Les feuilles jaunies, les fleurs ainsi que les siliques déjà formées des plantes utilisées pour la transformation sont éliminées. Les bourgeons floraux des plantes sont imbibés dans la

Tableau 22 : Compositions des différents milieux utilisés lors de la transformation du clone 717 1B-4 de peuplier par *A. tumefasciens*.

Pour 1 litre	Multiplication	Préculture et coculture	Décontamination sélection	Régénération
Composés	MS 1/2	M1	M2	M3
Macro-éléments	50 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Oligo-éléments	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Fe	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Myo-inositol	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
M.E.S	-	10 ml	10 ml	10 ml
Saccharose	20 g	30 g	30 g	30 g
pH	5,9-6	5,8	5,8	5,8
Agar	7 g	7 g	7 g	7 g
Après autoclavage				
Vitamines	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
L-Glutamine	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
2 ip	-	1 ml	1 ml	-
ANA	-	1 ml	1 ml	-
Ticarpen	-	-	5 ml	5 ml
Cefotaxine	-	-	5 ml	5 ml
TDZ	-	-	-	200 µl
Kanamycine	-	-	-	1 ml

La composition des différentes solutions a été obtenue d'après Leplé et al., 1992.

solution de cellules d'*A. tumefaciens* pendant 1 min en agitant légèrement et en évitant le contact des feuilles de la rosette principale avec la solution de transformation.

Les graines obtenues à partir des plantes transformées sont ensuite sélectionnées sur un milieu MS gélosé supplémenté avec de la kanamycine à raison de 50 mg/l. Les générations suivantes sont aussi sélectionnées en présence de kanamycine afin d'identifier les lignées homozygotes.

13. Expression transitoire dans des cellules de mésophylle de tabac

Une préculture de 10 ml d'*A. tumefaciens* portant le vecteur binaire approprié est mis à agiter toute une nuit à 27°C. Le milieu de culture est un milieu LB supplémenté avec les antibiotiques appropriés. Après centrifugation, les bactéries sont lavées avec du milieu d'infiltration (50 mM MES, 2 mM NaH₂PO₄, 0,5 % glucose et 100 µM acetosyringone) puis resuspendues dans ce même milieu afin d'obtenir une DO à 600 nm comprise entre 0,06 et 0,12. Les feuilles de tabac sont ensuite infiltrées à l'aide d'une seringue de 5 ml en appliquant une pression douce à travers les stomates de l'épiderme. Les plantes inoculées sont ensuite remises dans des conditions normales de culture. Les zones infiltrées sont coupées entre 48 h et 72 h après inoculation et observées au microscope confocal à fluorescence.

14. Transformation du Peuplier 717-1B4

La transformation d'explants de peuplier cultivé in vitro s'effectue en plusieurs étapes (Leplé et al., 1992).

14.1. Préculture d'*A. tumefaciens* et préparation des explants de peuplier

La première étape (vendredi) consiste en une préculture de la souche d'*A. tumefaciens* ainsi que la préparation des explants de peuplier destinés à être transformés. La souche d'*A. tumefaciens* utilisée pour la transformation est étalée en stries denses sur milieu LB additionné des antibiotiques appropriés à la souche d'*A. tumefaciens* et placée à 27°C pendant 48 h. Des entre-nœuds d'environ 0,8 cm sont prélevés sur des vitro-plants âgés de 2 mois environ. Les explants sont fendus sur la moitié de leur longueur et sont déposés en en boîtes de Pétri (20 explants par boîte) contenant le milieu M1 (Tableau 22) pour 48 h à l'obscurité à 24°C.



Figure 46 : Sélection des transformants sur milieu M2 contenant de la kanamycine.



Figure 47 : Apparition de cals verts (indiqués par les flèches) correspondant à la régénération des transformants.



Figure 48 : Apparition de bourgeons issus des cals.

14.2. Trempage

La deuxième étape (lundi), celle dite du trempage, consiste à préparer une suspension d'*A. tumefaciens* dans du MS30 liquide (Tableau 22) avec une DO à 660 nm de 0,3. Ensuite, 60 explants sont déposés dans 100 ml de suspension d'*A. tumefaciens* sous agitation douce à 125 tours/min pendant 16 h à 24°C et à l'obscurité.

14.3. Coculture

La troisième étape (mardi) est une étape de coculture. La suspension d'*A. tumefaciens* est éliminée par aspiration à l'aide d'une pipette stérile. Les explants sont ensuite lavés dans 100 ml d'eau stérile pendant 5 min à 125 tours/min. L'opération est renouvelée 5 à 7 fois afin d'éliminer le plus de bactéries possible. Les explants sont enfin tamponnés sur des serviettes en papier stériles puis placés sur le milieu M2 (Tableau 22) pendant 3 semaines à 24°C.

14.4. Sélection des transformants

Après 3 semaines sur milieu M2, les explants (Figure 46) sont placés sur un milieu M2 contenant de la kanamycine (50 mg/l). A partir de cette étape, les explants sont placés à la lumière et à 24°C. Le milieu de culture est renouvelé toutes les deux semaines jusqu'à apparition de cals verts sur les explants.

14.5. Régénération des transformants

Au fur et à mesure de leur apparition, les cals verts (Figure 47) sont excisés quand leur diamètre est supérieur à 0,1 cm. Les cals verts excisés sont placés sur le milieu M3 (Tableau 22) à 24°C, à la lumière. Le milieu de culture est renouvelé toutes les deux semaines. Lorsque les cals sont hérissés de bourgeons (Figure 48), la concentration de thidiazuron du milieu M3 est diminuée d'un facteur 10. Par la suite, les bourgeons allongés en pousse sont repiqués en tube sur le milieu de multiplication classique (Tableau 22) pour permettre leur enracinement et leur élongation.

Tableau 23 : Composition de la solution de coloration utilisée pour la localisation de l'activité des fusions promoteur-gène rapporteur GUS.

Composés	Concentration des solutions stock	Volume
Tampon Phosphate pH 7,0	100 mM	5 ml
K ₄ Fe(CN) ₆	100 mM	100 µl
K ₃ Fe(CN) ₆	100 mM	100 µl
Triton X-100	-	10 µl
X Gluc	-	3 mg
H ₂ O	-	4,8 ml

14.6. Localisation histochimique de l'expression des gènes par fusion promoteur du gène d'intérêt-gène rapporteur GUS

Le principe de la coloration est de révéler l'activité de l'enzyme β -glucuronidase afin de pouvoir visualiser l'expression du gène d'intérêt dans les tissus de la plante transformée. Le meilleur substrat de l'enzyme est le 5-bromo-4-chlor-3-indolyl glucuronide plus communément appelé X-GLUC. En présence de la β -glucuronidase, ce substrat donne un précipité bleu. Les tissus des plantes transformées sont isolés et incubés dans la solution de coloration (Tableau 23) à 37°C. Le temps d'incubation varie entre 20 min et quelques heures ; ce laps de temps dépendant de l'intensité de la coloration obtenue.

Les tissus ainsi colorés sont ensuite placés dans des bains d'éthanol 70% afin d'éliminer tous les pigments, notamment chlorophylliens, pour obtenir une meilleure visualisation de la coloration GUS.

Section 3 - Résultats

1. Le génome du peuplier *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)

Publication n°1 - Science 2006

Résumé : La présente étude porte sur le séquençage et l'assemblage du premier génome d'un arbre, celui du peuplier *Populus trichocarpa*. Plus de 45 000 gènes putatifs codant des protéines ont été identifiés. L'analyse du génome assemblé a mis en évidence un évènement de duplication entière du génome, à l'issue duquel environ 8 000 paires de gènes dupliqués ont été conservées dans le génome du peuplier. Un second évènement de duplication plus ancien, coïncide avec la divergence entre *Populus* et *Arabidopsis*. Les évènements tels que la substitution de nucléotides, la duplication en tandem de gènes et les réarrangements bruts des chromosomes apparaissent pour être plus lents chez le peuplier que chez *Arabidopsis*. Le peuplier présente un nombre de gènes codant des protéines plus important qu'*Arabidopsis*, avec en moyenne 1,4 à 1,6 homologues putatifs présents chez le peuplier pour chaque gène chez *Arabidopsis*. Cependant, la fréquence relative des domaines protéiques est similaire dans les deux génomes. Les exceptions surreprésentées chez le peuplier incluent des gènes associés avec la biosynthèse de la paroi ligno-cellulosique, le développement du méristème, la résistance aux maladies ainsi que le transport des métabolites.

The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)

G. A. Tuskan,^{1,3*} S. DiFazio,^{1,4†} S. Jansson,^{5†} J. Bohlmann,^{6†} I. Grigoriev,^{9†} U. Hellsten,^{9†} N. Putnam,^{9†} S. Ralph,^{6†} S. Rombauts,^{10†} A. Salamov,^{9†} J. Schein,^{11†} L. Sterck,^{10†} A. Aerts,⁹ R. R. Bhale Rao,⁵ R. P. Bhale Rao,¹² D. Blaudez,¹³ W. Boerjan,¹⁰ A. Brun,¹³ A. Brunner,¹⁴ V. Busov,¹⁵ M. Campbell,¹⁶ J. Carlson,¹⁷ M. Chalot,¹³ J. Chapman,⁹ G.-L. Chen,² D. Cooper,⁶ P. M. Coutinho,¹⁹ J. Couturier,¹³ S. Covert,²⁰ Q. Cronk,⁷ R. Cunningham,¹ J. Davis,²² S. Degroove,¹⁰ A. Déjardin,²³ C. dePamphilis,¹⁸ J. Detter,⁹ B. Dirks,²⁴ I. Dubchak,^{9,25} S. Duplessis,¹³ J. Ehlting,⁷ B. Ellis,⁶ K. Gendler,²⁶ D. Goodstein,⁹ M. Gribskov,²⁷ J. Grimwood,²⁸ A. Groover,²⁹ L. Gunter,¹ B. Hamberger,⁷ B. Heinze,³⁰ Y. Helariutta,^{12,31,33} B. Henrissat,¹⁹ D. Holligan,²¹ R. Holt,¹¹ W. Huang,⁹ N. Islam-Faridi,³⁴ S. Jones,¹¹ M. Jones-Rhoades,³⁵ R. Jorgensen,²⁶ C. Joshi,¹⁵ J. Kangasjärvi,³² J. Karlsson,⁵ C. Kelleher,⁶ R. Kirkpatrick,¹¹ M. Kirst,²² A. Kohler,¹³ U. Kalluri,¹ F. Larimer,² J. Leebens-Mack,²¹ J.-C. Leplé,²³ P. Locascio,² Y. Lou,⁹ S. Lucas,⁹ F. Martin,¹³ B. Montanini,¹³ C. Napoli,²⁶ D. R. Nelson,³⁶ C. Nelson,³⁷ K. Nieminen,³¹ O. Nilsson,¹² V. Pereda,¹³ G. Peter,²² R. Philippe,⁶ G. Pilate,²³ A. Poliakov,²⁵ J. Razumovskaya,² P. Richardson,⁹ C. Rinaldi,¹³ K. Ritland,⁸ P. Rouzé,¹⁰ D. Ryaboy,²⁵ J. Schmutz,²⁸ J. Schrader,³⁸ B. Segerman,⁵ H. Shin,¹¹ A. Siddiqui,¹¹ F. Sterky,³⁹ A. Terry,⁹ C.-J. Tsai,¹⁵ E. Uberbacher,² P. Unneberg,³⁹ J. Vahala,³² K. Wall,¹⁸ S. Wessler,²¹ G. Yang,²¹ T. Yin,¹ C. Douglas,^{7†} M. Marra,^{11†} G. Sandberg,^{12†} Y. Van de Peer,^{10†} D. Rokhsar,^{9,24†}

We report the draft genome of the black cottonwood tree, *Populus trichocarpa*. Integration of shotgun sequence assembly with genetic mapping enabled chromosome-scale reconstruction of the genome. More than 45,000 putative protein-coding genes were identified. Analysis of the assembled genome revealed a whole-genome duplication event; about 8000 pairs of duplicated genes from that event survived in the *Populus* genome. A second, older duplication event is indistinguishably coincident with the divergence of the *Populus* and *Arabidopsis* lineages. Nucleotide substitution, tandem gene duplication, and gross chromosomal rearrangement appear to proceed substantially more slowly in *Populus* than in *Arabidopsis*. *Populus* has more protein-coding genes than *Arabidopsis*, ranging on average from 1.4 to 1.6 putative *Populus* homologs for each *Arabidopsis* gene. However, the relative frequency of protein domains in the two genomes is similar. Overrepresented exceptions in *Populus* include genes associated with lignocellulosic wall biosynthesis, meristem development, disease resistance, and metabolite transport.

Forests cover 30% (about 3.8 billion ha) of Earth's terrestrial surface, harbor substantial biodiversity, and provide humanity with benefits such as clean air and water, lumber, fiber, and fuels. Worldwide, one-quarter of all industrial feedstocks have their origins in forest-based resources (1). Large and long-lived forest trees grow in extensive wild populations across continents, and they have evolved under selective pressures unlike those of annual herbaceous plants. Their growth and development involves extensive secondary growth, coordinated signaling and distribution of water and nutrients over great distances, and strategic storage and redistribution of metabolites in concordance with interannual climatic cycles. Their need to survive and thrive in fixed locations over centuries under continually changing physical and biotic stresses also sets them apart from short-lived plants. Many of the features that distinguish trees from other organisms, especially their large sizes and long-generation times, present challenges to the study of the cellular and molecular mechanisms that underlie their unique biology. To enable and facilitate such investigations in a relatively well-studied model

tree, we describe here the draft genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray), and compare it to other sequenced plant genomes.

P. trichocarpa was selected as the model forest species for genome sequencing not only because of its modest genome size but also because of its rapid growth, relative ease of experimental manipulation, and range of available genetic tools (2, 3). The genus is phenotypically diverse, and interspecific hybrids facilitate the genetic mapping of economically important traits related to growth rate, stature, wood properties, and paper quality. Dozens of quantitative trait loci have already been mapped (4), and methods of genetic transformation have been developed (5). Under appropriate conditions, *Populus* can reach reproductive maturity in as few as 4 to 6 years, permitting selective breeding for large-scale sustainable plantation forestry. Finally, rapid growth of trees coupled with thermochemical or biochemical conversion of the lignocellulosic portion of the plant has the potential to provide a renewable energy resource with a concomitant reduction of greenhouse gases (6–8). 117

Sequencing and Assembly

A single female genotype, “Nisqually 1,” was selected and used in a whole-genome shotgun

¹Environmental Sciences Division, ²Life Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831, USA. ³Plant Sciences Department, University of Tennessee, TN 37996, USA. ⁴Department of Biology, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA. ⁵Umeå Plant Science Centre, Department of Plant Physiology, Umeå University, SE-901 87, Umeå, Sweden. ⁶Michael Smith Laboratories, ⁷Department of Botany, ⁸Department of Forest Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada. ⁹U.S. Department of Energy, Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, USA. ¹⁰Department of Plant Systems Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium. ¹¹Genome Sciences Centre, 100-570 West 7th Avenue, Vancouver, BC V5Z 4S6, Canada. ¹²Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden. ¹³Tree-Microbe Interactions Unit, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)—Université Henri Poincaré, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France. ¹⁴Department of Forestry, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061, USA. ¹⁵Biotechnology Research Center, School of Forest Resources and Environmental Science, Michigan Technological University, Houghton, MI 49931, USA. ¹⁶Department of Cell and Systems Biology, University of Toronto, 25 Willcocks Street, Toronto, Ontario, M5S 3B2 Canada. ¹⁷School of Forest Resources and Huck Institutes of the Life Sciences, ¹⁸Department of Biology, Institute of Molecular Evolutionary Genetics, and Huck Institutes of Life Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA. ¹⁹Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR6098, CNRS and Universities of Aix-Marseille I and II, case 932, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille, France. ²⁰Warnell School of Forest Resources, ²¹Department of Plant Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA. ²²School of Forest Resources and Conservation, Genetics Institute, and Plant Molecular and Cellular Biology Program, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA. ²³INRA-Orléans, Unit of Forest Improvement, Genetics and Physiology, 45166 Olivet Cedex, France. ²⁴Center for Integrative Genomics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA. ²⁵Genomics Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA. ²⁶Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA. ²⁷Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. ²⁸The Stanford Human Genome Center and the Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA 94305, USA. ²⁹Institute of Forest Genetics, United States Department of Agriculture, Forest Service, Davis, CA 95616, USA. ³⁰Federal Research Centre for Forests, Hauptstrasse 7, A-1140 Vienna, Austria. ³¹Plant Molecular Biology Laboratory, Institute of Biotechnology, ³²Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FI-00014 Helsinki, Finland. ³³Department of Biology, 200014, University of Turku, FI-20014 Turku, Finland. ³⁴Southern Institute of Forest Genetics, United States Department of Agriculture, Forest Service and Department of Forest Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ³⁵Whitehead Institute for Biomedical Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA. ³⁶Department of Molecular Sciences and Center of Excellence in Genomics and Bioinformatics, University of Tennessee, Memphis, TN 38163, USA. ³⁷Southern Institute of Forest Genetics, United States Department of Agriculture, Forest Service, Saucier, MS 39574, USA. ³⁸Developmental Genetics, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany. ³⁹Department of Biotechnology, KTH, AlbaNova University Center, SE-106 91 Stockholm, Sweden.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: gtk@ornl.gov

†These authors contributed equally to this work as second authors.

‡These authors contributed equally to this work as senior authors.

sequence and assembly strategy (9). Roughly 7.6 million end-reads representing 4.2 billion high-quality (i.e., Q20 or higher) base pairs were assembled into 2447 major scaffolds containing an estimated 410 megabases (Mb) of genomic DNA (tables S1 and S2). On the basis of the depth of coverage of major scaffolds (~7.5 depth) and the total amount of nonorganellar shotgun sequence that was generated, the *Populus* genome size was estimated to be 485 ± 10 Mb ($\pm$ SD), in rough agreement with previous cytogenetic estimates of about 550 Mb (10). The near completeness of the shotgun assembly in protein-coding regions is supported by the identification of more than 95% of known *Populus* cDNA in the assembly.

The ~75 Mb of unassembled genomic sequence is consistent with cytogenetic evidence that ~30% of the genome is heterochromatic (9). The amount of euchromatin contained within the *Populus* genome was estimated in parallel by subtraction on the basis of direct measurements of 4',6'-diamidino-2-phenylindole-stained prophase and metaphase chromosomes (fig. S4). On average, $69.5 \pm 0.3\%$ of the genome consisted of euchromatin, with a significantly lower proportion of euchromatin in linkage group I (LGI) ($66.4 \pm 1.1\%$) compared with the other 18 chromosomes ($69.7 \pm 0.03\%$, $P \leq 0.05$). In contrast, *Arabidopsis* chromosomes contain roughly 93% euchromatin (11). The unassembled shotgun sequences were derived from variants of organellar DNA, including recent nuclear translocations; highly repetitive genomic DNA; haplotypic segments that were redundant with short subsegments of the major scaffolds (separated as a result of extensive sequence polymorphism and allelic variants); and contaminants of the template DNA, such as endophytic microbes inhabiting the leaf and root tissues used for template preparation (12) (fig. S1 and table S3). The end-reads correspond-

ing to chloroplast (fig. S5) and mitochondrial genomes were assembled into circular genomes of 157 and 803 kb, respectively (9).

We anchored the 410 Mb of assembled scaffolds to a sequence-tagged genetic map (fig. S3). In total, 356 microsatellite markers were used to assign 155 scaffolds (335 Mb of sequence) to the 19 *P. trichocarpa* chromosome-scale linkage groups (13). The vast majority (91%) of the mapped microsatellite markers were colinear with the sequence assembly. At the extremes, the smallest chromosome, LGIX [79 centimorgans (cM)], is covered by two scaffolds containing 12.5 Mb of assembled sequence, whereas the largest chromosome, LGI (265 cM), contains 21 scaffolds representing 35.5 Mb (fig. S3). We also generated a physical map based on bacterial artificial chromosome (BAC) fingerprint contigs using a Nisqually-1 BAC library representing an estimated 9.5-fold genome coverage (fig. S2). Paired BAC-end sequences from most of the physical map were linked to the large-scale assembly, permitting 2460 of the physical map contigs to be positioned on the genome assembly. Combining the genetic and physical map, nearly 385 Mb of the 410 Mb of assembled sequence are placed on a linkage group.

Unlike *Arabidopsis*, where predominantly self-fertilizing ecotypes maintain low levels of allelic polymorphism, *Populus* species are predominantly dioecious, which results in obligate outcrossing. This compulsory outcrossing, along with wind pollination and wind-dispersed plume seeds, results in high levels of gene flow and high levels of heterozygosity (that is, within individual genetic polymorphisms). Within the heterozygous Nisqually-1 genome, we identified 1,241,251 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) or small insertion/deletion polymorphisms (indels) for an overall rate of approximately 2.6 polymorphisms per kilobase. Of these polymorphisms, the overwhelming majority (83%) occurred in noncoding portions of the genome (Table 1). Short indels and SNPs within exons resulted in frameshifts and nonsense stop codons within predicted exons, respectively, suggesting that null alleles of these genes exist in one of the haplotypes. Some of the polymorphisms may be artifacts from the assembly process,

although these errors were minimized by using stringent criteria for SNP identification (9).

Gene Annotation

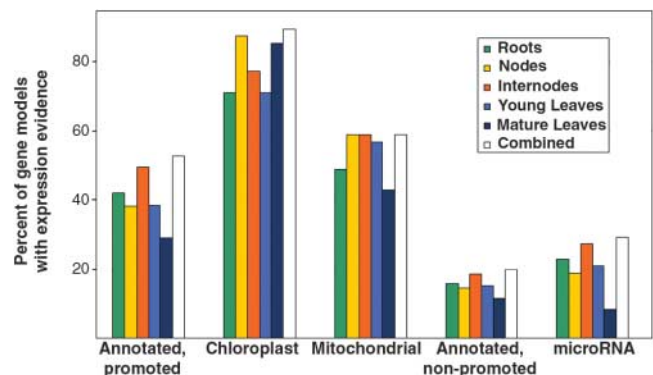
We tentatively identified a first-draft reference set of 45,555 protein-coding gene loci in the *Populus* nuclear genome (www.jgi.doe.gov/poplar) using a variety of ab initio, homology-based, and expressed sequence tag (EST)-based methods (14–17) (table S5). Similarly, 101 and 52 genes were annotated in the chloroplast and mitochondrial genomes, respectively (9). To aid the annotation process, 4664 full-length sequences, from full-length enriched cDNA libraries from Nisqually 1, were generated and used in training the gene-calling algorithms. Before gene prediction, repetitive sequences were characterized (fig. S15 and table S14) and masked; additional putative transposable elements were identified and subsequently removed from the reference gene set (9). Given the current draft nature of the genome, we expect that the gene set in *Populus* will continue to be refined.

About 89% of the predicted gene models had homology [expectation (E) value $\leq 1 \times 10^{-8}$] to the nonredundant (NR) set of proteins from the National Center for Biotechnology Information, including 60% with extensive homology that spans 75% of both model and NR protein lengths. Nearly 12% (5248) of the predicted *Populus* genes had no detectable similarity to *Arabidopsis* genes (E value $\leq 1 \times 10^{-3}$); conversely, in the more refined *Arabidopsis* set, only 9% (2321) of the predicted genes had no similarity to the *Populus* reference set. Of the 5248 *Populus* genes without *Arabidopsis* similarity, 1883 have expression evidence from the manually curated *Populus* EST data set, and of these, 274 have no hits (E value $\geq 1 \times 10^{-3}$) to the NR database (9). Whole-genome oligonucleotide microarray analysis provided evidence of tissue-based expression for 53% of the reference gene models (Fig. 1). In addition, a signal was detected from 20% of genes that were initially annotated and excluded from the reference set, suggesting that as many as 4000 additional genes (or gene fragments) may be present. Within the reference gene set, we identified 13,019 pairs of orthologs between

Table 1. Characterization of polymorphisms according to their positions relative to predicted coding sequences, introns, and untranslated regions (UTRs). Rate shows the percentage of potential sites of each class that were polymorphic. Most indels within exons resulted in frame shifts, but we could not quantify this due to difficulties with assembly and sequencing of regions containing indels. Nonsense mutations created stop codons within predicted exons.

Source	Number of loci	Rate (%)
Noncoding	1,027,322	0.32
INTRON	141,199	0.25
3'UTR	6,731	0.25
5'UTR	3,306	0.24
Exon	62,656	0.14
Within exons:		
Indels	2,722	0.01
Nonsense	926	0.02
Nonsynonymous	32,207	0.10

Fig. 1. Whole-genome oligonucleotide microarray expression data for all predicted gene models in *P. trichocarpa*. Values represent the proportion of genes expressed above negative controls at a 5% false discovery rate. The x axis represents the subsets of predicted genes that were analyzed for the annotated and promoted *P. trichocarpa* gene set (42,373 genes), chloroplast gene set (49 genes), mitochondria gene set (49 genes), annotated, nonpromoted gene set (10,875 genes), and



genes in *Populus* and *Arabidopsis* using the best bidirectional Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) hits, with average mutual coverage of these alignments equal to 93%; 11,654 pairs of orthologs had greater than 90% alignment of gene lengths, whereas only 156 genes had less than 50% coverage. As of 1 June 2006, ~10% (4378) gene models have been manually validated and curated.

Genome Organization

Genome duplication in the Salicaceae. *Populus* and *Arabidopsis* lineages diverged about 100 to 120 million years ago (Ma). Analysis of the

Populus genome provided evidence of a more recent duplication event that affected roughly 92% of the *Populus* genome. Nearly 8000 pairs of paralogous genes of similar age (excluding tandem or local duplications) were identified (Fig. 2). The relative age of the duplicate genes was estimated by the accumulated nucleotide divergence at fourfold synonymous third-codon transversion position (4DTV) values. A sharp peak in 4DTV values, corrected for multiple substitutions, representing a burst of gene duplication, is evident at 0.0916 ± 0.0004 (Fig. 3A). Comparison of 1825 *Populus* and *Salix* orthologous genes derived from *Salix* EST suggests that both genera share

this whole-genome duplication event (Fig. 3B). Moreover, the parallel karyotypes and collinear genetic maps (18) of *Salix* and *Populus* also support the conclusion that both lineages share the same large-scale genome history. If we naively calibrated the molecular clock using synonymous rates observed in the Brassicaceae (19) or derived from the *Arabidopsis-Oryza* divergence (20), we would conclude that the genome duplication in *Populus* is very recent [8 to 13 Ma, as reported by Sterk (21)]. Yet the fossil record shows that the *Populus* and *Salix* lineages diverged 60 to 65 Ma (22–25). Thus, the molecular clock in *Populus* must be ticking at only

Fig. 2. Chromosome-level reorganization of the most recent genome-wide duplication event in *Populus*. Common colors refer to homologous genome blocks, presumed to have arisen from the salicoid-specific genome duplication 65 Ma, shared by two chromosomes. Chromosomes are indicated by their linkage group number (I to XIX). The diagram to the left uses the same color coding and further illustrates the chimeric nature of most linkage groups.

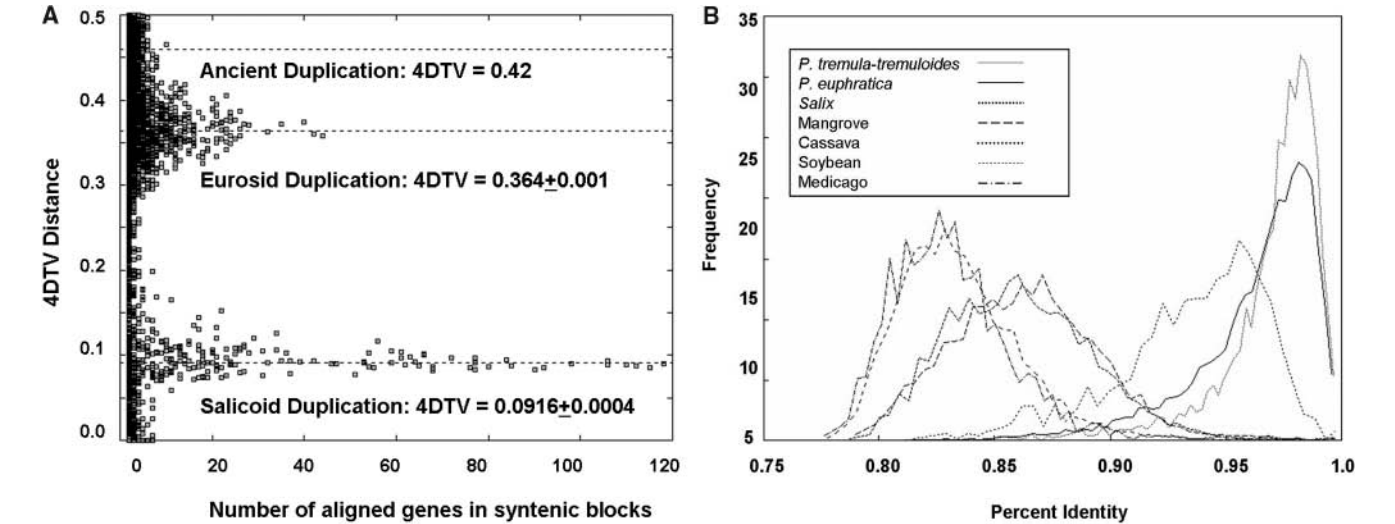
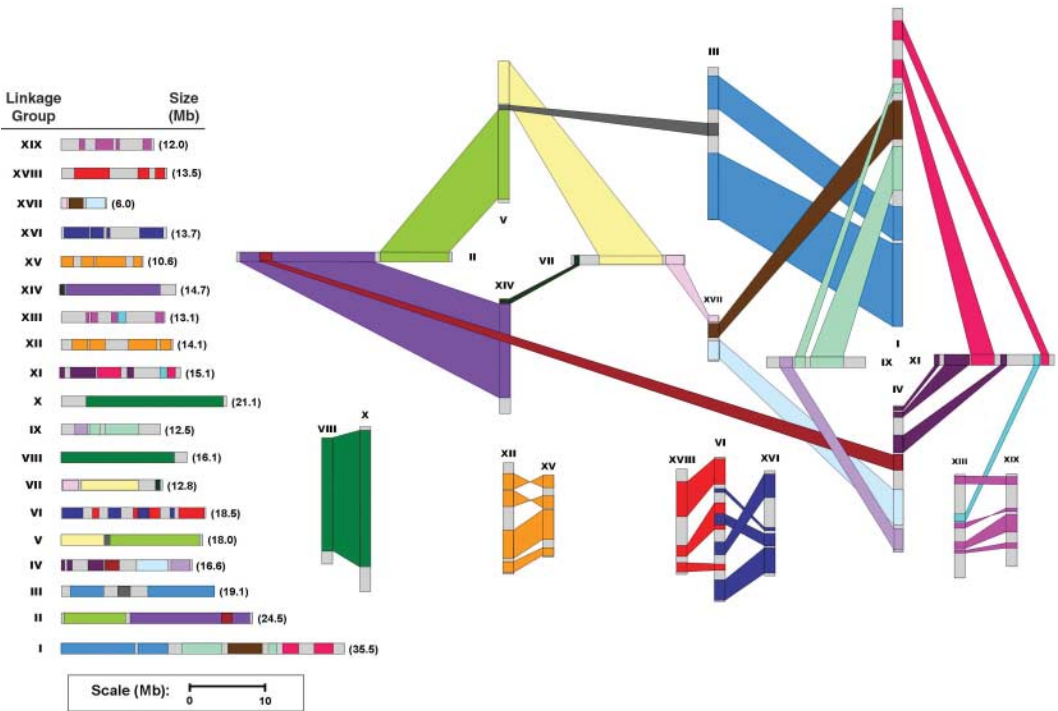


Fig. 3. (A) The 4DTV metrics for paralogous gene pairs in *Populus-Populus* and *Populus-Arabidopsis*. Three separate genome-wide duplications events are detectable, with the most recent event contained within19 *Populus trichocarpa* CDS. the Salicaceae and the middle event apparently shared among the Eurosoids. (B) Percent identity distributions for mutual best EST hit to

one-sixth the estimated rate for *Arabidopsis* (that is, 8 to 13 Ma divided by 60 to 65 Ma). Qualitatively similar slowing of the molecular clock is found in the *Populus* chloroplast and mitochondrial genomes (9). Because *Populus* is a long-lived vegetatively propagated species, it has the potential to successfully contribute gametes to multiple generations. A single *Populus* genotype can persist as a clone on the landscape for millennia (26), and we propose that recurrent contributions of “ancient gametes” from very old individuals could account for the markedly reduced rate of sequence evolution. As a result of the slowing of the molecular clock, the *Populus* genome most likely resembles the ancestral eusoid genome.

To test whether the burst of gene creation 60 to 65 Ma was due to a single whole-genome event or to independent but near-synchronous gene duplication events, we used a variant of the algorithm of Hokamp *et al.* (27) to identify segments of conserved synteny within the *Populus* genome. The longest conserved syntenic block from the 4DTV ~0.09 epoch spanned 765 pairs of paralogous genes. In total, 32,577 genes were contained within syntenic blocks from the salicoid epoch; half of these genes were contained in segments longer than 142 paralogous pairs. The same algorithm, when applied to randomly shuffled genes, typically yields duplicate blocks with fewer than 8 to 9 genes, indicating that the *Populus* gene duplications occurred as a single genome-wide event. We refer to this duplication event as the “salicoid” duplication event.

Nearly every mapped segment of the *Populus* genome had a parallel “paralogous” segment elsewhere in the genome as a result of the salicoid event (Fig. 2). The pinwheel patterns can be understood as a whole-genome duplication followed by a series of reciprocal tandem terminal fusions between two separate sets of four chromosomes each—the first involving LGII, V, VII, and XIV and the second involving LGI, XI, IV, and IX. In addition, several chromosomes appear to have experienced minor reorganizational exchanges. Furthermore, LGI appears to be the result of multiple rearrangements involving three major tandem fusions. These results suggest that the progenitor of *Populus* had a base chromosome number of 10. After the whole-genome duplication event, this base chromosome number experienced a genome-wide reorganization and diploidization of the duplicated chromosomes into four pairs of complete paralogous chromosomes (LGVI, VIII, X, XII, XIII, XV, XVI, XVIII, and XIX); two sets of four chromosomes, each containing a terminal translocation (LGI, II, IV, V, VII, IX, and XI); and one chromosome containing three terminally joined chromosomes (LGIII with I or XVII with VII). The colinearity of genetic maps among multiple *Populus* species suggests that the genome reorganization occurred before the evolution of the modern taxa of *Populus*.

Genome duplication in a common ancestor of *Populus* and *Arabidopsis*. The distribution of 4DTV values for paralogous pairs of genes

also shows that a large fraction of the *Populus* genome falls in a set of duplicated segments anchored by gene pairs with 4DTV at 0.364 ± 0.001 , representing the residue of a more ancient, large-scale, apparently synchronous duplication event (Fig. 3A). This relatively older duplication event covers about 59% of the *Populus* genome with 16% of genes in these segments present in two copies. Because this duplication preceded and is therefore superimposed upon the salicoid event, each genomic region is potentially covered by four such segments. Similarly, the *Arabidopsis* genome experienced an older “beta” duplication that preceded the Brassicaceae-specific “alpha” event (28–32).

We next asked whether the *Arabidopsis* “beta” (30, 32) and *Populus* 4DTV ~0.36 duplication events were (i) independent genome-wide duplications that occurred after the split from the last common eusoid ancestor (H_1) or (ii) a single shared duplication event that occurred in an ancestral lineage (i.e., before the divergence of eusoid lineages I and II) (H_2). These two hypotheses have very different implications for the interpretation of homology between *Populus* and *Arabidopsis*. Under H_1 , each genomic segment in one species is homologous to four segments in the other; whereas under H_2 , each segment is homologous to only two segments in the other species. These hypotheses were tested by comparing the relative distances between gene pairs sampled within and between *Populus* and *Arabidopsis*. H_2 was generally supported (9), but we could not reject H_1 . We can only conclude that the *Populus* genome duplication occurred very close to the time of divergence of the eusoid I and II lineages (9), with slight support for a shared duplication. This coincident timing raises the possibility of a causal link between this duplication and rapid diversification early in eusoid (and perhaps core eudicot) history. We refer to this older *Populus/Arabidopsis* duplication event as the “eusoid” duplication event. We note that the salicoid duplication occurred independently of the eusoid duplication observed in the *Arabidopsis* genome.

Gene Content

Although *Populus* has substantially more protein-coding genes than *Arabidopsis*, the relative frequency of domains represented in protein databases (Prints, Prosite, Pfam, ProDom, and SMART) in the two genomes is similar (9). However, the most common domains occur in *Populus* compared with *Arabidopsis* in a ratio ranging from 1.4:1 to 1.8:1. Noteworthy outliers in *Populus* include genes and gene domains associated with disease and insect resistance (such as, in *Populus* versus *Arabidopsis*, respectively: leucine-rich repeats, 1271 versus 527; NB-ARC domain, 302 versus 141; and thaumatin, 55 versus 24), meristem development (such as NAC transcription factors, 157 versus 100, respectively), and metabolite and nutrient transport [such as oligopeptide transporter of the proton-

dependent oligopeptide transporter (POT) and oligopeptide transporter (OPT) families, 129 versus 61, and potassium transporter, 30 versus 13, respectively].

Some domains were underrepresented in *Populus* compared with *Arabidopsis*. For example, the F-box domain was twice as prevalent in *Arabidopsis* as in *Populus* (624 versus 303, respectively). The F-box domain is involved in diverse and complex interactions involving protein degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway (33). Many of the ubiquitin-associated domains are underrepresented in *Populus* compared with *Arabidopsis* (for example, the *Ulp1* protease family and the C-terminal catalytic domain, 10 versus 63, respectively). Moreover, the RING-finger domains are nearly equally present in both genomes (503 versus 407, respectively), suggesting that protein degradation pathways in the two organisms are metabolically divergent.

The common eusoid gene set. The *Populus* and *Arabidopsis* gene sets were compared to infer the conserved gene complement of their common eusoid ancestor, integrating information from nucleotide divergence, synteny, and mutual best BLAST-hit analysis (9). The ancestral eusoid genome contained at least 11,666 protein-coding genes, along with an undetermined number that were either lost in one or both of the lineages or whose homology could not be detected. These ancestral genes were the progenitors of gene families of typically one to four descendants in each of the complete plant genomes and account for 28,257 *Populus* and 17,521 *Arabidopsis* genes. Gene family lists are accessible at www.phytozome.net. The gene predictions in these two genomes that could not be accounted for in the eusoid clusters were often fragmentary or difficult to categorize, and we could not confidently assign orthology to them. They may include previously unidentified or rapidly evolving genes in the *Populus* and/or *Arabidopsis* lineages, as well as poorly predicted genes.

Noncoding RNAs. Based on a series of publicly available RNA detection algorithms (34), including tRNAscan-SE, INFERNAL, and snoScan, we identified 817 putative tRNAs; 22 U1, 26 U2, 6 U4, 23 U5, and 11 U6 spliceosomal small nuclear RNAs (snRNAs); 339 putative C/D small nucleolar RNAs (snoRNAs); and 88 predicted H/ACA snoRNAs in the *Populus* assembly. All 57 possible anticodon tRNAs were found. One selenocysteine tRNA was detected and two possible suppressor tRNAs (anticodons that bind stop codons) were also identified. *Populus* has nearly 1.3 times as many tRNA genes as *Arabidopsis*. In contrast to *Arabidopsis* (fig. S7A), the copy number of tRNA in *Populus* was significantly and positively correlated with amino acid occurrence in predicted gene models (fig. S7B). The ratio of the number of snRNAs in *Populus* compared with the number in *Arabidopsis* is 1.3 to 1.0, yet U1, U2, and U5 are overrepresented in *Populus*, whereas U4 is underrepresented. Further-

more, U14 was not detected in *Arabidopsis*. The snRNAs and snoRNAs have not been experimentally verified in *Populus*.

There are 169 identified microRNA (miRNA) genes representing 21 families in *Populus* (table S7). In *Arabidopsis*, these 21 families contain 91 miRNA genes, representing a 1.9X expansion in *Populus*, primarily in miR169 and miR159/319. All 21 miRNA families have regulatory targets that appear to be conserved among *Arabidopsis* and *Populus* (table S8). Similar to the miRNA genes themselves, the number of predicted targets for these miRNA is expanded in *Populus* (147) compared with *Arabidopsis* (89). Similarly, the genes that mediate RNA interference (RNAi) are also overrepresented in *Populus* (21) compared to *Arabidopsis* (11) [e.g., AGO1 class, 7 versus 3; RNA helicase 2 versus 1; HEN, 2 versus 1; HYL1-like (double-stranded RNA binding proteins), 9 versus 5, respectively].

Tandem duplications. In *Populus* there were 1518 tandemly duplicated arrays of two or more genes based on a Smith-Waterman alignment *E* value $\leq 10^{-25}$ and a 100-kb window. The total number of genes in such arrays was 4839 and the total length of tandemly duplicated segments in *Populus* was 47.9 Mb, or 15.6% of the genome (fig. S8). By the same criteria, there are 1366 tandemly duplicated segments in *Arabidopsis*, covering 32.4 Mb, or 27% of the genome. By far the most common number of genes within a single array was two, with 958 such arrays in *Populus* and 805 in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* had a larger number of arrays containing six or more genes than did *Populus*. Tandem duplications thus appear to be relatively more common in *Arabidopsis* than in *Populus*. This may in part be due to difficulties in assembling tandem repeats from a whole-genome shotgun sequencing approach, particularly when tandemly duplicated genes are highly conserved. Alternatively, the *Populus* genome may be undergoing rearrangements at a slower rate than the *Arabidopsis* genome, which is consistent with our observations of reduced chromosomal rearrangements and slower nucleotide substitution rates in *Populus*.

In some cases, genes were highly duplicated in both species, and some tandem duplications predated the *Populus*-*Arabidopsis* split (9). The largest number of tandem repeats in *Populus* in a single array was 24 and contained genes with high homology to S locus-specific glycoproteins. Genes of this class also occur as tandem repeats in *Arabidopsis*, with the largest segments containing 14 tandem duplicates on chromosome 1. One of the InterPro domains in this protein, IPR008271, a serine/threonine protein kinase active site, was the most frequent domain in tandemly repeated genes in both species (fig. S8). Other common domains in both species were the leucine-rich repeat (IPR007090, primarily from tandem repeats of

disease resistance genes), the pentatricopeptide repeat RNA-binding proteins (IPR002885), and the uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase domain (IPR002213) (table S9).

In contrast, some genes were highly expanded in tandem duplicates in one genome and not in the other (fig. S8). For example, one of the most frequent classes of tandemly duplicated genes in *Arabidopsis* was F-box genes, with a total of 342 involved in tandem duplications, the largest segment of which contained 24 F-box genes. *Populus* contains only 37 F-box genes in tandem duplications, with the largest segment containing only 3 genes.

Postduplication Gene Fate

Functional expression divergence. In *Populus*, 20 of the 66 salicoid-event duplicate gene pairs contained in 19 *Populus* EST libraries (2.3% of the total) showed differential expression (9) [displaying significant deviation in EST frequencies per library (Fig. 4)]. Out of 18 eurosid-event duplicate gene pairs (2.7% of the total), 11 also displayed significant deviation in EST frequencies per library. Many of the duplicate gene pairs that displayed significant overrepresentation in one or more of the 19 sampled libraries were involved in protein-protein interactions (such as annexin) or protein folding (such as cyclophilins). In the eurosid set, there was a greater divergence in the best BLAST hit among pairwise sets of genes. These results support the premise of functional expression divergence among some duplicated gene pairs in *Populus*.

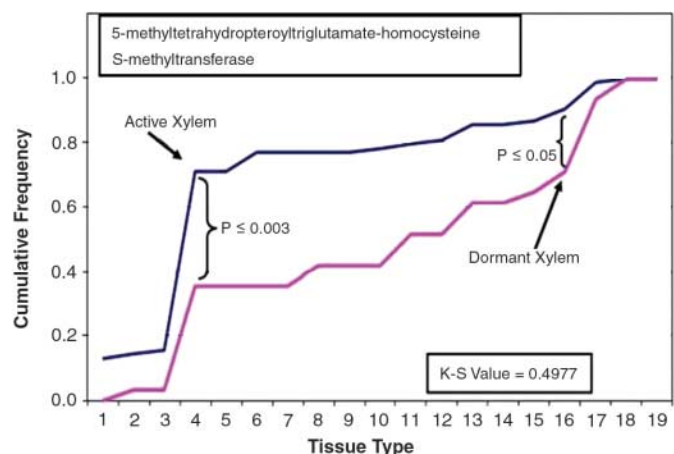
To further test for variation in gene expression among duplicated genes, we examined whole-genome oligonucleotide microarray data containing the 45,555 promoted genes (9). There was significantly lower differential expression in the salicoid duplicated pairs of genes (mean = 5%) relative to eurosid duplications (mean = 11%), again suggesting that differential expression patterns for retained paralogous gene pairs is

an ongoing process that has had more time to occur in eurosid pairs (Fig. 5). This difference could also be due to absolute expression level, which may vary systematically between the two duplication events. Moreover, differential expression was more evident in the wood-forming organs. Almost 14 and 13% (2632 pairs of genes) of eurosid duplicated genes in the nodes and internodes, respectively, displayed differential expression, compared with 8% or less in roots and young leaves (Fig. 5).

Single-nucleotide polymorphisms. *Populus* is a highly polymorphic taxon and substantial numbers of SNPs are present even within a single individual (Table 1). The ratio of non-synonymous to synonymous substitution rate ($\omega = dN/dS$) was calculated as an index of selective constraints for alleles of individual genes (9). The overall average *dN* across all genes was 0.0014, whereas the *dS* value was 0.0035, for a total ω of 0.40, suggesting that the majority of coding regions in the *Populus* genome are subject to purifying selection. There was a significant, negative correlation between ω and the 4DTV distance to the most closely related paralog ($r = -0.034$, $P = 0.028$), which is consistent with the expectation of higher levels of nonsynonymous polymorphism in recently duplicated genes as a result of functional redundancy (20, 35). Similarly, genes with recent tandem duplicates (4DTV ≤ 0.2) had significantly higher ω than did genes with no recent tandem duplicates (Wilcoxon rank sum $Z = 8.65$, $P \leq 0.0001$) (table S10).

The results for tandemly duplicated genes were consistent with expectations for accelerated evolution of duplicated genes (20). However, this expectation was not upheld for paralogous pairs of genes from the whole-genome duplication events. Relative rates of nonsynonymous substitution were actually lower for genes with paralogs from the salicoid and eurosid whole-genome duplication events than for genes with no paralogs (table S11). One possible explanation for this

Fig. 4. Kolmogorov-Smirnov (K-S) test for differential expression for 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase genes [for descriptions of the EST data set, see Sterky *et al.* (79)]. Results suggest that the duplicated genes in *Populus* are differentially expressed in alternate tissues. Tissue types include: cambial zone (1), young leaves (2), flower buds (3), tension wood (4), senescing leaves (5), apical shoot (6), dormant cambium (7), active cambium (8), cold stressed leaves (9), roots (10), bark (11), shoot meristem (12), male catkins (13), dormant buds (14), female catkins (15), petioles (16), wood cell death (17), imbibed seeds (18) and infected leaves (19).



discrepancy is that the apparent single-copy genes have a corresponding overrepresentation of rapidly evolving pseudogenes. However, this does not appear to be the case, as demonstrated by an analysis of gene size, synonymous substitution rate, and minimum genetic distance to the closest paralog as covariates in an analysis of variance with ω as the response variable (table S11). Therefore, genes with no paralogs from the salicoid and eurosid duplication events seem to be under lower selective constraints, and purifying selection is apparently stronger for genes with paralogs retained from the whole-genome duplications. Chapman *et al.* (36) have recently proposed the concept of functional buffering to account for similar reduction in detected mutations in paralogs from whole-genome duplications in *Arabidopsis* and *Oryza*. The vegetative propagation habit of *Populus* may also favor the conservation of nucleotide sequences among duplicated genes, in that complementation among duplicate pairs of genes would minimize loss of gene function associated with the accumulation of deleterious somatic mutations.

Gene family evolution. The expansion of several gene families has contributed to the evolution of *Populus* biology.

Lignocellulosic wall formation. Among the processes unique to tree biology, one of the most obvious is the yearly development of secondary xylem from the vascular cambium. We identified *Populus* orthologs of the approximately 20 *Arabidopsis* genes and gene families involved in or associated with cellulose biosynthesis. The *Populus* genome has 93 cellulose synthesis-related genes compared with 78 in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* genome encodes 10 *CesA* genes belonging to six classes known to participate in cellulose microfibril biosynthesis (37). *Populus* has 18 *CesA* genes (38), including duplicate copies of *CesA7* and *CesA8* homologs. *Populus* homologs of *Arabidopsis CesA4*, *CesA7*, and *CesA8* are coexpressed during xylem development and tension wood formation (39). Furthermore, one pair of *CesA* genes appears unique to *Populus*, with no homologs found in *Arabi-*

dopsis (40). Many other types of genes associated with cellulose biosynthesis, such as *KOR*, *SuSY*, *COBRA*, and *FRA2*, occur in duplicate pairs in *Populus* relative to single-copy *Arabidopsis* genes (39). For example, *COBRA*, a regulator of cellulose biogenesis (41), is a single-copy gene in *Arabidopsis*, but in *Populus* there are four copies.

The repertoire of acknowledged hemicellulose biosynthetic genes in *Populus* is generally similar to that in *Arabidopsis*. However, *Populus* has more genes encoding α -L-fucosidases and fewer genes encoding α -L-fucosyltransferases than does *Arabidopsis*, which is consistent with the lower xyloglucan fucose content (42) in *Populus* relative to *Arabidopsis*.

Lignin, the second most abundant cell wall polymer after cellulose, is a complex polymer of monolignols (hydroxycinnamyl alcohols) that encrusts and interacts with the cellulose/hemicellulose matrix of the secondary cell wall (43). The full set of 34 *Populus* phenylpropanoid and lignin biosynthetic genes (table S13) was identified by sequence alignment to the known *Arabidopsis* phenylpropanoid and lignin genes (44, 45). The size of the *Populus* gene families that encode these enzymes is generally larger than in *Arabidopsis* (34 versus 18, respectively). The only exception is cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which is encoded by a single gene in *Populus* and two genes in *Arabidopsis* (Fig. 6C); CAD is also encoded by only a single gene in *Pinus taeda* (46, 47). Two lignin-related *Populus C4H* genes are strongly coexpressed in tissues related to wood formation, whereas the three *Populus C3H* genes show reciprocally exclusive expression patterns (48) (Fig. 6, A and B).

Secondary metabolism. *Populus* trees produce a broad array of nonstructural, carbon-rich secondary metabolites that exhibit wide variation in abundance, stress inducibility, and effects on tree growth and host-pest interactions (49–53). Shikimate-phenylpropanoid-derived phenolic esters, phenolic glycosides, and condensed tannins and their flavonoid precursors comprise

the largest classes of these metabolites. Phenolic glycosides and condensed tannins alone can constitute up to 35% leaf dry weight and are abundant in buds, bark, and roots of *Populus* (50, 54, 55).

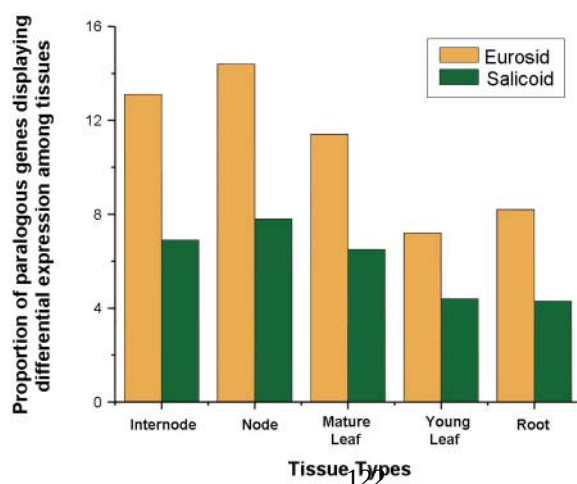
The flavonoid biosynthetic genes are well annotated in *Arabidopsis* (56) and almost all (with the exception of flavonol synthase) are encoded by single-copy genes. In contrast, all but three such enzymes (chalcone isomerase, flavonoid 3'-hydroxylase, and flavanone 3-hydroxylase) are encoded by multiple genes in *Populus* (53). For example, the chalcone synthase, controlling the committed step to flavonoid biosynthesis, has expanded to at least six genes in *Populus*. In addition, *Populus* contains two genes each for flavone synthase II (cytochrome accession number CYP98B) and flavonoid 3',5'-hydroxylase (CYP75A12 and CYP75A13), both of which are absent in *Arabidopsis*. Furthermore, three *Populus* genes encode leucoanthocyanidin reductase, required for the synthesis of condensed tannin precursor 2,3-*trans*-flavan-3-ols, a stereochemical configuration also lacking in *Arabidopsis* (57). In contrast to the 32 terpenoid synthase (TPS) genes of secondary metabolism identified in the *Arabidopsis* genome (58), the *Populus* genome contains at least 47 TPS genes, suggesting a wide-ranging capacity for the formation of terpenoid secondary metabolites.

A number of phenylpropanoid-like enzymes have been annotated in the *Arabidopsis* genome (44, 45, 59–61). One example is the family encoding CAD. In addition to the single *Populus CAD* gene involved in lignin biosynthesis, several other clades of CAD-like (CADL) genes are present, most of which fall within larger subfamilies containing enzymes related to multifunctional alcohol dehydrogenases (Fig. 6). This comparative analysis makes it clear that there has been selective expansion and retention of *Populus CADL* gene families. For example, *Populus* contains seven CADL genes (*PoptrCADL1* to *PoptrCADL7*; Fig. 6C) encoding enzymes related to the *Arabidopsis* BAD1 and BAD2 enzymes with apparent benzyl alcohol dehydrogenase activities (62). BAD1 and BAD2 are known to be pathogen inducible, suggesting that this group of *Populus* genes, including the *Populus SAD* gene, previously characterized as encoding a sinapaldehyde-specific CAD enzyme (63), may be involved in chemical defense.

Disease resistance. The likelihood that a perennial plant will encounter a pathogen or herbivore before reproduction is near unity. The long-generation intervals for trees make it difficult for such plants to match the evolutionary rates of a microbial or insect pest. Aside from the formation of thickened cell walls and the synthesis of secondary metabolites that constitute a first line of defense against microbial and insect pests, plants use a variety of disease-resistance (*R*) genes.

The largest class of characterized *R* genes encodes intracellular proteins that contain a

Fig. 5. Proportion of eurosid and salicoid duplicated gene sets differentially expressed in stems (nodes and internode), leaves (young and mature), and whole roots. Samples from four biological replicates collected from the reference genotype Nisqually 1 were individually hybridized to whole-genome oligonucleotide microarrays containing three 60-oligomer oligonucleotide probes for each gene. Differential expression between duplicated genes was evaluated in *t* tests and declared significant at a 5% false discovery rate (9).



nucleotide-binding site (NBS) and carboxy-terminal leucine-rich-repeats (LRR) (64). The NBS-coding *R* gene family is one of the largest in *Populus*, with 399 members, approximately twice as high as in *Arabidopsis*. The NBS family can be divided into multiple subfamilies with distinct domain organizations, including 64 TIR-NBS-LRR genes, 10 truncated TIR-NBS that lack an LRR, 233 non-TIR-NBS-LRR genes, and 17 unusual TIR-NBS-containing genes that have not been identified previously in *Arabidopsis* (TNLT, TNLN, or TCNL domains) (Table 2). Five gene models coding for TNL proteins contained a predicted N-terminal nuclear localization signal (65). The number of non-TIR-NBS-LRR genes in *Populus* is also much higher than that in *Arabidopsis* (209 versus 57, respectively). Notably, 40 non-TIR-NBS genes, not found in *Arabidopsis*, carry an N-terminal BED DNA-binding zinc finger domain that was also found in the *Oryza Xa1* gene. These findings suggest that domain cooption occurred in *Populus*. Most NBS-LRR (about 65%) in *Populus* occur as singletons or in tandem duplications, and the distribution of pairwise genetic distances among these genes suggests a recent expansion of this family. That is, only 10% of the NBS-LRR genes are associated with the eurosid and salicoid duplication events, compared with 55% of the extracellular LRR receptor-like kinase genes (for example, fig. S10).

Several conserved signaling components such as RAR1, EDS1, PAD4, and NPR1, known to be recruited by *R* genes, also contain multiple homologs in *Populus*. For example, two copies of the *PAD4* gene, which functions upstream of salicylic acid accumulation, and five copies of the *NPR1* gene, an important regulator of responses downstream of salicylic acid, are found in *Populus*. Nearly all genes known to control disease resistance signaling in *Arabidopsis* have putative orthologs in *Populus*. *Populus* has a larger number of β -1,3-glucanase and chitinase genes than does *Arabidopsis* (131 versus 73, respectively). In summary, the structural and genetic diversity that exists among *R* genes and their signaling components in *Populus* is remarkable and suggests that unlike the rest of the genome, contemporary diversifying selection has played an important role in the evolution of disease resistance genes in *Populus*. Such diversification suggests that enhanced ability to detect and respond to biotic challenges through *R* gene-mediated signaling may be critical over a decades-long life span of this genus.

Membrane transporters. Attributes of *Populus* biology such as massive interannual, seasonal, and diurnal metabolic shifts and redeployment of carbon and nitrogen may require an elaborate array of transporters. Investigation of gene families coding for transporter proteins (<http://plantst.genomics.purdue.edu/>) in the *Populus* genome revealed a general expansion relative to *Arabidopsis* (1722 versus 959, in *Populus* versus *Arabidopsis*, respectively) (table S12). Five gene

families, coding for adenosine 5'-triphosphate-binding cassette proteins (ABC transporters, 226 gene models), major facilitator superfamily proteins (187 genes), drug/metabolite transporters (108 genes), amino acid/auxin permeases (95 genes), and POT transporters (90 genes), accounted for more than 40% of the total number of transporter gene models (fig. S14). Some large families such as those encoding POT (4.3X relative to *Arabidopsis*), glutamate-gated ion channels (3.7X), potassium uptake permeases (2.3X), and ABC transporters (1.9X) are expanded in *Populus*. We identified a subfamily of five putative aquaporins, lacking in the *Arabidopsis*. *Populus* also harbors seven transmembrane re-

ceptor genes that have previously only been found in fungi, and two genes, identified as mycorrhizal-specific phosphate transporters, that confirm that the mycorrhizal symbiosis may have an impact on the mineral nutrition of this long-lived species. This expanded inventory of transporters could conceivably play a role in adaptation to nutrient-limited forest soils, long-distance transport and storage of water and metabolites, secretion and movement of secondary metabolites, and/or mediation of resistance to pathogen-produced secondary metabolites or other toxic compounds.

Phytohormones. Both physiological and molecular studies have indicated the importance of

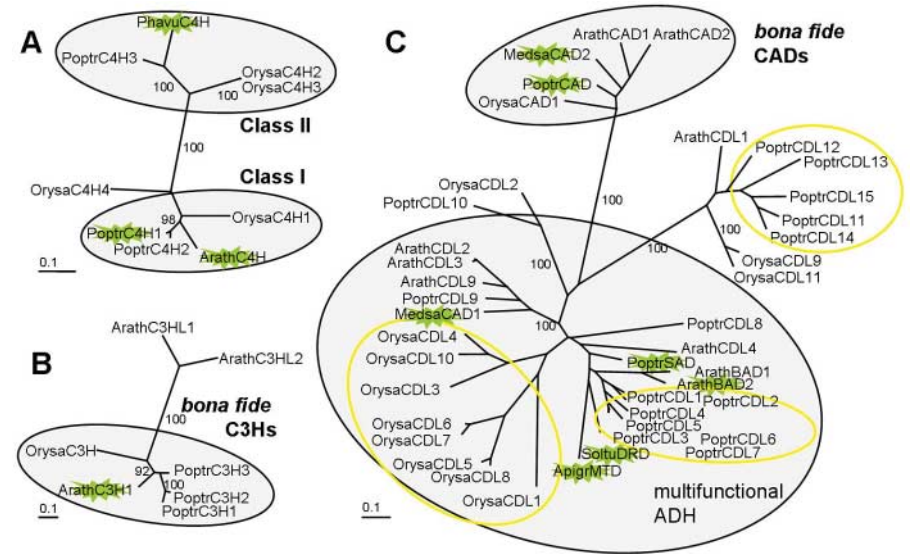


Fig. 6. Phylogenetic analysis of gene families in *Populus*, *Arabidopsis*, and *Oryza* encoding selected lignin biosynthetic and related enzymes. (A) Cinnamate-4-hydroxylase (*C4H*) gene family. (B) 4-coumaroyl-shikimate/quinic-3-hydroxylase (*C3H*) gene family. (C) Cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) and related multifunctional alcohol dehydrogenase gene family. *Arabidopsis* gene names are the same as those in Ehling *et al.* (80). *Populus* and *Oryza* gene names were arbitrarily assigned; corresponding gene models are listed in table S13. Genes encoding enzymes for which biochemical data are available are highlighted with a green flash. Yellow circles indicate monospecific clusters of gene family members.

Table 2. Numbers of genes that encode domains similar to plant *R* proteins in *Populus*, *Arabidopsis* (81), and *Oryza* (82). *, BED finger and/or DUF1544 domain; CC, coiled coil; –, not detected.

Predicted protein domains	Letter code	<i>Populus</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Oryza</i>
TIR-NBS	TN	10	21	–
TIR-NBS-LRR	TNL	64	83	–
TIR-NBS-LRR-TIR	TNLT	13	–	–
TIR-NBS-LRR-NBS	TNLN	1	–	–
NBS-LRR-TIR	NLT	1	–	–
TIR-CC-NBS-LRR	TCNL	2	–	–
CC-NBS	CN	19	4	7
CC-NBS-LRR	CNL	119	51	159
BED/DUF1544*-NBS	BN	5	–	–
NBS-BED/DUF1544*	NB	1	–	–
BED/DUF1544*-NBS-LRR	BNL	24	–	–
NBS-LRR	NL	90	6	40
NBS	N	49	1	45
Others	–	–	41	284
Total NBS genes		398	207	535

hormonal regulation underlying plant development. Auxin, gibberellin, cytokinin, and ethylene responses are of particular interest in tree biology.

Many auxin responses (66–71) are controlled by auxin response factor (ARF) transcription factors, which work together with cognate AUX/IAA repressor proteins to regulate auxin-responsive target genes (72, 73). A phylogenetic analysis using the known and predicted ARF protein sequences showed that *Populus* and *Arabidopsis* ARF gene families have expanded independently since they diverged from their common ancestor. Six duplicate ARF genes in *Populus* encode paralogs of ARF genes that are single-copy *Arabidopsis* genes, including ARF5 (MONOPTEROS), an important gene required for auxin-mediated signal transduction and xylem development. Furthermore, five *Arabidopsis* ARF genes have four or more predicted *Populus* ARF gene paralogs. In contrast to ARF genes, *Populus* does not contain a notably expanded repertoire of AUX/IAA genes relative to *Arabidopsis* (35 versus 29, respectively) (74). Interestingly, there is a group of four *Arabidopsis* AUX/IAA genes with no apparent *Populus* orthologs, suggesting *Arabidopsis*-specific functions.

Gibberellins (GAs) are thought to regulate multiple processes during wood and root development, including xylem fiber length (75). Among all gibberellin biosynthesis and signaling genes, the *Populus* GA20-oxidase gene family is the only family with approximately two times the number of genes relative to *Arabidopsis*, indicating that most of the duplicated genes that arose from the salicoid duplication event have been lost. GA20-oxidase appears to control flux in the biosynthetic pathway leading to the bioactive gibberellins GA₁ and GA₄. The higher complement of GA20-oxidase genes may have biological importance in *Populus* with respect to secondary xylem and fiber cell development.

Cytokinins are thought to control the identity and proliferation of cell types relevant for wood formation as well as general cell division (67). The total number of members in gene families encoding cytokinin homeostasis related isopentenyl transferases (IPT) and cytokinin oxidases is roughly similar between *Populus* and *Arabidopsis*, although there appears to be lineage-specific expansion of IPT subfamilies. The cytokinin signal transduction pathway represents a two-component phosphorelay system, in which a two-component hybrid receptor initiates a phosphotransfer by means of histidine-containing phosphotransmitters (HPT) to phospho-accepting response regulators (RR). One family of genes, encoding the two-component receptors (such as CK11), is notably expanded in *Populus* (four versus one in *Populus* and *Arabidopsis*, respectively) (76). Gene families coding for recently identified pseudo-HPT and atypical RR are overrepresented in *Populus* relative to *Arabidopsis* (2.5- and 4.0-fold increase in *Populus*, respectively). Both of these

gene families have been implicated in the negative regulation of cytokinin signaling (67, 77), which is consistent with the idea of increased complexity in regulation of cytokinin signal transduction in *Populus*.

Populus and *Arabidopsis* genomes contain almost identical numbers of genes for the three enzymes of ethylene biosynthesis, whereas the number of genes for proteins involved in ethylene perception and signaling is higher in *Populus*. For example, *Populus* has seven predicted genes for ethylene receptor proteins and *Arabidopsis* has five; the constitutive triple response kinase that acts just downstream of the receptor is encoded by four genes in *Populus* and only one in *Arabidopsis* (78). The number of ethylene-responsive element binding factor (ERF) proteins (a subfamily of the AP2/ERF family) is higher in *Populus* than in *Arabidopsis* (172 versus 122, respectively). The increased variation in the number of ERF transcription factors may be involved in the ethylene-dependent processes specific to trees, such as tension wood formation (68) and the establishment of dormancy (71).

Conclusions

Our initial analyses provide a flavor of the opportunities for comparative plant genomics made possible by the generation of the *Populus* genome sequence. A complex history of whole-genome duplications, chromosomal rearrangements and tandem duplications has shaped the genome that we observe today. The differences in gene content between *Populus* and *Arabidopsis* have provided some tantalizing insights into the possible molecular bases of their strongly contrasting life histories, although factors unrelated to gene content (such as regulatory elements, miRNAs, posttranslational modification, or epigenetic modifications) may ultimately be of equal or greater importance. With the sequence of *Populus*, researchers can now go beyond what could be learned from *Arabidopsis* alone and explore hypotheses to linking genome sequence features to wood development, nutrient and water movement, crown development, and disease resistance in perennial plants. The availability of the *Populus* genome sequence will enable continuing comparative genomics studies among species that will shed new light on genome reorganization and gene family evolution. Furthermore, the genetics and population biology of *Populus* make it an immense source of allelic variation. Because *Populus* is an obligate outcrossing species, recessive alleles tend to be maintained in a heterozygous state. Informatics tools enabled by the sequence, assembly, and annotation of the *Populus* genome will facilitate the characterization of allelic variation in wild *Populus* populations adapted to a wide range of environmental conditions and gradients over large portions of the Northern Hemisphere. Such variants represent a rich reservoir of molecular resources useful in biological applications,

development of alternative energy sources, and mitigation of anthropogenic environmental problems. Finally, the keystone role of *Populus* in many ecosystems provides the first opportunity for the application of genomics approaches to questions with ecosystem-scale implications.

References and Notes

- Food and Agricultural Organization of the United Nations, *State of the World's Forests 2003* (FAO, Rome, 2003).
- R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., in *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*, R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman, T. M. Hinckley, Eds. (NRC Research Press, Ottawa, 1996), pp. 1–7.
- G. A. Tuskan, S. P. DiFazio, T. Teichmann, *Plant Biol.* **6**, 2 (2004).
- T. M. Yin, S. P. DiFazio, L. E. Gunter, D. Riemenschneider, G. A. Tuskan, *Theor. Appl. Genet.* **109**, 451 (2004).
- R. Meilan, C. Ma, in *Agrobacterium Protocols*, vol. 344 of *Methods in Molecular Biology*, K. Wang, Ed. (Humana Press, Totowa, NJ, 2006), pp. 143–151.
- G. A. Tuskan, *Biomass Bioenerg.* **14**, 307 (1998).
- G. A. Tuskan, M. Walsh, *For. Chron.* **77**, 259 (2001).
- S. Wullschlegel et al., *Can. J. For. Res.* **35**, 1779 (2005).
- Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
- H. D. Bradshaw, R. F. Stettler, *Theor. Appl. Genet.* **86**, 301 (1993).
- M. Koornneef, P. Fransz, H. de Jong, *Chromosome Res.* **11**, 183 (2003).
- O. Santamaria, J. J. Diez, *For. Pathol.* **35**, 95 (2005).
- G. A. Tuskan et al., *Can. J. For. Res.* **34**, 85 (2004).
- A. A. Salamov, V. V. Solov'yev, *Genome Res.* **10**, 516 (2000).
- E. Birney, R. Durbin, *Genome Res.* **10**, 547 (2000).
- T. Schiex, A. Moisan, P. Rouzé, in *Computational Biology: Selected Papers from JOBIM'2000, number 2066 in LNCS* (Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2001), pp. 118–133.
- Y. Xu, E. C. Uberbacher, *J. Comput. Biol.* **4**, 325 (1997).
- S. J. Hanley, M. D. Mallott, A. Karp, *Tree Genet. Genomes*, in press.
- M. A. Koch, B. Haubold, T. Mitchell-Olds, *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1483 (2000).
- M. Lynch, J. S. Conery, *Science* **290**, 1151 (2000).
- L. Sterck et al., *New Phytol.* **167**, 165 (2005).
- L. A. Dode, *Bull. Soc. Hist. Nat. Autun* **18**, 161 (1905).
- R. Regnier, in *Revue des Sociétés Savantes de Normandie* (Rouen, France, 1956), vol. 1, pp. 1–36.
- M. E. Collinson, *Proc. R. Soc. Edinburgh B Bio. Sci.* **98**, 155 (1992).
- J. E. Eckenwalder, in *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*, R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman, T. M. Hinckley, Eds. (NRC Research Press, Ottawa, 1996), chap. 1.
- J. B. Mitton, M. C. Grant, *Bioscience* **46**, 25 (1996).
- K. Hokamp, A. McLysaght, K. H. Wolfe, *J. Struct. Funct. Genomics* **3**, 95 (2003).
- J. E. Bowers, B. A. Chapman, J. K. Rong, A. H. Paterson, *Nature* **422**, 433 (2003).
- L. M. Zahn, J. Leebens-Mack, C. W. dePamphilis, H. Ma, G. Theissen, *J. Hered.* **96**, 225 (2005).
- S. De Bodt, S. Maere, Y. Van de Peer, *Trends Ecol. Evol.* **20**, 591 (2005).
- K. L. Adams, J. F. Wendel, *Trends Genet.* **21**, 539 (2005).
- G. Blanc, K. Hokamp, K. H. Wolfe, *Genome Res.* **13**, 137 (2003).
- B. A. Schulman et al., *Nature* **408**, 381 (2000).
- S. Griffiths-Jones et al., *Nucleic Acids Res.* **33**, D121 (2005).
- S. Lockton, B. S. Gaut, *Trends Genet.* **21**, 60 (2005).
- B. A. Chapman, J. E. Bowers, F. A. Feltus, A. H. Paterson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2730 (2006).
- T. A. Richmond, C. R. Somerville, *Plant Physiol.* **124**, 495 (2000).
- S. Djerbi, M. Lindsog, L. Arvestad, F. Sterky, T. T. Teeri, *Planta* **221**, 739 (2005).

39. C. P. Joshi *et al.*, *New Phytol.* **164**, 53 (2004).
40. A. Samuaga, C. P. Joshi, *Gene* **334**, 73 (2004).
41. F. Roudier *et al.*, *Plant Cell* **17**, 1749 (2005).
42. R. M. Perrin *et al.*, *Science* **284**, 1976 (1999).
43. R. W. Whetten, J. J. Mackay, R. R. Sederoff, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 585 (1998).
44. J. Ehling *et al.*, *Plant J.* **42**, 618 (2005).
45. J. Baez, A. Rohde, J. H. Christensen, Y. Van de Peer, W. Boerjan, *Plant Physiol.* **133**, 1051 (2003).
46. D. M. O'Malley, S. Perte, R. R. Sederoff, *Plant Physiol.* **98**, 1364 (1992).
47. J. J. Mackay, W. W. Liu, R. Whetten, R. R. Sederoff, D. M. O'Malley, *Mol. Gen. Genet.* **247**, 537 (1995).
48. J. Schrader *et al.*, *Plant Cell* **16**, 2278 (2004).
49. S. Whitham, S. McCormick, B. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8776 (1996).
50. G. M. Gebre, T. J. Tschaplinski, G. A. Tuskan, D. E. Todd, *Tree Physiol.* **18**, 645 (1998).
51. G. Arimura, D. P. W. Hulke, J. Bohlmann, *Plant J.* **37**, 603 (2004).
52. D. J. Peters, C. P. Gonsabel, *Plant J.* **32**, 701 (2002).
53. C.-J. Tsai, S. A. Harding, T. J. Tschaplinski, R. L. Lindroth, Y. Yuan, *New Phytol.* **172**, 47 (2006).
54. M. M. De S3, R. Subramaniam, F. E. Williams, C. J. Douglas, *Plant Physiol.* **90**, 728 (1992).
55. R. L. Lindroth, S. Y. Hwang, *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 357 (1996).
56. B. Winkel-Shitiley, *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 218 (2002).
57. G. J. Tanner *et al.*, *J. Biol. Chem.* **278**, 31647 (2003).
58. S. Aubourg, A. Lecharny, J. Bohlmann, *Mol. Genet. Genomics* **267**, 730 (2002).
59. M. A. Costa *et al.*, *Physiochemistry* **64**, 1097 (2003).
60. D. Cukovic, J. Ehling, J. A. VanZille, C. J. Douglas, *Biol. Chem.* **382**, 645 (2001).
61. J. M. Shockey, M. S. Fida, J. Browse, *Plant Physiol.* **132**, 1065 (2003).
62. L. E. Somssich, P. Werner, S. Kiedrowski, K. Hanhcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14199 (1996).
63. L. Li *et al.*, *Plant Cell* **13**, 1567 (2001).
64. B. C. Meyers, S. Kaushik, R. S. Handley, *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 129 (2005).
65. L. Delalande *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2404 (2002).
66. E. J. Mielniczak, M. Baucher, B. Sundberg, W. Boerjan, *Plant Mol. Biol.* **47**, 239 (2001).
67. A. P. Mäthöfen *et al.*, *Science* **311**, 94 (2006).
68. S. Andersson-Gunnarsson *et al.*, *Plant J.* **34**, 339 (2003).
69. J. M. Højgaard, K. Olderson, B. Sundberg, *Plant Physiol.* **135**, 212 (2004).
70. M. G. Cline, K. Dong-H, *Ann. Bot. (London)* **90**, 417 (2002).
71. R. Ruonala, P. Rinne, M. Baghour, H. Tuomivuori, J. Kangasjärvi, *Plant J.*, in press.
72. R. Moyle *et al.*, *Plant J.* **31**, 675 (2002).
73. D. Weiers *et al.*, *EMBO J.* **24**, 1874 (2005).
74. G. Hagen, T. Gailloche, *Plant Mol. Biol.* **49**, 373 (2002).
75. M. E. Eriksson, M. Ivarsson, O. Olsson, T. Moritz, *Met. Biotechnol.* **18**, 784 (2000).
76. T. Kakinoue, *Science* **274**, 902 (1996).
77. T. Kiba, K. Aoki, H. Sakashima, T. Mizuno, *Plant Cell Physiol.* **45**, 1063 (2004).
78. T. Nakano, K. Suzuki, T. Fujimura, H. Shinshi, *Plant Physiol.* **140**, 411 (2006).
79. F. Sterky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13951 (2004).
80. J. Ehling *et al.*, *Plant J.* **42**, 618 (2005).
81. B. C. Meyers, S. Kaushik, R. S. Handley, *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 129 (2005).
82. M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, *Mol. Cell* **14**, 787 (2004).
83. We thank the U.S. Department of Energy, Office of Science for supporting the sequencing and assembly portion of this study; Genome Canada and the Province of British Columbia for providing support for the BAC end, BAC genotyping, and full-length cDNA portions of this study; the Umeå University and the Royal Technological Institute (KTH) in Stockholm for supporting the EST assembly and annotation portion of this study; the membership of the International *Populus* Genome Consortium for supplying genetic and genomics resources used in the assembly and annotation of the genome; the NSF Plant Genome Program for supporting the development of Web-based tools; T. H. D. Bradshaw and R. Steiner for input and review on draft copies of the manuscript; J. M. Tuskan for guidance and input during the analysis and writing of the manuscript; and the anonymous reviewers who provided critical input and recommendations on the manuscript. GenBank Accession Number: AARH00000000.

Supporting Online Material

www.science.org/content/full/10.1126/science.1128691
Materials and Methods

Figs. S1 to S15

Tables S1 to S14

References

13 April 2006; accepted 7 August 2006
10.1126/science.1128691

2. La famille des transporteurs d'ammonium chez le peuplier

Publication n°2 - New Phytologist 2007

Résumé: L'ammonium et le nitrate constituent les sources azotées préférentielles pour la croissance et le développement des plantes supérieures. Dans cette étude, nous présentons la caractérisation de la famille des transporteurs d'ammonium (AMT) chez une espèce pérenne : *Populus trichocarpa*. L'expression des gènes *AMT* du peuplier a été entreprise et la caractérisation fonctionnelle des deux transporteurs, *AMT1;2* et *AMT1;6*, a été réalisée par expression hétérologue chez la levure.

Le génome de *P. trichocarpa* présente 14 *AMTs* putatifs, soit deux fois plus que le nombre d'*AMTs* présents chez *Arabidopsis*. Au niveau des racines, l'expression du transporteur de haute affinité *AMT1;2* augmente au niveau de la symbiose mycorhizienne et ce transporteur serait partiellement responsable du transport d'ammonium de haute affinité mesuré chez le peuplier. Des études d'expression par RT-PCR ont démontré que l'expression de *AMT1;6* était fortement affectée par le cycle diurne et que *AMT3;1* était exclusivement exprimé dans les feuilles sénescences. *AMT2;1* est fortement exprimé dans les feuilles alors que *AMT2;2* est surtout exprimé dans le pétiole. Ces analyses d'expression ont également permis de démontrer l'expression spécifique de *AMT1;5* dans les étamines et celle de *AMT1;6* dans les fleurs femelles, indiquant une fonction clé de ces transporteurs dans le développement des organes reproducteurs chez le peuplier. La présente étude fournit des informations tant au niveau génomique que transcriptomique sur la famille *AMT* du peuplier permettant d'entrevoir le rôle précis de chaque transporteur dans la physiologie du peuplier.

The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant

Jérémy Couturier, Barbara Montanini, Francis Martin, Annick Brun, Damien Blaudez and Michel Chalot

Research Unit INRA/UHP 1136 'Tree-microbe Interactions', Nancy-University, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Summary

Author for correspondence:

Michel Chalot

Tel: +33 3 83684238

Fax: +33 3 83684292

Email: Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Received: 4 October 2006

Accepted: 24 November 2006

- Ammonium and nitrate are the prevalent nitrogen sources for growth and development of higher plants. Here, we report on the characterization of the ammonium transporter (AMT) family in the perennial species *Populus trichocarpa*.
- *In silico* analysis and expression analysis of AMT genes from poplar was performed. In addition, AMT1;2 and AMT1;6 function was studied in detail by heterologous expression in yeast.
- The *P. trichocarpa* genome contains 14 putative AMTs, which is more than twice the number of AMTs in *Arabidopsis*. In roots, the high-affinity AMT1;2 strongly increased upon mycorrhiza formation and might be partly responsible for the high-affinity ammonium uptake component measured in poplar. Transcript level for the high-affinity AMT1;6 was strongly affected by the diurnal cycle. AMT3;1 was exclusively expressed in senescing poplar leaves. Remarkably AMT2;1 was highly expressed in leaves while AMT2;2 was mostly expressed in petioles. Specific expression of AMT1;5 in stamen and of AMT1;6 in female flower indicate that they have key functions in reproductive organ development in poplar.
- The present study provides basic genomic and transcriptomic information for the poplar AMT family and will pave the way for deciphering the precise role of AMTs in poplar physiology.

Key words: ammonium transport, ectomycorrhiza, expression analysis, metabolite pools, *Populus trichocarpa*, yeast complementation.

New Phytologist (2007) **174**: 137–150

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01992.x

Introduction

Ammonium is a primary source of nitrogen (N) for both perennial and annual species. It is taken up from the soil by ammonium transporters through the plasma membrane of root cells (Kaiser *et al.*, 2002) and incorporated into glutamine via glutamine synthetase (GS) present in the cytoplasm and plastids, the biochemistry of which has also been described in perennial species (Suarez *et al.*, 2002). Ammonium is also produced within plants either by reduction of nitrate and nitrite obtained from the soil, or by catabolism of endogenous amino compounds. For example, the photo-respiratory nitrogen cycle generates a large amount of ammonium in leaf mitochondria that is subsequently transported to chloroplasts for reassimilation by GS, although this statement

has now to be interpreted with caution, given the recent finding that the nuclear encoded GS *GLN2* may also be addressed to the mitochondria (Taira *et al.*, 2004).

The biochemistry and molecular biology of ammonium transport in plants has been extensively studied and recent comprehensive reviews are available (Schjoerring *et al.*, 2002; Loque & von Wiren, 2004). Physiological studies on ammonium uptake by plant roots has provided evidence for the existence of a low affinity nonsaturable transport system (LATS), which operates in the millimolar concentration range and a high-affinity transport system (HATS), which operates in the submillimolar concentration range. The HATS exhibits saturation kinetics, energy dependence, and leads to depolarization of the plasma membrane electrical potential (Ludewig *et al.*, 2002).

The first ammonium transporter (AMT) genes were identified in yeast (Marini *et al.*, 1994) and *Arabidopsis* (Ninnemann *et al.*, 1994) by functional complementation of a yeast mutant deficient in high-affinity ammonium uptake. In plants, the AMT family can be subdivided into two subfamilies (Loque & von Wiren, 2004). Members of the AMT1 subfamily are intron-free, except LjAMT1;1 (Salvemini *et al.*, 2001); whereas members of AMT2 subfamily contain some introns in their gene sequences. The AMT2 family has been further divided into three subclades in rice (Suenaga *et al.*, 2003). Several plant AMT1 subfamily members, including homologs from *Arabidopsis thaliana* (AtAMT1;1, AtAMT1;2, AtAMT1;3; Ninnemann *et al.*, 1994; Gazzarrini *et al.*, 1999), *Brassica napus* (BnAMT1;2; Pearson *et al.*, 2002), *Lotus japonicus* (LjAMT1;1, LjAMT1;2, LjAMT1;3; Salvemini *et al.*, 2001; D'Apuzzo *et al.*, 2004), *Lycopersicon esculentum* (LeAMT1;1, LeAMT1;2 and LeAMT1;3; Lauter *et al.*, 1996; von Wiren *et al.*, 2000b; Becker *et al.*, 2002; Ludewig *et al.*, 2002) or *Oryza sativa* (OsAMT1;1, OsAMT1;2, OsAMT1;3; Sonoda *et al.*, 2003) have been characterized in yeast or in *Xenopus* oocytes. AtAMT1;1 encodes a high-affinity transporter with a K_m value of $< 0.5 \mu\text{M}$ and is expressed in roots and leaves, while AtAMT1;2 and AtAMT1;3 encode transporters of lower affinity (K_m values of $25\text{--}40 \mu\text{M}$) and are mainly expressed in roots (Gazzarrini *et al.*, 1999). AtAMT1;2 expressed in yeast mutant displays biphasic kinetics (K_m values of $36 \mu\text{M}$ and 3.0 mM) for methylammonium uptake (Shelden *et al.*, 2001). AMT expression has been studied in detail in *Arabidopsis* and rice, and the data demonstrated the close relationship between AMT1;1 and AMT1;3 expression with glutamine (Rawat *et al.*, 1999) and sugar (Gazzarrini *et al.*, 1999; Rawat *et al.*, 1999) concentrations, respectively.

More recently, a second subfamily of ammonium transporters (AMT2) with distinct biochemical features, has been identified in several plants such as *A. thaliana* (Sohlenkamp *et al.*, 2002), *L. japonicus* (Simon-Rosin *et al.*, 2003) and *O. sativa* (Suenaga *et al.*, 2003). Plant AMT2 family members are more closely related to ammonium transporters from prokaryotes than they are to plant AMT1. While plant members of the AMT1 subfamily are preferentially expressed in roots (with the exception of LeAMT1;3 (von Wiren *et al.*, 2000b), LjAMT1;1 and LjAMT1;2 (D'Apuzzo *et al.*, 2004), AtAMT2 showed a higher level of gene expression in shoots compared with roots (Sohlenkamp *et al.*, 2002) and OsAMT2;1 presented a constitutive expression in shoots and roots (Suenaga *et al.*, 2003). These distinct expression patterns may support the fact that individual members of the AMT family would function not only in ammonium uptake in roots, but also in ammonium recycling during leaf senescence or photorespiration (Howitt & Udvardi, 2000; von Wiren *et al.*, 2000a). Multiple forms of ammonium transporters in higher plants allow a greater regulatory flexibility and organelle-, cell-, tissue- or organ-specialization, and enable cells to take up ammonium over a wide range of concentrations (D'Apuzzo *et al.*, 2004).

As exemplified above, most studies have focused on a few annual species (*A. thaliana*, *L. esculentum*, *L. japonicus* and *O. sativa*), thus available information concerning N transport in perennial woody models is much more limited, particularly at the molecular level. The perennial life style of trees implies specific physiological traits that have been recently discussed (Suarez *et al.*, 2002; Bhalerao *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004; Sterky *et al.*, 2004). Related to N nutrition, one of these traits is the mobilization and storage in perennial tissues of the N present in leaves during autumn, which is remobilized at the beginning of the next growing season (Suarez *et al.*, 2002). Thus, transport mechanisms for nitrogenous compounds are likely to be different from those used by annual species, and probably rely on perennial-specific transport functions.

Taking advantage of the shotgun sequenced *Populus trichocarpa* (Nisqually 1) genome (Tuskan *et al.*, 2006), we present here the expression analysis of AMT members from the perennial tree species poplar and extend the analysis of five AMT members to include the functional characterization of three AMT1 and two AMT2 members by heterologous expression in yeast.

Materials and Methods

Plant growth and media composition

Populus tremula × *alba* (clone INRA 717 1B4) cuttings were cultivated as described by Kohler *et al.* (2003) in a growth chamber for 6 wk with a light intensity of $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a day–night temperature regime of 16 h at 24°C at 80% relative humidity and 8 h at 18°C at 60% relative humidity. For further experiments (N regime, light regime), *P. tremula* × *alba* plants were grown hydroponically for 2 months in the following nutrient solution: $0.75 \text{ mM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.7 mM KNO_3 , $5.15 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$, $0.375 \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $100 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $5 \mu\text{M KI}$, $100 \mu\text{M MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $30 \mu\text{M ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $1 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \mu\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \mu\text{M CoCl}_2$, $100 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The pH was adjusted to 5.6–5.8 with KOH. The nutrient solution was renewed every week. When needed, plants were then transferred to a N-free nutrient solution. To maintain K^+ at a constant concentration KCl (2.36 mM) and K_2SO_4 (1.17 mM) were substituted for KNO_3 .

All experiments were carried out using the *P. tremula* × *alba* poplar clone, except when specific tissues were examined. Thus, fruits (harvested 21 April 2004), buds, stamens and female flowers (harvested 29 March 2005) were collected on 25-yr-old trees (*Populus trichocarpa* species) grown outdoors under natural conditions at the University campus.

Mycorrhizal inoculation

Populus tremula × *alba* (clone INRA 717 1B4) cuttings were cultivated in a growth chamber for 2 wk as already described

and then transferred onto Petri dishes, coinoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr, in a modified MS solution (Murashige & Skoog, 1962), supplemented with 0.1% glucose and 1.5% agar. *Paxillus involutus* was pregrown for 10 d on agar medium containing modified Melin-Norkrans medium, as described by Selle *et al.* (2005). Mycorrhizal and nonmycorrhizal control roots were harvested 1 month after contact.

Cloning of AMTs cDNAs, yeast transformation and [¹⁴C]MA uptake

Predicting coding sequences corresponding to AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT1;4, AMT1;5, AMT1;6, AMT2;1, AMT2;2, AMT3;1 and AMT4;5 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from cDNA generated from same tissues used for reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) studies. The fidelity of PCR amplifications was verified by sequencing. The amplification products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and, after *NotI* digestion, inserted into the yeast expression vector pFL61 (Minet *et al.*, 1992). The yeast strain 31019b (*MATa mep1Δ mep2Δ::LEU2 mep3Δ::KanMX2 ura3*; (Marini *et al.*, 1997)) was transformed with pFL61 harboring the cDNA sequences of AMTs. Yeast transformants were selected on N-free minimal medium supplemented with 1 mM glutamine and 3% glucose. Yeast complementation tests were performed as described previously (Javelle *et al.*, 2003). Methylammonium uptake assays were conducted under previously described experimental conditions (Gazzarrini *et al.*, 1999; Montanini *et al.*, 2002).

RT-PCR

Total RNA extraction was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Darmstadt, Germany) from approximately 100 mg of frozen tissues of poplar. To remove contaminating genomic DNA, the samples were treated with DNase I (Qiagen). To obtain cDNA, 1 µg of total RNA was annealed to oligo-dT primers (Promega) and reverse transcribed using Reverse Transcriptase (Qiagen) at 37°C for 1 h. Every reaction was set up in three replicates. For each *AMT*, the PCR program was as follows: 94°C for 3 min and 37 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 1 min 45 s. *AMT* fragments were gel-purified and sequenced to ensure accuracy and specificity. The whole set of *AMT* genes (14 genes) was tested by RT-PCR in every experiment carried out but only AMTs detected are retained in figures for greater clarity. A cDNA fragment corresponding to the constitutively expressed ubiquitin gene was amplified simultaneously (28 cycles) and used as a control. Cysteine protease (*CP*) gene was amplified (35 cycles) and used as control of the senescing state of leaves. The sequences of the gene-specific oligonucleotides designed in the nonconserved 5' and 3' regions of the genes were used for RT-PCR and are listed in Table 1.

Table 1 Primers used for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis

Name	Sequence
AMT1;1 f	AGAGACTCTGACATCCTTCACTCC
AMT1;1 r	AATATGAGGTCCCTCTTAGACG
AMT1;2 f	ATGGCCTGCTCAGCCTCTGAC
AMT1;2 r	GCATCAAACCTTGATCACACATTG
AMT1;3 f	CTGTGTGACAGTACCCTTCACTTC
AMT1;3 r	ACAAAATAGTCCCTCTTACGCA
AMT1;4 f	TTTACAATGGCAGCTCTAACTTGC
AMT1;4 r	CTAGGGATCCGCCTTTGTGCATCATAAA
AMT1;5 f	ACCTTTCAATGGCATCATCGCCT
AMT1;5 r	TCAGACAACACCTAGCTGCTT
AMT1;6 f	ATGGAGGTCTCATGGGAACAAAGT
AMT1;6 r	TCATGAATGATTCGACCTTGG
AMT2;1 f	ATGAATGCCTCAACAGCTTATG
AMT2;1 r	TTGTTTCTGCATTGCTTAC
AMT2;2 f	ATGGATGCCCCCGCATGAACAA
AMT2;2 r	GTATGCAGGCATCTAGCTTA
AMT3;1 f	AAAACCATGGCTGCTCTCCACCCAA
AMT3;1 r	CTACAACACTTGAGTTGATGAC
AMT4;1 f	ATGAAGCAAGTCCAGCATGA
AMT4;1 r	CCCTGTACATTATCAGTGT
AMT4;2 f	AATGAGCAATGATACTGCCTTCCC
AMT4;2 r	CTATGTCTTCTCAGCTTGACGA
AMT4;3 f	CGGAGGCAAAAAAGCCGTAGTC
AMT4;3 r	CATTTTCAAATAAGCACAAACC
AMT4;4 f	ATGAACAAGGGAGACAATGCAT
AMT4;4 r	TCATACCATTGGAACATCACCG
AMT4;5 f	CTCCCTATGAATTCCCAACAGGA
AMT4;5 r	TCAGAAGCGTTGTGGCAGAAGTA
UBQf	GCACCTCTGGCAGACTCAA
UBQr	TAACAGCCGCTCCAAACAGT
CPf	AGTCACTGAGAAAGGCTGTGG
CPr	CCAAATGGATTGTTCTTGCTC
ASN2f	CAGGCCTGATCTTGGAAAGGATT
ASN2r	GCAACTGTTGCAGTTTTCTCCAGC

Amino acid extraction and analysis

Amino acids were extracted twice from 10 to 20 mg dried plant tissues with 300 µL 70% (v : v) cold ethanol. The samples were dried using a Reacti-Therm. Heating Module (Pierce, Rockford, IL, USA) and resuspended in 400 µL 0.1 N HCl. Amino acids and standards were then purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and aliquots of purified samples were transferred to microvials, dried in a Reacti-Therm Heating Module (Pierce) and derivatized according to Javelle *et al.* (2003). Gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed as described previously (Javelle *et al.*, 2003).

Soluble sugars extraction and analysis

Soluble sugars were extracted from approx. 100 mg of fresh plant tissues, with 1.1 ml 70% (v : v) cold methanol. The extracts

were centrifuged to get supernatant for assay of soluble sugars by the anthrone solution colorimetric method (Miller, 1959). The sugar content was determined by measuring the absorbance at 620 nm. These values were then regressed against readings from a set of standard solutions of glucose.

Phylogenetic analyses

Full-length amino acid sequences were aligned by CLUSTALW and imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Phylogenetic analyses were conducted using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1000 replicates. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances. The accession numbers or gene models of version 1.1 of the *P. trichocarpa* genome database used were: PtrAMT1;1 (Poptr1_1 : 804848), PtrAMT1;2 (Poptr1_1 : 665333), PtrAMT1;3 (Poptr1_1 : 565016), PtrAMT1;4 (Poptr1_1 : 799507), PtrAMT1;5 (Poptr1_1 : 645545), PtrAMT1;6 (Poptr1_1 : 804509), PtrAMT2;1 (Poptr1_1 : 802015), PtrAMT2;2 (Poptr1_1 : 808726), PtrAMT3;1 (Poptr1_1 : 175190), PtrAMT4;1 (Poptr1_1 : 754260), PtrAMT4;2 (Poptr1_1 : 260884), PtrAMT4;3 (Poptr1_1 : 205629), PtrAMT4;4 (Poptr1_1 : 806873), PtrAMT4;5 (Poptr1_1 : 424130). Other accession numbers were: AtAMT1;1 (At4g13510), AtAMT1;2 (At1g64780), AtAMT1;3 (At3g24300), AtAMT1;4 (At4g28700), AtAMT1;5 (At3g24290), AtAMT2;1 (At2g38290), LeAMT1;1 (P58905), LeAMT1;2 (O04161), LeAMT1;3 (Q9FVN0), LjAMT1;1 (Q9FSH3), LjAMT1;2 (Q7Y1B9), LjAMT1;3 (Q70KK9), LjAMT2;1 (Q93 × 02), OsAMT1;1 (Os04g43070), OsAMT1;2 (Os02g40710), OsAMT1;3 (Os02g40730), OsAMT2;1 (Os05g39240), OsAMT2;2 (Os01g61550), OsAMT2;3 (Os01g61510), OsAMT3;1 (Os01g65000), OsAMT3;2 (Os02g34580), OsAMT3;3 (Os03g62200), OsAMT4;1 (Os12g01420), BnAMT1;2 (AAG28780), PttAMT1;2 (AJ646889).

Results

Cloning and *in silico* analysis of the AMT family

The first whole-genome sequence and assembly for a tree species, namely that of *P. trichocarpa* was recently reported (Tuskan *et al.*, 2006). The JGI *P. trichocarpa* gene search mode revealed the existence of 14 *AMT* gene models. As suggested by a phylogenetic tree based on protein multiple sequence alignment, six sequences from *P. trichocarpa* genome fell in the subgroup AMT1 and eight in the subgroup AMT2. *Populus* thus possesses a higher number of *AMT* genes in both subfamilies than *Arabidopsis* or rice. *Populus* AMT2 as well

as rice AMT2 members further divided into three clades (Fig. 1).

Genes encoding proteins from different sub-branches markedly differ in their exon–intron structure: for example, the intron size and location of splicing sites are roughly conserved in genes in each AMT2 subclade, while *AMT1* genes contain no intron with the exception of *LjAMT1;1* (Salvemini *et al.*, 2001).

Analysis of the assembled genome revealed relatively recent whole-genome duplication shared among all modern taxa in Salicaceae. A second, older duplication appears to be shared with the *Arabidopsis* lineage (Tuskan *et al.*, 2006). These duplicated genes originated through very recent small-scale gene duplications and one relatively recent large-scale gene duplication event (Sterck *et al.*, 2005). A detailed analysis of duplication events for the *AMT* members revealed that *AMT1;1* and *AMT1;4* derived from a common ancestor through an ancient duplication event, and that *AMT2;2* and *AMT2;1* derived from a common ancestor through a recent duplication event. Interestingly, *AMT2;1* and *AMT2;2* showed specific expression patterns, with *AMT2;1* mostly expressed in leaves and *AMT2;2* mostly expressed in petioles (Fig. 2).

Figure 1 presents tentative signature sequences for the proteins of the AMT1 and AMT2 plant subfamilies, based on the existing AMT signature (Saier, 1998). Logo representation of the AMT signature was constructed at the web interface program WEBLOGO (Crooks *et al.*, 2004) on the basis of the alignment of 39 plant AMT members. These sequences may serve as identification motifs specific for the two subfamilies, and when scanned against the GenBank database, retrieved only members of each subfamily. These sequences can be used to identify additional members of the two subfamilies in other plant species as they are being sequenced.

Analyses carried out with the transmembrane (TM) prediction program THMM (<http://www.CBS.dk>) suggest that the poplar AMT family proteins are likely to have 9–11 TM domains as do the other AMT plant members (Schwacke *et al.*, 2003). *In silico* analysis accompanied by experiments using fusion proteins, indicate that the majority of the Mep/Amr proteins contain 11 membrane-spanning helices, with the N-terminus on the exterior face of the membrane and the C-terminus on the interior (Marini & Andre, 2000; Thomas *et al.*, 2000).

Table 2 shows that the *AMT* gene and AMT protein sequences share a high degree of identity between *Populus* species, with nucleotide and protein identities of at least 97.7% and 96.9%, respectively. This facilitates *in silico* and RT-PCR analyses and comparisons across *Populus* species.

It is also worth noting that most *AMT* genes are sporadically distributed across the poplar genome, except *AMT1;4*, *AMT1;5* and *AMT4;1* which are located on linkage group (LG) II. The *AMT1;4* locus stretches from position 23601578 to 23603065 while the *AMT1;5* locus extends from position

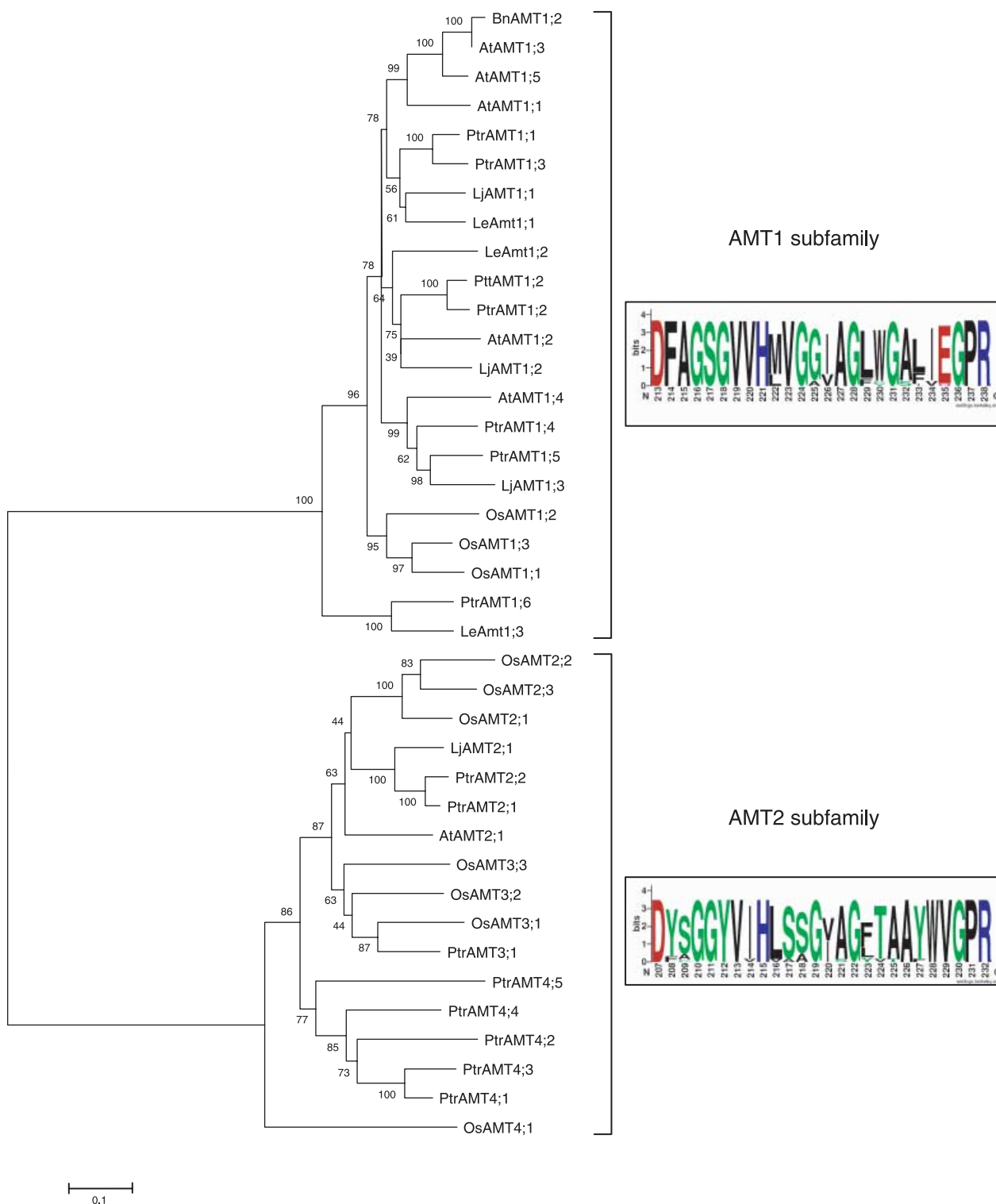


Fig. 1 An unrooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the ammonium transporter (AMT) family. The analysis was performed as described in the Material and Methods section. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances. Accession numbers are given in the Material and Methods section. Sequence logos of AMT1 and AMT2 subfamilies showed on the right were generated using *WEBLOGO* (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (Crooks *et al.*, 2004)).

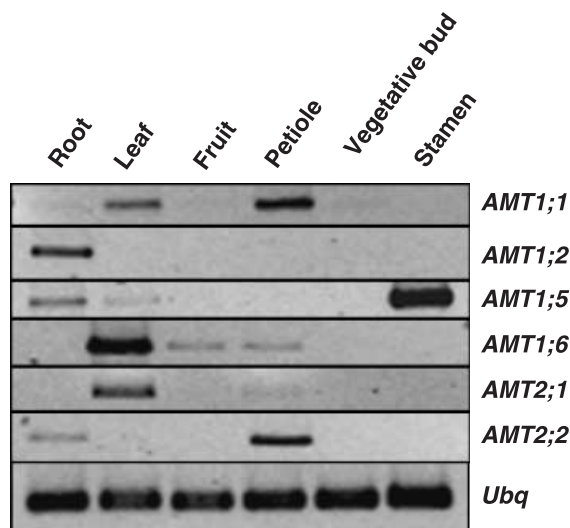


Fig. 2 Tissue-dependent expression of AMTs in poplar. Expression of *AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;5*, *AMT1;6*, *AMT2;1* and *AMT2;2* was analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in tissues collected as described in the Material and Methods section. Aliquots of 1 µg total RNAs were reverse-transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as an internal control. Experiments were repeated at least three times, with similar results.

Table 2 Identity between ammonium transporter (*AMT*) sequences cloned from *Populus tremula* × *alba* and sequences retrieved from the *Populus trichocarpa* database (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>)

Gene name	% Identity (DNA sequence)	% Identity (protein sequence)
<i>AMT1;1</i>	99.6	99.2
<i>AMT1;2</i>	97.7	96.9
<i>AMT1;3</i>	99.9	99.6
<i>AMT1;4</i>	99.1	98.4
<i>AMT1;5</i>	99.3	99.2
<i>AMT1;6</i>	99.9	99.8
<i>AMT2;1</i>	99.9	99.8
<i>AMT2;2</i>	99.4	99.2
<i>AMT3;1</i>	99.4	99.4

23599283–23600819 on poplar LG II, thus appearing as tandem repeats (see Supplementary Material, Fig. S1).

All transcript levels were measured in all experiments described later. Expression levels for *AMT1;3*, *AMT1;4*, *AMT4;1*, *AMT4;2*, *AMT4;3*, and *AMT4;4* were undetectable in any organs examined so far in poplar tissues. By contrast, the other *AMT* genes showed contrasting expression patterns as examined in the following text.

Effects of various N regimes

In order to investigate the impact of N regime on the regulation of *AMT* transcript levels, total RNAs and amino

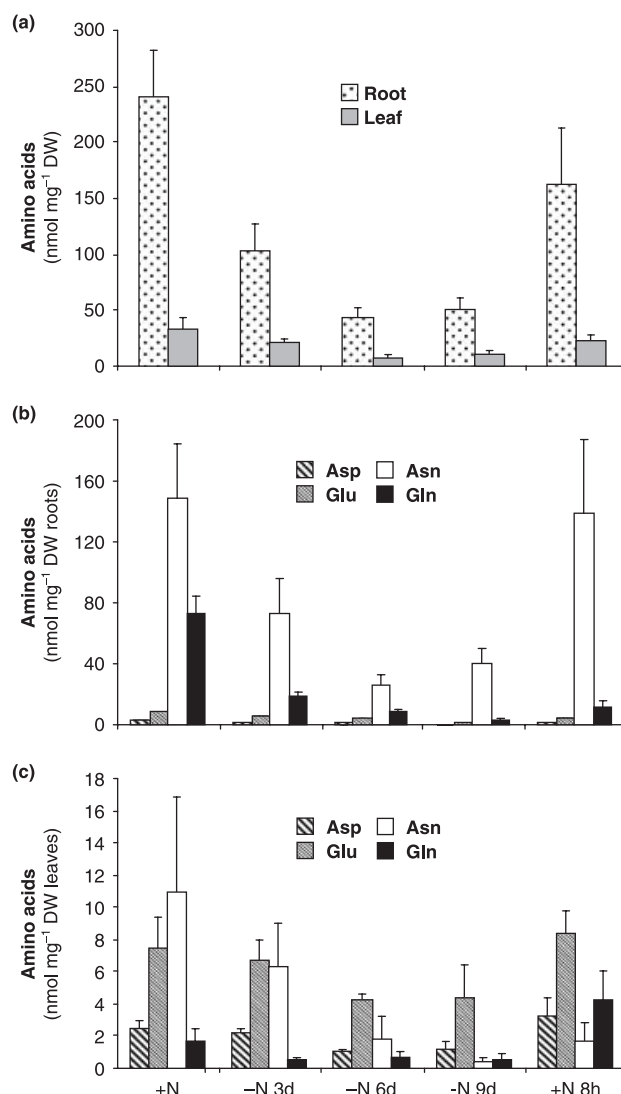


Fig. 3 Quantification of amino acids by gas chromatography-mass spectrometry in leaves and roots of poplar during nitrogen (N) deprivation and resupply. (a) Total free amino acid contents declined during N starvation in roots and leaves. (b) Asparagine and glutamine were the major amino acids in roots. (c) Asparagine and glutamate were the major amino acids in leaves. Values are expressed as means ± SE of four replicate experiments.

acids were extracted from roots and leaves of plants transferred in a N-free medium for various lengths of times, and further resupplied with N for 8 h. The concentration of total amino acids, measured by GC-MS, in roots and leaves decreased by five- and three-fold, respectively, during 9 d of N starvation (Fig. 3a). In N-fed poplar (grown for 2 months in N-supplied medium), asparagine was the predominant amino acid, accounting for 62% and 33% in roots and leaves, respectively, followed by glutamine in roots (Fig. 3b) and glutamate in leaves (Fig. 3c). The glutamine concentration decreased by 26-fold after 9 d of N-starvation in roots (Fig. 3b), whereas

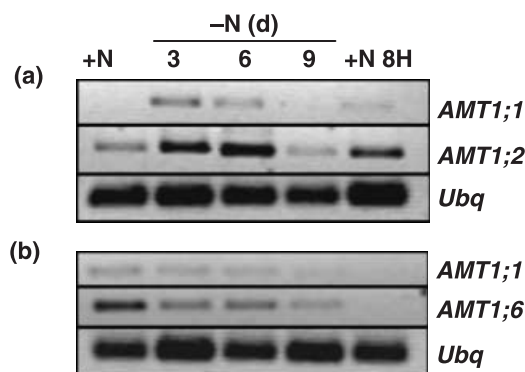


Fig. 4 Effect of the nitrogen (N) regime on *AMT* expression in leaves and roots of poplar. (a) Expression of the *AMT1;1* and *AMT1;2* transcripts in roots of poplar plants. (b) Expression of the *AMT1;1* and *AMT1;6* transcripts in leaves of poplar plants. RNA was extracted at different times of N starvation and 500 ng of total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control. Analyses were performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in triplicate and without substantial variation of expression levels.

asparagine decreased by 25-fold in leaves (Fig. 3c). The amino acid pools were rapidly reconstituted after 8 h of N resupply in roots, while in leaves the asparagine levels did not completely reached the +N level.

AMT1;2 transcripts strongly increased in roots under a short period of N starvation, but declined after 9 d of N starvation and increased again upon N resupply (Fig. 4a). It is worth noting that expression of *AMT1;2* was restricted to roots, whereas *AMT1;1* transcripts were detected in shoot and root tissues (Fig. 2). *AMT1;1* transcripts were undetectable under N-sufficient condition in roots, increased under N starvation, and remained weakly expressed during nitrogen resupply (Fig. 4a). In leaves, *AMT1;1* was weakly expressed and poorly affected by N starvation (Fig. 4b). Similarly, *AMT1;5* and *AMT2;1* were only weakly expressed under these experimental conditions (data not shown). *AMT1;6* transcripts declined under N starvation, compared with a N-sufficient growth condition, but remained low after N resupply (Fig. 4b), which might be linked to the poor increase in asparagine level at that time. All other *AMTs* were also analysed but were not detected under the conditions used in this experiment.

Effects of light regimes

Figure 5 shows diurnal variations in *AMT* expression levels in roots and leaves of plants collected at 4-h intervals in poplar. Our data indicate that *AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;6* and *AMT2;1* transcript levels exhibit diurnal rhythms, the largest diurnal changes in transcript levels being found for *AMT1;2* in root (Fig. 5a) and *AMT1;6* in leaf (Fig. 5b). *AMT1;1* and *AMT1;5* were only weakly expressed in leaves throughout the

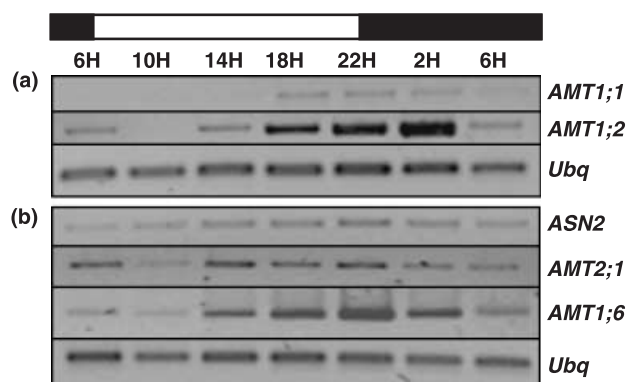


Fig. 5 Effect of the light-dark cycle on *AMT* expression in leaves and roots of poplar. (a) Expression of the *AMT1;1* and *AMT1;2* transcripts in roots of poplar plants. (b) Expression of the *AMT2;1*, *AMT1;6* and *ASN2* transcripts in leaves of poplar plants. RNA was extracted from tissues collected at 4-h intervals in poplar during a light-dark period. Aliquots of 500 ng total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control. Analyses were performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in triplicate and without substantial variation of expression levels. *ASN*: asparagine synthetase gene.

time course of the experiment (not shown). When light was switched off, the soluble sugar content in roots was at the highest level (98 mg equivalent glucose g⁻¹ FW at 22 : 00 h) and decreased to 69 mg equivalent glucose g⁻¹ FW after 8 h of dark regime. In leaves, the soluble sugar content was, respectively, 445 and 368 mg equivalent glucose g⁻¹ FW at 22 : 00 h and 06 : 00 h. In addition, expression of a leaf asparagine synthetase gene (*ASN2*) was followed and showed a diurnal variation, similar to *AMT1;6* transcript level, although at a lesser extent.

AMT expression during senescence

The expression of the *AMTs* was studied in young, mature and senescing leaves. The senescing state of the leaves was confirmed by the parallel amplification of a cysteine protease gene (Bhalerao *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004), which was detected only at the latter stage (Fig. 6). *AMT1;5* and *AMT1;6* showed increased expression levels in senescing leaves compared with young leaves. By contrast, *AMT3;1* was exclusively expressed in senescing leaves (Fig. 6).

AMT expression in reproductive organs

Stamens exhibited a strong expression level for *AMT1;5* transcripts, whereas female flowers showed expression for *AMT1;6* (Fig. 7a). Amino acid pools in these tissues also reached the highest levels ever measured in poplar tissues, especially in stamens (Fig. 7b). We might therefore conclude that *AMT1;5* and *AMT1;6* are not under the control of N catabolic repression in these poplar tissues. This also indicates that another as yet unidentified mechanism allowed for full

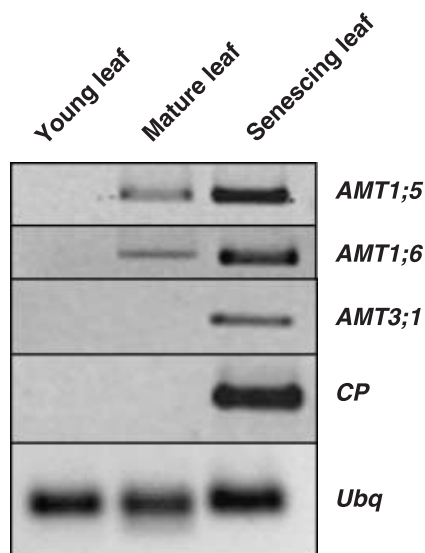


Fig. 6 Senescence-dependent expression of *AMT1;5*, *AMT1;6* and *AMT3;1* in leaves of poplar. Expression of *AMT1;5*, *AMT1;6* and *AMT3;1* was analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in young, mature and senescing leaves. Aliquots of 300 ng total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as an internal control. Cystein protease (*CP*) was used as a marker of the senescing state (Bhalerao *et al.*, 2003). Experiments were repeated for each member at least three times, with similar results.

derepression of *AMT1;5* and full repression of *AMT1;6* in stamens, and the reverse in female flowers.

Effects of mycorrhizal inoculation

Figure 8 shows variations in *AMT* expression levels of roots inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*, collected after 1 month of growth after contact. Our data indicate a substantial increase of the root *AMT1;2* transcript level, whereas the other root expressed *AMTs* did not show any significant transcript variation (not shown).

In silico analysis of ESTs

An *in silico* analysis of poplar expressed sequence tags (ESTs) was carried out using the GenBank EST databases, from which 69 ESTs corresponding to *AMTs* from poplar could be retrieved. This analysis confirmed the broad distribution of *AMT1;1* and *AMT2;1* transcripts and the root distribution of *AMT1;2* transcripts. The lack of transcript for *AMT1;4* and for some *AMT4* subclade members is also confirmed. Expressed sequences tags corresponding to *AMT1;6* were mostly found in EST database from leaves (Table 3), which agreed with the fact that *AMT1;6* was mostly expressed in shoot tissues (Figs 2, 3, 4, 5 and 6).

Although detected by RT-PCR, no EST was retrieved for *AMT1;5* and *AMT2;2*, probably because there were no EST

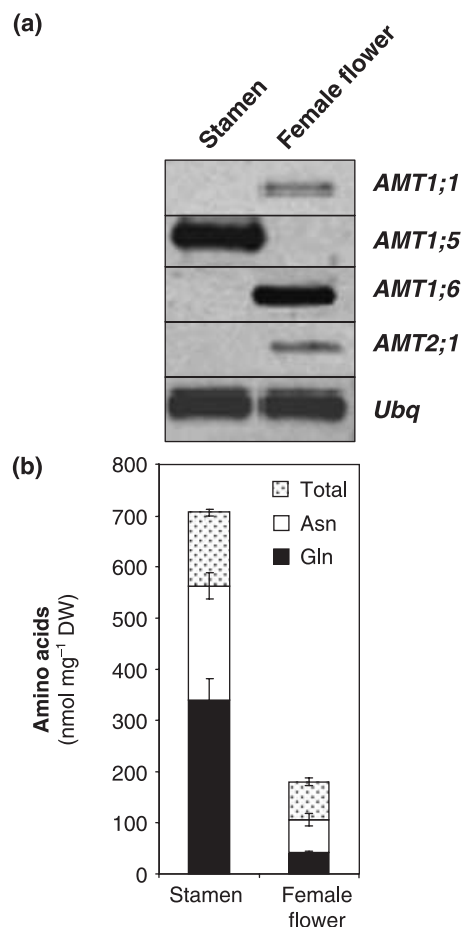


Fig. 7 Specific expression of *AMTs* in reproductive organs of poplar. (a) Expression of *AMT1;1*, *AMT1;5*, *AMT1;6* and *AMT2;1* genes in stamens and female flowers of poplar. Aliquots of 1 µg total RNAs were reverse-transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control. Analyses were performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in triplicate. (b) Quantification of free amino acids by gas chromatography-mass spectrometry in stamens and female flowers of poplar. Glutamine (Gln) was the major amino acid in stamens whereas asparagine (Asn) was the major amino acid in female flowers. Values are expressed as means ± SE of three replicate experiments.

databases for the specific tissues, i.e. stamens (*AMT1;5*). Conversely, ESTs were found for *AMT4;2* in floral bud databases, for *AMT3;1* in poplar bark database (Ralph *et al.*, 2006) and for *AMT4;5* in poplar cultured cells. These are tissues that we have not investigated in the present study but this opens new perspectives for the search of *AMT4* subgroup transcripts. For *AMT3;1*, transcripts of which were detected specifically in senescing leaves (Fig. 6), four ESTs were retrieved from a leaf EST database, although the development state was not provided in the database. *AMT1;3* was not detected by RT-PCR, although we found five ESTs in leaf databases. However these studies were of *P. euphratica* (three ESTs (Brosche *et al.*, 2005)) or systemically wound-induced leaf (two ESTs; Christopher *et al.*, 2004) – specific conditions that were not tested in the present study.

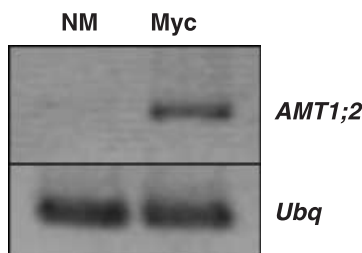


Fig. 8 Impact of ectomycorrhiza formation on *AMT1;2* expression in roots of poplar. Mycorrhizal (Myc) and nonmycorrhizal (NM) roots were collected on Petri dishes grown poplar, in association with *Paxillus involutus*. Aliquots of 200 ng and 100 ng total RNA from Myc and NM roots (to ensure equal amount of root material), respectively, were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control.

Table 3 *In silico* analyses of ammonium transporter (*AMT*) genes in poplars (*Populus*)

Gene name	Number of occurrences in EST database	EST tissue localization	RT-PCR product (present work)
<i>AMT1;1</i>	21	3C, 11L, 2SL, 2S, 1Ba, 1R, 1X	R, L, F, FF, P, B
<i>AMT1;2</i>	13	13R	R
<i>AMT1;3</i>	5	5L	
<i>AMT1;4</i>	0		
<i>AMT1;5</i>	0		R, L, St
<i>AMT1;6</i>	11	11L	L, F, FF, P
<i>AMT2;1</i>	9	1R, 2CC, 2FC, 1FB, 2SL, 1L	L, FF, P
<i>AMT2;2</i>	0		R, P
<i>AMT3;1</i>	7	4L, 1B, 2Ba	SL
<i>AMT4;1</i>	0		
<i>AMT4;2</i>	1	1FB	
<i>AMT4;3</i>	0		
<i>AMT4;4</i>	0		
<i>AMT4;5</i>	2	2CC	R, F

EST, expressed sequences tag; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.
Number of occurrences and tissue localizations of *AMT* ESTs retrieved from the EST GenBank database (Altschul *et al.*, 1997). Tissues were as follows: B, bud; Ba, bark; C, cambium; CC, cell culture; F, fruit; FB, floral bud; FC, female catkin; FF, female flower; L, leaf; P, petiole; R, root; S, stem; SL, senescing leaf; St, stamen; X, not determined.

Functional expression of *AMTs* in a yeast mutant defective in NH_4^+ uptake

Yeast has provided a genuine heterologous expression system for characterizing many plant nutrient and metabolite transporters. The yeast strain 31019b is defective in the three endogenous NH_4^+ transporters (*mep1*, *mep2* and *mep3*) and is unable to grow on medium containing 1 mM NH_4^+ as the

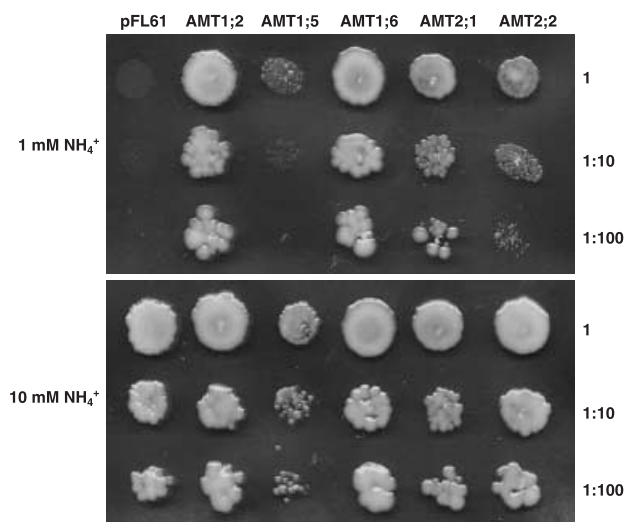


Fig. 9 Complementation of yeast mutant Δmep strain 31019b by poplar ammonium transporters (*AMTs*). Yeast strain 31019b was transformed with the yeast expression vector pFL61 or pFL61 harboring the coding sequences of *AMT1;2*, *AMT1;5*, *AMT1;6*, *AMT2;1*, or *AMT2;2*. Growth was assayed on minimal medium containing 1 mM or 10 mM NH_4^+ as sole nitrogen source. Pictures were taken after 2 d of growth at 30°C.

sole N source (Marini *et al.*, 1997). Transformation with the yeast expression vector pFL61 bearing the *AMT1;2*, *AMT1;5*, *AMT1;6*, *AMT2;1* or *AMT2;2* coding sequences under the control of the constitutive yeast phosphoglycerate kinase gene promoter (Minet *et al.*, 1992), conferred the ability of 31019b to grow at 1 mM NH_4^+ as the sole N source (Fig. 9). Yeast transformed with empty plasmid (pFL61) was used as a negative control. Thus, all five genes encode functional NH_4^+ transporters. By contrast, the other three-expressed poplar *AMTs* (*AMT1;1*, *AMT3;1* and *AMT4;5*) were unable to complement the Mep deficiency in the yeast strain 31019b. This inability might result from poor targeting to the yeast plasma membrane. Two intron-free *AMTs*, for which transcripts were not detected (*AMT1;3* and *AMT1;4*), were cloned using their genomic sequence and used to transform the triple Mep mutant, but were unable to complement the growth deficiency on low ammonium (data not shown). Cells expressing *AMT1;5* grew less than the control strain on 10 mM ammonium (Fig. 9), suggesting that *AMT1;5* expression was toxic to yeast cells.

We further tested the sensitivity of yeast cells to increasing methylammonium concentrations (Fig. 10). Cells expressing *AMT2;1*, or *AMT2;2* retained the ability to grow on methylammonium, therefore indicating that methylammonium was not taken up by these cells. As found for other *AMT2* family members (Sohlenkamp *et al.*, 2002), it seems that poplar *AMT2;1*, or *AMT2;2* have a particularly low affinity for methylammonium, whereas *AMT1* family members can readily take up methylammonium.

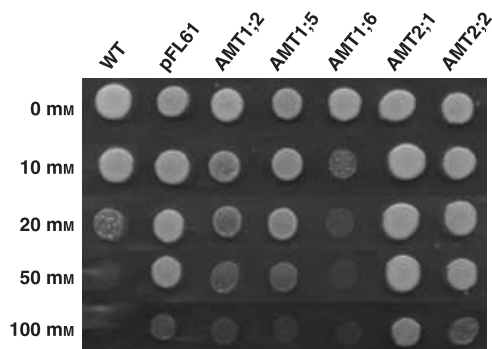


Fig. 10 Sensitivity of yeast cells to toxic concentrations of methylammonium. Yeast strain 31019b was transformed with the yeast expression vector pFL61 or pFL61 harboring the coding sequences of *AMT1;2*, *AMT1;5*, *AMT1;6*, *AMT2;1*, or *AMT2;2*. Growth was assayed on minimal medium containing 0.1% proline supplemented with 0–100 mM methylammonium. Pictures were taken after 3 d of growth at 30°C.

Kinetics studies of *AMT1;2* and *AMT1;6* transporters expressed in yeast

To determine differences in substrate affinities between the *AMT* proteins, we used ^{14}C -labeled methylammonium as a substrate analog and measured short-term uptake in transformed yeast Δmep strain 31019b. Only members of the *AMT1* subfamily showed methylamine uptake capacities (Sohlenkamp *et al.*, 2002). Among the *AMT1* members, expression of *AMT1;2* and *AMT1;6* conferred the ability to take up ^{14}C -labeled methylammonium in the range of 0.03–3 mM whereas 31019b transformed with the vector alone (Fig. 11a) did not take up significant amounts of ^{14}C -labeled methylammonium in the same concentration range. Kinetic parameters were calculated from Lineweaver–Burk plots. *AMT1;2* displayed a higher affinity ($K_m = 45 \mu\text{M}$) and a lower capacity ($V_m = 0.349 \pm 0.007 \text{ nmol min}^{-1} 10^8 \text{ cell}^{-1}$) for methylammonium than *AMT1;6* ($K_m = 85 \mu\text{M}$; $V_m = 1.058 \pm 0.024 \text{ nmol min}^{-1} 10^8 \text{ cell}^{-1}$). Since the affinities for methylammonium do not necessarily reflect the affinity for ammonium, we performed inhibition studies with varying NH_4^+ concentrations. The K_i values were deduced from Dixon plots, and a 50% inhibition was observed at 11 and 16 μM for *AMT1;2* and *AMT1;6*, respectively (Fig. 11b). Inhibition studies indicated that these two NH_4^+ transporters possess a much higher affinity for NH_4^+ than for methylammonium.

Discussion

An extended *AMT* family in the poplar genome

Analysis of genomes of *Arabidopsis* and rice revealed the presence of six and 10 *AMT* genes, respectively. In the poplar

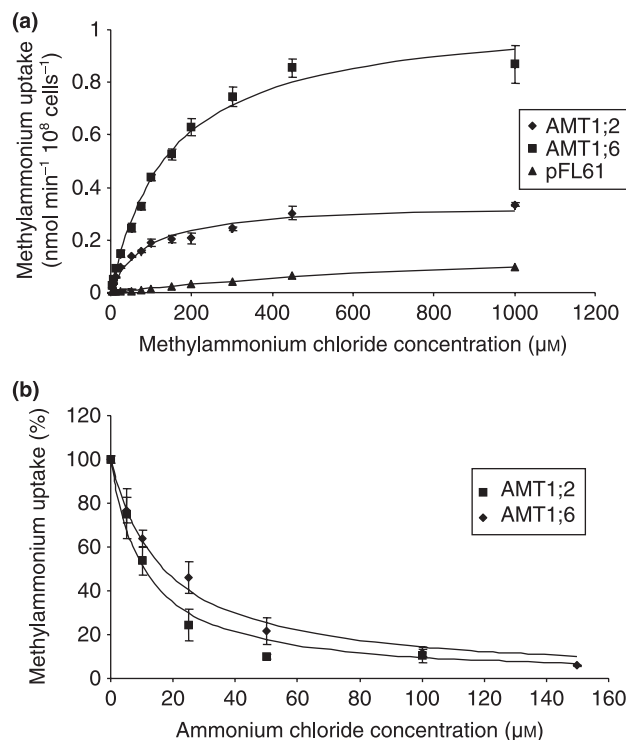


Fig. 11 Kinetic analysis of *AMT1;2* and *AMT1;6* in transformed yeast. (a) Concentration dependent kinetics of ^{14}C -methylammonium uptake by the yeast strain 31019b (Marini *et al.*, 1997) transformed with pFL61 alone or pFL61 harboring *AMT1;2* and *AMT1;6*. (b) Influence of increasing NH_4^+ concentrations on ^{14}C -methylammonium uptake rates. The ^{14}C -methylammonium uptake was measured at the corresponding K_m of each *AMT*. Values are expressed as means $\pm$ SD of three replicate experiments.

genome, 14 *AMT* genes were identified, and assigned to the *AMT1* subfamily (six genes) or to the *AMT2* subfamily (eight genes). Interestingly, poplar possesses a much greater number of *AMT2* genes than *Arabidopsis* and a greater number of *AMT1* genes than rice. Although a few poplar *AMT* transcripts were not detectable in any tissue tested in this work, the expression patterns of the expressed members strongly suggest specific features related to the peculiar physiology of a perennial and mycorrhizal tree. Trees differ fundamentally from annual plant species in that they are adapted to survive on a long time-scale. The most obvious manifestation of this is the development of wood, or secondary xylem, from the vascular cambium. This secondary meristem is essential for tree growth and development and in providing support for a tall structure. Taken with caution, a comparison of the number of *AMT* genes in different species might suggest that plant species from different environments or with different life style organize ammonium transport with a fairly unequal number of ammonium transporters.

The root specific *AMT1;2* is highly regulated by N availability and mycorrhization

AMT1;2 was specifically and highly expressed in roots (Figs 4 and 5). Determination of affinity constants for ^{14}C methylammonium uptake by *AMT1;2* in yeast and transport inhibition by NH_4^+ revealed that this protein is a high-affinity ammonium transporter ($K_m \text{NH}_4^+ = 11 \mu\text{M}$), indicating that it might be partly responsible for the HATS ammonium uptake component measured in *Populus* species (Min *et al.*, 2000). The downregulation of *AMT* transcript in N-fed *P. tremula* $\times$ *alba* root is consistent with the downregulation of HATS ammonium influx measured in *P. tremuloides* (Min *et al.*, 2000). Indeed, *AMT1;2* transcript levels in poplar (Fig. 4a) negatively correlated with root glutamine concentrations (Fig. 3b), as already demonstrated for *AtAMT1;1* (Rawat *et al.*, 1999) and *LeAMT1;1* (von Wiren *et al.*, 2000b). *AMT1;2* seems to represent the functional ortholog of *AtAMT1;1* and *LeAMT1;1*. However, prolonged incubation in a N-deficient growth medium resulted in a decrease of the *AMT1;2* transcript level, probably owing to the appearance of proteolysis-derived ammonia. In addition, *AMT1;2* was overexpressed in *P. involutus* mycorrhizal roots. Indeed, expression of its closest ortholog *PttAMT1;2* from *Populus tremula* $\times$ *tremuloides* was increased fourfold in the ectomycorrhizal symbiosis between *P. tremula* $\times$ *tremuloides* and *Amanita muscaria*, suggesting an increased ammonium uptake capacity of mycorrhizal poplar roots (Selle *et al.*, 2005). Recent studies on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* demonstrated that ammonium is exported by intraradical hyphae in arbuscular mycorrhizal symbiosis (Govindarajulu *et al.*, 2005), suggesting that ammonium could be a major source of fungus-derived N in mycorrhizal symbiosis (Chalot *et al.*, 2006).

In roots, four other *AMT* genes, *AMT1;1* (Fig. 4), *AMT1;5* (Table 3), *AMT2;2* (Fig. 2) and *AMT4;5* (Table 3) were expressed, reflecting a potential role in covering the N demand through uptake of soil NH_4^+ in various N regime. Although the kinetic parameters were not determined for this subset of genes, we might hypothesize that some of them could be involved in the LATS component of ammonium influx (Min *et al.*, 2000), or in the retrieval of leaked ammonium (von Wiren *et al.*, 2000a). However, they were also expressed in other poplar tissues such as petiole (*AMT1;1* and *AMT2;2*) or stamen (*AMT1;5*) and therefore a specific function in root uptake can be ruled out.

The shoot-specific *AMT1;6* and *AMT3;1* are strongly upregulated during senescence

Several lines of evidence indicate that transport of NH_4^+ , and hence leaf-expressed *AMT*s, might be of particular importance for N nutrition and metabolism in leaves. First, NH_4^+ can be imported from the atmosphere into leaf cells through stomata (Husted & Schjoerring, 1996). Second,

significant concentrations of NH_4^+ have been measured in the xylem (Rawat *et al.*, 1999), indicating that a considerable amount of N is translocated to shoots in this form. Third, the photorespiratory N cycle generates a large amount of NH_4^+ in leaf mitochondria that is subsequently transported to chloroplasts for reassimilation by GS, implying that the expression of *AMT* genes can be important to ensure the recycling of NH_4^+ during photorespiration (D'Apuzzo *et al.*, 2004). Finally, the *AMT*s might also be recruited during the senescing process.

Expression of *AMT1;6*, *AMT2;1* and *AMT3;1* was exclusively detected in shoot tissues (Table 3). *AMT1;6* is the closest ortholog of *LeAMT1;3* in tomato (von Wiren *et al.*, 2000b) and both genes form a distant clade in the *AMT1* subfamily (Fig. 1). *AMT1;6* complemented the triple ΔMep yeast strain (Fig. 9) and had a high affinity constant ($K_m \text{NH}_4^+ = 16 \mu\text{M}$) comparable to that of *AMT1;2* (Fig. 11b). It was suggested that *LeAMT1;3* might be linked to the synthesis of asparagine as a N storage form in darkness or to the deamination of glutamate by glutamate dehydrogenase (von Wiren *et al.*, 2000b). Consistent with this observation, *AMT1;6* transcripts declined under N starvation in poplar (Fig. 4b), which was characterized by a decrease of the asparagine pool (Fig. 3c). In *Arabidopsis*, asparagine synthetase is encoded by a small gene family (*ASN1*, *ASN2* and *ASN3*) and it has been shown that *ASN2* expression correlates with ammonium metabolism (Wong *et al.*, 2004). Indeed, the light induction of *ASN2* is ammonium dependent and *ASN2* transcripts decreased after transfer to ammonium-free growth medium. It has been suggested that the physiological role of *ASN2* may be related, directly or indirectly to the recapture of lost N resources under stress conditions. However, the hypothesis that *LeAMT1;3* is involved in the transport of photorespiratory NH_4^+ was not supported. *AMT1;6* expression was strongly affected by the diurnal cycle (Fig. 5b) and correlated well with the sugar content. This is in good agreement with a recent report, which indicated that sugars make a major contribution to the diurnal changes of gene expression, while light, N metabolites and water deficit may make smaller contributions (Blasing *et al.*, 2005).

Expression of *AMT1;5*, *AMT1;6* and *AMT3;1* increased with the state of maturation of leaves and highly correlated with the expression of the marker gene, cysteine protease whose implication in senescence has been revealed (Bhalerao *et al.*, 2003) (Fig. 6). However, in contrast to *AMT1;5* and *AMT1;6*, *AMT3;1* expression was only detected in senescing leaves. Ammonium release during senescence has been documented (Mattsson & Schjoerring, 2003) and the specific expression of the glutamine synthetase gene *NtGLN 1;3* was observed in senescing leaves of *Nicotiana tabacum* (Brugiére *et al.*, 2000). In addition to the putative function of *AMT2* members during leaf senescence (Howitt & Udvardi, 2000; von Wiren *et al.*, 2000a; van der Graaff *et al.*, 2006), our data suggest that *AMT1* members might also be recruited

to ensure ammonium assimilation during the process of leaf senescence.

It is also worth noting the contrasting expression patterns of *AMT1;5* and *AMT1;6*: both were fully expressed in senescing leaves (Fig. 6), but the expression of *AMT1;5* in flowers was specific to stamens and that of *AMT1;6* specific to female flowers (Fig. 7a). The higher expression of *AMT1;5* in stamens (Fig. 7) is in good agreement with data on its closest ortholog *AtAMT1;4*. Indeed, to complement the poplar data, we extracted GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) (www.genevestigator.ethz.ch) data for the *Arabidopsis* AMT gene family, which indicated that *AtAMT1;4* was solely expressed in male flower but not in female flower parts. *AMT1;5* and *AMT1;6*, might have important and specific roles in reproductive organ development in the dioecious plant, poplar. Further functional analysis is required to establish the precise role of AMTs and their correlation to plant reproduction mechanisms.

The two AMT genes *AMT2;1* and *AMT2;2* have been partly subfunctionalized during poplar evolution

AMT2;1 and *AMT2;2* restored growth of the triple Mep mutant (Fig. 9) but were unable to take up methylamine, as demonstrated for other AMT2 members (Simon-Rosin *et al.*, 2003). The single members of the AMT2 subfamily in *Arabidopsis* and *L. japonicus*, as well as the closest ortholog in rice (*OsAMT2;1*) were expressed in all organs (Sohlenkamp *et al.*, 2002; Simon-Rosin *et al.*, 2003; Suenaga *et al.*, 2003). *AtAMT2* was suggested to play a significant role in transferring ammonium between the apoplast and symplast of cells throughout the plant. Although expression of *AtAMT2* in shoots responded little to changes in root N status, transcript levels in leaves declined under high CO₂ conditions (Sohlenkamp *et al.*, 2002). The *LjAMT2;1* gene was found to be constitutively expressed throughout *Lotus* plants particularly in all major tissues of nodules. *LjAMT2;1* would be implicated in the recovery of ammonium lost from nodule cells by efflux. A similar role may be fulfilled in other organs, especially leaves, which liberate ammonium during normal metabolism (Simon-Rosin *et al.*, 2003). Unlike other plant species, this set of AMT genes in poplar displayed specific expression pattern, *AMT2;2* being mostly expressed in petiole and *AMT2;1* being highly expressed in leaves (Fig. 2). *AMT2;2* and *AMT2;1* arose from a recent duplication event (Sterck *et al.*, 2005; Tuskan *et al.*, 2006), which, in addition, resulted in a functional specialization (this work). The release of duplicate copies from constraints enables the evolution of new functions (neofunctionalization) or the loss of function (formation of a pseudogene), as observed for MADS-box genes (Irish & Litt, 2005). Alternatively, duplicated gene copies can potentially diverge in their roles, retaining different subfunctions of the original gene. The distribution and tissue localization of this subset of AMT2 genes in various plant species (*AtAMT2;1*,

LjAMT2;1, *OsAMT2;1*, *AMT2;1* and *AMT2;2*) suggest that the two poplar genes have been partly subfunctionalized during poplar evolution.

The high expression of *AMT1;1* and *AMT2;2* in petiole tissues is intriguing (Fig. 2). Much controversy exists about whether or not NH₄⁺ is translocated in the xylem from roots to shoots. It was demonstrated that NH₄⁺ might indeed constitute a significant part of the N translocated from the roots to the shoot in the xylem. A fundamental requirement for ammonium translocation is the presence of transport systems capable of loading NH₄⁺ into the xylem and of subsequently moving NH₄⁺ from the leaf apoplast solution into the leaf cells (Schjoerring *et al.*, 2002). Furthermore, significant NH₄⁺ contents were measured in the phloem sap of ammonium-fed tobacco plants, which was correlated with a higher glutamate dehydrogenase activity and polypeptide content in stems (Terce-Laforgue *et al.*, 2004). Considering the frequency of plasmodesmata along the palisade cell/bundle sheath cell/companion cell and paraveinal mesophyll cell/bundle sheath cell/companion cell routes, Russin & Evert (1985) concluded that *Populus deltoides* would rather behave as a symplastic loader, suggesting that N compounds may also use the symplastic route for loading. In that case, active transport would not be required during these transfer steps. The compartmentalization of the ammonia assimilatory pathway in the vascular tissue, especially in perennial plants (Paczek *et al.*, 2002), to better control carbon and N allocation at particular stages of plant development and/or under certain physiological conditions, needs to be better assessed.

Conclusion

The analysis of the AMT expression patterns in different organs of poplar show that expression of a given transporter can be very specific or can overlap with other genes, thus covering most tissues tested so far in poplar. The cell specificity of the individual members still remains to be demonstrated. The present data could show that multiple AMT genes with different spatial expression and transcriptional regulation allow the plant to respond differentially to varying nutritional conditions in the environment. Specific features of the perennial lifestyle plant, such as a high potential for ammonium remobilization during senescence or upon ectomycorrhization, together with subfunctionalization of AMT members, have been highlighted. The elucidation of the AMT gene family may present a comprehensive foundation for future studies on the ammonium nutrition of perennial plants.

Acknowledgements

B.M. was supported by a postdoctoral fellowship and J.C. by a PhD fellowship from the 'Ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche'. We thank Prof. Simone Ottonello

(University Parma, Italy) for providing facilities for yeast uptake experiments and Dr Pascal Frey and Veronica Pereda (INRA Nancy) for providing leaf material. Financial support from the IFR 110 (Génomiques, Ecophysiologie et Ecologie fonctionnelle) is gratefully acknowledged.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST – a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, *et al.* 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* 5: R24.
- Becker D, Stanke R, Fendrik I, Frommer WB, Vanderleyden J, Kaiser WM, Hedrich R. 2002. Expression of the NH_4^+ -transporter gene *LeAMT1*; 2 is induced in tomato roots upon association with N_2 -fixing bacteria. *Planta* 215: 424–429.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Björkbacka H, Birve SJ, Karlsson J, Gardestrom P, Gustafsson P, Lundeberg J, Jansson S. 2003. Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology* 131: 430–442.
- Blasing OE, Gibon Y, Gunther M, Hohne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible WR, Stitt M. 2005. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3257–3281.
- Brosche M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmaki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Altman A, Polle A, Dreyer E, Rudd S, Paulin L, Auvinen P, Kangasjarvi J. 2005. Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biology* 6: R101.
- Brugiere N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B. 2000. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* 211: 519–527.
- Chalot M, Blaudez D, Brun A. 2006. Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Sciences* 11: 263–266.
- Christopher ME, Miranda M, Major IT, Constabel CP. 2004. Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* 219: 936–947.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188–1190.
- D'Apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, El Alaoui H, Barbulova A, Betti M, Dimou M, Katinakis P, Marquez A, Marini AM, Udvardi MK, Chiurazzi M. 2004. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. *Plant Physiology* 134: 1763–1774.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wiren N. 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 11: 937–948.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819–823.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge U-I, Kunze R. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* 141: 776–792.
- Howitt SM, Udvardi MK. 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1465: 152–170.
- Husted S, Schjoerring JK. 1996. Ammonia flux between oilseed rape plants and the atmosphere in response to changes in leaf temperature, light intensity, and air humidity (interactions with leaf conductance and apoplastic NH_4^+ and H^+ concentrations). *Plant Physiology* 112: 67–74.
- Irish VF, Litt A. 2005. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment. *Current Opinion in Genetic Development* 15: 454–460.
- Javelle A, Morel M, Rodriguez-Pastrana BR, Botton B, Andre B, Marini AM, Brun A, Chalot M. 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (*Amt*) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* 47: 411–430.
- Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass AD. 2002. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA 'knockout' of the high-affinity NH_4^+ transporter *AtAMT1*;1. *Plant Physiology* 130: 1263–1275.
- Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Encelot N, Martin F. 2003. The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. *FEBS Letters* 542: 37–41.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150–163.
- Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB. 1996. Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 8139–8144.
- Loque D, von Wiren N. 2004. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 55: 1293–1305.
- Ludewig U, von Wiren N, Frommer WB. 2002. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1*; 1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13548–13555.
- Marini AM, Andre B. 2000. *In vivo* N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Molecular Microbiology* 38: 552–564.
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, Andre B. 1994. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 13: 3456–3463.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B. 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cellular Biology* 17: 4282–4293.
- Mattsson M, Schjoerring JK. 2003. Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves. *New Phytologist* 160: 489–499.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Min X, Siddiqi MY, Guy RD, Glass ADM, Kronzucker HJ. 2000. A comparative kinetic analysis of nitrate and ammonium influx in two early-successional tree species of temperate and boreal forest ecosystems. *Plant, Cell & Environment* 23: 321–328.
- Minet M, Dufour ME, Lacroite F. 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant Journal* 2: 417–422.
- Montanini B, Moretto N, Soragni E, Percudani R, Ottonello S. 2002. A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genetics and Biology* 36: 22–34.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for the growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB. 1994. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO Journal* 13: 3464–3471.
- Pacek V, Dubois F, Sangwan R, Morot-Gaudry JF, Roubelakis-Angelakis KA, Hirel B. 2002. Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insights on the regulation of carbon and nitrogen metabolism. *Planta* 216: 245–254.
- Pearson JN, Finnemann J, Schjoerring JK. 2002. Regulation of the high-affinity ammonium transporter (*BnAMT1*; 2) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Molecular Biology* 49: 483–490.

- Ralph S, Oddy C, Cooper D, *et al.* 2006. Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Molecular Ecology* 15: 1275–1297.
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD. 1999. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant Journal* 19: 143–152.
- Russin WA, Evert RF. 1985. Studies on the leaf of *Populus deltoides* (Salicaceae): ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentrations. *American Journal of Botany* 72: 1256–1273.
- Saier MH Jr. 1998. Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Advances in Microbial Physiology* 40: 81–136.
- Salvemini F, Marini A, Riccio A, Patriarca EJ, Chiurazzi M. 2001. Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. *Gene* 270: 237–243.
- Schoererring JK, Husted S, Mack G, Mattsson M. 2002. The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 883–890.
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flugge UI, Kunze R. 2003. ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* 131: 16–26.
- Selle A, Willmann M, Grunze N, Gessler A, Weiss M, Nehls U. 2005. The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 697–706.
- Shelden MC, Dong B, De Bruxelles GL, Trevaskis B, Whelan J, Ryan PR, Howitt SM, Udvardi MK. 2001. *Arabidopsis* ammonium transporters, AtAMT1;1 and AtAMT1;2, have different biochemical properties and functional roles. *Plant and Soil* 231: 151–160.
- Simon-Rosin U, Wood C, Udvardi MK. 2003. Molecular and cellular characterisation of LjAMT2; 1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 51: 99–108.
- Sohlenkamp C, Wood CC, Roeb GW, Udvardi MK. 2002. Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology* 130: 1788–1796.
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wiren N, Yamaya T, Yamaguchi J. 2003. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1; 1–1; 3) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44: 726–734.
- Sterck L, Rombauts S, Jansson S, Sterky F, Rouze P, van de Peer Y. 2005. EST data suggest that poplar is an ancient polyploid. *New Phytologist* 167: 165–170.
- Sterky F, Bhalerao RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandre K, Strauss SH, Sundberg B, Gustafsson P, Uhlen M, Bhalerao RP, Nilsson O, Sandberg G, Karlsson J, Lundberg J, Jansson S. 2004. A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 13951–13956.
- Suarez MF, Avila C, Gallardo F, Canton FR, Garcia-Gutierrez A, Claros MG, Canovas FM. 2002. Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 891–904.
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wiren N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T. 2003. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44: 206–211.
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA. 2004. *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell* 16: 2048–2058.
- Terce-Laforgue T, Dubois F, Ferrario-Mery S, de Crecenzo MA, Sangwan R, Hirel B. 2004. Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiology* 136: 4308–4317.
- Thomas GH, Mullins JG, Merrick M. 2000. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Molecular Microbiology* 37: 331–344.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, *et al.* 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604.
- von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB. 2000a. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 254–261.
- von Wiren N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB. 2000b. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant Journal* 21: 167–175.
- Wong HK, Chan HK, Coruzzi GM, Lam HM. 2004. Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 332–338.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621–2632.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1 Linkage map positions of ammonium transporter (AMT) poplar genes.

Table S1 Ratios (ammonium transporter (AMT) expression/ubiquitin (UBQ) expression) were calculated for each gene

This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.2007.01992.x>

(This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

3. L'azote et la sénescence automnale du peuplier

Publication n°3 – En préparation

Résumé: Dans les sols forestiers, la disponibilité en azote est extrêmement faible et les économies des ressources azotées sont d'une importance particulière pour les espèces forestières capables de se développer au cours de différentes saisons pendant un grand nombre d'années. Les expériences menées au sein de la présente étude, ont porté sur l'analyse des teneurs en acides aminés et l'expression des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse de l'arginine mais également les gènes codant pour les transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) chez le peuplier au cours de la sénescence automnale. Les analyses des teneurs en acides aminés montrent une augmentation de la teneur en glutamine dans les feuilles et une accumulation d'arginine dans les tiges au cours de la sénescence. Parallèlement, les expressions des gènes codant certaines enzymes impliquées dans la synthèse de l'arginine ainsi que les gènes codant les transporteurs CAT ont été mesurées dans les mêmes tissus. La présente étude fournit les premières informations concernant les teneurs en acides aminés et l'expression des membres de la famille CAT au cours de la sénescence automnale chez le peuplier. Cette étude met notamment en lumière le rôle de l'arginine et des transporteurs CAT dans la physiologie du peuplier au cours de la sénescence automnale.

Nitrogen in senescing leaves of poplar

Jérémy Couturier, Damien Blaudez and Michel Chalot*

Research Unit INRA/UHP 1136 “Tree-microbe Interactions”, Nancy-University, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Running title: Nitrogen in senescing leaves of poplar

* Author for correspondence: Michel Chalot

Research Unit INRA/UHP “Tree-microbe Interactions”

Faculty of Sciences and Technology

Nancy-University

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words : Nitrogen metabolism, senescence, arginine, cationic amino acid transporters, storage protein, *Populus trichocarpa*.

Summary

Nitrogen availability in the forest soil is extremely low and nitrogen economy has a special importance in woody plants that are able to cope with seasonal periods of growth and development over a large number of years. Here we report on the analysis of the amino acids pools and expression of arginine synthesis and cationic amino acid transporter (CAT) genes in the perennial species *Populus trichocarpa* during autumn senescence.

Amino acids pools analyses showed an increase of glutamine in leaves and an accumulation of arginine in stems during senescence. Expression analysis of arginine synthesis genes and *CAT* genes during senescence was performed.

The present study provides basic information for the poplar amino acids pools and poplar *CAT* family expression during senescence and pave the way for deciphering the roles of arginine and CATs in poplar physiology during autumn senescence.

Introduction

Seasonal nitrogen (N) cycling is an adaptation of plants to winter-cold seasonal climates which nutrients (mostly N) are often considered to be the major growth-limiting factor (Cooke and Weih, 2005). Nitrogen translocation from senescing leaves to over-winter storage sites is a common feature of temperate deciduous trees (Ryan and Bormann, 1982). Poplar is extremely efficient at N conservation since more than 80% of the whole-tree nitrogen content is conserved during dormancy (Pregitzer *et al.*, 1990). During autumnal leaf senescence, there is a functional shift in leaf metabolism from resource assimilation to resource remobilization and export. N-rich amino acids and other mobile nutrients are transported via the phloem from senescing leaves to perennial tissues where they are used to synthesize proteins (Sauter *et al.*, 1989; Hörtensteiner and Feller, 2002). Proteins represent the major fraction of the stored nitrogen and vegetative storage proteins (VSPs) represent the major form of reduced N storage in vegetative tissues of both annual and perennial plants (Staswick, 1994; Stepien *et al.*, 1994). The bark-storage protein (BSP) family comprises the major VSPs in *Populus*. During autumn, BSPs accumulate in the bark parenchyma and xylem cells of the main stem, branches and roots of the tree (Sauter *et al.*, 1989).

Amino acids are the currency of nitrogen exchange between source to sink tissues in plants (Bush, 1999). Glutamine is the predominant translocation form for organic nitrogen in poplar (Dickson, 1979; Sauter and van Cleve, 1992) and is preferentially transported through the stem to developing leaves via a xylem-to-phloem transfer facilitated by ray cells (Dickson *et al.*, 1985). Nevertheless, amino acid composition of xylem sap present seasonal variations. During the wintering phase, arginine is the major amino acid in bark and xylem of poplar whereas at the time of budding and growing, glutamine and glutamate become dominant (Sagisaka, 1974). These variations in amino acid pools could be associated with variations in expression of amino acid transporter genes not only in storage tissues but also in sieve

elements which allow amino acid distribution in whole plant. In plants, the majority of putative amino acid transporters genes can be classified into two major groups: the amino acid transporter family (ATF) and the amino acid polyamine choline superfamily (APC) (Wipf *et al.*, 2002). Most of the amino acid transporters from plants that have been functionally characterized belong to the ATF superfamily, with the amino acid permease (AAP) family being the best studied subfamily (Boorer and Fischer, 1997; Boorer *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1995, 2002; Okumoto *et al.*, 2002, 2004). In plants, APC amino acid transporters are poorly understood and were only described in Arabidopsis. APC transporters of the L-type amino acid transporter (LAT) subfamily (five members) have not been characterized and only a few members of the cationic amino acid transporters (CAT) family have been studied (Frommer *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2004; Hammes *et al.*, 2006). They contain between 11 and 14 putative TM domains and they are high affinity basic amino acid transporters. They localize to the plasma membrane or the vacuole (Frommer *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2004, Hammes *et al.*, 2006). It has been demonstrated that *AtCAT1* was expressed in leaves, flowers and developing siliques and transcripts were specifically localized in major veins of leaves and roots (Frommer *et al.*, 1995). It has been suggested that *AtCAT1* might play multiple roles in phloem physiology, from phloem loading to providing amino acids for developing embryos. Moreover, *AtCAT1* is likely to be proton-driven high-affinity transporters that transport mainly cationic amino acids (Frommer *et al.*, 1995). *AtCAT2* is probably localized to the tonoplast and may encode the long-sought vacuolar amino acid transporter (Su *et al.*, 2004). *AtCAT5* functions as a high-affinity, basic amino acid transporter at the plasma membrane. Expression profiles suggest that *AtCAT5* may function in the re-uptake of leaked amino acids at the leaf margin (Su *et al.*, 2004). *AtCAT8* is expressed in young and rapidly dividing tissues such as young leaves and root apical meristem. *AtCAT8* is also localized to the plasma membrane (Su *et al.*, 2004). *AtCAT6* has a high affinity for cationic amino acids and is also likely to be energized

by protons (Hammes *et al.*, 2006). AtCAT6 transports large, neutral and cationic amino acids in preference to other amino acids and plays a role in supplying amino acids to sink tissues of plants and nematode-induced feeding structures.

As exemplified above, nitrogen storage and cycling have traditionally been investigated at the molecular physiology and ecophysiology scales. We present here the analysis of amino acid pools in different organs of poplar during autumn senescence and winter. Taking advantage of the annotated *Populus trichocarpa* (Nisqually 1) genome (Tuskan *et al.*, 2006), we also present here the expression analysis during the same period of genes coding CAT members and genes coding enzymes of the arginine biosynthesis.

Materials and Methods

Plant Material

Leaves, 1-yr and 2-yr-old stems were sampled from a free-growing *Populus trichocarpa* at the University of Nancy campus. About 20 leaves and 4 stems were sampled at 2 PM for every time point, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RT-PCR

Total RNA extraction was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Darmstadt, Germany) from approximately 100 mg of frozen tissues of poplar. To remove contaminating genomic DNA, the samples were treated with DNase I (Qiagen). To obtain cDNA 300 ng of total RNA was annealed to oligo-dT primers (Promega, Madison, WI, USA) and reverse transcribed using Reverse Transcriptase (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 42°C for 1 h 30 min. Every reaction was set up in three replicates. For each CAT, the PCR program was as follows: 94°C for 3 min and 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 1 min. The whole set of *CAT* genes (12 genes) was tested by RT-PCR in every experiment carried

Table 1 Primers used for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis

Name	Sequence
<i>PtrCAT1 f</i>	ACCATTTATGCCATATGATGTCCG
<i>PtrCAT1 r</i>	GGTTCAACTTGTGATGACACAAC
<i>PtrCAT2 f</i>	TTCCTCTGCATTGCTGCATAT
<i>PtrCAT2 r</i>	TAGTGACATCTGGGCTACCTGTA
<i>PtrCAT3 f</i>	GTCCTCTTCGTTTTACAACG
<i>PtrCAT3 r</i>	TTTCTCCAGAGCTCCGATAA
<i>PtrCAT4 f</i>	TTTGCATAGGAGAAGGTGCAGCAT
<i>PtrCAT4 r</i>	GACAAAGCAACGCCTATACCT
<i>PtrCAT5 f</i>	ACAGCACTGAATACTGCTGTA
<i>PtrCAT5 r</i>	GCTAGCTTCAAGAGGTTTGTT
<i>PtrCAT6 f</i>	TACATGTGTGTTATCGGACGGTC
<i>PtrCAT6 r</i>	TTACACTTTGAAAGAATTAATATGGTCCTCGC
<i>PtrCAT7 f</i>	CTGTCTTTGCCATAGCACAAAG
<i>PtrCAT7 r</i>	CTGGCCTTTAGTGTGGTCATG
<i>PtrCAT8 f</i>	GCCTCTATTGCTACTGCTTTTATC
<i>PtrCAT8 r</i>	TCCAAGTGATCCAACCATTAAGCT
<i>PtrCAT9 f</i>	CAGCTTTCAATGAGCTTACTGCTT
<i>PtrCAT9 r</i>	ACAAGACTTCCAATGATGCCT
<i>PtrCAT10 f</i>	ACAGCTTCAATTGCACTCTTTACC
<i>PtrCAT10 r</i>	TCATAGCAGCTGAATATCTAGC
<i>PtrCAT11 f</i>	TCATCAAGAAGGTGGAGACCAAGA
<i>PtrCAT11 r</i>	GGCAGCACAAACAAAAACAGAT
<i>PtrCAT12 f</i>	TGATCATCAAGAAGAAGGGCTG
<i>PtrCAT12 r</i>	CACAACACCAACAAGAACAGCA
<i>UBQ f</i>	GCACCTCTGGCAGACTACAA
<i>UBQ r</i>	TAACAGCCGCTCCAAACAGT
<i>CP f</i>	AGTCACTGAGAAAGGCTGTGG
<i>CP r</i>	CCAAATGGATTGTTCTTGCTC
<i>AS f</i>	AGCGGAAATACTTATTGGGGACGT
<i>AS r</i>	ACAAGTTCCTGTCCCTGCTATA
<i>AL f</i>	GTTCTGTTACACACATTTGCAA
<i>AL r</i>	ACAGGTTCCCTTGTCTTCCTGCAA
<i>OTC f</i>	ATGGCCTGAACTATAACCATCC
<i>OTC r</i>	CTCGATCTTGCTGATTCCAGC
<i>CPS f</i>	CGGTGTCCTAACCACAGAAGAATT
<i>CPS r</i>	CCTCAGGATGGTATTGTAGAGA

out but only *CATs* detected and well expressed are retained in figures for greater clarity. For arginine biosynthesis study, cDNA corresponding to arginosuccinate lyase (*AL*), arginosuccinate synthase (*AS*), ornithine transcarbamoylase (*OTC*) and carbamoyl-phosphate synthase (*CPS*) were amplified using the same PCR program described above. A cDNA fragment corresponding to the constitutively expressed ubiquitin gene was amplified simultaneously (28 cycles) and used as a control. Cysteine protease (*CP*) gene was amplified (28 cycles) and used as control of the senescing state of leaves. The sequences of the gene-specific oligonucleotides designed in the nonconserved regions of the genes were used for RT-PCR and are listed in Table 1.

Amino acid extraction and analysis

Amino acids were extracted twice from 10 to 20 mg dried plant tissues with 300 μ L 70% (v : v) cold ethanol. The samples were dried using a Reacti-Therm. Heating Module (Pierce, Rockford, IL, USA) and resuspended in 400 μ L 0.1 N HCl. Amino acids and standards were then purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and aliquots of purified samples were transferred to microvials, dried in a Reacti-Therm Heating Module (Pierce) and derivatized according to (Javelle *et al.*, 2003). Gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed as described previously (Javelle *et al.*, 2003).

Protein extraction and analysis

Small pieces (about 50-100 mg) of branches were ground with a mortar in liquid nitrogen and pestle in 2 ml of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF (Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride), 50 mM β mercaptoethanol. Samples were then mixed by vortexing, and held on 4°C for 30 min. Samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min and the supernatant

collected. Proteins were precipitated with acetone at -20°C for 2 hrs. Aliquots of 100 µl were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min and proteins were resuspended with SDS 0,1%. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) colorimetric assay kit (Interchim, Montluçon, France) (Brown *et al.*, 1989). The BCA procedure was as per manufacturer recommendations, with bovine serum albumin as a standard and absorbance measured at 562 nm. Protein concentrations were determined for duplicate subsamples for each replicate.

Phylogenetic analyses

Amino acid sequences were aligned by CLUSTALW and imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Phylogenetic analyses were conducted using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1000 replicates. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances.

The accession numbers or genes models of version 1.1 of the *P. trichocarpa* genome used were: AtCAT1 (At4g21120), AtCAT2 (At1g58030), AtCAT3 (At5g36940), AtCAT4 (At3g03720), AtCAT5 (At2g34960), AtCAT6 (At5g04770), AtCAT7 (At3g10600), AtCAT8 (At1g17120), AtCAT9 (At1g05940), Os11g05690, Os06g34830, Os03g43970, Os12g06060, Os03g45170, Os12g42850, Os01g11160, PtrCAT1 (Poptr1_1:570928), PtrCAT2 (Poptr1_1:571264), PtrCAT3 (Poptr1_1:573976), PtrCAT4 (Poptr1_1:248775), PtrCAT5 (Poptr1_1:800060), PtrCAT6 (Poptr1_1:264766), PtrCAT7 (Poptr1_1:423928), PtrCAT8 (Poptr1_1:798197), PtrCAT9 (Poptr1_1:755066), PtrCAT10 (Poptr1_1:567910), PtrCAT11 (Poptr1_1:806659), PtrCAT12 (Poptr1_1:808200).

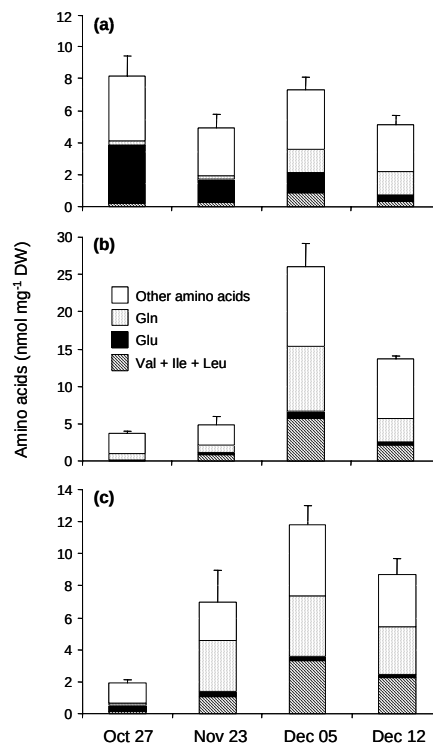


Fig. 1 Quantification of amino acids by gas chromatography-mass spectrometry in limb (a), central vein (b) and petiole (c) of poplar during senescence. Values are expressed as mean $\pm$ SE of three replicate experiments.

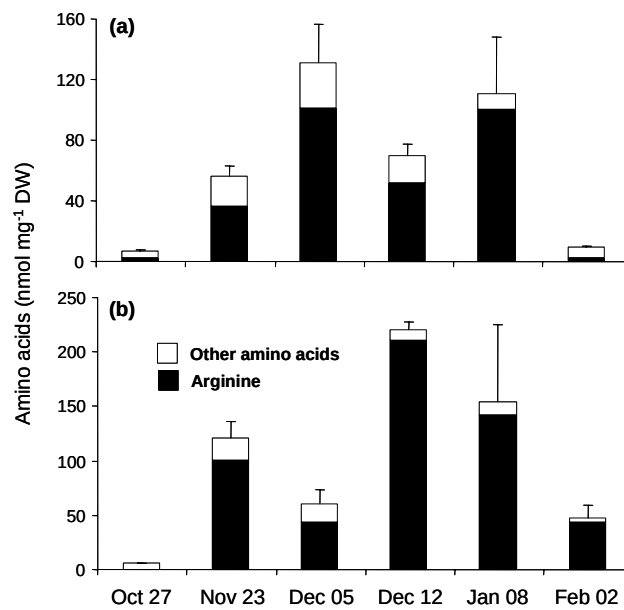


Fig. 2 Quantification of amino acids by gas chromatography-mass spectrometry in 1-yr-old (a) and 2-yr-old (b) stems of poplar during senescence. Values are expressed as mean $\pm$ SE of three replicate experiments.

For phylogenetic analyses of *CPS* genes, the accession numbers or genes models of version 1.1 of the *P. trichocarpa* genome used were: AtCPS (At3g27740), NtCPS (CAC85725), OsCPS (BAD08105), PtrCPS1 (Poptr1_1:796331), PtrCPS2 (Poptr1_1:553916).

Results

Dynamic changes in amino acid and protein pools

Amino acid contents were investigated in limb (Fig. 1a), central vein (Fig. 1b), and petiole (Fig. 1c) of poplar leaves. In limb, total amino acid content did not change much during senescence, varying between 5 and 8 nmol per mg of dry weight. Metabolic profiling of individual amino acids indicated that glutamate (and aspartate, not shown) content decreased whereas that of glutamine (and asparagine, not shown) increased during leaf senescence (Fig. 1a). In central vein and petiole, total amino acid content increased by ca. six fold from October 27 to December 5, thereafter decreasing at the latest sampling date (Figs 1b and 1c). Glutamine was the predominant amino acid before leaf fall, representing 23 and 34% of the total amino acid pool in central vein and petiole respectively, followed by leucine, isoleucine and valine.

Amino acid pools were investigated in 1-yr-old (Fig. 2a) and 2-yr-old (Fig. 2b) stems. In October, amino acid amounts were less than 15 nmol per mg dry weight and arginine was almost undetectable in 2-yr-old stems. During autumnal senescence, total amino acid pools increased by 20- and 37-fold in 1-yr-old and 2-yr-old stems, respectively, when measured at their maximal level. Noticeably, arginine rapidly became the predominant amino acid accumulated in both stems, accounting for 91% and 92% in 1-yr-old and 2-yr-old stems, respectively, at January 8. Arginine accumulation was slightly delayed in 2-yr-old stems, peaking at December 5 in 1-yr-old stems and at December 12 in 2-yr-old stems (Fig. 2).

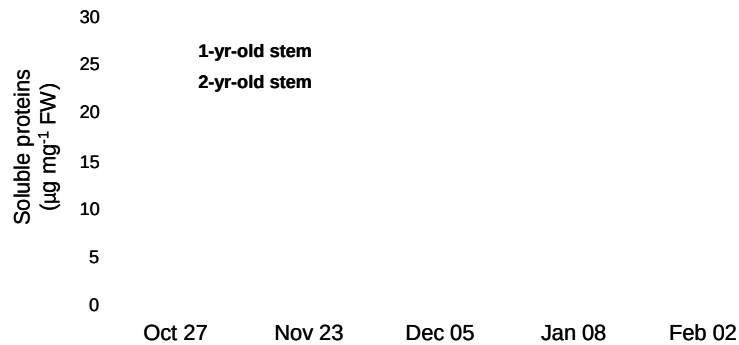


Fig. 3 Quantification of soluble protein in 1-yr-old (a) and 2-yr-old (b) stems of poplar during autumnal senescence and winter. Protein concentration was determined for duplicate sub-samples from each replicate. Values are expressed as mean $\pm$ SE of three replicate experiments.

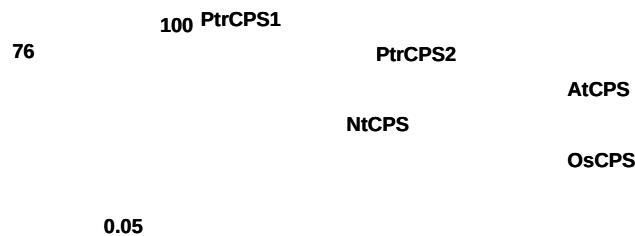


Fig. 4 An unrooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the carbamoyl-phosphate synthetase (CPS) of poplar, *Arabidopsis*, rice and tobacco. The analysis was performed as described in the Material and Methods section. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances. Accession numbers are given in the Materials and Methods section.

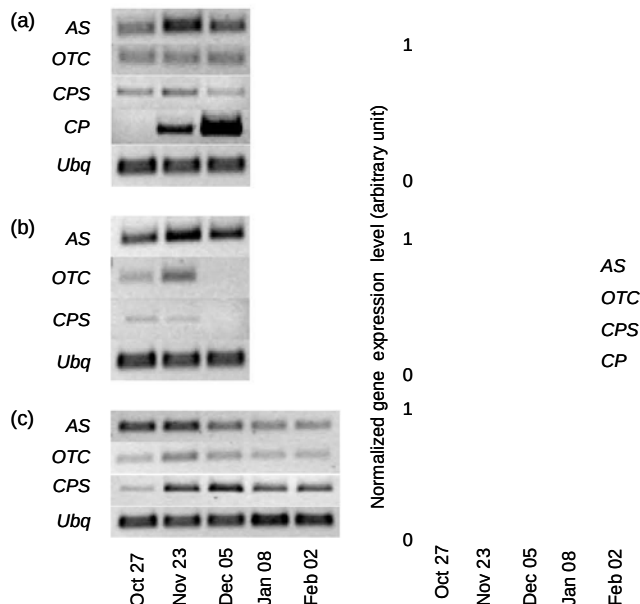


Fig. 5 Expression of arginine biosynthetic genes in various poplar tissues during or after senescence. (a) Expression of AS, OTC, CPS and CP genes in limb. Cystein protease (CP) was used as a marker of the senescing state (Bhalerao *et al.*, 2003). (b) Expression of AS, OTC and CPS genes in petiole. (c) Expression of AS, OTC and CPS in 2-yr-old stems. Total RNAs were extracted at different time period during autumn and winter and 300 ng of total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control. Analyses were performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in triplicate. Signal intensities (representative gels, left panels) were normalized to the constitutive expressed poplar ubiquitin gene (right panels).

The amount of total soluble proteins was investigated in 1-yr-old and 2-yr-old stems (Fig. 3). During autumnal senescence, soluble protein content of 2-yr-old stems increased by more than 3-fold between October 27 and January 8. In contrast, there were no statistically significant changes in soluble protein content of 1-yr-old stems during senescence.

Arginine biosynthesis genes expression during senescence

Considering the striking accumulation of arginine during senescence, we investigated some of the genes involved in its biosynthesis. The JGI *P. trichocarpa* gene search mode revealed the existence of two carbamoyl phosphate synthetase (*CPS*) gene models for the small subunit, whereas only a single gene was detected in *Arabidopsis*, tobacco and rice (Fig. 4). We also investigated the three other genes coding ornithine transcarbamylase (*OTC*), argininosuccinate synthase (*AS*) and argininosuccinate lyase (*AL*), for which ESTs were detected in poplar EST databases. In order to investigate their expression during senescence in poplar, total RNAs were extracted from limbs, petioles and 2-yr-old stems sampled at different times during autumn and winter. *AL* transcripts were undetectable under conditions used in these experiments (not shown). In limb, *CPS* and *OTC* genes were weakly expressed and poorly affected by autumnal senescence whereas *AS* transcripts slightly increased (Fig. 5a). The senescing state of leaves was confirmed by the parallel amplification of a cysteine protease gene (Bhalerao *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004), which was highly expressed at December 5. Similarly, in petiole, *CPS* and *OTC* transcripts were weakly detected while *AS* transcripts were more strongly detected during autumnal senescence (Fig. 5b). In 2-yr-old stems, as observed in limb and petiole, *OTC* was weakly expressed and *AS* expression decreased after November 23 (Fig. 5c). In contrast, *CPS* expression increased by 11-fold during leaf senescence and was maximal at December 5 (Fig. 5c).

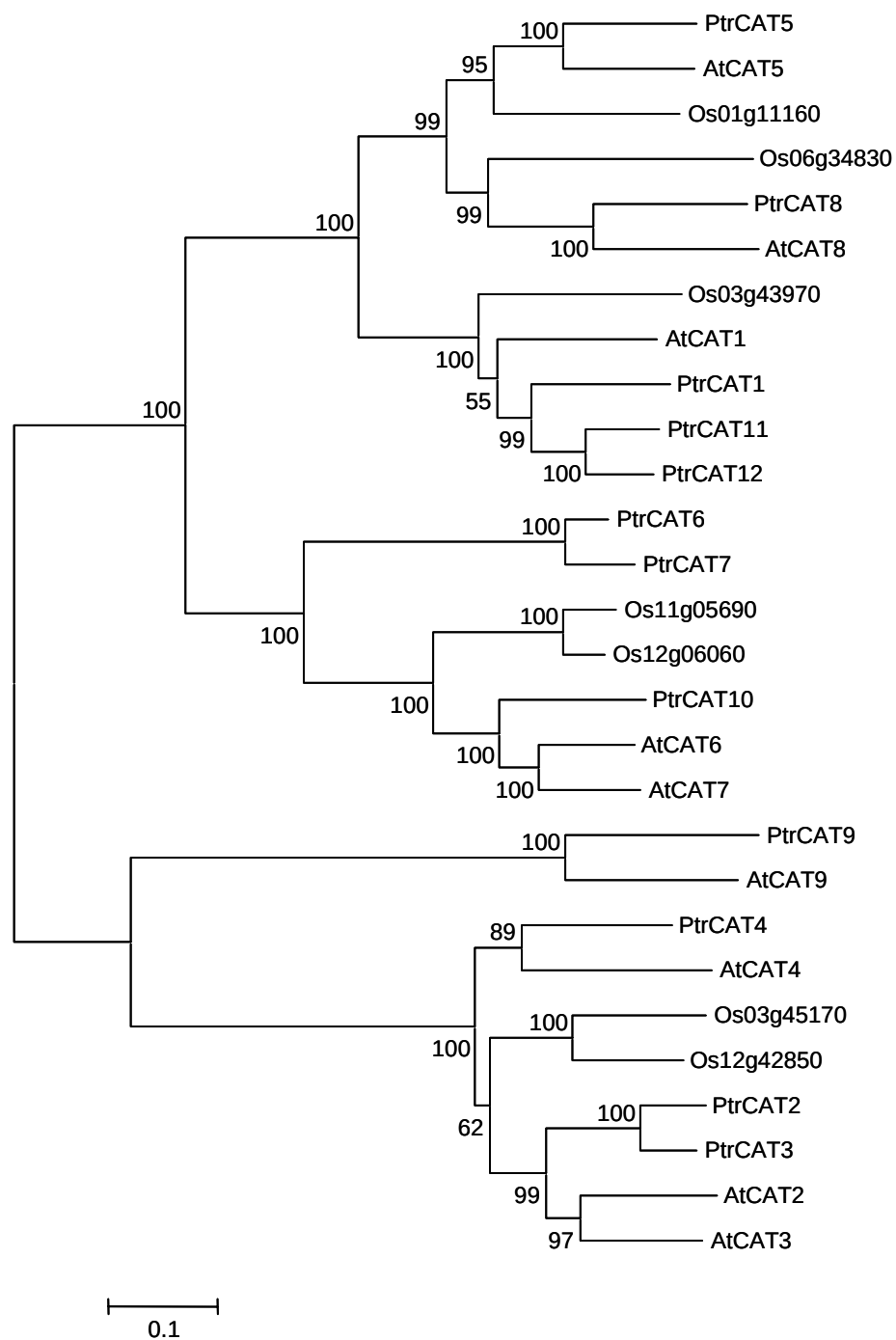


Fig. 6 An unrooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the cationic amino acid transporter (CAT) family. The analysis was performed as described in the Materials and Methods section. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances. Accession numbers are in given in the Materials and Methods section.

In silico and expression analyses of the CAT family members

The JGI *P. trichocarpa* gene search mode revealed the existence of 12 *CAT* gene models. As described for *Arabidopsis* *CAT* family, poplar *CAT* members can be phylogenetically grouped into small subgroups (Fig. 6). Analysis of the assembled genome revealed relatively recent whole-genome duplication shared among all modern taxa in *Salicaceae*. A second, older duplication appears to be shared with the *Arabidopsis* lineage (Tuskan *et al.*, 2006). These duplicated genes originated through very recent small-scale gene duplications and one relatively recent large-scale gene duplication event (Sterck *et al.*, 2005). A detailed analysis of duplication events for the *CAT* members revealed that *CAT6*, *CAT7* and *CAT9* derived from a common ancestor through an ancient and a recent duplication event, and that *CAT2* and *CAT3* derived from a common ancestor through a recent duplication event. The same analysis also revealed that *CAT11* and *CAT12* derived from a common ancestor through a recent duplication event.

To investigate the potential role of *CAT* members during senescence, transcript levels were estimated in limbs, petioles and 2-yr-old stems sampled at different times during autumn and winter. *CAT10* and *CAT11* showed increased expression levels in senescing leaves in December compared with leaves collected in October (Fig. 7a). Conversely, *CAT2* and *CAT12* were expressed in leaves in October and November but not expressed at the end of the senescing period (Fig. 7a). *CAT3* and *CAT4* transcripts remained high throughout the season and were not affected by leaf senescence (Fig. 7a). Similarly, *CAT1* and *CAT8* were only weakly expressed and poorly affected by senescence in these experiments (data not shown). All other *CAT* members were also analyzed but were not detected in these samples.

As observed in limb, *CAT3* and *CAT4* were strongly expressed in petiole but transcript levels of these genes were poorly affected by leaf senescence (Fig. 7b). Similarly, *CAT1* transcripts were poorly detected and not affected by senescence (data not shown) whereas

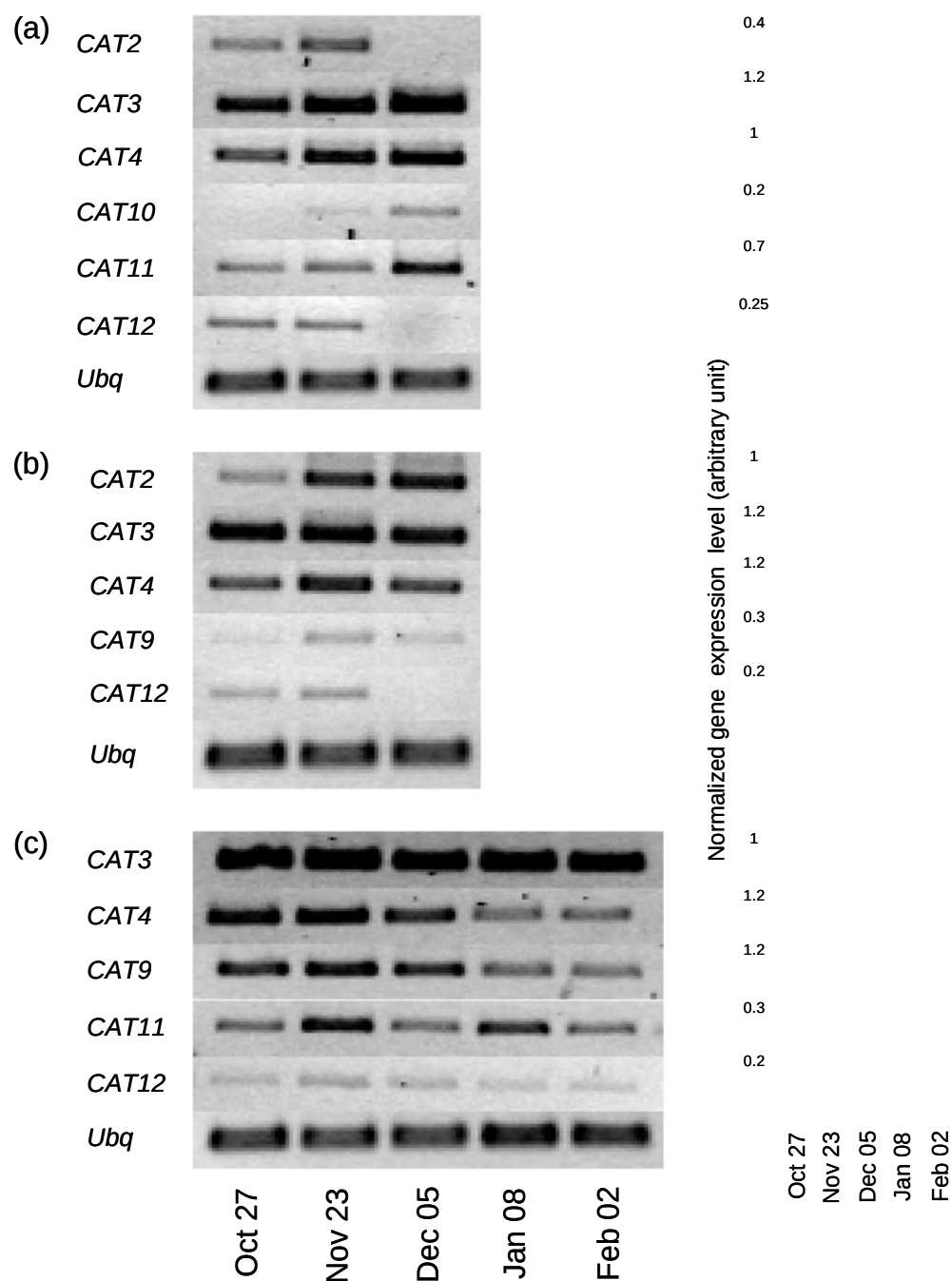


Fig. 7 Expression of *CAT* transporter genes in various poplar tissues during or after senescence. (a) Expression of *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *CAT4*, *CAT8*, *CAT10*, *CAT11* and *CAT12* genes in limb. (b) Expression of *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *CAT4*, *CAT9* and *CAT12* genes in petiole. (c) Expression of *CAT2*, *CAT3*, *CAT4*, *CAT6*, *CAT11* and *CAT12* genes in 2-yr-old stems. Total RNAs were extracted at different time period during autumn and winter and 300 ng of total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin (*Ubq*) gene was amplified and used as internal control. Analyses were performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in triplicate. Signal intensities (representative gels, left panels) were normalized to the constitutive expressed poplar ubiquitin gene (right panels).

CAT12 transcripts were slightly detected in October and November but not detected at the end of the senescing period (Fig. 7b).

Interestingly, although not expressed in limb and only poorly expressed in petiole, *CAT9* was highly expressed in 2-yr-old stems, just before leaf fall. In contrast, *CAT2* was very weakly expressed in 2-yr-old stems in autumn and in winter (data not shown). *CAT12* presented the same expression pattern in 2-yr-old stems, in limb and in petiole (Fig. 7c). As observed in limb and in petiole, *CAT3* transcript levels were high and poorly affected by senescence in 2-yr-old stems (Fig. 7c). Interestingly, *CAT4* and *CAT9* transcript levels were high during autumn senescence and decreased in 2-yr-old stems after leaf fall (Fig. 7c). More surprising, *CAT11* expression was subjected to quite high variations (Fig. 7c) which could be related to amino acid content and more particularly to arginine. Indeed, the amino acid content of 2-yr-old stems displayed the same variations than *CAT11* expression during autumn and winter (Fig. 2b). All other *CATs* were also analyzed but were not detected in these experiments.

Discussion

Nitrogen remobilization in autumn leaves

Nitrogen economy has a special importance in woody plants that are able to cope with seasonal periods of growth and development over a large number of years. As N availability in the forest soil is extremely low, efficient mechanisms are required for the assimilation, storage, mobilization and recycling of inorganic and organic forms of N. Seasonal N cycling is an adaptation of plants to winter-cold seasonal climates in which nutrients (mostly N) are often considered to be the major growth-limiting factor (Cooke and Weih, 2005). In the N metabolism of conifers, the cyclic interconversion of arginine and the amides glutamine and

asparagine plays a central role and its regulation is critical to maintain the N economy of these long-living plants (Canovas *et al.*, 2007).

At the beginning of autumn, the major amino acids found in limbs were glutamate and glutamine. During senescence glutamate content decreased whereas that of glutamine increased. The same variations were observed for aspartate and asparagine but at a smaller extent (Fig. 1a). Furthermore, it has been demonstrated that N content decreased in aspen autumn leaves and about 80% of total leaf N was withdrawn during autumn senescence (Keskitalo *et al.*, 2005). The decrease in total amino acid content in leaves during senescence agreed with this previous work. On the other hand, qualitative changes in amino acid content also revealed this N remobilization process. In senescing leaves, a large amount of ammonium is produced as a result of protein hydrolysis (Hörteinstainer and Feller, 2002). Ammonium is assimilated into the glutamine amide group and the specific expression of the glutamine synthetase gene *NtGLN1;3* was observed in senescing leaves of *Nicotiana tabacum* (Brugiere *et al.*, 2000). Moreover, it has been recently demonstrated that expression of several ammonium transporter genes in poplar (*PtrAMT1;5*, *PtrAMT1;6* and *PtrAMT3;1*) increased with the maturation state of leaves suggesting that they are specifically recruited to ensure ammonium assimilation during the process of leaf senescence (Couturier *et al.*, 2007). Whereas glutamate decreased with ageing, the glutamine pool increased suggesting that glutamine biosynthesis had exhausted the glutamate pool.

In central vein and petiole, amino acid contents increased during senescence until December 5, before leaf fall (Figs 1b and 1c). Glutamine was the major amino acid found in central vein and petiole, whereas glutamate represented less than 3% and 6%, respectively in these tissues. The increase in glutamine content in central vein and petiole suggests an export from leaves to perennial organs during autumn (Fig. 8). It can be also noted that leucine, isoleucine and valine contents increased strongly in central vein and petiole during

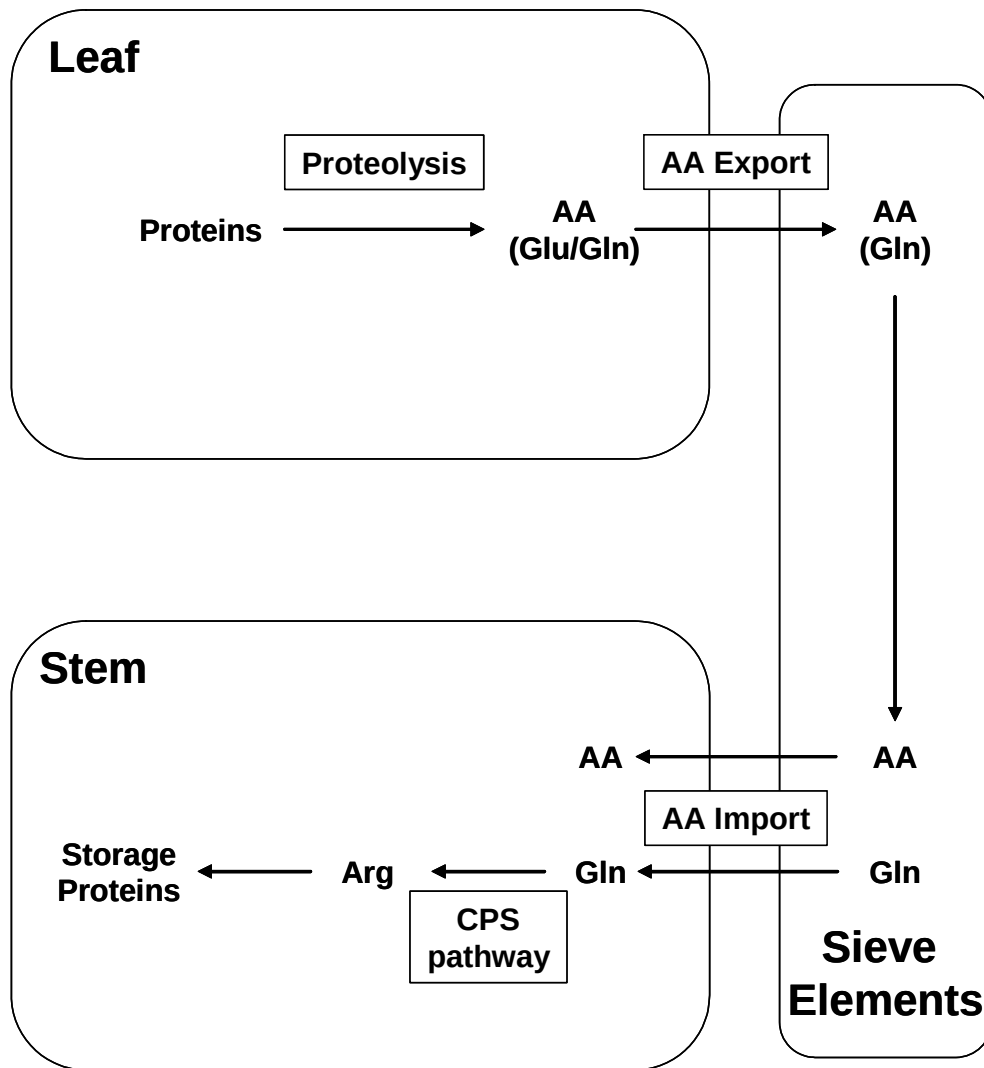


Fig. 8 Autumnal N remobilization from leaves to perennial organs in poplar. Protein breakdown during autumn leaf senescence in poplar accounts for a notable proportion of the N exported from leaves. N-rich amino acids, such as glutamine, are transported via the phloem from senescing leaves to perennating organs, such as stems, where they are used to synthesise storage proteins. In leaves, glutamine could be preferentially used as transport component from senescing leaves to perennial poplar tissues. In stems, glutamine could be used for carbamoyl phosphate synthesis via the CPS pathway and consequently for arginine synthesis. Arginine accumulation in poplar stems during autumn and winter could be considered as a temporary N storage form and could be used after for storage protein synthesis.

senescence, which was not observed in limb. Interestingly, pools of leucine and isoleucine increased also with ageing in *Arabidopsis* leaves (Diaz *et al.*, 2005). It has been suggested that isoleucine and leucine biosynthesis exhausted the aspartate pool. The same processes could occur in poplar leaves during senescence.

During autumn leaf senescence, there is a functional shift in leaf metabolism from resource allocation to resource remobilization and export. Rubisco breakdown during autumn leaf senescence in poplar (Brendley and Pell, 1998) accounts for a notable proportion of the N exported from leaves (Titus and Kang, 1982; Millard and Thompson, 1989). N-rich amino acids are transported via the phloem from senescing leaves to perennial tissues, where they are used to synthesize proteins (Sauter *et al.*, 1989). During autumn, bark storage proteins (BSPs) accumulate in perennating tissues such as bark, wood and roots (Sauter and van Cleve, 1990; Langheinrich and Tischner, 1991). Interestingly, arginine and soluble protein contents increased during autumn and were higher after leaf fall (Figs 2 and 3). This was most evidenced for arginine, which increased from undetectable levels in October to more than 200 nmol per mg dry weight at December 12 in 2-yr-old stems. Arginine content decreased after leaf fall. Furthermore, as observed in several *Populus* species (Langheinrich and Tischner, 1991), two major polypeptides accumulated in 1-yr and 2-yr-old stems during autumn and winter (data not shown). Previous studies have demonstrated that during the wintering phase, arginine was the major amino acid both in bark and xylem (Sagisaka, 1974). It can be noted that storage proteins are particularly rich in arginine and in amide-containing amino acids (Muntz, 1998). Arginine accumulation in poplar stems during autumn and winter could therefore be considered as a temporary N storage form that could be used thereafter for storage protein synthesis (Fig. 8).

Arginine is preferentially synthesised in stems

The fact that arginine was not detected in limb, central vein and petiole during senescence suggests that arginine synthesis may occur in stems. The metabolic route to arginine synthesis in plants involves two distinct processes: synthesis of ornithine from glutamate and synthesis of arginine from the ornithine intermediate (Slocum, 2005). The second process requires the carbamoyl-phosphate intermediate, which is generated from glutamine via the carbamoyl phosphate synthetase (CPS). The CPS protein is made up of a small and a large subunit (Slocum, 2005). Three other enzymes are involved in arginine synthesis: ornithine transcarbamylase (OTC), argininosuccinate synthase (AS) and argininosuccinate lyase (AL). A detailed expression analysis of *AS* and *OTC* revealed that these genes were expressed in leaf and petiole during autumn (Figs 5a and 5b). However none of these gene expression followed the *CP* marker gene. *AS* transcript levels were preferentially higher in autumn than in winter (Figs 5). *OTC* transcripts did not show variations during senescence in leaf, petiole and stem (Figs 5). In contrast, the *CPS* gene expression level strongly increased in stem during senescence (Fig. 5c), whereas it was weakly detected in leaf and petiole (Figs 5a and 5b). It also clearly matches the *CP* expression in leaves. Interestingly, stem glutamine content increased from November to January (data not shown) and carbamoyl-phosphate is generated from glutamine via the CPS. In stems, glutamine could be used for carbamoyl phosphate synthesis and consequently for arginine synthesis. In leaves, glutamine could be preferentially used as a transport component from senescing leaves to perennial poplar tissues (Fig. 8). Nevertheless, it cannot be ruled out that arginine could also be synthesised in leaf but at a smaller extent. Indeed, in *Arabidopsis* senescing leaves, it has been demonstrated that arginine content increased and represented around 1% of total amino acid content (Diaz *et al.*, 2005).

CAT members display different expression patterns during autumn senescence

In *Arabidopsis*, members of the CAT family have been characterized as high affinity basic amino acid transporters. AtCAT1 and AtCAT5 mediate for instance high affinity transport of arginine, lysine and histidine (Frommer *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2004). To complement previous expression studies, we extracted GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) (www.genevestigator.ethz.ch) data for the *Arabidopsis* CAT gene family, which indicated that AtCAT2 and AtCAT5 were mostly up-regulated during leaf senescence. AtCAT2 probably locates to the tonoplast and may encode the long-sought vacuolar amino acid transporter (Su *et al.*, 2004). AtCAT5 functions as a high-affinity, basic amino acid transporter at the plasma membrane and AtCAT5 may function in reuptake of leaking amino acids at the leaf margin (Su *et al.*, 2004). In poplar senescing leaves, CAT11 and at a smaller extent CAT10, were up-regulated during senescence (Fig. 7a). In contrast to their *Arabidopsis* orthologs (Fig. 6), CAT5 transcripts were not detected and CAT2 was only expressed at the beginning of senescence (Fig. 7a). However, CAT2 was strongly up-regulated in petiole during senescence and very weakly expressed in stems (Figs 7b and 7c). Nevertheless, expression of the orthologous genes of amino acid transporters may not be similar because the pool of amino acids available for phloem transport is differentially regulated in different species (Delrot *et al.*, 2001). A detailed analysis of each amino acid transporter gene had to be made before conclusions can be drawn from the role of the different orthologs. Differential expression of orthologous transporters in different species may provide information for gene origination and evolution (Liu and Bush, 2006). CAT3 was highly expressed in limb, petiole and stem and was only slightly affected by senescence in leaves (Figs 7). CAT4 was also highly expressed in limb, petiole and stem but in contrast to CAT3, it was down-regulated in stem during winter (Figs 7). CAT9 transcripts were weakly detected in petiole and strongly in stems (Figs 7b and 7c). CAT9 seems to be preferentially expressed in organs containing sieve elements. CAT11

expression pattern is very interesting so far as this gene was not expressed in petiole but expressed in limb and stem (Figs 7). Moreover, *CAT11* expression was up-regulated in senescing leaves (Fig. 7a) and subjected to quite high variations in stem (Fig. 7c). Interestingly, total amino acid content and arginine content in particular displayed variations of the same order (Fig. 2b). In stem, *CAT11* expression could be related to amino acid content and arginine particularly.

Conclusion

The analysis of amino acids pools in different organs show that efficient N remobilization from leaves to perennial organs occurs in poplar during autumn senescence. N-rich amino acids, such as glutamine, are transported via the phloem from senescing leaves to perennial organs, such as stems, where they are used to synthesize storage proteins. The present data show a strong arginine accumulation in stems during autumn and at the beginning of winter. The elucidation of amino acid content patterns may present a comprehensive foundation for future studies on the amino acid transport and metabolism during autumn N remobilization in perennial plants.

Acknowledgements

J.C. was supported by a PhD fellowship from the “Ministère délégué à l’Enseignement supérieur et à la Recherche”. Aude Migeon and Frédéric Guinet are gratefully acknowledged for the help in sampling leaves, petioles and stems of poplar and technical assistance. We thank Dr Nicolas Rouhier (University Nancy, France) for help with protein extraction.

References

- Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, et al. 2004.** A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* **5**: R24.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Björkbacka H, Birve SJ, Karlsson J, Gardestrom P, Gustafsson P, Lundeberg J, Jansson S. 2003.** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology* **131**: 430-442.
- Boorer KJ, Fischer WN. 1997.** Specificity and stoichiometry of the *Arabidopsis* H⁺/amino acid transporter AAP5. *Journal of Biological Chemistry* **29**: 13040–13046.
- Boorer KJ, Frommer WB, Bush DR, Loo DDF, Wright EM. 1995.** Kinetics and specificity of a H⁺/amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **29**: 2213–2220.
- Brendley BW, Pell EJ. 1998.** Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiology* **18**: 81-90.
- Brugiere N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B. 2000.** Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**: 519-527.
- Bush DR. 1999.** Sugar transporters in plant biology. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 187-191.
- Canovas FM, Avila C, Canton FR, Canas RA, de la Torre F. 2007.** Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2307-2318.
- Cooke JE, Weih M. 2005.** Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* **167**:19-30.
- Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M. 2007.** The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* **174**: 137-150.
- Delrot S, Rochat C, Tegeder M, Frommer WB. 2001.** Amino acid transport. In: Lea P, Gaudry JFM, eds. *Plant Nitrogen* Paris, France: INRA-Springer, 215-235.
- Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry JF, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. 2005.** Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiology* **138**: 898-908.
- Dickson RE, Vogeman TC, Larson PR. 1985.** Glutamine transfer from xylem to phloem and translocation to developing leaves of *Populus deltoides*. *Plant Physiology* **77**: 412-417.
- Dickson RE. 1979.** Xylem translocation of amino acids from roots to shoots in cottonwood plants. *Canadian Journal of Forest Research* **9**: 374-378.
- Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB. 1995.** Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **29**: 16315–16320.
- Fischer WN, Loo DD, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM, Frommer WB. 2002.** Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant Journal* **29**: 717-731.
- Frommer WB, Hummel S, Unseld M, Ninnemann O. 1995.** Seed and vascular expression of a high affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **29**: 12036–12040.
- Hammes UZ, Nielsen E, Honaas LA, Taylor CG, Schachtman DP. 2006.** AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **48**: 414-426.

- Hörtensteiner S, Feller U. 2002.** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**: 927-937.
- Javelle A, Morel M, Rodriguez-Pastrana BR, Botton B, Andre B, Marini AM, Brun A, Chalot M. 2003.** Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* **47**: 411-430.
- Keskitalo J, Bergquist G, Gardestrom P, Jansson S. 2005.** A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology* **139**: 1635-1648.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Langheinrich U, Tischner R. 1991.** Vegetative storage proteins in poplar. Induction and characterization of a 32- and 36-kilodalton polypeptide. *Plant Physiology* **97**: 1017-1025.
- Liu X, Bush DR. 2006.** Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* **30**:113-120.
- Millard P, Thomson CM. 1989.** The effect of the autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1285-1289.
- Müntz K. 1998.** Deposition of storage protein. *Plant Molecular Biology* **38**: 77-99.
- Okumoto S, Koch W, Tegeder M, Fischer WN, Biehl A, Leister D, Stierhof YD, Frommer WB. 2004.** Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2155-2168.
- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W. 2002.** High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 45338-45346.
- Pregitzer KS, Dickmann DI, Hendrick R, Nguyen PV. 1990.** Whole-tree carbon and nitrogen partitioning in young hybrid poplars. *Tree Physiology* **7**: 79-93.
- Ryan DF, Bormann FH. 1982.** Nutrient resorption in northern hardwood forests. *Bioscience* **32**: 29-32.
- Sagisaka S. 1974.** Effect of low temperature on amino acid metabolism in wintering poplar: arginine-glutamine relationships. *Plant Physiology* **53**: 319-322.
- Sauter JJ, van Cleve B, Wellenkamp S. 1989.** Ultrastructural and biochemical studies results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of other tree species. *Holzforschung* **43**: 1-6.
- Sauter JJ, van Cleve B. 1990.** Biochemical, immunochemical, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (*Populus x canadensis* 'robusta') wood. *Planta* **183**: 92-100.
- Sauter JJ, van Cleve B. 1992.** Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of *Populus x canadensis* and its relation to protein body remobilisation. *Trees* **7**: 26-32.
- Slocum RD. 2005.** Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 729-745.
- Staswick PE. 1994.** Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 303-322.
- Stepien V, Sauter JJ, Martin F. 1994.** Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 185-192.

Su YH, Frommer WB, Ludewig U. 2004. Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 3104-3113.

Titus JS, Kang S-M. 1982. Nitrogen metabolism, translocation, and recycling in apple trees. *Horticultural Reviews* **4**: 204-246.

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. 2002. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 139-147.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**: 2621-2632.

4. Expression spécifique d'un transporteur putatif d'acides aminés dans les cellules de protoxylème du peuplier

Publication n°4 – En préparation

Résumé : Les acides aminés constituent la principale forme d'échange de l'azote entre les tissus « source » et les tissus « puits » des plantes. Au cours de l'hiver, les arbres stockent l'azote au niveau des tissus pérennes, et une grande partie de l'azote utilisé pour le développement des feuilles au printemps provient de la remobilisation des réserves stockées pendant l'hiver. Chez le peuplier, un membre de la famille AAP (Amino Acid Permease), *AAP11*, est uniquement exprimé au niveau des bourgeons végétatifs suggérant un rôle potentiel dans le transfert des acides aminés au cours du développement des bourgeons. Des analyses histochimiques de transformants de peuplier exprimant des fusions promoteur *AAP11*-gène rapporteur *GUS* révèlent que *AAP11* est exprimé préférentiellement dans les cellules du protoxylème, notamment au niveau des tissus jeunes des plants. D'autre part, au niveau des bourgeons, les cellules du protoxylème sont formées au cours de l'hiver, avant le débourrement. *AAP11* pourrait donc jouer un rôle crucial dans le transport des acides aminés au cours de la formation des cellules du protoxylème.

Selective expression of a putative amino acid transporter in protoxylem cells of poplar

Jérémy Couturier, Elisabeth de Fay, Damien Blaudez and Michel Chalot*

Research Unit INRA/UHP 1136 “Tree-microbe Interactions”, Nancy-University, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Running title: Amino acid transporter in poplar

* Author for correspondence: Michel Chalot

Research Unit INRA/UHP “Tree-microbe Interactions”

Faculty of Sciences and Technology

Nancy-University

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words : amino acid transport, *Populus trichocarpa*, protoxylem cells, bud burst.

Summary

Amino acids are the currency of nitrogen exchange between source to sink tissues in plants. Deciduous trees store nitrogen during winter in perennial tissues and much of the nitrogen used for leaf growth in the spring comes from the remobilization of stored the remobilization of stored reserves. *AAP11*, a member of the Amino Acid Permease (AAP) family, is only expressed in vegetative bud, suggesting a potential role in the distribution of amino acids during bud development. Histochemical analyses of *AAP11* promoter-GUS expressing plants revealed that *AAP11* is preferentially expressed in protoxylem cells. During winter, protoxylem was formed before bud burst and *AAP11* could play a crucial role for uptake of amino acids during protoxylem formation.

Introduction

Amino acids play fundamental roles in a multitude of processes, including protein synthesis, hormone metabolism, cell growth, production of metabolic energy, nucleobase synthesis and urea biosynthesis (Coruzzi and Zhou, 2001). More importantly, amino acids represent the principal long-distance transport form of organic nitrogen (N) and are distributed through xylem and phloem to all plant organs. On the basis of sequence homologies, amino acid transporter genes of plants can be classified into two major groups: the amino acid transporter family (ATF) and the amino acid polyamine choline superfamily (APC) (Wipf et al., 2002a). Most of the amino acid transporters from plants that have been functionally characterized belong to the ATF superfamily, with the amino acid permease (AAP) family being the best studied subfamily. In *Arabidopsis*, AtAAP1 to AtAAP6 and AtAAP8 have been characterized in more detail using heterologous expression systems, and they preferentially transport neutral amino acids and glutamate (Fischer et al., 2002; Okumoto et al., 2002). Previous studies have demonstrated specific expression of different AAP members in *A. thaliana*. AtAAP1 is expressed in the endosperm and the cotyledon whereas AtAAP2 is expressed in the vascular strands of siliques in funiculi (Hirner et al., 1998). AtAAP2 might play important roles in long-distance transport of amino acids (Hirner et al., 1998; Ortiz-Lopez et al., 2000). Recently it has been demonstrated that AtAAP1 imports amino acids into root cells when they are supplied at ecologically relevant concentrations suggesting an important role of AtAAP1 for efficient use of nitrogen sources present in the rhizosphere (Lee et al., 2007). It has been suggested that AtAAP3 may be involved in amino acid uptake from the phloem or in retrieving amino acids from the soil (Fischer et al., 1998). Nevertheless, AtAAP3 expression was recently observed for a short period in the connective tissue of the stamen before dehiscence, although it was mainly expressed in the root vascular tissue (Okumoto et al., 2004). AtAAP5 might be involved in phloem loading of amino acids from

source tissues (Fischer et al., 1995; Hirner et al., 1998) and in transporting amino acids into the developing embryo (Ortiz-Lopez et al., 2000). Expression of *AtAAP6* was first mainly detected in roots, sink leaves and cauline leaves (Fischer et al., 1995). Furthermore it has been showed that *AtAAP6* is expressed in xylem parenchyma, suggesting that *AtAAP6* might function in uptake of amino acids from the xylem because a high-affinity transporter may be required due to the low amino acid concentration in xylem sap (Okumoto et al., 2002). The last characterized member of this subfamily, *AtAAP8*, is notably expressed in young siliques and developing seeds (Okumoto et al., 2002). Recently it has been suggested that *AtAAP8* might play a crucial role for the uptake of amino acids into the endosperm and supplying the developing embryo with amino acids during early embryogenesis (Schmidt et al., 2007).

Most articles have been devoted to the description of amino acid transporters in *A. thaliana*, but there is less information about gene distribution in other higher plants, particularly in perennial plants (Fischer et al., 2002 ; Su et al., 2004, Liu and Bush, 2006). In woody perennial roots and stems, N reserves are broken down into amino acids that are further transported to growing tissues to supply N for early season development of expanding buds (Bollmark et al., 1999). Deciduous trees store N during winter in perennial tissues in specific wood and bark storage proteins that are degraded during spring shoot growth (Coleman et al., 1991; Sauter and van Cleve, 1992) and most of the nitrogen used by deciduous trees for bud burst and leaf growth in the spring comes from the remobilization of stored reserves (Millard, 1996). For example, in apple trees, the concentration of amino acids in the xylem sap rose following bud burst and the peak in amino acid concentration corresponded with the period when the rate of N remobilization was the fastest (Malaguti et al., 2001). Several studies have demonstrated translocation of specific compounds during remobilization: citrulline in *Betula pendula* (Millard et al., 1998), arginine, GABA, glutamine and citrulline in *Juglans nigra x regia* (Frak et al., 2002), glutamine, asparagine and aspartate in *Prunus avium* (Grassi et al.,

2002; Millard et al., 2006) and glutamine in *Populus trichocarpa* x *Populus balsamifera* (Millard et al., 2006). Identification and characterization of transport systems that direct the flow of N metabolites between cellular compartments, in tissues and organs, and throughout the plant, is therefore crucial to understand N transport and allocation. In perennial plants little is known about the molecular mechanisms involved in transport of amino acids between source tissues and sink tissues such as developing buds. In this work, we provide data on a novel AAP member that is strongly expressed in early stages of bud development. We successfully used *in situ* RT-PCR experiments and *in situ* promoter-GUS experiments to show the specific expression of the transporter in buds where it is predicted to play an important function in nitrogen transfer in support of protoxylem development.

Materials and Methods

Plant Material

Vegetative buds were sampled from a free-growing *Populus trichocarpa* at the University of Nancy campus. About 20 buds were sampled at 14 PM for every time point, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RT-PCR

Total RNA extraction was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Darmstadt, Germany) from approximately 100 mg of frozen tissues of poplar. To remove contaminating genomic DNA, the samples were treated with DNase I (Qiagen). To obtain cDNA 500 ng of total RNA was annealed to oligo-dT primers (Promega, Madison, WI, USA) and reverse transcribed using Reverse Transcriptase (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 42°C for 1 h 30 min. Every reaction was set up in three replicates. For each AAP, the PCR program was as follows: 94°C for 3 min and 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 1 min.

Table 1 Primers used fore reverse transcriptase polymerase chain reaction

Name	Sequence
<i>AAP10 f</i>	TCATGTGAATATGGGGACGCTATTT
<i>AAP10 r</i>	TACTGAACCATCCTTCCACAAATGC
<i>AAP11 f</i>	CCATGTAAACACAAGGACATTCCCA
<i>AAP11 r</i>	CTGAGAACCAACGTTCTGCGAACTC
<i>AAP12 f</i>	CCTTGTGAATACGTGTATACTCCGT
<i>AAP12 r</i>	TCGAGGACCAACGTTCTACAAACGT
<i>AAP13 f</i>	GGGATCGCAGGAGTCTCAGCTTAT
<i>AAP13 r</i>	GAAACACAATCTGAGGAGATTCAA
<i>AAP14 f</i>	AGCATCACTGGATCCTCAACTCAC
<i>AAP14 r</i>	GAGACAAAGCCTCGGGAGGTTGAT

AAP10, *AAP11*, *AAP12*, *AAP13*, and *AAP14* genes were tested by RT-PCR in every experiment carried. A cDNA fragment corresponding to the constitutively expressed ubiquitin gene was amplified simultaneously (28 cycles) and used as a control. The sequences of the gene-specific oligonucleotides designed in the nonconserved regions of the genes were used for RT-PCR and are listed in Table 1.

Amino acid extraction and analysis

Amino acids were extracted twice from 10 to 20 mg dried plant tissues with 300 µL 70% (v : v) cold ethanol. The samples were dried using a Reacti-Therm. Heating Module (Pierce, Rockford, IL, USA) and resuspended in 400 µL 0.1 N HCl. Amino acids and standards were then purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and aliquots of purified samples were transferred to microvials, dried in a Reacti-Therm Heating Module (Pierce) and derivatized according to (Javelle *et al.*, 2003). Gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed as described previously (Javelle *et al.*, 2003).

Histology of buds

Frozen buds were immersed into the chromic-acetic-formalin fixative, Craf I (Sass 1958), and were vacuum-infiltrated until thawing. They were fixed two days later and were preserved in this fixative until cutting. Before cutting they were washed and the scales were removed. The resting bud was superficially embedded in 6% agar-agar and then cut longitudinally with a vibratome LeicaVT 1000S into 20-25 µm-thick sections. The median sections were stained with the Wiesner reagents (Sass 1958), which mainly indicates the cinnamaldehyde groups present in lignins (Monties 1980, Vallet *et al.* 1996): fresh sections were left for 3 min in 1%

phloroglucinol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 95% ethanol and mounted in 50% HCl, and observed by standard light microscopy.

DNA constructs

The *PtrAAP11* genomic region from the position 2,000-bp upstream of the translation initiation site to the start of the coding sequence was amplified by PCR using genomic DNA *Populus trichocarpa* *Nisqually-1* (2,000-bp fragment, 5'-AAAAAGCTTAGCAATAAAAACAAATAAAAA-3', 5'-AAAGGATCCGTCGATCAAATTCAGGGGAGG-3'). The promoter fragment was cloned into the *HindIII/BamHI* site of the binary vector pBI101.3 (Jefferson et al., 1987) and sequenced to confirm that no modifications occurred.

Poplar transformation

Agrobacterium-mediated transformation (Leplé et al., 1992) was used to transform poplar (*Populus tremula x alba*, clone Institut National de la Recherche Agronomique no 717 1B-4).

Histochemical localization of GUS activity

For histochemical localization of β -glucuronidase activity, plant material was infiltrated with GUS staining solution containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.1% (v : v) Triton X-100, 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc). Staining was performed for 3-24 h at 37°C. For thin sections, plant material was fixed into the chromic-acetic-formalin fixative, Crafi I (Sass 1958), after staining as described above. Plant material was embedded in 6% agar-agar and then cut longitudinally with a vibratome Leica VT 1000S into 20-25 μ m-thick sections.

Phylogenetic analyses

Amino acid sequences were aligned by CLUSTALW and imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package version 3.1 (Kumar et al., 2004). Phylogenetic analyses were conducted using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1000 replicates. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances.

The accession numbers or gene models of version 1.1 of the *P. trichocarpa* genome used were: AtAAP1 (At1g58360), AtAAP2 (At5g09220), AtAAP3 (At1g77380), AtAAP4 (At5g63850), AtAAP5 (At1g44100), AtAAP6 (At5g49630), AtAAP7 (At5g23810), AtAAP8 (At1g10010), PtrAAP1 (Poptr1_1:202159), PtrAAP2 (Poptr1_1:207199), PtrAAP3 (Poptr1_1:818545), PtrAAP4 (Poptr1_1:595125), PtrAAP5 (Poptr1_1:551420), PtrAAP6 (Poptr1_1:595874), PtrAAP7 (Poptr1_1:551421), PtrAAP8 (Poptr1_1:674664), PtrAAP9 (Poptr1_1:200759), PtrAAP10 (Poptr1_1:582548), PtrAAP11 (Poptr1_1:270039), PtrAAP12 (Poptr1_1:642685), PtrAAP13 (Poptr1_1:285212), PtrAAP14 (Poptr1_1:582546), OsAAP1 (Os07g04180), OsAAP2 (Os06g36180), OsAAP3 (Os12g08090), OsAAP4 (Os12g08130), OsAAP5 (Os12g09320), OsAAP6 (Os02g01210), OsAAP7 (Os04g56470), BnAAP (Q703G1), BnAAP1 (Q7Y077), BnAAP6 (Q7Y076), GmAAP (Q9ARG2), LeAAP1 (Q8GZV4), LeAAP2 (Q8GZV3), LeAAP3 (Q8GZV5), RcAAP1 (O82044), RcAAP3 (Q9ZRS1), StAAP (P93561), VfAAP (Q9ZR62), VfAAP1 (Q93X15), VfAAP3 (Q93X14), VfAAP4 (Q93X13).

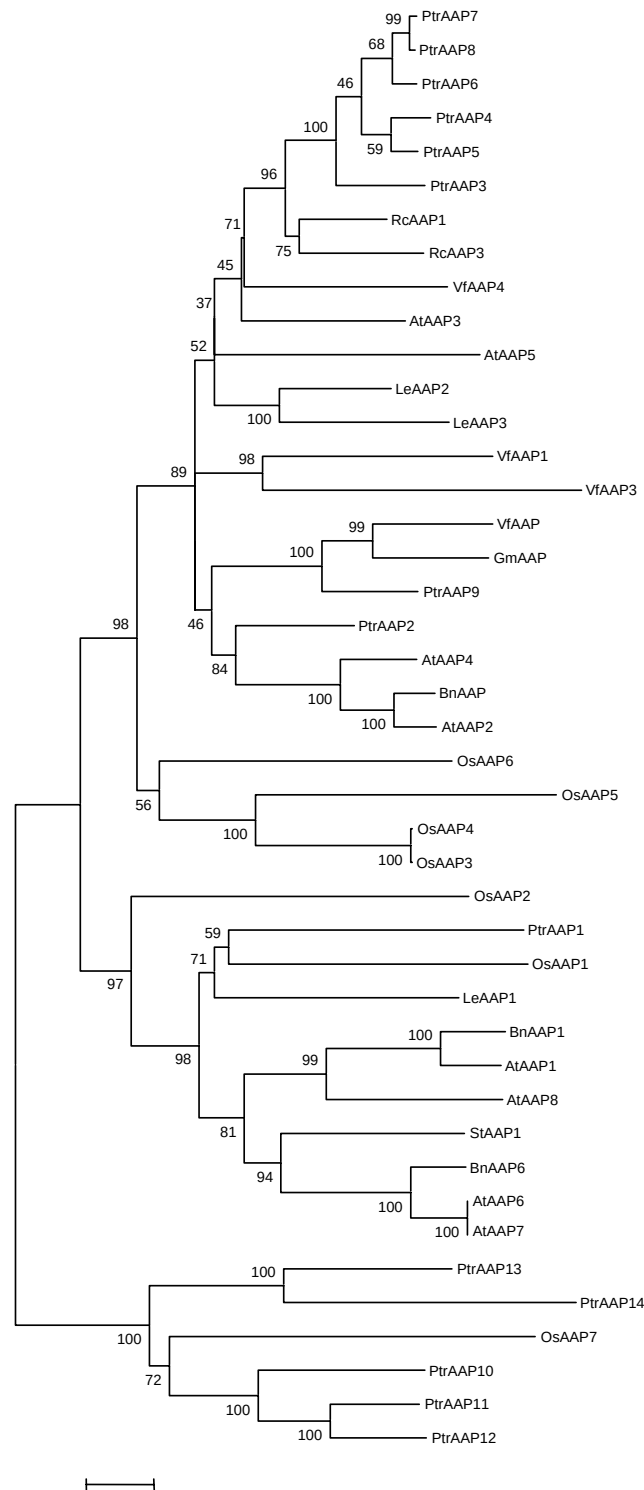


Figure 1. An unrooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the amino acid permease (AAP) family in plants.

The analysis was performed as described in the Materials and Methods section and the tree was generated using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) after sequence alignment. Bootstrap values are indicated (1000 replicates). Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distances. Accession numbers are given in the “Materials and Methods” section.

Results

In silico analysis of the AAP family

The first whole-genome sequence and assembly for a tree species, namely that of *P. trichocarpa* was recently reported (Tuskan et al., 2006). The JGI *P. trichocarpa* gene search mode revealed the existence of 14 AAP gene models. *Populus* thus possesses a higher number of AAP genes than *Arabidopsis* (8 genes) and rice (7 gene models). As suggested by a phylogenetic tree based on protein multiple sequence alignment, AAP family can be divided into three clades (Fig. 1). Interestingly, one clade contains only poplar AAP members (i.e AAP10, AAP11, AAP12, AAP13, AAP14) except OsAAP7. The intron-exon structure of these genes is highly conserved, showing 7 exons of comparable lengths. Analysis of the assembled genome revealed recent whole-genome duplication shared among all modern taxa in Salicaceae. A second, older duplication appears to be shared with the *Arabidopsis* lineage (Tuskan et al., 2006). These duplicated genes originated through very small-scale gene duplications and one relatively recent large-scale gene duplication event (Sterck et al., 2005). A detailed analysis of duplication events for the AAP members revealed that AAP12 and AAP14 derived from a common ancestor through a recent duplication event. It is also worth noting that AAP genes are sporadically distributed across the poplar genome except, AAP10, AAP11 and AAP14 which are located on scaffold 140 whereas AAP5 and AAP7 are located on linkage group (LG) II. The AAP5 locus stretches from position 5482358 to 5484862 while AAP7 locus extends from position 5499759-5501710 on poplar LG II.

Expression analysis of poplar AAP cluster

To investigate expression of AAP10, AAP11, AAP12, AAP13 and AAP14 in poplar, total RNAs were extracted from different tissues. AAP13 transcripts were not detected in any organs examined so far in poplar tissues (Fig. 2). By contrast, the other AAP genes showed

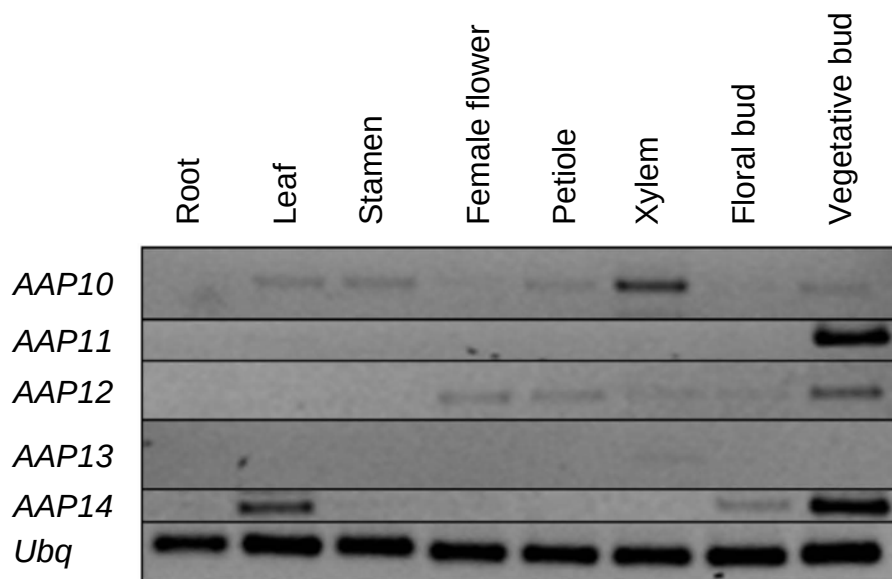


Fig. 2 Tissue-dependent expression of poplar *AAP* cluster.

Expression of *AAP10*, *AAP11*, *AAP12*, *AAP13* and *AAP14* was analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in tissues collected as described by Couturier et al. (2007). Aliquots of 1 µg total RNAs were reverse-transcribed into cDNA. The ubiquitin gene (*Ubq*) was amplified and used as an internal control. Experiments were repeated at least three times, with similar results.

Table 2 *In silico* analyses of *AAP* genes in poplars.

Number of occurrences and tissue localizations of amino acid transporters ESTs retrieved from the EST Genbank database (Altschul *et al.*, 1997). Tissues were classified as follows : C, cambium ; L, leaf ; MR, mycorrhizal root ; Sh, shoot; VT, vascular tissues; X, xylem.

Gene name	Number of occurrences in EST database	EST tissue localization
<i>AAP10</i>	2	2X
<i>AAP11</i>	2	2C
<i>AAP12</i>	3	2L, 1MR
<i>AAP13</i>	2	1 Sh, 1VT
<i>AAP14</i>	6	3L, 3 Sh

contrasting expression patterns. *AAP10* was mostly expressed in xylem and in aerial tissues but at a smaller extent (Fig. 2). *AAP12* transcripts were slightly detected in aerial tissues such as vegetative bud, female flower and petiole (Fig. 2). *AAP14* was strongly expressed in leaf and vegetative bud. *AAP14* transcripts were also detected in flower bud but at a smaller extent (Fig. 2). Interestingly, *AAP11* expression pattern was different compared to other AAP genes of the poplar cluster. Indeed, *AAP11* transcripts were specifically detected in vegetative bud (Fig. 2).

In silico analysis of ESTs

An *in silico* analysis of poplar expressed sequence tags (ESTs) was carried out using the GenBank EST databases, from which 48 ESTs corresponding to AAPs from poplar could be retrieved. Considering the poplar AAP cluster, 15 ESTs were retrieved. *AAP13* transcripts were not detected by RT-PCR, although we found 2 ESTs in shoot and vascular tissues databases. However these studies corresponded to specific conditions that were not tested in the present study. ESTs analysis confirmed the xylem distribution of *AAP10* transcripts and the leaf distribution of *AAP14* transcripts (Fig.2, Table 2). Expressed sequence tags corresponding to *AAP12* were mostly found in leaf and mycorrhizal roots although *AAP12* transcripts were mostly detected in shoot tissues (Fig. 2). Expressed sequence tags corresponding to *AAP11* were only found in EST database from cambium (Table 2).

AAP11 expression during bud development

Considering the striking expression of *AAP11* in vegetative bud, we investigated the impact of bud development on the regulation of *AAP11* transcript levels. Total RNAs and amino acids were extracted from poplar buds sampled during winter and spring, after bud burst. The

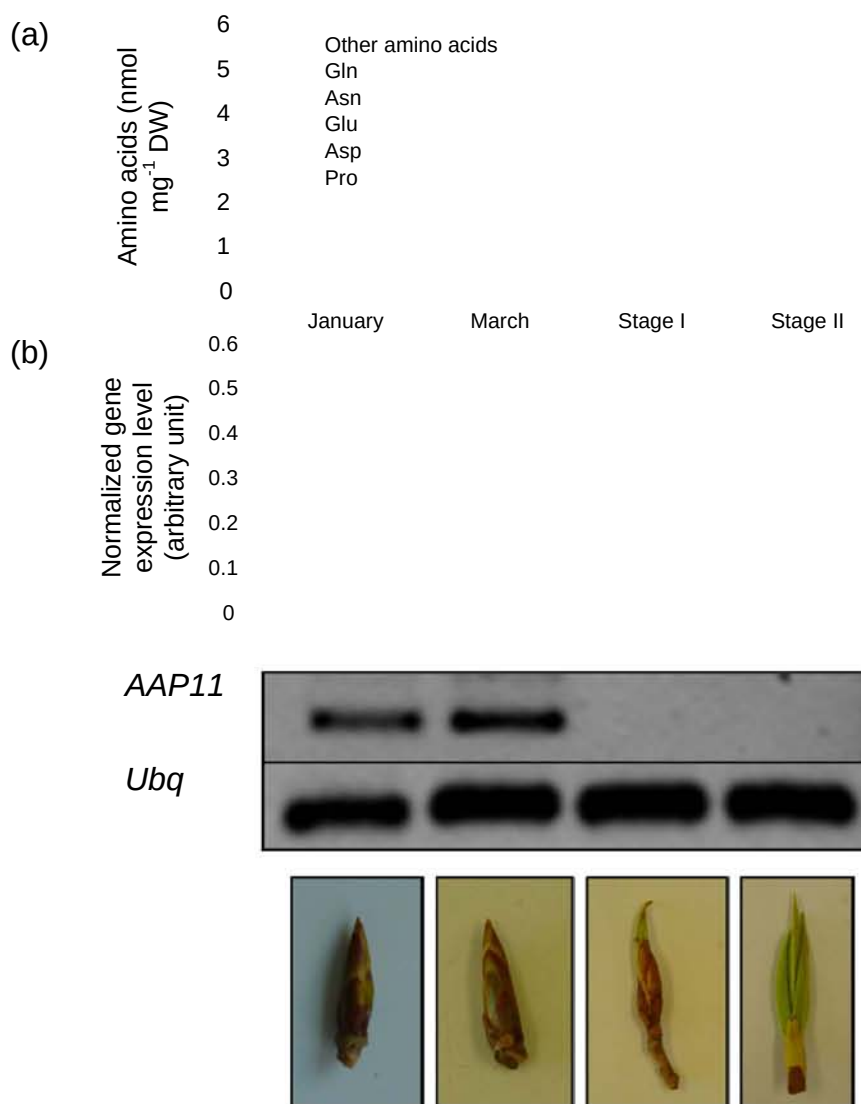


Fig. 3 Specific expression of *AAP11* during bud burst in poplar.

(a) Quantification of amino acids by gas chromatography-mass spectrometry in buds of poplar during winter and bud burst. Total amino acid content increased during bud burst. Asparagine (Asn) was the major amino acid just before bud burst whereas proline (Pro) was the major amino acid at the latest stage. Values are expressed as means $\pm$ SE of three replicate experiments.

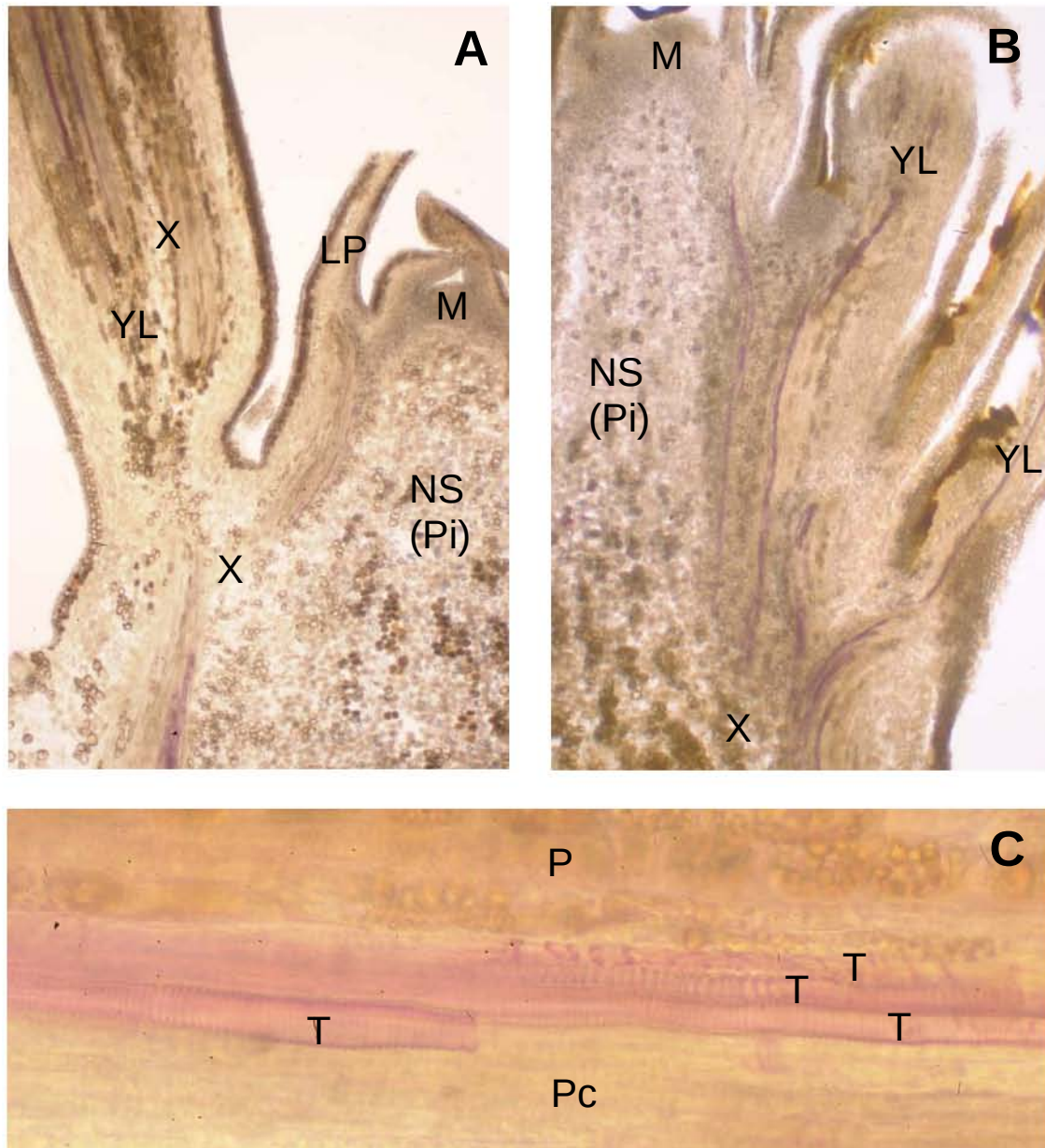
(b) Expression of *AAP11* was analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction in bud during winter and bud burst. Aliquots of 500 ng total RNAs were reverse transcribed into cDNA. The ubiquitin gene (*Ubq*) was amplified and used as an internal control. Signals were normalized to the constitutive expressed poplar ubiquitin gene. Experiments were repeated at least three times, with similar results.

concentration of total amino acids, measured by GC-MS, increased by 27-fold between January and after scales felt (Fig. 3a). Interestingly, qualitative and quantitative changes were detected between the various steps of bud development. In January, serine and glutamate were the predominant amino acids accounting for 32% and 24% respectively. In March, just before bud burst, asparagine was the predominant amino acid accounting for 50% of total amino acid content. During bud burst, asparagine concentration decreased by 3-fold and accounted for 5% of total amino acid content at stage II (Fig. 3a). On the contrary, proline, aspartate, glutamate and glutamine contents increased after bud burst (Fig. 3a). The highest increase was observed for proline content since its concentration increased by 244-fold between January and stage II, accounting for 2.5% and 22% respectively (Fig. 3a).

AAP11 transcripts were solely detected in January and March but not detected after bud burst (Fig. 3b) indicating that *AAP11* may play a role in early steps just before bud burst. *AAP11* expression in vegetative buds was confirmed, as already observed (Fig. 2).

Histology of winter buds

In order to investigate the tissue formation in bud during winter, longitudinal median sections stained with phloroglucinol-HCl of poplar buds sampled in January and March were carried out. Phloroglucinol-HCl underlined the presence of lignin and enabled to detect the presence of xylem elements. In January, the phloroglucinol-HCl positively reactive tissue, i.e. xylem, present as long strands at the base of the next shoot and in the young leaves, but absent in the leaf primordia and the neighbourhood of the shoot apical meristem (Fig. 4a). In March, several strands of phloroglucinol-HCl positively reactive tissue found in the newly elongated next shoot and young leaves, but still absent in the neighbourhood of the shoot apical meristem (Fig. 4b). Detail of a phloroglucinol-HCl positively reactive strand of the young leaf



1bar = 0,05 mm = 50 μ m

Fig. 4 Views of the heart of poplar buds sampled in January (a) and March (b) and detail of the primary xylem (c), longitudinal median sections stained with phloroglucinol-HCl.

(a) In January, the phloroglucinol-HCl positively reactive tissue, i.e. xylem (X), present as long strands at the base of the next shoot (NS) and in the young leaves (YL), but absent in the leaf primordia (LP) and the neighbourhood of the shoot apical meristem (M).

(b) In March, several strands of phloroglucinol-HCl positively reactive tissue found in the newly elongated next shoot and young leaves, but still absent in the neighbourhood of the shoot apical meristem.

(c) Detail of a phloroglucinol-HCl positively reactive strand of the young leaf observed in A showing four tracheids (T) typical of the primary xylem, with annular secondary walls next to the pith (Pi) and helical secondary wall next to the procambium (Pc).

observed in January showed tracheids typical of the primary xylem, with annular secondary walls next to the pith and helical secondary wall next to the procambium (Fig. 4c). In the same time, it can be observed that buds swelled between January and March. In winter buds, protoxylem was formed before bud burst.

Histochemical analysis of AAP11 expression

To study the tissue specificity of *AAP11* expression throughout plant development, 5' upstream region was isolated and fused to the *Escherichia coli* β -glucuronidase (GUS; *uidA*) gene. Poplar was transformed and 10 independent transgenic lines were analyzed for reporter gene activity. GUS activity was initially analyzed in leaves, stems and roots for independent lines which showed very similar patterns of expression, varying only in the intensity of GUS staining. Three representative lines were used to determine the expression pattern in more details. Transgenic plants expressing the *uidA* gene under the control of *Gal1* promoter showed strong reporter gene activity in the apical region of stem (Fig. 5a). Cross-sections through apical area of stems showed that GUS activity is confined to protoxylem cells (Fig. 5b).

Discussion

An extended AAP family in the poplar genome

Using molecular phylogeny, amino acid transporters have been grouped in two superfamilies, the ATF and APC superfamilies (Wipf et al., 2002a). The AAP family belonging to ATF superfamily is the best studied subfamily particularly in *Arabidopsis*. Analysis of genomes of rice and *Arabidopsis* revealed the presence of seven and eight *AAP* genes, respectively. In the poplar genome, 14 *AAP* genes were identified and five genes were grouped into a specific

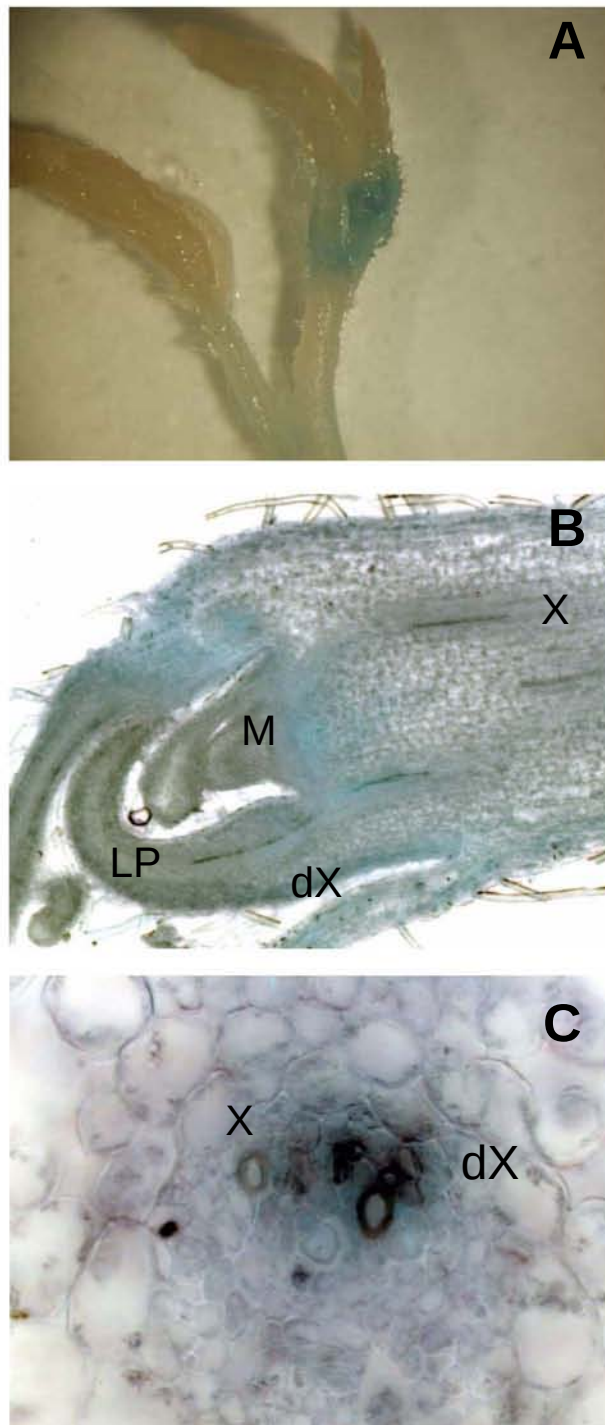


Fig. 5 Histochemical analyses of *AAP11* promoter-*GUS* fusions.

Expression of *GUS* under control of the *AAP11* promoter in 3-week olds in vitro plants.

(a) *AAP11-GUS* expression is restricted to the apical area of stem.

(b) Longitudinal median section show a high *AAP11-GUS* expression in differentiating xylem cells (dX) and meristem cells (M). *AAP11-GUS* expression is not detected in leaf primordium (LP) and differentiated xylem (X).

(c) *AAP11-GUS* expression is restricted to differentiating protoxylem cells (dX) and not detected in differentiated xylem (X).

cluster without *Arabidopsis* orthologs and only one rice ortholog (Fig. 1). Taken with caution, a comparison of the number of AAP genes in different species might suggest that plant species from different environments or with different life style organize amino acid transport with a fairly unequal number of amino acid transporters. In poplar, *AAP10*, *AAP11*, *AAP12*, *AAP13* and *AAP14* showed contrasting expression patterns and were mostly expressed in aerial tissues. Interestingly, *AAP11*, *AAP12* and *AAP14* transcripts were detected in vegetative buds with *AAP11* expression restricted to vegetative buds suggesting a specific role of *AAP11* in these tissues.

Protoxylem-specific expression of *AAP11*

Xylem plays an important role in strengthening plant bodies as well as in transporting water and minerals. It is a complex tissue composed of vessels, tracheids, fibres and parenchyma. Xylem vessels, a conductive component of the vascular tissues in plants, are found throughout the plant body. To colonize the land, plants have evolutionarily developed different types of xylem vessels that function in the long-distance transport of water, various nutrients, and signaling molecules throughout their life (Raven et al. 1999). Two types of vessels mature in characteristic positions within protoxylem and metaxylem of the primary xylem tissue that differentiates from the procambium during the early ontogeny of a plant. The protoxylem vessels, which commonly have annular and spiral thickenings, mature before the surrounding organs have elongated. These are frequently destroyed by the extension of the surrounding tissues. The metaxylem vessels, which usually have reticulate and pitted thickenings, mature after the surrounding organs complete their growth. In contrast to protoxylem vessels, they are not destroyed, and constitute the water-conducting tubes of the mature plant (Esau, 1977).

RT-PCR analyses indicated that *AAP11* expression was restricted to vegetative buds (Fig. 2) and particularly before bud burst since *AAP11* transcript levels were undetected after bud

burst (Fig. 3b). Moreover, GUS activity under control of *AAP11* promoter showed expression restricted to protoxylem cells of shoot apex (Fig. 5). On the other hand, protoxylem formation occurred in vegetative buds during winter, just before bud burst (Fig. 4). The same observation has been also made in *Picea abies* buds (De Faÿ et al., 2000). It has been suggested that protoxylem was formed prior to bud burst and was functional shortly before the start of bud outgrowth. These authors have also demonstrated that differentiation of conducting elements in developing embryonic shoots was essential to bud burst and that bud burst occurred as a result of the functioning of protoxylem which permits the mass hydration of embryonic shoots and therefore rapid elongation (De Faÿ et al., 2000).

Physiological role of AAP11

We have demonstrated that AAP11 was specifically expressed in protoxylem cells, particularly in young tissues. *Arabidopsis* AAP family has been characterized extensively by heterologous expression in yeast and *Xenopus* oocytes (Boorer and Fischer, 1997; Boorer et al., 1996; Fischer et al., 1995, 2002; Okumoto et al., 2002). AAPs transport a broad spectrum of amino acids and their apparent K_m values indicate that they are low-affinity system except AtAAP6 which has been characterized to transport acidic and neutral amino acids with a much higher affinity than other AtAAP analyzed (Fischer et al., 2002).

Subcellular localization has been determined for two members of the AAP family, AtAAP1 and AtAAP3. AtAAP1 was shown to be localized in plasma membrane of the root epidermis and in the outer cell layer of the root cap, suggesting that AtAAP1 facilitates uptake of amino acids into root cells for transfer of amino acids to the vasculature (Lee et al., 2007). AtAAP3 was shown to be localized in the nuclear membrane, in organelle-like structures, and the plasma membrane, suggesting trafficking or cycling of the transporter (Okumoto et al., 2004).

In this way, AAP11 might have an important and specific role in protoxylem cells development and differentiation.

Acknowledgements

J.C. was supported by a PhD fellowship from the “Ministère délégué à l’Enseignement supérieur et à la Recherche”. Aude Migeon and Frédéric Guinet are gratefully acknowledged for the help in sampling buds of poplar and technical assistance.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Bollmark L, Sennerby-Forsse L, Ericsson T. 1999.** Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting-derived *Salix viminalis* plants. *Canadian Journal of Forest Research* **29**: 85-94
- Boorer KJ, Fischer WN. 1997.** Specificity and stoichiometry of the *Arabidopsis* H⁺/amino acid transporter AAP5. *J. Biol. Chem.* **29**: 13040–13046.
- Boorer KJ, Frommer WB, Bush DR, Loo DDF, Wright EM. 1996.** Kinetics and specificity of a H⁺/amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **29**: 2213–2220.
- Coleman GD, Chen TH, Ernst SG, Fuchigami L. 1991.** Photoperiod Control of Poplar Bark Storage Protein Accumulation. *Plant Physiol.* **96**: 686-692.
- Coruzzi GM, Zhou L. 2001.** Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current Opinion Plant Biology* **4**: 247-53.
- Couturier J, Montanini B, Martin F, Brun A, Blaudez D, Chalot M. 2007.** The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* **174**: 137-150.
- De Faÿ E, Vacher V, Humbert F. 2000.** Water-related phenomena in winter buds and twigs of *Picea abies* L. (Karst.) until Bud-burst: A biological, histological and NMR study. *Annals of Botany* **86**: 1097-1107.
- Fischer WN, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitzkreuz K, Frommer WB. 1998.** Plant amino acid transport. *Trends Plant Sci.* **29**: 188–195.
- Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB. 1995.** Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **29**: 16315–16320.
- Fischer WN, Loo DD, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM, Frommer WB. 2002.** Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant Journal* **29**: 717-731.
- Fischer WN, Loo DD, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM, Frommer WB. 2002.** Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J.* **29**: 717-731.
- Frak E, Millard P, Le Roux X, Guillaumie S, Wendler R. 2002.** Coupling sap flow velocity and amino acid concentrations as an alternative method to ¹⁵N labeling for quantifying nitrogen remobilization by walnut trees. *Plant Physiology* **130**: 1043-1053.
- Grassi G, Millard P, Wendler R, Minotta G, Tagliavini M. 2002.** Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1689-1699.

Hirner B, Fischer WN, Rentsch D, Kwart M, Frommer WB. 1998. Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **14**: 535-544.

Javelle A, Morel M, Rodriguez-Pastrana BR, Botton B, Andre B, Marini AM, Brun A, Chalot M. 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* **47**: 411-430.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**: 3901-3907.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**: 150-163.

Lee YH, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber APM, Tegeder M. 2007. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **50**: 305-319.

Leple JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L. 1992. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* **11**: 137-141.

Liu X, Bush DR. 2006. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* **30**:113-120.

Malaguti D, Millard P, Wendler R, Hepburn A, Tagliavini M. 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *J Exp Bot.* **52**: 1665-1671.

Millard P, Wendler R, Grassi G, Grelet GA, Tagliavini M. 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiology* **26**: 527-536.

Millard P, Wendler R, Hepburn A, Smith A. 1998. Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant, Cell and Environment* **21**: 715-722.

Millard P. 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **159**: 1-10.

Monties B. 1980. Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés; Paris: Bordas.

Okumoto S, Koch W, Tegeder M, Fischer WN, Biehl A, Leister D, Stierhof YD, Frommer WB. 2004. Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *J Exp Bot.* **55**: 2155-2168.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W. 2002. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* **277**: 45338-45346.

Ortiz-Lopez A, Chang HC, Bush DR. 2000. Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1465**: 275-280.

Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D. 2005. The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**: 404-408.

Sass JE. 1958. Botanical microtechnique. Third edition. Ames, Iowa: The Iowa State University Press.

Sauter JJ, van Cleve B. 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of *Populus x canadensis* and its relation to protein body remobilisation. *Trees* **7**: 26-32.

Schmidt R, Stransky H, Koch W. 2007. The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* In press.

Su YH, Frommer WB, Ludewig U. 2004. Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **136**: 3104-3113.

Tillemans V, Dispa L, Remacle C, Collinge M, Motte P. 2005. Functional distribution and dynamics of *Arabidopsis* SR splicing factors in living plant cells. *Plant Journal* **41**: 567-582.

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604.

Vallet C, Chabbert B, Czaninski Y, Monties B. 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany* **78**: 625-632.

Wipf D, Benjdia M, Tegeder M, Frommer WB. 2002b. Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Letters* **528**: 119-124.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. 2002a. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci.* **27**: 139-147.

Section 4 - Conclusions générales et perspectives

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit visait à mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place par le peuplier pour faire face aux contraintes environnementales, notamment en ce qui concerne la disponibilité en ressources azotées. L'objectif général était de mettre en évidence les mécanismes moléculaires permettant l'absorption et le transfert de l'azote organique et inorganique entre les différents organes chez le peuplier.

1- La première partie a consisté à identifier les gènes putatifs impliqués dans le transport de composés azotés mais également dans l'assimilation de l'azote inorganique.

Publication 1 : The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) (Tuskan et al., 2006 Science 313 (5793) p1596-1604).

Le peuplier est le premier arbre pour lequel le séquençage et l'assemblage du génome ont été réalisés. Ce travail a permis d'identifier environ 45 000 gènes putatifs répartis sur 19 groupes de liaison. L'analyse du génome assemblé a également mis en évidence un évènement de duplication entière du génome, à l'issue duquel environ 8 000 paires de gènes dupliqués ont été conservées dans le génome du peuplier. Un second évènement de duplication plus ancien, coïncide avec la divergence entre *Populus* et *Arabidopsis*. Le peuplier présente un nombre de gènes codant des protéines plus important qu'*Arabidopsis*, avec en moyenne 1,4 à 1,6 homologues putatifs présents chez le peuplier pour chaque gène chez *Arabidopsis*. Les exceptions surreprésentées chez le peuplier incluent des gènes associés avec la biosynthèse de la paroi ligno-cellulosique, le développement du méristème, la résistance aux maladies ainsi que le transport des métabolites. En ce qui concerne les gènes reliés aux mécanismes de transport, environ 1800 gènes ont été répertoriés dans le génome du peuplier. Cela représente un peu moins du double du nombre de gènes présents chez *A. thaliana*. Néanmoins, une étude détaillée des différentes familles révèle l'extension de certaines d'entre elles chez le peuplier. En ce qui concerne les familles de transporteurs de composés azotés, on constate que le peuplier possède plus du double de gènes pour la famille des transporteurs d'ammonium (AMT) mais également les deux superfamilles principales de transporteurs d'acides aminés (ATF et APC). Une fois répertoriée, un travail plus approfondi d'analyse *in silico* de l'expression des différents gènes d'intérêt via les banques d'ESTs disponibles a été entrepris et a permis de mieux cerner les conditions expérimentales à utiliser pour la caractérisation de chacun de ces gènes. En outre il serait également intéressant de poursuivre ces études plus

approfondies sur d'autres familles de transporteurs de composés azotés mais aussi certaines familles de gènes candidats impliqués dans le métabolisme azoté plus généralement.

2- La deuxième partie de mon travail consistait à caractériser les membres de la famille des transporteurs d'ammonium impliqués dans l'absorption et le transport de l'ammonium chez le peuplier.

Publication 2 : The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant (Couturier et al., 2007 New Phytologist 174 (1) p137-150).

Des analyses phylogénétiques révèlent que chez le peuplier, la famille de transporteurs d'ammonium (AMT) est constituée de 14 gènes, contre 6 chez *Arabidopsis* et 10 chez le riz. L'analyse des différents motifs d'expression de chaque membre *AMT* dans les différents organes de peuplier révèle que certains transporteurs peuvent être plus ou moins spécifiques d'un tissu particulier. Par exemple *AMT1;2* est uniquement exprimé au niveau des racines, *AMT1;5* est fortement exprimé dans les étamines et *AMT3;1* est uniquement exprimé dans les feuilles sénescentes. D'autre part, il a aussi été démontré qu'un événement de duplication a abouti dans le cas de *AMT2;1* et *AMT2;2* à une spécialisation tissulaire. Ainsi, pris dans leur ensemble, les transporteurs d'ammonium sont présents dans la majorité des tissus testés. Cette étude permet d'émettre l'hypothèse que de multiples gènes *AMT*, présentant des motifs différents d'expression et de régulation, permettent à la plante de répondre efficacement à des conditions nutritionnelles environnementales variables. D'autre part, cette étude a également mis en évidence des caractéristiques propres au style de vie pérenne du peuplier, comme la remobilisation de l'ammonium au cours de la sénescence et au sein de la symbiose ectomycorhizienne.

L'étude de la spécificité cellulaire ainsi que la caractérisation biochimique des différents membres *AMT* présents chez le peuplier pourrait permettre d'assigner un rôle particulier à chacun et de mieux cerner le rôle du transfert de l'ammonium dans le style de vie pérenne du peuplier, notamment lors de la sénescence automnale. Ceci concerne en premier lieu *AMT3;1* qui est exprimé uniquement au cours de la sénescence foliaire mais également *AMT1;5* et *AMT1;6* tous deux surexprimés au cours de ce même processus.

3- La troisième partie de mon travail était d'étudier la sénescence automnale du peuplier en conditions naturelles, en se focalisant plus particulièrement sur les flux d'acides aminés entre les feuilles et les organes pérennes comme les tiges et les protéines potentiellement impliquées dans ces flux.

Publication 3 : Nitrogen in senescing leaves of poplar (Couturier et al., en préparation)

L'analyse des teneurs en acides aminés dans le limbe, le pétiole et la tige au cours de la sénescence automnale a permis de montrer une remobilisation de l'azote des feuilles vers les organes pérennes du peuplier. Les acides aminés riches en azote, tels que la glutamine, sont transportés, via le phloème, des feuilles sénescentes vers les organes pérennes, tels que les tiges, où ils sont utilisés pour la synthèse de protéines de réserve. Cette étude montre une forte accumulation d'arginine au niveau des tiges au cours de l'automne et au début de l'hiver. Conjointement, des analyses d'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse de l'arginine laissent supposer que la synthèse d'arginine a préférentiellement lieu au niveau des tiges. D'autre part l'arginine serait également préférentiellement synthétisée à partir du carbamoyl-phosphate, dérivant lui-même de la glutamine issue de la remobilisation de l'azote au niveau des feuilles. Parallèlement, des analyses d'expression de transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) pouvant prendre en charge l'arginine ont montré que ces différents transporteurs présentent des modalités d'expression variables au cours de la sénescence. Certains transporteurs pourraient être impliqués dans la remobilisation automnale de l'azote. Par exemple, au niveau des tiges, l'expression de *CAT11* est sujette à de fortes variations qui pourraient être reliées aux teneurs en acides aminés et notamment aux teneurs en arginine. Les perspectives de ce travail s'orientent vers la caractérisation biochimique des transporteurs CAT pouvant être impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence automnale. D'autre part, la localisation plus fine de la synthèse de l'arginine accumulée au cours de l'automne et au début de l'hiver sera d'un grand intérêt afin de mieux appréhender les mécanismes dans la remobilisation automnale chez le peuplier.

4- La quatrième partie de mon travail, en relation avec la précédente, était d'étudier la remobilisation printanière de l'azote au travers de l'un des phénomènes les plus visibles de cette remobilisation, le débourrement des bourgeons. Ce travail s'est notamment attaché à caractériser un transporteur putatif d'acides aminés principalement exprimé au niveau du bourgeon.

Publication 4 : Specific expression of a putative amino acid transporter in protoxylem cells of poplar (Couturier et al., en préparation)

Des analyses phylogénétiques révèlent que chez le peuplier, la famille AAP de transporteurs d'acides aminés est constituée de 14 gènes, contre 8 chez *Arabidopsis* et 7 chez le riz. D'autre part, ces analyses révèlent également un sous groupe phylogénétique constitué uniquement de 5 membres AAP du peuplier et un membre AAP du riz. Des études d'expression par RT-PCR montrent qu'un membre de ce sous groupe, *AAP11*, est uniquement exprimé au niveau du bourgeon végétatif. Des analyses complémentaires ont permis d'affiner cette observation et montrent que ce gène est exprimé au cours de l'hiver, avant le débourrement printanier. Parallèlement, des études histologiques révèlent que le xylème est progressivement formé au cours de l'hiver au niveau des bourgeons. De plus des analyses d'expression par fusion promoteur-gène rapporteur *GUS* démontrent une expression spécifique du gène *AAP11* au niveau des cellules du protoxylème de l'apex des tiges. Au niveau du bourgeon, l'expression du gène *AAP11* est donc reliée à la mise en place des cellules du protoxylème au cours de l'hiver. D'autre part, ces travaux ont également montré qu'au cours de l'hiver et du débourrement, les teneurs en acides aminés du bourgeon augmentent fortement, notamment les teneurs en proline, glutamine et glutamate. Cette variation de la teneur en acides aminés reflète la remobilisation printanière de l'azote. Les perspectives de ce travail sont multiples, notamment en ce qui concerne la caractérisation des propriétés biochimiques et de la localisation subcellulaire de *AAP11*. Cette étude fournit également les bases des phénomènes de remobilisation de l'azote au printemps au niveau des bourgeons. De futurs travaux portant sur la caractérisation des protéines responsables de la forte augmentation des taux d'acides aminés au cours de l'hiver et du débourrement permettront de mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène très important chez les espèces pérennes.

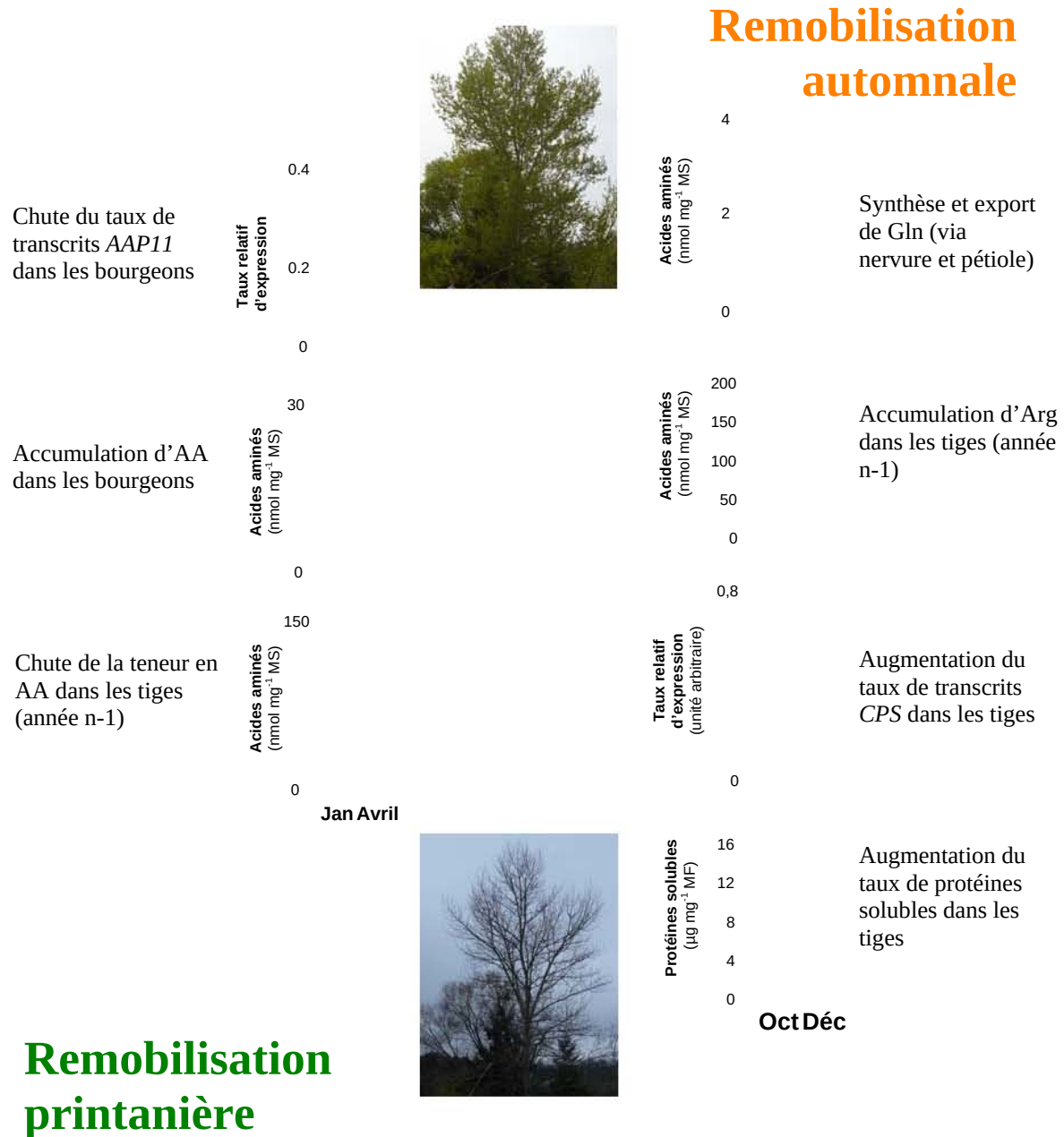


Figure 49 : Conclusions sur les phénomènes de remobilisation de l'azote chez le peuplier au cours de l'automne et du printemps.

L'ensemble des différentes études entreprises au cours de ce travail de thèse visait à étudier certains mécanismes de transport impliqués dans l'absorption et la remobilisation de certaines sources d'azote, l'ammonium et les acides aminés, chez le peuplier. Des travaux approfondis ont ainsi permis de mettre en évidence différents rôles des transporteurs d'ammonium dans la physiologie du peuplier, notamment dans la symbiose mycorhizienne et la sénescence automnale. Ces travaux constituent également une base de travail en vue de caractériser chaque membre et d'assigner un rôle particulier à chacun dans la physiologie du peuplier. Concernant les familles de transporteurs d'acides aminés, les études entreprises se sont plutôt focalisées sur certains membres pouvant avoir un rôle particulier dans les phénomènes de remobilisation de l'azote au cours de l'automne et du printemps. Néanmoins la caractérisation des familles de transporteurs d'acides aminés du peuplier reste parcellaire, principalement dûe au grand nombre de gènes modèles recensés lors de l'annotation du génome du peuplier. De futures études sont donc nécessaires afin de poursuivre la caractérisation de ces familles de transporteurs d'acides aminés qui semblent jouer des rôles importants lors des phénomènes de remobilisation de l'azote, phénomènes fondamentaux du style de vie pérenne des arbres. Les différentes études entreprises ont mis en évidence la synthèse et l'export de glutamine des feuilles sénescentes vers les organes pérennes et particulièrement les tiges, où il y a accumulation d'arginine au cours de l'automne et au début de l'hiver. Parallèlement, le taux de transcrits du gène codant la CPS, enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'arginine, augmente au cours de l'automne et au début de l'hiver au niveau des tiges (Figure 49). Au printemps, la remobilisation de l'azote se manifeste notamment par une augmentation de la teneur en acides aminés au niveau des organes en croissance comme les bourgeons par exemple. Dans le même temps, le taux de transcrits du gène AAP11, chute, ce gène étant uniquement exprimé avant le débourrement des bourgeons (Figure 49). Outre les perspectives immédiates visant à poursuivre les études déjà engagées (caractérisation biochimique et subcellulaire de AAP11, rôle du gène *AMT3;1* dans les feuilles sénescentes) des perspectives plus globales existent, en particulier sur les relations acides aminés/protéines de stockage, mais également sur les systèmes de transport des acides aminés entre organes pérennes et organes en développement (Figure 50).

L'azote est un des éléments limitant la croissance des arbres et par conséquent la productivité forestière. L'azote est essentiel pour l'utilisation du carbone, la croissance et le développement des racines, ainsi que pour le transport d'autres nutriments entre les différents organes des plantes. L'application de fertilisants azotés est une des approches utilisées pour augmenter la croissance et la production des plantations forestières. Toutefois, les

Remobilisation automnale



Lieu de synthèse et les
systèmes de transport pour
l'arginine

Systèmes de transport impliqués
dans le transfert des acides
aminés entre organes pérennes et
tissus en développement

Rôle du transporteur AMT3;1

Caractérisation fonctionnelle et
localisation subcellulaire du
transporteur AAP11

Relations acides
aminés/protéines de stockage

Remobilisation printanière



Figure 50 : Principales perspectives concernant les phénomènes de remobilisation de l'azote chez le peuplier au cours de l'automne et du printemps.

phénomènes de remobilisation de l'azote chez les arbres constituent une stratégie efficace pour l'économie et une meilleure utilisation des ressources azotées. Les différents travaux effectués au cours de mon travail de thèse s'inscrivent dans des études plus globales visant à mieux comprendre les mécanismes utilisés par le peuplier pour absorber mais également transférer les principaux éléments azotés nécessaires à sa croissance et son développement. Ainsi, une meilleure compréhension de ces différents mécanismes pourrait aider à mieux appréhender les transferts d'azote de l'arbre et à plus long terme augmenter la productivité d'une des essences les plus cultivées en France.

Section 5 - Références bibliographiques

Accardi A, Miller C (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* 427: 803-807.

Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Journal of Neurochemistry* 74: 2622-2625.

Altschul SF, Boguski MS, Gish W, Wootton JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics* 6: 119-129.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

Andrade SL, Dickmanns A, Ficner R, Einsle O (2005) Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14994-14999.

Atkins CA (2000) Biochemical aspects of assimilate transfers along the phloem path: N-solutes in lupins. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 531-537.

Attiwill PM, Adams MA (1993) Nutrient cycling in forests. *New Phytologist* 124: 561-582.

Avice JC, Le Dily F, Goulas E, Noquet C, Meuriot F, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP, Ourry A (2003) Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: Roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* 81: 1198-1212.

Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist* 149: 4-8.

Becker D, Stanke R, Fendrik I, Frommer WB, Vanderleyden J, Kaiser WM, Hedrich R (2002) Expression of the NH₄⁺ transporter gene *LeAMT1;2* is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. *Planta* 215: 424-429.

Becking JH (1956) On the mechanism of ammonium uptake by maize roots. *Acta Botanica Neerlandica* 5: 2-79.

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 29: 948-950.

Berger S, Bell E, Sadka A, Mullet JE (1995) *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology* 27: 933-942.

Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, Chalot M (2003) Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *The Plant Cell* 15: 2911-2928.

Bloom AJ, Jackson LE, Smart DR (1993) Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant, Cell and Environment* 16: 199-206.

Bollmark L, Sennerby-Forsse L, Ericsson T (1999) Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting-derived *Salix viminalis* plants. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 85-94.

Boorer KJ, Fischer WN (1997) Specificity and stoichiometry of the *Arabidopsis* H⁺/amino acid transporter AAP5. *Journal of Biological Chemistry* 272: 13040–13046.

Boorer KJ, Frommer WB, Bush DR, Loo DDF, Wright EM (1995) Kinetics and specificity of a H⁺/amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 2213–2220.

Botella MA, Cerda A, Martinez V, Lips SH (1994) Nitrate and ammonium uptake by wheat seedlings as affected by salinity and light. *Journal of Plant Nutrition* 17: 839-850.

Bouche N, Fromm H (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* 9: 110-115.

Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R (2000) Emerging model system in plant biology : Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 306-313.

Britto DT, Glass ADM, Kronzucker HJ, Yaeesh Siddiqi M (2001) Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of NH₄⁺/NH₃. An evaluation of recent proposals. *Plant Physiology* 125: 523-526.

Brugiere N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel BR (2000) Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* 211: 519-527.

Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 9: 49-56.

Busch W, Saier MH Jr (2002) The transporter classification (TC) system. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* 37: 287-337.

Bush DR (1993) Proton coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29: 513–542.

Canovas FM, Avila C, Canton FR, Canas RA, de la Torre F (2007) Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* 58: 2307-2318.

Catoni E, Desimone M, Hilpert M, Wipf D, Kunze R, Schneider A, Flugge UI, Schumacher K, Frommer WB (2003) Expression pattern of a nuclear encoded mitochondrial arginine-ornithine translocator gene from *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 7;3:1.

Cerezo M, Tillard P, Gojon A, Primo-Millo E, García-Agustín P (2001) Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta* 214: 97-105.

Chalot M, Blaudez D, Brun A (2006) Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* 11: 263-266.

Chalot M, Brun A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 21-44.

Chang HC, Bush DR (1997) Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters. *Journal of Biological Chemistry* 272:30552-30557.

Chapin III FS, Moilanen L, Kielland K (1993) Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* 361: 150-153.

Chapin III FS, Schulze ED, Mooney HA (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423-447.

Chen L, Bush DR (1997) LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 29: 1127-1134.

Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A, Bush DR (2001) ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 1813-1820.

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127: 1550-1557.

Choi WJ, Chang SX, Hao X (2005) Soil retention, tree uptake, and tree resorption of $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ and $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ applied to trembling and hybrid aspens at planting. *Canadian Journal of Forest Research* 35: 823-831.

Clarkson DT, Lüttge U (1991) II. Mineral nutrition: inductible and repressible nutrient transport systems. *Progress in Botany* 52: 61-83.

Clarkson DT, Gojon A, Saker LR, Wiersema PK, Purves JV, Tillard P, Arnold GM, Paans AJM, Vaalburg W, Stulen I (1996) Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: Direct comparison of ^{13}N and ^{15}N tracing. *Plant, Cell and Environment* 19: 859-868.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.

Cooke JE, Weih M (2005) Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* 167:19-30.

Coruzzi GM, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 247-253.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188–1190.

D'Apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, El Alaoui H, Barbulova A, Betti M, Dimou M, Katinakis P, Marquez A, Marini AM, Udvardi MK, Chiurazzi M (2004) Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. *Plant Physiology* 134: 1763-1774.

Day DA, Udvardi MK (1992) Metabolite exchange across symbiosome membranes. *Symbiosis* 14: 175-189.

DesRochers A, Van Den Driessche R, Thomas BR (2003) Nitrogen fertilization of trembling aspen seedlings grown on soils of different pH. *Canadian Journal of Forest Research* 33: 552-560.

DesRochers A, van den Driessche R, Thomas BR (2006) NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. *Forest Ecology and Management* 232: 216-225.

DeWald DB, Mason HS, Mullet JE (1992) The soybean vegetative storage proteins VSP α and VSP β are acid phosphatases active on polyphosphates. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15958-15964.

Dyckmans J, Flessa H (2001) Influence of tree internal N status on uptake and translocation of C and N in beech: A dual ^{13}C and ^{15}N labeling approach. *Tree Physiology* 21: 395-401.

Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. *Biology of Populus*. Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, et Hinckley TM. (Eds) NRC Research Press: 7-32.

Fischer WN, AndréB, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitzkreuz K, Frommer WB (1998) Plant amino acid transport. *Trends in Plant Science* 29: 188–195.

Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB (1995) Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 29: 16315–16320.

Fischer WN, Loo DDF, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright, EM, Frommer WB (2002) Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *The Plant Journal* 29: 717-731.

Fisk MC, Schmidt SK (1996) Microbial responses to nitrogen additions in alpine tundra soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 751-755.

Frommer WB, Hummel S, Reismeier JW (1993) Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 29: 5944–5948.

Frommer WB, Hummel S, Unseld M, Ninnemann O (1995) Seed and vascular expression of a high affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 29: 12036–12040.

Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wiren N (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. The Plant Cell 11: 937-948.

Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B (1997) Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 160: 239-251.

Geßler A, Kopriva S, Rennenberg H (2004) Regulation of nitrate uptake at the whole-tree level: interaction between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. Tree Physiology 24: 1313-1321.

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Research 20: 1425.

Glass ADM, Siddiqi MY (1995) Nitrogen absorption by plant root, In Srivastava H.S. and Singh RP. Nitrogen in higher plant. Associated Pub. Co., New Dehli, pp. 21-56.

Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology 20: 1203–1207.

Glenn AR, Dilworth MJ (1984) Methylamine and ammonium transport systems in *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. Journal of General Microbiology 130: 1961-1968.

Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature 435: 819-823.

Grallath S, Weimar T, Meyer A, Gummy C, Suter-Grotemeyer M, Neuhaus JM, Rentsch D (2005) The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. Plant Physiology 137: 117-126.

Grassi G, Millard P, Wendler R, Minotta G, Tagliavini M (2002) Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. Plant, Cell and Environment 25: 1689-1699.

Guo MG 2004 Molecular and genomic analysis of nitrogen regulation of amino acid permease I (AAP1) in *Arabidopsis*. PhD dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA.

Hammes UZ, Nielsen E, Honaas LA, Taylor CG, Schachtman DP (2006) AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in *Arabidopsis*. The Plant Journal 48: 414-426.

Hawkins S, Leplé JC, Cornu D, Jouanin L, Pilate G (2003) Stability of transgene expression in poplar : A model of forest tree species. *Annals of Forest Science* 60: 427-438.

Haynes RJ (1986) Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. *Mineral Nitrogen in the Plant-soil System* ed. London: Academic Press: 303-378.

Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W (2006) *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *The Plant Cell* 18: 1931-1946.

Hirner B, Fischer WN, Rentsch D, Kwart M, Frommer WB (1998) Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 14: 535-544.

Hobbie EA, Colpaert JV (2003) Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants. *New Phytologist* 157: 115-126.

Hofmann K, Stoffel W (1992) PROFILEGRAPH: an interactive graphical tool for protein sequence analysis. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 331-337.

Hörtensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53: 927-937.

Howitt SM, Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 152-170.

Howitt SM, Udvardi MK, Day DA, Gresshoff PM (1986) Ammonia transport in free-living and symbiotic *Rhizobium* sp. ANU289. *Journal of General Microbiology* 132: 257-261.

Hoyos ME, Palmieri L, Wertin T, Arrigoni R, Polacco JC, Palmieri F (2003) Identification of a mitochondrial transporter for basic amino acids in *Arabidopsis thaliana* by functional reconstitution into liposomes and complementation in yeast. *The Plant Journal* 33: 1027-1035.

Hsu LC, Chiou TJ, Chen L, Bush DR (1993) Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7441-7445.

Ireland RJ, Lea PJ (1999) *Plant Amino Acids*. B.J. Singh ed, Marcel Dekker, New York, pp. 49-110.

Ito H, Fukuda Y, Muruta K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153: 163-168.

Jack DL, Paulsen IT, Saier MH (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146: 1797-1814.

Jahn TP, Moller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kuhlbrandt W, Schjoerring JK (2004) Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters* 574: 31-36.

Jauniaux JC, Vandenbol M, Vissers S, Broman K, Grenson M (1987) Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning of the *Put4* gene and study of *Put4* RNA levels in wild type and mutant strains. *European Journal of Biochemistry* 164: 601-606.

Javelle A, Andre B, Marini AM, Chalot M (2003) High-affinity ammonium transporters and nitrogen sensing in mycorrhizas. *Trends in Microbiology* 11: 53-55.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.

Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 687-696.

Joy KW (1988) Ammonia, glutamine and asparagine : a carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany* 66: 2103-2109.

Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass AD (2002) Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "knockout" of the high-affinity NH_4^+ transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology* 130: 1263-1275.

Keskitalo J, Bergquist G, Gardeström P, Jansson S (2005) A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology* 139: 1635-1648.

Khademi S, O'Connell J III, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305: 1587-1594.

Kielland K (1994) Amino acid absorption by Arctic plants: Implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology*: 2373-2383.

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001) Expression cloning of a Na^+ -independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H^+ /monocarboxylate transporters. *Journal of Biological Chemistry* 276: 17221-17228.

Koch W, Kwart M, Laubner M, Heineke D, Stransky H, Frommer WB, Tegeder M (2003) Reduced amino acid content in transgenic potato tubers due to antisense inhibition of the leaf H^+ /amino acid symporter StAAP1. *The Plant Journal* 33: 211-220.

Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.

Kronzucker HJ, Britto DT, Davenport RJ, Tester M (2001) Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Science* 6: 335-337.

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1996) Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. *Plant Physiology* 110: 773-779.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150-163.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341-372.

Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 569-593.

Langheinrich U (1993) Clonal variation in apical growth and content in vegetative storage proteins in *Populus*. *Trees* 7: 242-249.

Langheinrich U, Tischner R (1991) Vegetative storage proteins in poplar. Induction and characterization of a 32- and 36-kilodalton polypeptide. *Plant Physiology* 97: 1017-1025.

Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8139-8144.

Lee YH, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber AP, Tegeder M (2007) AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 50: 305-319.

Lee YH, Tegeder M (2004) Selective expression of a novel high-affinity transport system for acidic and neutral amino acids in the tapetum cells of *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal* 40: 60-74.

Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A (1999) Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* 18: 509-519.

Leple JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* 11: 137-141.

Lipson DA, Raab TK, Schmidt SK, Monson RK (1999) Variation in competitive abilities of plants and microbes for specific amino acids. *Biology and Fertility of Soils* 29: 257-261.

Liu X, Bush DR (2006) Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* 30: 113-120.

Loqué D, Lalonde S, Looger LL, von Wiren N, Frommer WB (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* 446: 195-198.

Loqué D, Ludewig U, Yuan L, von Wiren N (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiology* 137: 671-680.

Loqué D, von Wiren N (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 55: 1293-1305.

Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, von Wiren N (2006) Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 48: 522-534.

Ludewig U (2006) Ion transport versus gas conduction: function of AMT/Rh-type proteins. *Transfusion Clinique et Biologique* 13: 111-116.

Ludewig U, Neuhäuser B, Dynowski M (2007) Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* 581: 2301-2308.

Ludewig U, von Wiren N, Frommer WB (2002) Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13548-13555.

Ludewig U, Wilken S, Wu B, Jost W, Obrdlik P, El Bakkoury M, Marini AM, Andre B, Hamacher T, Boles E, von Wiren N, Frommer WB (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄⁺ uniporters. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45603-45610.

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6.

Malaguti D, Millard P, Wendler R, Hepburn A, Tagliavini M (2001) Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *Journal of Experimental Botany* 52: 1665-1671.

Marini A, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 17: 4282-4293.

Marini AM, Springael JY, Frommer WB, Andre B (2000) Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Molecular Microbiology* 35: 378-385.

Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, Andre B (1994) Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding a transporter of ammonium in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 13: 3456-3463.

Marschner H (1995) Mineral Nutrition in Higher Plants. London. Academic Press, 383 p.

Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102.

Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 159-163.

Masclaux C, Quiller I, Gallais A, Hirel B (2001) The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* 138: 69-81.

Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Jougllet T, Suzuki A (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* 140: 444-456.

Mawhinney TP, Robinett RS, Atalay A, Madson MA (1986) Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 358: 231-242.

May JD, Killingbeck KT (1992) Effects of preventing nutrient resorption on plant fitness and foliar nutrient dynamics. *Ecology* 73: 1868-1878.

Mayer M, Dynowski M, Ludewig U (2006) Ammonium ion transport by the AMT/Rh homolog LeAMT1;1. *Biochemical Journal* 396: 431-437.

Meyer A, Eskandari S, Grallath S, Rentsch D (2006) AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 7197-7204.

Millard P (1993) A review of internal cycling of nitrogen within trees in relation to soil fertility. In: Fragaso MAC, van Beusichem ML, eds. *Optimization of Plant Nutrition*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer, 623-628.

Millard P (1996) Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 159: 1-10.

Millard P, Proe MF (1991) Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. *New Phytologist* 117: 587-596.

Millard P, Wendler R, Hepburn A, Smith A (1998) Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant, Cell and Environment* 21: 715-722.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Min X, Siddiqi MY, Guy RD, Glass ADM, Kronzucker HJ (2000) A comparative kinetic analysis of nitrate and ammonium influx in two early-successional tree species of temperate and boreal forest ecosystems. *Plant Cell and Environment* 23: 321-328.

Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *The Plant Journal* 2: 417-422.

Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Heim U, Sauer N, Wobus U, Weber H (2001) Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *The Plant Journal* 28: 61-71.

Morgan MA, Jackson WA (1988) Reciprocal ammonium transport into and out of plant roots: modifications by plant nitrogen status and elevated root ammonium concentration. *Journal of Experimental Botany* 40: 207-214.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for the growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.

Murcha MW, Elhafez D, Lister R, Tonti-Filippini J, Baumgartner M, Philippar K, Carrie C, Mokranjac D, Soll J, Whelan J (2007) Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 199-212.

Nanjo T, Futamura N, Nishiguchi M, Igasaki T, Shinozaki K, Shinohara K (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant and Cell Physiology* 45: 1738-1748.

Neelam A, Marvier AC, Hall JL, Williams LE (1999) Functional characterization and expression analysis of the amino acid permease *RcAAP3* from castor bean. *Plant Physiology* 120: 1049-1056.

Neilsen D, Millard P, Neilsen GH, Hogue EJ (1997) Sources of N for leaf growth in a high-density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. *Tree Physiology* 17: 733-739.

Neuhäuser B, Dynowski M, Mayer M, Ludewig U (2007) Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiology* 143: 1651-1659.

Ninemann O, Jauniaux JC, Frommer WB (1994) Identification of a high affinity ammonium transporter from plants. *EMBO Journal* 13: 3464-3471.

Noiël N, Leplé JC, Pilate G (2002) Optimization of in vitro micropropagation and regeneration for *Populus x interamericana* and *Populus x euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*). *Plant Cell Reports* 20: 1150-1155.

Okumoto S, Koch W, Tegeder M, Fischer WN, Biehl A, Leister D, Stierhof YD, Frommer WB (2004) Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *Journal of Experimental Botany* 55: 2155-2168.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W (2002) High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 45338-45346.

Ortiz-Lopez A, Chang H, Bush DR (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 275-280.

Paczek V, Dubois F, Sangwan R, Morot-Gaudry JF, Roubelakis-Angelakis KA, Hirel B (2002) Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insights on the regulation of carbon and nitrogen metabolism. *Planta* 216: 245-254.

Palmieri L, Todd CD, Arrigoni R, Hoyos ME, Santoro A, Polacco JC, Palmieri F (2006) *Arabidopsis* mitochondria have two basic amino acid transporters with partially overlapping specificities and differential expression in seedling development. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1757: 1277-1283.

Pearson JN, Finnemann J, Schjoerring JK (2002) Regulation of the high-affinity ammonium transporter (*BnAMT1;2*) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Molecular Biology* 49: 483-490.

Persson J, Högborg P, Ekblad A, Högborg MN, Nordgren A, Näsholm T (2003) Nitrogen acquisition from inorganic and organic sources by boreal forest plants in the field. *Oecologia* 137: 252-257.

Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005) The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434: 404-408.

Peuke AD, Jeschke WD, Hartung W (1998) Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. II. The flows of cations, chloride and abscisic acid. *New Phytologist* 140: 625-636.

Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9: 138-146.

Pohlmeier K, Soll J, Grimm R, Hill K, Wagner R (1998) A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from Pea. *The Plant Cell* 10: 1207-1216.

Pohlmeier K, Soll J, Steinkamp T, Hinnah S, Wagner R (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9504-9509.

Qi Z, Stephens NR, Spalding EP (2006) Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology* 142: 963-971.

Raab TK, Lipson DA, Monson RK (1999) Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: Plant and soil processes. *Ecology* 80: 2408-2419.

Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD (1999) *AtAMT1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19: 143-152.

Renne P, Dressen U, Hebbeker U, Hille D, Flugge UI, Westhoff P, Weber AP (2003) The *Arabidopsis* mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. The Plant Journal 35: 316-331.

Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer WB (1996) Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. The Plant Cell 29: 1437–1446.

Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M (2007) Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. FEBS Letters 581: 2281-2289.

Rinaldi C (2007) Caractérisation des déterminants géniques impliqués dans l'interaction entre un agent pathogène, *Melampsora larici-populina*, et le Peuplier. Thèse

Rolletschek H, Hosein F, Miranda M, Heim U, Gotz KP, Schlereth A, Borisjuk L, Saalbach I, Wobus U, Weber H (2005) Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. Plant Physiology 137: 1236-1249.

Russnak R, Konczal D, McIntire SL (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. Journal of Biological Chemistry 276: 23849-23857.

Saier MH Jr (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 354-411.

Saier MH Jr, Tran CV, Barabote RD (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. Nucleic Acids Research 34: D181-186.

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anclia. Science 230: 1350-1354.

Salvemini F, Marini A, Riccio A, Patriarca EJ, Chiurazzi M (2001) Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. Gene 270: 237-243.

Sauter JJ, van Cleve B (1990) Biochemical, immunochemical, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (*Populus×canadensis'robusta'*) wood. Planta 183: 92-100.

Sauter JJ, van Cleve B (1992) Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of *Populus x Canadensis* and its relation to protein body remobilisation. Trees 7: 26-32.

Sauter JJ, van Cleve B, Wellenkamp S (1989) Ultrastructural and biochemical studies results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of other tree species. Holzforschung 43: 1-6.

Schmidt R, Stransky H, Koch W (2007) The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. Planta 226: 805-813.

Selle A, Willmann M, Grunze N, Geßler A, Weiß M, Nehls U (2005) The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 697-706.

Shelden MC, Dong B, de Bruxelles GL, Trevaskis B, Whelan J, Ryan PR, Howitt SM, Udvardi MK (2001) *Arabidopsis* ammonium transporters, AtAMT1;1 and AtAMT1;2 have different biochemical properties and functional roles. *Plant and Soil*, 231: 151-160.

Shen YG, Zhang WK, Yan DQ, Du BX, Zhang JS, Chen SH (2002) Overexpression of proline transporter gene isolated from halophyte confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Acta Botanica Sinica* 44: 956-962.

Shimazu M, Sekito T, Akiyama K, Ohsumi Y, Kakinuma Y (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4851-4857.

Simon-Rosin U, Wood C, Udvardi MK (2003) Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 51: 99-108.

Smith FA, Raven FA (1979) Intracellular pH and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 289-311.

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis 2nd Edn. Academic Press, San Diego.

Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M (2000) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters* 467: 273-278.

Sohlenkamp C, Wood CC, Roeb GW, Udvardi MK (2002) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology* 130: 1788-1796.

Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 6: 175-182.

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wiren N, Yamaya T, Yamaguchi J (2003) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44: 726-734.

Soupe E, Ramirez RM, Kustu S (2001) Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH₃ across the cytoplasmic membrane. *Molecular and Cellular Biology* 21: 5733-5741.

Staswick PE (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 303-322.

Stepien V, Sauter JJ, Martin F (1994) Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 185-192.

Su YH, Frommer WB, Ludewig U (2004) Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 3104-3113.

Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wiren N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T (2003) Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44: 206-211.

Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA (2004) *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell* 16: 2048-2058.

Taylor G (2002) *Populus: arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* (London) 90: 681-689.

Tegeder M, Offler CE, Frommer WB, Patrick JW (2000) Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiology* 122: 319-326.

Thomas GH, Mullins JG, Merrick M (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Molecular Microbiology* 37: 331-344.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.

Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*. 17: 849-850.

Tyerman SD, Whitehead LF, Day DA (1995) A channel-like transporter for NH_4^+ on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants. *Nature* 378: 629-632.

Ueda A, Shi W, Sanmiya K, Shono M, Takabe T (2001) Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. *Plant and Cell Physiology* 42: 1282-1289.

Uehlein N, Fileschi K, Eckert M, Bienert GP, Bertl A, Kaldenhoff R (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68: 122-129.

Ulrich WR, Larsson M, Larsson CM, Lesch S, Novacky A (1984) Ammonium uptake in *lemna gibba* G1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Plant Physiology* 61: 369-376.

Van Den Driessche R, Niemi F, Charleson L (2005) Fourth year response of aspen seedlings to lime, nitrogen and phosphorus applied at planting and 1 year after planting. *Forest Ecology and Management* 219: 216-228.

Van Den Driessche R, Rude W, Martens L (2003) Effect of fertilization and irrigation on growth of aspen (*Populus tremuloides* Michx.) seedlings over three seasons. *Forest Ecology and Management* 186: 381-389.

von Wirén N, Gazzarrini S, Frommer WB (1997) Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* 196: 191-199.

von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB (2000a) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology* 3 : 254-261.

von Wiren N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB (2000b) Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *The Plant Journal* 21: 167-175.

von Wiren N, Merrick M (2004) Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics in Current Genetics* 9: 95-120.

Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany* 51: 227-237.

Wang MY, Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV (1994) Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology *Plant Physiology* 104: 899-906.

Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM (1993) Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103: 1259-1267.

Waters JK, Hughes II BL, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW (1998) Alanine, not ammonia, is excreted from N_2 -fixing soybean nodule bacteroids *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12038-12042.

Weinbaum S, Van Kessel C (1998) Quantitative estimates of uptake and internal cycling of ^{14}N -labeled fertilizer in mature walnut trees. *Tree Physiology* 18: 795-801.

Wetzel S, Demmers C, Greenwood JS (1989) Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. *Planta* 178: 275-281.

Wetzel S, Greenwood JS (1991) A survey of seasonal bark proteins in eight temperate hardwoods. *Trees* 5: 153-157.

Wiame JM, Grenson M, Arst HN (1985) Nitrogen catabolic repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbial Physiology* 26: 1-87.

Willmann A, Weiss M, Nehls U (2007) Ectomycorrhiza-mediated repression of the high-affinity ammonium importer gene *AmAMT2* in *Amanita muscaria*. *Current Genetics* 51: 71-78.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 139-147.

Wood CC, Poree F, Dreyer I, Koehler GJ, Udvardi MK (2006) Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing *Arabidopsis* AtAMT1;1. *FEBS Letters* 580: 3931-3936.

Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* 16: 1123-1127.

Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wiren N (2007) The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Relies on the Isoform-Specific Localization and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters. *The Plant Cell* In Press.

Yuan L, Loqué D, Ye F, Frommer WB, von Wiren N (2007) Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter *AtAMT1;1*. *Plant Physiology* 143: 732-744.

Zheng L, Kostrewa D, Berneche S, Winkler FK, Li XD (2004) The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 17090-17095.

Les différentes études entreprises ont porté sur l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption et le transport de certaines sources d'azote, l'ammonium et les acides aminés, chez le peuplier. La première partie du travail, basée sur des analyses bioinformatiques du génome du peuplier a permis d'identifier les gènes modèles codant pour les transporteurs de différents composés azotés. Deuxièmement, des études *in situ* de la famille de transporteurs AMT chez le peuplier ont permis de montrer que celle-ci comporte 14 membres dont certains présentent une expression tissulaire très spécifique, comme *AMT1;2* dans les racines et *AMT3;1* dans les feuilles sénescentes. Les troisième et quatrième parties de ce travail se sont focalisées sur l'étude des mécanismes de transport impliqués dans la remobilisation automnale et printanière de l'azote. Ces études se sont notamment attachées à étudier le rôle des membres de deux familles de transporteurs d'acides aminés, la famille AAP et la famille CAT. Au cours de l'automne et au début de l'hiver, on observe une forte accumulation d'arginine au niveau des tiges. L'arginine serait préférentiellement synthétisée à partir de la glutamine issue de la remobilisation de l'azote foliaire. De plus, au niveau des tiges, l'expression de *CAT11* est sujette à de fortes variations qui pourraient être reliées aux teneurs en acides aminés notamment l'arginine. D'autre part, avons montré que l'expression spécifique du transporteur putatif d'acides aminés *AAP11* dans les bourgeons avant débourrement est liée à la mise en place des vaisseaux du protoxylème au niveau des ébauches foliaires contenues dans les bourgeons.

Mots-clés : peuplier, génome, transporteurs, ammonium, acides aminés, sénescence, remobilisation de l'azote.

This work concerns the identification of molecular mechanisms involved in the absorption and transport of different nitrogen sources, ammonium and amino acids, in poplar. The first part of the work was based on bioinformatic analyses to identify gene models coding for nitrogen compound transporters. The second part of my work dealt with the characterization of poplar AMT family which comprised 14 members, some of which presented specific expression pattern, such as *AMT1;2* in roots and *AMT3;1* in senescing leaves. The third and fourth parts of my work focused on transport mechanisms involved in nitrogen remobilization during autumn and spring. We studied more particularly two families of amino acid transporters, the AAP family and the CAT family. A strong accumulation of arginine was observed in stem during senescence. Glutamine could be preferentially used as a transport component from senescing to perennial tissues and could be preferentially used as nitrogen source for arginine synthesis in stem. Furthermore, *CAT11* expression was subjected to high variations in stem, which could be related to total amino acid content and arginine particularly. Moreover, we showed that the specific expression of a putative amino acid transporter *AAP11* in bud before bud-burst is linked to the formation of protoxylem cells in vegetative buds.

Keywords : poplar, genome, transporters, ammonium, amino acids, senescence, nitrogen remobilization.