

THESE

présentée par

Mr Mustapha ARKOUN

et soutenue

à Caen le **22/02/2012**

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
- Arrêté du 7 août 2006 -

Titre : Etude de la nutrition uréique et ammoniacale chez le colza (*Brassica napus* L.) et développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification.

MEMBRES du JURY

Mr Nicolaus Von Wirén, Professeur, IPK Gatersleben *(Rapporteur)*

Mr Christophe Salon, Directeur de Recherche, INRA Dijon *(Rapporteur)*

Mme Marie-Pascale Prud'homme, Professeur, Université de Caen

Mr Vincent Ferrières, Professeur, ENSCR, Université de Rennes

Mr Philippe Lainé, Maître de conférences, Université de Caen

Mr Jean-Claude Yvin, Directeur R et D, C.R.I.A.S Dinard *(Co-directeur de thèse)*

Mr Alain Ourry, Professeur, Université de Caen *(Directeur de thèse)*

THESE

présentée par

Mr Mustapha ARKOUN

et soutenue

à Caen le **22/02/2012**

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
- Arrêté du 7 août 2006 -

Titre : Etude de la nutrition uréique et ammoniacale chez le colza (*Brassica napus* L.) et développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification.

MEMBRES du JURY

Mr Nicolaus Von Wirén, Professeur, IPK Gatersleben *(Rapporteur)*

Mr Christophe Salon, Directeur de Recherche, INRA Dijon *(Rapporteur)*

Mme Marie-Pascale Prud'homme, Professeur, Université de Caen

Mr Vincent Ferrières, Professeur, ENSCR, Université de Rennes

Mr Philippe Lainé, Maître de conférences, Université de Caen

Mr Jean-Claude Yvin, Directeur R et D, C.R.I.A.S Dinard *(Co-directeur de thèse)*

Mr Alain Ourry, Professeur, Université de Caen *(Directeur de thèse)*

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements au directeur du laboratoire, M. Frédéric Le Dily, pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA afin de réaliser ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier, Mme Marie-Pascale Prud'homme et Vincent Ferrières, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. C'est également pour moi un honneur que M. Nicolaus von Wirén et M. Christophe Salon aient accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et de porter un regard critique et constructif à ce travail de recherche.

Il m'est agréable d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à M. Jean-Claude Yvin, pour avoir accepté de codiriger cette thèse, et de m'avoir donné l'occasion d'élargir ma thématique de recherche sur un plan plus fondamental. Je remercie également Mme Florence Cruz pour sa gentillesse et ses encouragements durant cette thèse. Mes remerciements vont aussi à M. José Maria Garcia-Mina pour ces précieux conseils et son esprit collaboratif. Je te remercie également de m'avoir accueilli au sein du CIPAV de Pampelune pour y effectuer mes premières expérimentations, et je n'oublie pas de remercier Maria, Fabrice, Oscar, Sarah, Diane et Roberto, pour leur disponibilité. J'espère avoir l'occasion de leur manifester ma reconnaissance en m'associant encore plus étroitement, dans l'avenir, à leurs travaux. Je remercie aussi tous les partenaires du projet AZOSTIMER pour leur collaboration constructive et leurs conseils lors des réunions de pilotage.

Ce travail n'aurait sans doute pas été possible sans les conseils éclairés et jamais démentis durant ma thèse, de mon maître et directeur de thèse, M. Alain Ourry, qui m'a apporté un soutien décisif et procuré cet encouragement indispensable à toute initiation à la recherche scientifique. J'ai été très sensible à la confiance dont tu as fait preuve à mon égard et à l'intérêt que tu as porté à mon travail. Merci également de m'avoir donné cette occasion unique de me frotter à l'expérience de l'enseignement supérieur. Je ne peux mieux manifester mon attachement qu'en continuant à faire valoir la fécondité de ton exemple. J'en profite également pour remercier Valérie, Morgane et Valentin pour leur amabilité.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à M. Philippe Laîné, dont le soutien indéfectible m'a aidé à surmonter de nombreuses difficultés. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton investissement et tes recommandations pendant ces trois dernières années, qui m'ont permis d'évoluer et d'appréhender au mieux mon travail. Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers M. Philippe Etienne pour m'avoir aiguillé avec beaucoup de disponibilité lors de mes expériences en biologie moléculaire. Je tiens par ailleurs à exprimer aux « deux Philippe », toute ma satisfaction et tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux sur le ton de la rigueur et de la bonne humeur.

Je tiens à remercier la personne sans qui je n'aurais pas pu accomplir ce travail. Celui que j'ai toujours considéré, en tout bien et tout honneur comme « mon fidèle assistant ». Je remercie donc chaleureusement M. Xavier Sarda pour son aide technique et pour le suivi rigoureux et efficace de mes expérimentations, aussi bien en laboratoire qu'en plein champ. Tu as également été d'un grand soutien moral, qui t'as valu le titre de "Cheriki" (Ami de

confiance). Je te remercie également de t'être investi dans cette thèse, surtout lors des dernières mises au point. Je te souhaite une brillante carrière et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de retravailler ensemble à l'avenir. Je tiens également à remercier ta maman, envers qui j'ai beaucoup d'estime. Merci à elle pour ses encouragements.

Je voudrais remercier Mme Céline Masclaux-Daubresse pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR1318 INRA-AgroParisTech, afin d'y effectuer les dosages enzymatiques, et pour m'avoir fait bénéficier de son expertise avec beaucoup de disponibilité. Merci également à Mme Fabienne Soulay pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie également M. Jean-Christophe Avice pour m'avoir initié à la protéomique et aux techniques de Western Blot, un grand merci pour ta disponibilité. J'en profite également pour remercier Mme Servane Lemauviel-Lavenant pour m'avoir aidé dans le traitement de mes données statistiques, pour ses conseils et son soutien. Enfin, je remercie Mme Julie Levallois pour le suivi de mes analyses en biologie moléculaire et sa vivacité.

J'aimerais remercier Daniel Pro, qui a assuré la synthèse et les tests *in vitro* des nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification, et Samuel Huguet pour les dosages des inhibiteurs dans le sol. Merci à vous deux pour votre esprit de collaboration.

J'adresse mes remerciements à Mme Marie Paule Bataillé et M. Raphael Ségura pour leur disponibilité constante, et le plus souvent dans l'urgence, lors de l'utilisation du spectromètre de masse. Je remercie vivement M. Dominique Ballois pour le suivi technique des cultures au champ. Je remercie également toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidé lors des récoltes, je pense notamment à Anne Françoise, Patrick, Magalie, Josiane et Sophie. Et je n'oublie pas Josette pour sa gentillesse et toutes les micro-pesées qu'elle a effectuées.

J'aimerais remercier tous les doctorants, avec qui j'ai partagé des moments agréables surtout lors des Journées de l'Ecole Doctorale. Je remercie également Laetitia Jannin pour son soutien et pour son aide lors de ces trois années de thèse.

Je voudrais aussi remercier tous mes amis, Moumene, Said, Sofiane, Menad, Nabila, Karima, Faty, Nouara et Karim. J'adresse des remerciements particuliers à Caroline, merci pour ta présence et ton soutien.

Je terminerai par une touche d'affection en pensant fortement à ma famille. Bien que loin, votre soutien a toujours été mon moteur et ma source d'énergie. Merci à ma sœur Doudouchette d'être constamment présente pour moi, depuis mon arrivée en France, et à son mari Islam pour ses encouragements incessants et sa fougue. Merci à Dahbi et son mari pour leurs moult demandes de nouvelles de moi. Je pense également à mon frère Brahim, à qui je souhaite bon vent dans le domaine de la recherche, beaucoup de courage et de persévérance. Un merci au grand Moh, qui me manque souvent d'ailleurs. Je remercie tendrement mes chers parents pour tout ce qu'ils m'ont offert et appris. Merci à mon père de m'avoir transmis la rigueur et le bon sens, et merci à ma mère de m'avoir inculqué la ténacité et la persévérance. Je pense très fort à vous.

*A mes chers parents
et à la mémoire de mon oncle*

LISTE DES ABREVIATIONS

-A-

AAT : Enzyme aspartate aminotransférase
 AM : 2-amino-4-chloro-methyl-pyrimidine
 AMO : Ammonium Monooxygenase
 AMT : Ammonium Transporter
 AN : Ammonium Nitrate
 APE : Agence de Protection de l'Environnement
 ARN : Acide Ribonucléique
 AS : Ammonium Sulfate
 ASN : Asparagine Synthétase
 ATS : Thiosulphate d'ammonium

-B-

BI : Benzimidazole
 BNI : Biologicals Nitrification Inhibitors
 BT : Benzothiazole

-C-

CDU : Cyclo Diurée
 CEC : Capacité d'Echange Cationique
 CHATS : Constitutive High Affinity Transport System
 CIEC : The International Scientific Centre for Fertilizers
 CIHP : Chromatographie Ionique Haute Performance

-D-

DCD : Dicyandiamide
 DMPP : 3,4-Dimethylpyrazol-phosphate

-E-

ENSCR : Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes 1

EUA: Efficacité d'Utilisation de l'Azote

-F-

Fd-GOGAT : Ferredoxin dependent Glutamate synthase
 FUI : Fond Unique Interministériel

-G-

GDH : Glutamate Déshydrogénase
 GFP : Green Fluorescence Protein
 GOGAT : Glutamate synthase
 GS : Glutamine Synthétase

-H-

HAO : Hydroxylamine Oxydoréductase
 HATS : High Affinity Transport System
 HQ : Hydroquinone

-I-

IBDU : Isobutyridène-Diurée
 IFA : International Fertilizer Association
 IHATS : Inducible High Affinity Transport System

-K-

Km : Constante de Michaelis

-L-

LANO : Laboratoire Agronomique de Normandie
 LATS : Low Affinity Transport System

-M-

MBI : 2-mercaptobenzimidazole
MBT : 2-mercaptobenzothiazole
MIPs : Aquaporines ou Major Intrinsic Proteins
MTBI : 2-(methylthio)benzimidazole
MTBT : 2-(méthylthio)benzothiazole

-N-

NADH-GOGAT : NADH-dependent glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase
NBPT : N-(n-butyl) thiophosphoric triamide
NBPTO : N-(n-butyl) phosphoric triamide
NR : Nitrate réductase
NRT : Nitrate Transporter

-O-

OHBI : 2-hydroxybenzimidazole
OHBT : 2-hydroxybenzothiazol

-P-

PAPR : Partially Acidulated Phosphate Rock
PEG : Polyéthylène glycol
PPD/PPDA : Phénylphosphorodiamidate

-Q-

PCR : Polymérase Chain Reactions

-S-

SCEES : Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques

SCU : Sulphur-Coated Urea

-U-

UAN : Urée-Ammonium-Nitrate
UF : Urée-Formaldéhyde

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES ABREVIATIONS	vi
TABLE DES MATIERES	viii
PREFACE	- 1 -
CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 7 -
I. Importance de l'azote dans l'agriculture	- 7 -
II. La fertilisation azotée dans la production agricole	- 7 -
II.1. Rôle de l'azote dans la plante	- 7 -
II.2. Engrais minéraux nitriques ou ammoniacaux	- 8 -
A. Absorption et assimilation du nitrate	- 10 -
B. Absorption et assimilation de l'ammonium	- 12 -
II.3. Engrais uréiques	- 16 -
A. Données économiques	- 17 -
A.1. Production	- 17 -
A.2. Consommation	- 17 -
B. L'urée comme source d'azote pour les plantes	- 18 -
B.1. Transport à haute affinité de l'urée	- 19 -
B.2. Transport passif de l'urée	- 21 -
C. Les ureases	- 22 -
D. Les protéines accessoires de l'urease	- 23 -
E. Sources métaboliques de l'urée	- 24 -
III. Fertilisation azotée et questions environnementales	- 26 -
III.1. Les émissions atmosphériques d'oxydes d'azote et d'ammoniac	- 26 -
III.2. Le lessivage du nitrate	- 28 -
IV. Stratégies pour limiter les risques environnementaux	- 29 -
IV.1. Engrais à libération lente et contrôlée	- 30 -
IV.2. Les inhibiteurs de la nitrification	- 32 -
A. Caractéristiques et modes d'action des inhibiteurs de nitrification	- 32 -
B. Types d'inhibiteurs de nitrification disponibles sur le marché	- 34 -
IV.3. Les inhibiteurs d'uréases	- 38 -
A. Caractéristiques et modes d'action des inhibiteurs d'uréases	- 38 -
B. Types d'inhibiteurs d'uréases disponibles sur le marché	- 39 -
V. Contexte et objectifs de recherche	- 43 -
CHAPITRE II. CRIBLAGE DES INHIBITEURS D'UREASES ET DE LA NITRIFICATION	- 46 -
A. MATERIELS ET METHODES	- 46 -
I. Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification	- 46 -
I.1. Les inhibiteurs de nitrification	- 46 -
I.2. Les inhibiteurs d'uréases	- 46 -
II. Les sols utilisés et leurs caractéristiques	- 47 -
III. Criblage et mise en place des traitements	- 47 -
III.1. Tests des inhibiteurs <i>in vitro</i>	- 47 -
III.2. Tests des inhibiteurs en microlysismètres	- 47 -
III.3. Tests des inhibiteurs sur des colonnes de sol	- 48 -

IV. Extractions et dosages de l'urée, du NH_4^+, du NO_3^- et des inhibiteurs de la nitrification	- 49 -
IV.1. Extraction	- 49 -
IV.2. Dosage de l'urée	- 49 -
IV.3. Dosage de l'ammonium	- 50 -
IV.4. Dosage du nitrate	- 50 -
IV.5. Dosage des inhibiteurs de la nitrification	- 50 -
V. Mesure de la solubilité et de l'écotoxicité des inhibiteurs de nitrification	- 51 -
V.1. Mesure de la solubilité	- 51 -
V.2. Mesure de l'écotoxicité	- 51 -
VI. Quantification des pertes ammoniacales par volatilisation	- 51 -
VI.1. Description du dispositif utilisé	- 51 -
VI.2. Dosage de l'ammoniac	- 52 -
VII. Traitement statistique des données	- 52 -
B. RESULTATS	- 53 -
I. Les inhibiteurs d'uréases	- 53 -
I.1. Effet du NBPT sur la volatilisation de l'ammoniac	- 53 -
I.2. Effet du NBPT et du NBPTO sur l'hydrolyse de l'urée et l'accumulation de l'ammonium	- 53 -
A. En sol alcalin	- 53 -
B. En sol acide	- 54 -
I.3. Stabilisation du NBPT par la cyclodextrine et la wollastonite en sol acide	- 54 -
I.4. Discussion et conclusion	- 55 -
II. Les inhibiteurs de nitrification	- 56 -
II.1. Effets du MBI et du MBT sur l'activité nitrifiante dans le sol	- 56 -
A. En sol alcalin	- 57 -
B. En sol acide	- 57 -
II.2. Test des inhibiteurs de nitrification glycosylés dérivés du MBI	- 58 -
II.3. Test des inhibiteurs de nitrification glycosylés dérivés du MBT	- 59 -
II.4. Tests de solubilité et d'écotoxicité des inhibiteurs de nitrification	- 59 -
II.5. Test des inhibiteurs en microlysismètres	- 60 -
A. Essai en sol alcalin	- 60 -
B. Essai en sol acide	- 61 -
II.6. Test des inhibiteurs sur des colonnes de sol	- 61 -
A. Effet des inhibiteurs sur l'activité nitrifiante	- 61 -
B. Devenir du DCD dans le sol et les eaux de percolation	- 62 -
C. Devenir du MBI, MBT et leur dérivé gentiobiosyl, dans le sol et les eaux de percolation	- 62 -
II.7. Discussion et conclusion	- 63 -
CHAPITRE III. ALIMENTATION UREIQUE CHEZ LE COLZA D'HIVER (BRASSICA NAPUS L.) : IMPORTANCE DU NICKEL ET EFFET D'UN INHIBITEUR D'UREASES	- 67 -
Keywords	- 67 -
Abstract	- 68 -
Abbreviations	- 68 -
I. Introduction	- 69 -
II. Materials and Methods	- 71 -
II.1. Growth conditions and experimental design	- 71 -
II.2. Determination of relative chlorophyll concentration	- 72 -
II.3. Total N and ^{15}N analysis	- 72 -
II.4. Determination of urea and ammonium content	- 73 -
II.5. Enzyme activities	- 73 -
II.6. Gel electrophoresis and protein blot analysis	- 73 -
II.7. RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis	- 73 -
II.8. Determination of amino acid profile	- 75 -

II.9. Data and statistical analysis	- 75 -
III. Results	- 75 -
III.1. Reduction of plant growth without Ni or with PPD supply	- 75 -
III.2. Urea uptake was restricted without Ni or with PPD supply and inversely related to <i>BnDUR3</i> expression	- 76 -
III.3. Urea and ammonium contents were accumulated without Ni or with PPD supply	- 76 -
III.4. Only PPD supply decreased GS activity and protein content	- 77 -
III.5. PPD increased shoot GDH activity but not its transcript levels	- 78 -
III.6. Lack of Ni or PPD addition reduced amino acid contents	- 78 -
IV. Discussion	- 78 -
IV.1. Plant growth is reduced by Ni deficiency or exposure to a urease inhibitor	- 79 -
IV.2. Urea uptake is impaired by the lack of Ni or the addition of PPD while the expression of <i>BnDUR3</i> is up-regulated	- 79 -
IV.3. Despite a lower uptake, urea is accumulated during N or Ni deficiency or by PPD supply	- 80 -
IV.4. Accumulation of Ammonium under Ni deficiency or PPD supply resulting from a lack of its assimilation ?	- 81 -
IV.5. As a consequence, amino acid content is reduced by Ni deficiency or PPD addition	- 82 -
Acknowledgements	- 83 -
<i>CHAPITRE IV. ALIMENTATION AMMONIACALE, NITRIQUE ET/OU UREIQUE CHEZ LE COLZA D'HIVER (BRASSICA NAPUS L.) : ETUDES EN CONDITIONS HYDROPONIQUES OU LYSIMETRIQUES</i>	- 85 -
Keywords	- 85 -
Abstract	- 86 -
I. Introduction	- 87 -
II. Materials and Methods	- 90 -
II.1. Site and lysimeter description	- 90 -
II.2. Soil and crop culture	- 90 -
II.3. Experimental treatment, labelling and harvest	- 90 -
II.4. Plant material for laboratory experiments	- 91 -
II.5. Total N, ¹⁵ N analysis and ¹⁵ N balance	- 92 -
II.6. RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis	- 92 -
II.7. Data and statistical analysis	- 93 -
III. Results	- 94 -
III.1. Fertilizer net uptake and N partitioning under lysimeter conditions	- 94 -
A. Environmental conditions	- 94 -
B. Yield and fertilizer use efficiency (FUE)	- 94 -
C. Partitioning of N taken up	- 94 -
III.2. Nitrate, ammonium and urea net uptake under hydroponic culture	- 96 -
A. Dry matter and N content	- 96 -
B. Uptake rate and analysis of <i>BnNRT1.1</i> , <i>BnNRT2.1</i> , <i>BnAMT1.1</i> and <i>BnDUR3</i> transcript levels	- 97 -
C. Ammonium assimilation: Analysis of <i>BnGDH2</i> transcript level	- 98 -
D. A signalling role of nitrate: Effect of nitrate pulse on urea and ammonium uptake	- 98 -
IV. Discussion	- 99 -
IV.1. Yield, N uptake and its distribution in plant organs	- 99 -
IV.2. N losses and effect of NBPT	- 100 -
IV.3. Net nitrate, ammonium and urea uptake under controlled conditions and effect of urea and ammonium on growth	- 101 -
IV.4. Nitrate correct the negative effect of urea and ammonium fed plants	- 103 -
IV.5. Nitrate as a signal molecule	- 103 -
IV.6. From controlled conditions to the field : any significant uptake of urea ?	- 104 -
V. Conclusion	- 104 -
Acknowledgements:	- 105 -

CHAPITRE V. CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE	- 107 -
I. Développement de fertilisants azotés présentant une efficacité nutritionnelle améliorée et respectueux de l'environnement	- 107 -
II. Efficacité et limites des nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification (<i>chapitre II</i>)	- 108 -
II.1. Inhibiteurs de la nitrification	- 108 -
II.2. Les inhibiteurs d'uréases	- 109 -
III. Alimentation uréique chez le colza : aspects physiologiques, moléculaires et agronomiques	- 110 -
III.1. Une déficience en nickel ou la présence d'un inhibiteur d'uréases pénalisent le fonctionnement des plantes cultivées en hydroponie (<i>chapitre III</i>)	- 110 -
A. Aspects physiologiques	- 111 -
B. Aspect moléculaire	- 112 -
III.2. L'enzyme GDH a un rôle important dans l'assimilation de l'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée	- 114 -
VI. Alimentation uréique vs ammoniacale : toxicité ou carence ?	- 114 -
V. le nitrate présente un double rôle : nutritionnel et signalétique	- 116 -
IV. Aspects agronomiques : Quels engrais pour demain ?	- 117 -
CHAPITRE VI. PERSPECTIVES DE RECHERCHES	- 121 -
I. Recherches finalisées	- 121 -
I.1. Les inhibiteurs de la nitrification	- 121 -
I.2. Les inhibiteurs d'uréases	- 122 -
II. Recherches fondamentales	- 123 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 125 -

PREFACE

La fertilisation azotée joue un rôle essentiel sur la croissance des végétaux et le rendement des cultures. Elle contribue à augmenter la croissance végétale ainsi que la production agricole, tout en ayant un impact sur la qualité des produits récoltés. Cependant, l'utilisation des engrais azotés par les plantes peut être considérée comme relativement inefficace au vu des quantités apportées. Généralement, la plante absorbe seulement 50% de l'azote appliqué. La cause principale de cette faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) est liée aux pertes importantes d'azote ammoniacal par volatilisation, et/ou d'azote nitrique par lixiviation lors de précipitations élevées. A ce titre, les conséquences liées à ces pertes peuvent avoir un impact à deux niveaux : tout d'abord économique puisqu'un défaut de valorisation constitue une perte financière non négligeable pour l'exploitant agricole et enfin environnemental, avec des impacts néfastes sur l'environnement direct (émission de gaz azotés contribuant à augmenter l'effet de serre, pollution des aquifères) ou indirect (coût énergétique de fabrication des engrais). Par ailleurs, compte tenu de la croissance de la démographie humaine attendue lors des 50 prochaines années mais aussi du développement de certains pays, l'utilisation d'engrais notamment azotés sera inévitablement croissante. Au delà des impacts environnementaux potentiels, il convient donc de concilier trois défis majeurs: assurer un approvisionnement alimentaire suffisant, maintenir un revenu agricole adéquat tout en minimisant les incidences défavorables sur l'environnement. Il est donc essentiel d'élaborer de nouvelles stratégies conduisant à une meilleure gestion de l'azote afin de répondre aux exigences économiques tout en tenant compte des préoccupations environnementales.

Le recours plus fréquent à l'utilisation de formes azotées moins coûteuses à produire telles que l'urée, pourrait contribuer à réduire les problèmes environnementaux liés aux apports importants d'intrants azotés (généralement sous forme de nitrate d'ammonium) à condition de retarder ou de différer sa dégradation dans le sol de manière à optimiser son prélèvement par les plantes. L'urée, qui présente l'avantage d'être plus riche en azote (46% contre 33% pour l'ammonitrate), est le fertilisant azoté le plus utilisé au niveau mondial (57% des engrais dans le monde). Son utilisation en France reste cependant marginale du fait de sa rapide hydrolyse en ammonium, par les uréases présentes dans le sol, qui est ensuite réduit par les bactéries nitrifiantes en nitrate, forme d'azote minéral facilement lixivié et à l'origine des

problèmes environnementaux tels que la pollution des aquifères, l'eutrophisation des cours d'eau, et la prolifération des algues vertes dans les milieux estuariens. Les pertes importantes d'azote par volatilisation ammoniacale liée à l'hydrolyse de l'urée constituent également un facteur limitant pour son utilisation en tant que fertilisant. L'emploi d'inhibiteurs d'uréases et/ou de nitrification devrait, par ailleurs, permettre de différer ou ralentir l'hydrolyse de l'urée permettant ainsi d'optimiser son prélèvement par les plantes tout en réduisant les pertes par volatilisation et par lixiviation.

Il existe très peu de composés efficaces susceptibles d'inhiber à la fois les activités nitrifiante et uréasique des enzymes à l'origine de la dégradation des engrais azotés dans le sol. Les inhibiteurs de la nitrification, comme le nitrapyrine, le dicyandiamide (DCD) et le 3,4-diméthylpyrazole phosphate (DMPP), ainsi que l'inhibiteur d'uréases, le N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) sont les plus utilisés en agriculture. Toutefois, leur durée d'action, qui est fonction des facteurs biotiques et abiotiques rencontrés, reste relativement faible. Par conséquent, une première perspective de recherche pourrait porter sur la synthèse de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de nitrification présentant une période d'action prolongée. De ce fait, mes travaux de recherche menés dans le cadre du projet AZOSTIMER, visent à améliorer le bilan agroenvironnemental des plantes de grande culture en pratiquant une fertilisation maîtrisée grâce au recours à des inhibiteurs d'uréases et/ou de nitrification, nouvellement synthétisés. Ces inhibiteurs sont en général des composés hétérocycliques très peu solubles dans l'eau. La glycosylation de ces composés constitue l'une des voies d'approche retenue afin d'augmenter leur efficacité en favorisant leur migration dans les différents horizons du sol et en ralentissant leur dégradation afin d'optimiser le prélèvement d'azote uréique et ammoniacal par les plantes.

Dans un tel contexte, l'application d'inhibiteurs d'uréases en combinaison avec des engrais uréiques, nécessite d'approfondir les études menées jusqu'à présent sur l'absorption et l'assimilation de l'urée par la plante, mais également d'étudier des effets physiologiques de ces inhibiteurs sur la croissance et le développement des cultures. En effet, il est généralement admis que l'azote de l'urée pour être assimilé, nécessite une hydrolyse de l'urée en ammonium et en dioxyde de carbone. Cependant, la récente découverte de l'existence de transporteurs d'urée et d'une enzyme uréase nickel dépendante chez les plantes, confortent l'idée de la capacité des plantes à prélever puis à assimiler l'azote uréique pour leur

croissance. Par ailleurs, comparativement à des plantes alimentées en nitrate ou en ammonium, une nutrition uréique stricte conduit à une diminution de la croissance et parfois à l'apparition de symptômes de carence azotée. Toutefois, il est généralement considéré qu'un apport de nitrate contribue à la levée de toxicité liée à l'urée. L'origine de ces symptômes et de la levée de cette toxicité restent à ce jour encore mal connues.

Dans un premier temps, les recherches développées dans le cadre de cette thèse visaient d'une part, à réaliser des tests *in vivo* afin de cribler de nouvelles molécules inhibitrices de l'activité uréasique et de la nitrification mises au point par les chercheurs de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes 1 (ENSCR, thèse de doctorat de D. PRO). Il s'agissait ensuite de valider les effets observés précédemment *in vitro* en testant les molécules présentant les caractéristiques les plus intéressantes (solubilité, écotoxicité, action sur l'inhibition de l'activité uréase, ou nitrifiante dans le sol) sur d'autres dispositifs expérimentaux, à savoir des microlysimètres ou des colonnes de sol, qui permettent de mettre en évidence l'effet de la glycosylation sur la mobilité des molécules dans le sol, ainsi que de suivre leur devenir dans les eaux de percolations.

Dans un deuxième temps, des recherches plus fondamentales portant sur l'absorption et l'assimilation de l'urée, son éventuelle toxicité, et la réduction de cette dernière par la présence de nitrate, ont été entreprises chez le colza (*Brassica napus* L.). Cette espèce, première culture oléagineuse en France, présente, malgré sa forte capacité à absorber le nitrate, une faible efficacité de transfert de l'azote des organes végétatifs vers les tissus reproducteurs. De ce fait, une fertilisation élevée (180 kg N/ha) est généralement apportée, causant un surcoût et des risques environnementaux liés au retour au sol de l'azote par minéralisation des feuilles chutées. Les expérimentations ont d'abord été menées en conditions contrôlées, dans le but d'étudier l'importance du nickel et les effets d'un inhibiteur d'uréases sur le métabolisme azoté de plantes de colza, puis en conditions de plein champ, sur cases lysimétriques. La contribution et le devenir de l'azote apporté par différents types d'engrais, en absence ou en présence d'un inhibiteur d'uréases, ont été estimés à l'aide d'un marquage ^{15}N . La distribution du traceur dans les différents compartiments (sol-plante-air) a permis d'établir un bilan azoté (sol-plante-atmosphère).

Ce manuscrit s'articule autour de trois grandes parties. Une partie introductive, qui fait état des connaissances actuelles, permet de préciser les objectifs de recherche, une autre partie présente les résultats sous forme de trois chapitres dont deux articles scientifiques, suivie d'une discussion générale, des conclusions et des perspectives de recherche issues de ce travail.

Les articles présentés dans la partie « résultats » du manuscrit sont les suivants :

- **Arkoun M., Jannin L., Laîné P., Etienne P., Masclaux-Daubresse C., Garnica M., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A.** (2011). A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and Phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Soumis à *Plant and Soil*, en révision.
- **Arkoun M., Sarda X., Jannin L., Laîné P., Etienne P., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A.** 2011. Hydropony versus field lysimeter study of urea, ammonium and nitrate uptake by oilseed rape (*Brassica napus* L.). Soumis à *Annals of Botany*.

- Ces résultats de recherche ont également fait l'objet de trois participations à des congrès nationaux et internationaux :

- **Arkoun M., Laîné P., Etienne P., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A.** Study of a nitrate supply on the removal toxicity of ammonium and urea nutrition in winter oilseed rape. Journée de l'Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement, Le Havre (France), 8-9 Juin 2011 (Poster).
- **Arkoun M., Laîné P., Etienne P., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A.** Study of a nitrate supply on the removal toxicity of ammonium and urea nutrition in winter oilseed rape. 13th International Rapeseed Congress. Prague (République Tchèque). 5-9 Juin 2011 (Poster).
- **Arkoun M., Laîné P., Etienne P., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A.** Correction of the negative effects of ammonium and urea nutrition by a nitrate supply in winter oilseed rape. 15th world fertilizer congress of the international scientific centre for fertilizers (CIEC). Bucarest (Roumanie). 29 Août-2 Septembre 2010 (Communication orale).

Le projet AZOSTIMER, au sein duquel s'insère cette thèse de doctorat, a été labellisé par le pôle de compétitivité Mer-Bretagne, et ce travail de thèse a été réalisé grâce à un financement par le Fond Unique Interministériel (FUI). Mon implication dans ce projet s'est par ailleurs traduite par ma participation à d'autres travaux non présentés dans cette thèse, ayant donné lieu à la rédaction des articles suivants :

Jannin L., Arkoun M., Etienne P., Lâiné P., Goux D., Garnica M., Fuentes M., Francisco S., Baigorri R., Cruz F., Houdusse F., Garcia-Mina J-M., Yvin J-C., Ourry A. (2011) *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosom* (L.) Le Jol. seaweed extract: Microarray analysis and physiological characterization of N, C and S metabolisms. Soumise à *Journal of Plant Growth Regulation*, en revision.

Jannin L., Arkoun M., Ourry A., Lâiné P., Goux D., Garnica M., Fuentes M., Francisco S., Baigorri R., Cruz F., Houdusse F., Garcia-Mina J-M., Yvin J-C., Etienne P. (2011). Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. Soumis à *Plant and Soil*.

Pro D., Arkoun M., Daniellou R., Nugier-Chauvin C., Morvan J., Ourry A., Yvin J.C., Ferrières V. (2011). Water soluble nitrification inhibitors: Impact of glycosylation. Soumis à *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

Chapitre I

Analyse Bibliographique

CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Importance de l'azote dans l'agriculture

L'azote est l'élément nutritif le plus important pour la production agricole.

Comme il est soumis à un cycle naturel dans l'air, le sol et l'eau, il subit différentes transformations chimiques et biologiques (fig. I-1). Il intervient dans les principaux processus de développement de la plante et de détermination du rendement : il stimule la croissance racinaire, le développement des cultures ainsi que l'absorption des autres éléments nutritifs. Dans la plupart des écosystèmes, il est prélevé par les plantes puis retourne au sol (par les résidus), où une partie est minéralisée par les microorganismes du sol. Dans les écosystèmes naturels, ce cycle de l'azote reste plus ou moins fermé, les apports de N compensent les pertes en N. Cependant, dans les écosystèmes agricoles, ce cycle est perturbé par l'exportation de quantités importantes d'azote au sein des tissus récoltés. Par conséquent, l'utilisation d'engrais azotés est essentielle pour maintenir et/ou augmenter la productivité agricole. Au cours des 50 dernières années, l'augmentation de la fertilisation azotée et une meilleure gestion de l'azote ont largement contribué à la forte augmentation de la production (Smil, 2001).

II. La fertilisation azotée dans la production agricole

A l'état naturel, tous les sols sont déficients en azote et ne permettent pas une croissance optimale des cultures. Par ailleurs, l'appauvrissement des sols en éléments nutritifs et la chute des rendements sont inévitables si aucun réapprovisionnement n'est pratiqué afin de reconstituer les stocks en nutriments. La production agricole ne peut donc être soutenue sans le recours à l'utilisation d'engrais, de plantes fixatrices d'azote et/ou de sources organiques d'azote. Les engrais azotés sont appliqués depuis plus de 150 ans, et leur utilisation a fortement augmenté après la seconde guerre mondiale. Jointes aux progrès de la sélection génétique et des itinéraires techniques incluant la protection des cultures, ils devraient permettre d'atteindre des rendements cultureux suffisamment élevés pour assurer les ressources alimentaires de presque toute l'humanité.

II.1. Rôle de l'azote dans la plante

Généralement, l'azote représente en moyenne 1 à 5% de la matière sèche végétale, les fabacées présentent les teneurs les plus élevées (5%). Bien que ces teneurs soient faibles, l'azote entre dans la fabrication des acides nucléiques ou aminés, des protéines, de la

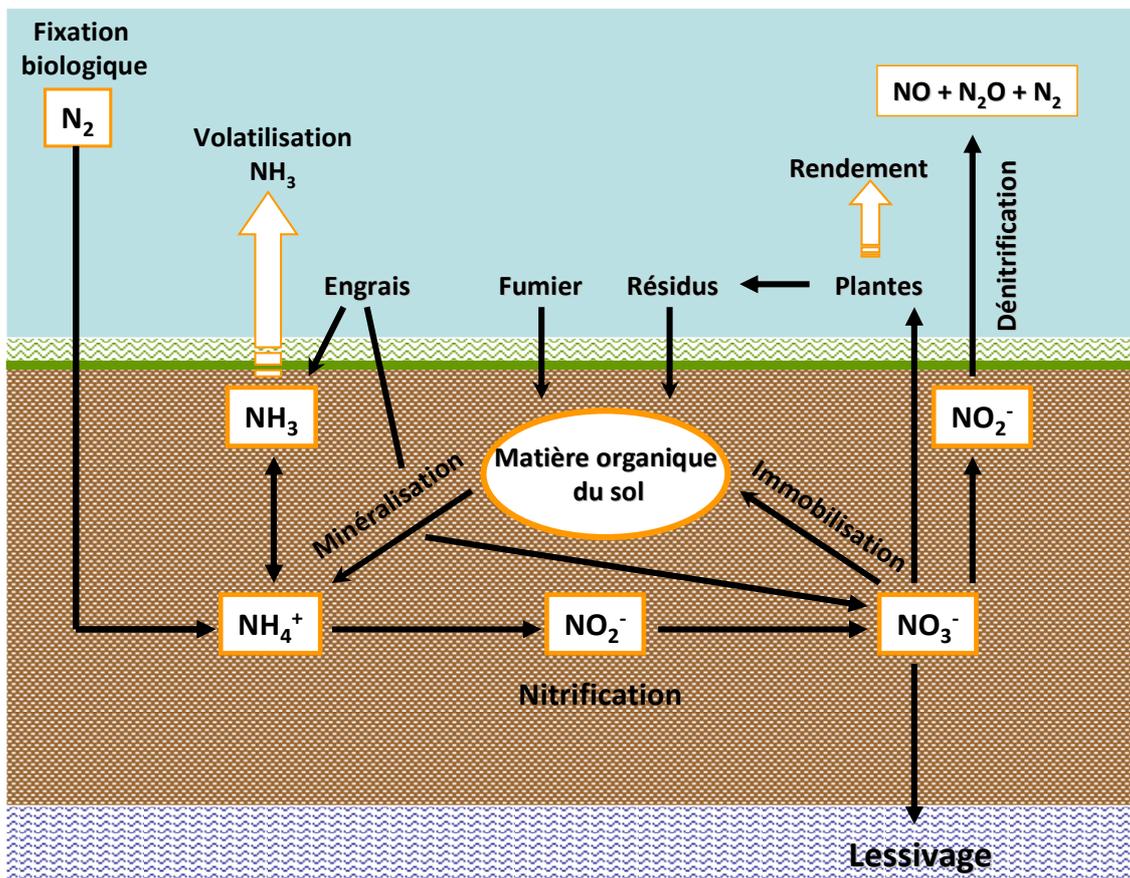


Figure I-1. Cycle de l'azote d'après Hofman et Van Cleemput (2004).

chlorophylle et de molécules indispensables à la croissance et au développement des plantes. Dans les tissus, les composés protéiques sont majoritaires, expliquant que de nombreuses plantes agricoles sont essentiellement cultivées pour la production de protéines végétales.

Le nitrate et l'ammonium sont les principales sources d'azote pour la croissance des plantes dans la plupart des environnements naturels et agricoles (Raven *et al.*, 1992). L'ammonium, issu de l'absorption racinaire ou généré par l'assimilation du nitrate, est converti en glutamine et en glutamate qui constituent les premières sources d'azote réduit dans la cellule.

Le nitrate est considéré comme la source d'azote majoritaire (Marschner, 1995), avec des concentrations plus élevées que celles de l'ammonium, notamment dans les sols bien aérés. En outre, la mobilité du nitrate dans le sol facilite son absorption par les plantes. Par conséquent, la plupart des plantes présentent un caractère nitrophile. Cependant, une production de matière sèche plus élevée, résultant d'un coût énergétique plus faible, est généralement observée lorsque le NO_3^- et le NH_4^+ sont apportés aux mêmes concentrations. En effet, la plante tire avantage des deux formes d'azote, la forme ammoniacale déjà réduite est assimilée plus rapidement et à moindre coût énergétique que le nitrate, alors que la forme nitrique est facilement transportée dans toute la plante, pouvant être stockée dans les vacuoles comme réserve azotée ou comme osmoticum. Une disponibilité insuffisante en azote entraînerait donc une réduction de la croissance des cultures et de la production. Les symptômes de carence sont la conséquence de perturbations métaboliques. Une carence en azote est caractérisée par des plantes chétives, des chloroses, ainsi qu'une entrée en sénescence prématurée des feuilles âgées (Gombert *et al.*, 2006). L'azote de ces feuilles est métabolisé puis transporté vers les jeunes feuilles en développement. Ces plantes présentent une maturation précoce avec pour conséquence un rendement plus faible.

II.2. Engrais minéraux nitriques ou ammoniacaux

Il existe trois sources possibles d'azote pouvant suppléer l'apport du sol pour l'agriculture; la fertilisation minérale et organique, la fixation biologique de l'azote et, dans certains cas, les dépôts atmosphériques.

La production mondiale d'engrais azotés est basée sur la fixation du N atmosphérique sous forme d'ammoniac (NH_3). L'ammoniac produit est ensuite utilisé pour la production d'engrais, contenant soit l'urée, l'ammonium, le nitrate, ou une combinaison des deux derniers

(fig. I-2). En plus de ces engrais azotés simples, des composés multinutritionnels contenant de l'azote et d'autres éléments, tels que le phosphore (P) et/ou le potassium (K), et plus récemment le soufre (S), sont aussi largement utilisés.

L'ammonium, le nitrate et l'urée, constituent donc les trois principales formes minérales d'engrais azotés. L'efficacité des engrais minéraux est influencée par le principe des échanges d'ions. En raison de sa charge positive, l'ammonium est adsorbé par les colloïdes du sol chargés négativement (argile et matière organique). Le NH_4^+ est ensuite, soit absorbé par les plantes, soit oxydé en nitrate par les bactéries du sol via le processus de nitrification (fig. I-1). En outre, l'ammonium apporté par fertilisation peut aussi être perdu par volatilisation dans l'atmosphère. L'ion ammonium est en équilibre chimique avec l'ammoniac (NH_3), et cet équilibre se déplace vers l'ammoniac dans les sols alcalins où les pertes par volatilisation peuvent être importantes (allant jusqu'à 9 millions de tonnes de N- NH_3 , constituant plus de 10% des engrais azotés utilisés au niveau mondial; IFA, 2003).

Contrairement à l'ammonium, le nitrate, porteur d'une charge négative, n'est pas retenu par les particules du sol et par conséquent, il peut être facilement lixivié en raison de sa solubilité. Il peut également être réduit en oxyde d'azote gazeux par le processus de dénitrification (fig.I-1). Par ailleurs, du fait de sa solubilité, le nitrate est facilement véhiculé par l'eau du sol jusqu'aux racines (flux de masse).

Dans les sols alcalins, du fait d'une nitrification rapide, le nitrate est généralement plus abondant que l'ammonium. En sol acide, les processus de minéralisation peuvent être bloqués, d'autant plus que la température est basse. Selon le degré de minéralisation et de nitrification, une nutrition mixte est souvent présente avec des proportions d'absorption de chacun des éléments différentes selon les espèces et les conditions environnementales. Les plantes se sont donc adaptées et ont développé des systèmes spécifiques de transport de nitrate ou d'ammonium (systèmes de transport à forte affinité et à faible affinité ; Crawford et Forde, 2002).

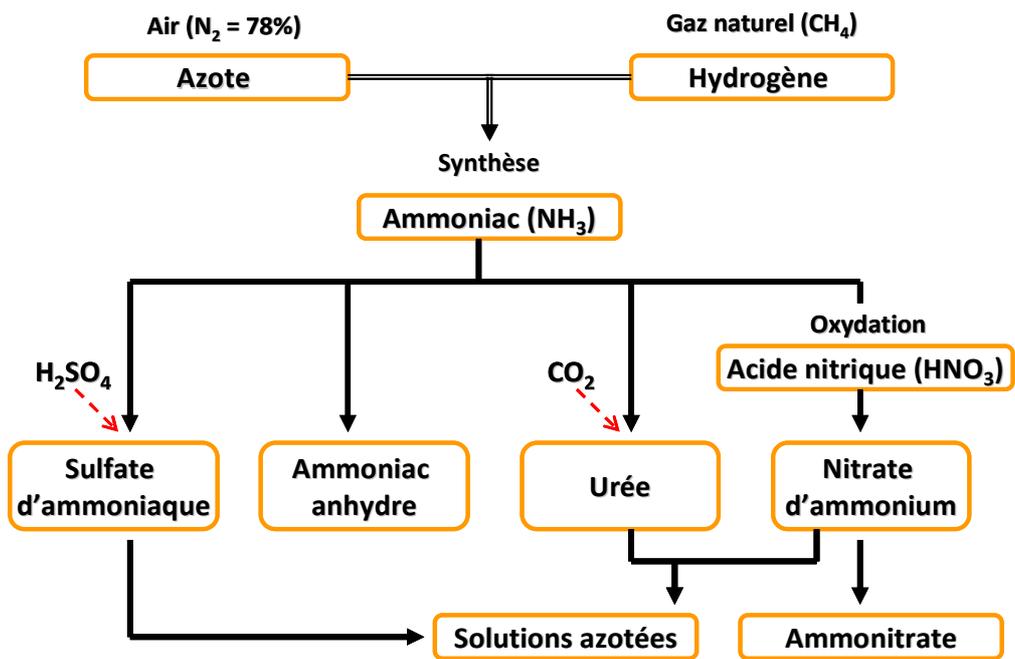


Figure I-2. Principales méthodes de fabrication des engrais azotés.

A. Absorption et assimilation du nitrate

- Au niveau physiologique

La concentration en nitrate est très fluctuante dans les sols : elle peut varier de quelques micromolaires (μM) à plusieurs millimolaires (mM). Les plantes ont ainsi développé des systèmes d'absorption adaptés aux différentes concentrations rencontrées :

- Un système de transport à haute affinité appelé « HATS » (« High Affinity Transport System »), capable de transporter les ions NO_3^- lorsqu'ils sont présents dans le milieu à des concentrations inférieures à $500\mu\text{M}$. Il présente une cinétique de saturation de type Michaelis-Menten et une sensibilité à la température et aux inhibiteurs du métabolisme (Glass *et al.*, 1990). Ce système présente deux composantes : une composante constitutive (CHATS), caractérisée par une très forte affinité pour le nitrate et une faible capacité d'absorption, et une composante inductible (IHATS), caractérisée par une affinité plus faible mais une capacité d'absorption du nitrate supérieure (Doddema et Telkamp, 1979).
- Un système de transport à faible affinité appelé « LATS » (« Low Affinity Transport System »), qui opère pour de fortes concentrations externes ($> 500 \mu\text{M}$) en NO_3^- . Il présente une cinétique linéaire en fonction de la concentration en NO_3^- et il est moins sensible à la température et aux inhibiteurs du métabolisme que le système HATS (Glass *et al.*, 1990).

- Au niveau moléculaire

Les protéines responsables de chacun de ces deux systèmes de transport appartiennent à une famille multigénique de transporteurs. Les gènes *NRT2* et *NRT1* sont responsables des systèmes de transports à haute et à faible affinité (Forde, 2000).

- La famille de gènes *NRT2*

Les premiers membres de la famille de transporteur de nitrate *NRT2* des plantes supérieures, ont été identifiés chez l'orge par homologie de séquences avec le gène *crnA* du champignon *Aspergillus nidulans* (Trueman *et al.*, 1996). Au moins deux autres gènes ont été identifiés chez *Nicotiana plumbaginifolia* (Quesada *et al.*, 1997) et sept ou dix gènes chez l'orge (Trueman *et al.*, 1996). Actuellement sept gènes appartenant à la famille *NRT2* (*AtNRT2.1* à *AtNRT2.7*), sont décrits chez *Arabidopsis thaliana* (Orsel *et al.*, 2002). Sur la base d'une forte induction par le nitrate, *AtNRT2.1* a été identifié comme le gène codant au

moins en partie pour le système de transport IHATS (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur et Daniel-Vedele, 1999). En fonction de leur réponse à un apport de 1mM de NO_3^- , les sept gènes ont été regroupés en trois catégories. La première catégorie comprend les gènes *AtNRT2.1* et *AtNRT2.2*, dont l'expression augmente jusqu'à 5 fois après 3h d'exposition, puis sont réprimés à partir de 72h. La deuxième catégorie comprend les gènes exprimés de façon constitutive (*AtNRT2.5* et *AtNRT2.6*), ne présentant aucun phénomène d'induction par le NO_3^- . Enfin, la troisième catégorie comprend les gènes dont l'expression est réprimée après un apport de NO_3^- (*AtNRT2.4* et *AtNRT2.7*; Okamoto *et al.*, 2003).

Les transporteurs NRT2 d'*Arabidopsis* sont principalement exprimés dans la racine, *AtNRT2.1* étant le plus abondamment exprimé (Orsel *et al.*, 2002).

Cependant, *AtNRT2.3* et *AtNRT2.5* sont aussi exprimés dans les parties aériennes et le gène *AtNRT2.7* est préférentiellement exprimé dans les feuilles (Okamoto *et al.*, 2003).

- La famille de gènes *NRT1*

Le gène *AtNRT1.1*, identifié initialement chez *Arabidopsis thaliana*, code un système de transport qui intervient aux faibles et aux fortes concentrations en nitrate (Liu *et al.*, 1999; Liu et Tsay, 2003). L'analyse du séquençage complet d'*Arabidopsis thaliana* révèle que les gènes *AtNRT1* constituent une famille de transporteurs du nitrate plus grande (52 gènes) que ceux de *AtNRT2*. Le premier gène de la famille NRT1, *AtNRT1.1*, a été isolé grâce à un mutant d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* résistant au chlorate, analogue toxique du nitrate. Il est principalement exprimé dans les racines et rapidement induit par le nitrate (Tsay *et al.*, 1993). Il est également exprimé dans les jeunes organes en formation, avec un possible rôle dans le développement de la plante et en particulier celui des racines primaires et secondaires (Guo *et al.*, 2001). *AtNRT1.1* aurait également un rôle dans l'ouverture des stomates et participerait à la tolérance au stress hydrique (Guo *et al.*, 2001). Plus récemment, NRT1.1 a été identifié comme un transporteur d'auxine et serait impliqué dans le mécanisme de perception du signal nitrate et le développement des racines secondaire (Krouk *et al.*, 2010). Comme pour *AtNRT2.1*, le gène *AtNRT1.1* est inductible par le nitrate, et il est réprimé lors d'une période de carence en nitrate (Lejay *et al.*, 1999). Le gène *AtNRT1.2* joue un rôle important dans la composante constitutive du système d'absorption à faible affinité du nitrate, que ce soit au niveau racinaire ou au niveau foliaire (Okamoto *et al.*, 2003). Enfin, Le gène *AtNRT1.5* serait impliqué dans le transport du nitrate dans le xylème (Canivenc, 2005).

Les transporteurs de nitrate sont finement régulés en fonction de la source d'azote disponible et du statut nutritionnel de la plante. Une régulation serait exercée négativement

par les produits de l'assimilation du nitrate tels que l'ammonium et les acides aminés (Cooper et Clarkson, 1989; Muller *et al.*, 1995; Vidmar *et al.*, 2000), et positivement par les produits issus de la photosynthèse, comme le saccharose (Lejay *et al.*, 1999).

Le nitrate absorbé par les racines est selon les espèces assimilé dans les racines et/ou dans les feuilles. Il est réduit dans le cytosol en nitrite par la nitrate réductase (NR ; EC 1.6.6.1), puis en ammonium dans les plastes, par la nitrite réductase (NiR; EC 1.7.7.1).

La régulation de l'expression de ces deux enzymes a été largement décrite dans la littérature tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel (Crawford, 1988, 1995)

B. Absorption et assimilation de l'ammonium

- Au niveau physiologique

L'absorption de l'ammonium nécessite également l'intervention des deux systèmes de transport HATS et LATS. Le système HATS fonctionne pour des concentrations en ammonium inférieures à 1 mM, avec une cinétique de transport de type Michaelis-Menten. Selon les espèces, le K_m varie de 10 à 170 μM (Glass et Siddiqi, 1995). Le transport d'ammonium via ce système est accompagné d'une forte dépolarisation membranaire, il est de type uniport énergie dépendant, ou symport proton dépendant (Wang *et al.*, 1994). Le système LATS fonctionne lorsque la concentration en ammonium est supérieure à 1mM et n'est pas saturable (Glass et Siddiqi, 1995). Le transport d'ammonium n'est pas énergie dépendant, suggérant que ce système facilite la diffusion passive de l'ammonium.

- Au niveau moléculaire

AtAMT1.1 a été le premier gène identifié chez *Arabidopsis thaliana* grâce à la complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) déficient pour le transport de l'ammonium (Ninnemann *et al.*, 1994). La famille des gènes *AMT1* responsables du transport à haute affinité du NH_4^+ , comporte cinq membres, parmi lesquels *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* et *AtAMT1.3* ont été les plus étudiés (Gazzarini *et al.*, 1999). Les trois gènes sont exprimés dans les racines, alors que seul *AtAMT1.1* est également exprimé au niveau foliaire (Ninnemann *et al.*, 1994). Lors d'une carence azotée, le niveau de transcrits de *AtAMT1.1* augmente de sept fois durant les 24 premières heures (Rawat *et al.*, 1999). De la même façon, *AtAMT1.3* est fortement induit par une déficience en azote dans le milieu alors qu'aucun changement n'est observé pour *AtAMT1.2* (Gazzarini *et al.*, 1999). La régulation de ces gènes est corrélée avec les changements d'activité des systèmes de transport de l'ammonium. Elle serait principalement régulée par la concentration en N de la rhizosphère, à

la différence de la régulation par le statut azoté de la plante dans le cas de l'absorption du nitrate (Gansel *et al.*, 2001). La glutamine exercerait aussi un rétrocontrôle négatif sur la transcription du gène *AtAMT1.1* (Rawat *et al.*, 1999).

AtAMT2 est un transporteur d'ammonium qui a un lointain rapport avec les cinq membres de la famille des transporteurs *AtAMT1*. D'après Ludewig *et al.* (2001), il est plus proche des transporteurs d'ammonium des procaryotes que ceux présents chez les plantes.

Le gène *AtAMT2* est exprimé dans différents organes d'*Arabidopsis*. Au niveau racinaire, son expression est régulée par la concentration en N du milieu. Il est partiellement réprimé par des concentrations élevées en nitrate d'ammonium et il est, à l'inverse des gènes *ATNRT2*, induit lors d'une période de carence. Cette régulation a été moins clairement établie au niveau des parties aériennes. L'étude de l'expression de la protéine *AtAMT2* dans les cellules épidermiques des feuilles indique une localisation membranaire de cette dernière. Le gène *AtAMT2* jouerait donc un rôle important dans le recyclage de l'ammonium issu du métabolisme photorespiratoire (Sohlenkamp *et al.*, 2002).

- Assimilation de l'ammonium

L'ammonium est un composé toxique qui ne peut pas s'accumuler dans les cellules végétales. Son assimilation ou sa réassimilation est donc une nécessité vitale pour les plantes. Il est généré lors de différents processus comme la réduction du nitrate, la photorespiration, le catabolisme protéique ainsi que le catabolisme de certains acides aminés, comme l'asparagine, ou des uréides (allantoïne, acide allantoïque), dont la dégradation conduit à la formation d'ammonium et de CO₂ (Blevins, 1989; Mifflin et Lea, 1980).

Chez les végétaux supérieurs, plusieurs enzymes sont potentiellement capables de catalyser l'incorporation de l'ammonium dans des molécules organiques sous forme de groupements amine ou amide. La glutamine synthétase (GS), la glutamate synthase (GOGAT), et la glutamate déshydrogénase (GDH) sont les principales enzymes impliquées dans l'assimilation de l'ammonium. La glutamine synthétase et la glutamate synthase catalysent le transfert de l'ammonium dans une molécule organique. L'ion ammonium est incorporé au glutamate par la glutamine synthétase pour former la glutamine (fig. I-3). Le groupement amide de la glutamine est ensuite transféré à un acide cétonique, l' α -cétoglutarate (α -KG) par la glutamate synthase (GOGAT). Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une est utilisée comme substrat de la glutamine synthétase pour la formation de glutamine, l'autre est une source d'azote organique pour les réactions de transamination qui aboutissent à la synthèse de l'ensemble des acides aminés comme l'aspartate, impliquant

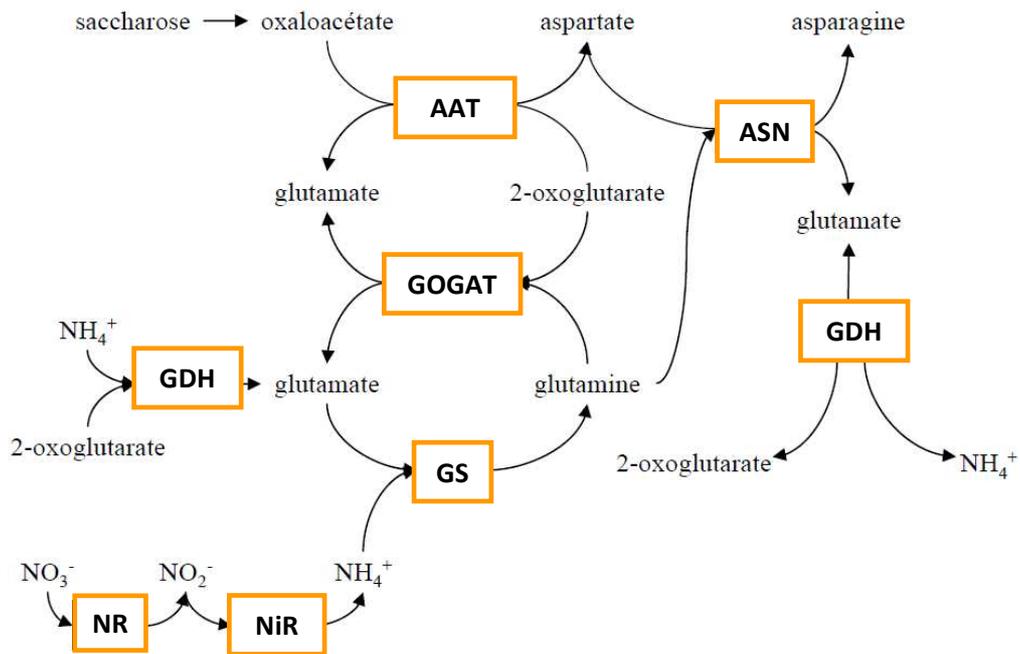


Figure I-3. Voie d'assimilation de l'azote. GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; AAT, aspartate aminotransferase; ASN, asparagine synthetase; GDH, glutamate deshydrogenase; NiR, nitrite réductase; NR, nitrate réductase (d'après Coruzzi, 2003).

l'enzyme aspartate aminotransférase (AAT), et l'asparagine via l'asparagine synthétase (ASN, fig. I-3). Glutamine, glutamate, aspartate et asparagine, sont les composés majoritairement utilisés pour le transport de l'azote organique chez les plantes (Hirel et Lea, 2001; Peoples et Gifford, 1993).

La glutamate déshydrogénase (GDH) a d'abord été considéré comme l'enzyme principale de l'assimilation de l'ammonium. La découverte de la glutamate synthase (GOGAT, Lea et Mifflin, 1974) a ensuite permis de mettre en évidence le rôle majeur de la GS dans l'assimilation de l'ammonium. La GDH jouerait un rôle complémentaire au cycle GS/GOGAT, notamment dans la réassimilation de l'ammonium en conditions de stress ou dans certains stades spécifiques du développement (Rhodes *et al.*, 1989; Yamaya *et al.*, 1986).

La glutamine synthétase (GS; E.C. 6.3.1.2) a d'abord été purifiée et caractérisée à partir de plantes en 1953 (Elliott, 1953). Une de ces caractéristiques, est sa forte affinité pour l'ammonium et donc sa capacité à intégrer efficacement l'ammonium dans des molécules organiques. Il existe deux isoenzymes de glutamine synthétase :

- La glutamine synthétase cytoplasmique (GS1) est présente principalement dans les racines et plus généralement dans les tissus non photosynthétiques. Cependant, de nombreuses études ont montré la localisation de la GS1 dans le phloème et les tissus vasculaires (Tobin et Yamaya, 2001). Le niveau d'expression de GS1 dans les tissus du mésophylle dépend de l'âge de la plante et du stade de développement. Chez le tabac, elle joue un rôle important dans les processus de remobilisation de l'azote pendant la sénescence (Brugière *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, cinq gènes codant pour l'isoforme cytoplasmique (*GLN1.1* à *GLN1.5*), ont été identifiés. *GLN1.1*, *GLN1.2*, et *GLN1.3* sont principalement exprimés dans les racines et les feuilles sénescentes (Bernhard et Matile, 1994; Peterman et Goodman, 1991). Les gènes *GLN1.4* et *GLN1.5* seraient respectivement induits lors de la sénescence foliaire et lors de la germination des graines (Pourtau *et al.*, 2006).
- La glutamine synthétase chloroplastique (GS2) est l'isoforme majoritaire présente dans les tissus photosynthétiques. Elle jouerait un rôle prépondérant dans l'assimilation de l'ammonium issu de la réduction du nitrate dans les chloroplastes et/ou dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire (Tobin et Yamaya, 2001). Un seul gène codant pour la forme chloroplastique (*GLN2*) a été identifié chez

Arabidopsis. Son expression serait détectable uniquement dans les jeunes feuilles vertes et serait induit par la lumière (Bernhard et Matile, 1994).

Le niveau de transcrits de la GS est régulé par les molécules carbonées et azotées (Oliveira et Coruzzi, 1999). Des effets positifs de l'ammonium et/ou du nitrate sur l'expression des gènes GS ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces. Dans certains cas, ces deux formes d'azote minéral augmentent l'activité GS et le niveau de transcrits du gène, alors que l'effet de la concentration en ammonium et en nitrate sur l'expression des gènes de GS varient selon les espèces et selon les différentes familles multigéniques considérées (Sechley *et al.*, 1992).

La glutamate synthase (GOGAT) présente deux types d'activité, une qui utilise le pouvoir réducteur de la ferrédoxine (Fd-GOGAT; E.C. 1.4.7.1) et l'autre dépendante des pyridines nucléotides (NADH-GOGAT; E.C. 1.4.1.13 ; Hirel et Lea, 2001). La Fd-GOGAT est abondante dans les chloroplastes. Elle est essentielle pour la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire (Somerville et Ogren, 1980), et son activité est souvent supérieure à celle de la NADH-GOGAT (Suzuki et Gadal, 1984). La NADH-GOGAT est surtout présente dans les organes non chlorophylliens et serait impliquée dans l'assimilation primaire de l'ammonium. Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour la Fd-GOGAT (*GLU1* et *GLU2*; Coschigano *et al.*, 1998), et un seul pour la NADH-GOGAT (*GLT1*). Le gène *GLU1* est exprimé majoritairement dans les feuilles et est régulé par la lumière, alors que *GLU2* est exprimé dans les racines. *GLT1* est constitutif, faiblement exprimé dans les feuilles mais fortement dans les racines (Coruzzi, 2003).

La glutamate déshydrogénase (GDH; E.C. 1.4.1.2) qui catalyse *in vitro* l'amination réductrice et réversible du 2-oxoglutarate en glutamate, joue un rôle clé dans le métabolisme du glutamate (fig. I-3). Cependant, d'autres études indiquent que, *in vivo*, la GDH catalyse aussi la désamination oxydative du glutamate en ammonium. Le rôle physiologique de la GDH reste toujours controversé (Dubois *et al.*, 2003; Mifflin et Habash, 2002). Actuellement, il est admis que la GDH ne joue aucun rôle essentiel dans l'assimilation de l'azote, mais son rôle potentiel dans l'assimilation de l'ammonium dans certaines conditions physiologiques ne peut pas être écarté (Dubois *et al.*, 2003). Par exemple, la GDH opérant dans le sens d'une amination en réponse à des niveaux élevés d'ammonium, montre l'importance de cette enzyme dans la détoxification de cet élément. Deux études récentes ont également montré que

la GDH intervient dans l'assimilation de l'ammonium lors d'un stress salin (Skopelitis *et al.*, 2006; Tercé-Laforgue *et al.*, 2004). Lorsque le cycle GS/GOGAT est altéré ou saturé durant la sénescence foliaire, la GDH aurait une fonction aminante et un rôle dans l'assimilation du NH_4^+ issus de l'activité photorespiratoire (Osuji *et al.*, 1996). Inversement, si la GDH opère dans le sens d'une désamination, elle peut alimenter le cycle de l'acide tricarboxylique en molécules carbonées pour la production d'énergie lors de conditions limitantes en carbone (Rhodes *et al.*, 1989; Robinson *et al.*, 1992; Aubert *et al.*, 2001; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1991; Mifflin et Habache, 2002; Dubois *et al.*, 2003).

La GDH présente un profil isoenzymatique complexe chez la plupart des plantes, lié à l'assemblage aléatoire de deux types de sous-unités, α et β , pour former sept isoformes hexamérique, qui peuvent être détectées par électrophorèse sur gel natif (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1991; Osuji *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, les deux sous-unités sont codées par deux gènes distincts : un gène codant la sous-unité α -GDH (GDH2, TAIR: At5g07440) et un autre codant la sous-unité β -GDH (GDH1, TAIR: At5g18170 ; <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1>, *Arabidopsis thaliana* Genome Project). Récemment, des études *in vivo* utilisant des plantes de tabac transgéniques, modifiées dans l'expression des gènes codant pour les deux sous unités α et β , montrent que dans des conditions de croissance normale, la GDH1 (sous-unité β), aurait une fonction désaminante du glutamate (Purnell et Botella., 2007), tandis que la GDH2 (sous-unité α) présente une forte activité désaminante et une très faible amination (Skopelitis *et al.*, 2007).

L'enzyme GDH est abondante dans les différents organes de la plante avec une localisation mitochondriale. Une étude immunocytochimique, montre que chez les plantes supérieures, la protéine GDH est localisée dans les mitochondries des cellules phloémiques et dans le cytosol des organes ou des tissus sénescents (Dubois *et al.*, 2003). Ceci suggère que cette enzyme joue un double rôle au niveau du phloème, soit dans les mitochondries lorsque les disponibilités en azote minéral sont faibles ou dans le cytosol lorsque les concentrations en ammonium atteignent un seuil de toxicité (Tercé-Laforgue *et al.*, 2004).

II.3. Engrais uréiques

L'urée [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] est une molécule largement présente dans le milieu naturel. Elle constitue une source d'azote pour la croissance de divers organismes dont les bactéries, les champignons et les plantes. En raison de sa teneur élevée en azote et son faible coût de production, l'urée représente plus de 50% du total des engrais azotés appliqués dans l'agriculture (fig. I-4), en particulier dans les pays en voie de développement.

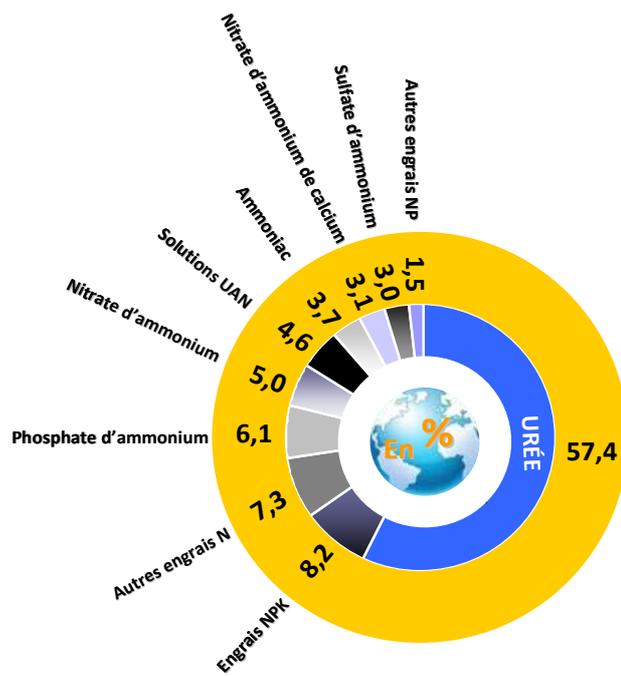


Figure I-4. Engrais azotés : consommation dans le monde (exprimé en % ; source : International Fertilizer Industry Association IFA, 2009).

Lorsque l'urée est appliquée au sol, elle est rapidement hydrolysée en ammonium, grâce à l'action des uréases de la microflore, puis en nitrate. L'urée est alors sujette à différents mécanismes de pertes d'azote, comme la volatilisation ammoniacale, le lessivage ou la dénitrification (fig. I-5). L'hydrolyse de l'urée favorise l'augmentation du pH du sol, et conduit à des pertes d'azote sous forme d'ammoniac (NH_3), surtout si l'urée est appliquée en surface (Nohrstedt *et al.*, 2000). Ces pertes par volatilisation sont courantes, pouvant aller jusqu'à 60% de l'N apporté. Afin de minimiser ce phénomène, l'urée est incorporée dans le sol juste après son application, soit par le travail du sol ou par irrigation. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs d'uréases est la solution la plus récemment envisagée pour réduire les émissions ammoniacales (cf. III.3).

A. Données économiques

A.1. Production

La production mondiale des engrais a fortement augmenté au cours des 50 dernières années. Dans son ensemble, la consommation a augmenté de 40% entre 1980 et 2006 (fig. I-6). L'Asie de l'Est (plus particulièrement la Chine) demeure le principal producteur d'urée dans le monde (fig. I-7), avec 44% de la production mondiale, soit 28,9 millions de tonnes d'N produites en 2007. Le deuxième grand acteur régional, l'Asie du Sud (dont les principaux acteurs sont l'Inde et le Pakistan), totalise 19% de la production mondiale, soit 12,5 millions de tonnes d'N.

Une grande partie de la production, notamment asiatique, est destinée à la consommation locale et 25% de la production est destinée aux échanges. Cinq pays détiennent 52% des exportations mondiales, à savoir la Chine, la Russie, l'Arabie Saoudite, le Qatar et l'Égypte.

Des évolutions substantielles des capacités de production sont attendues en Égypte et en Algérie, où plusieurs projets sont envisagés à l'horizon 2013 et qui devraient renforcer leur rôle d'acteur clef dans la production d'urée en Afrique du nord. L'Iran, le Qatar et Oman sont des acteurs importants du moyen orient et comptent doubler leur capacité de production à moyen terme.

A.2. Consommation

Jusqu'aux années 1960, l'urée représentait seulement 5% de la consommation mondiale des engrais azotés. Son utilisation a connu une accélération à partir des années 1980

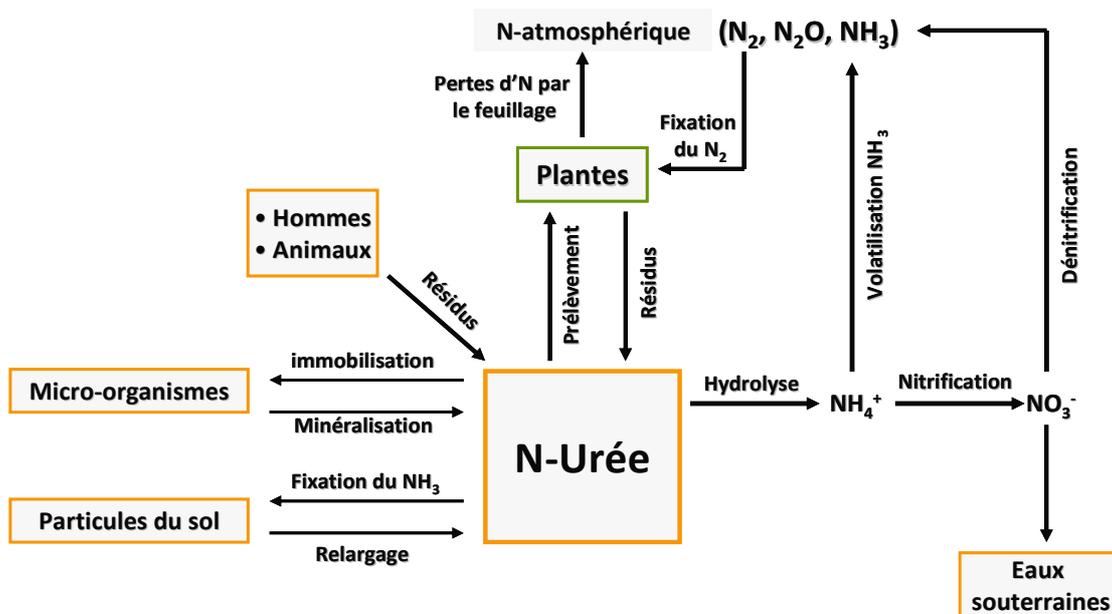


Figure I-5. Dynamique de l'urée dans le sol (Prasad, 1998).

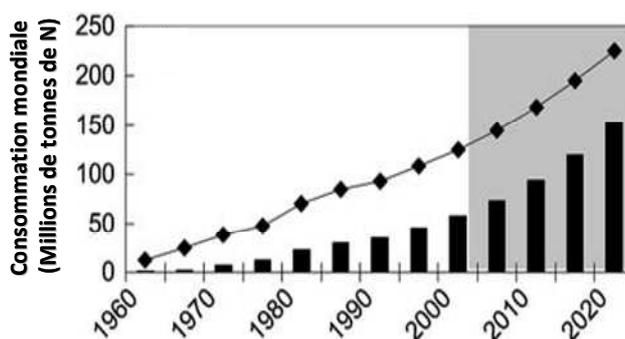


Figure I-6. Evolution de la consommation mondiale des engrais azotés (courbe) et de l'urée (histogrammes ; Glibert *et al.*, 2006).

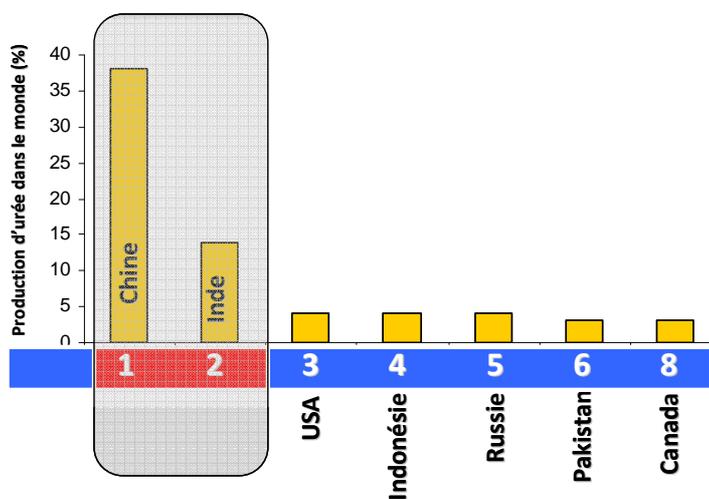


Figure I-7. Production d'urée en 2007 par pays (exprimé en %; IFA, 2009).

pour atteindre 40% du total des engrais azotés commercialisés en 1990 (fig. I-6 ; Glibert *et al.*, 2006). Aujourd'hui, 57,4% des engrais azotés sont sous forme uréique (fig. I-4).

La Chine et l'Inde sont les premiers consommateurs d'urée dans le monde et ont vu leur consommation doubler, voir quadrupler entre 1980 et 2006 pour déclasser les Etats-Unis de leur position de leader. La consommation de fertilisants en France a également connue un déclin, passant de 5,5 millions de tonnes dans les années 1980 à 3,5 millions de tonnes d'N en 2006, représentant environ 2% du marché mondial. Sa consommation en urée reste également très faible (0,2 millions de tonnes en 2000, soit 0,5% de la consommation mondiale).

En supposant que la consommation mondiale de l'urée augmente de 5% chaque année, elle pourrait atteindre 70% de la consommation totale des engrais d'ici la fin de la future décennie (fig. I-6). La majeure partie de cette augmentation devrait se produire dans les pays en développement, en particulier en Asie et en Amérique latine (Glibert *et al.*, 2006).

B. L'urée comme source d'azote pour les plantes

L'urée constitue donc une source azotée qui peut en tant que telle être prélevée par les plantes à partir de la solution du sol. Mais elle est également un intermédiaire du catabolisme de l'arginine dans la plante et intervient dans la remobilisation de l'azote à partir de tissus sources. L'azote de l'urée peut être assimilé après son hydrolyse en ammonium et en dioxyde de carbone. Il est généralement admis que les plantes prélèvent principalement l'ammonium et le nitrate issu de la dégradation de l'urée dans le sol, son absorption directe et son hydrolyse *in planta* n'étant jusqu'alors pas considérées comme significatives. Cette opinion est aujourd'hui remise en question depuis la découverte des transporteurs d'urée chez les plantes ainsi que leur capacité à assimiler et utiliser l'azote uréique pour leur croissance. Ceci a été démontré en conditions contrôlées afin d'éviter toute conversion de l'urée dans le milieu, comme son hydrolyse et sa transformation par les processus de nitrification. Cependant, comparativement à des plantes alimentées en nitrate ou en ammonium, une nutrition uréique stricte conduit à une diminution de la croissance et parfois à l'apparition de symptômes de carence azotée (Gerendás *et al.*, 1998; Gerendás et Sattelmacher, 1999; Mérigout *et al.*, 2008). Les raisons de ces symptômes sont encore mal connues, mais peuvent s'expliquer par un dérèglement osmotique et de l'homéostasie cellulaire (Gerendás et Sattelmacher, 1997), ou par une répartition endogène de l'azote inefficace (Cao *et al.*, 2010). Lorsque les plantes sont alimentées en urée, la concentration en azote et en acides aminés, en particulier la glutamine et l'asparagine, augmente (Cao *et al.*, 2010; Mérigout *et al.*, 2008). Cette augmentation peut contribuer à la diminution de la croissance des plantes. En effet, les concentrations élevées en

amide et acides aminés, qui indiqueraient un statut azoté important, conduiraient à une réduction du prélèvement de l'azote et de sa distribution au sein de la plante.

En tant que fertilisant azoté, l'urée est un engrais de choix de par sa richesse en azote. C'est une molécule non polaire fortement soluble, idéale pour un usage en pulvérisation foliaire, de même qu'en mélange avec d'autres fertilisants, pesticides ou herbicides. Son utilisation par pulvérisation foliaire est optimale et facilite la gestion de la fertilisation azotée lorsque les conditions de croissance sont défavorables, ou lorsque l'absorption racinaire est réduite (lors d'un stress hydrique ou salin par exemple). Cependant, l'urée directement absorbée au niveau foliaire provoque des brûlures du feuillage et des nécroses (Gooding et Davies, 1992; Nicoulaud et Bloom, 1996). Ces symptômes de phytotoxicité sont d'autant plus sévères que la température est forte, l'humidité faible, et que la solution d'urée pulvérisée est concentrée (Krogmeier *et al.*, 1989; Nicoulaud et Bloom, 1996; Witte, 2001). Chez la tomate par exemple, un apport d'urée par pulvérisation foliaire permet d'obtenir des rendements et une croissance optimale avec une solution d'urée à 0,2%. Des concentrations supérieures provoquent une diminution de la croissance et des dommages au niveau des feuilles (Nicoulaud et Bloom, 1996).

L'utilisation des engrais à base d'urée ne constitue pas la seule voie d'entrée de l'urée dans l'environnement. Les principales sources d'urée dans la nature émanent des excréments animaux et de la décomposition des molécules azotées des organismes morts. Les plantes sont capables d'utiliser cette urée issue de l'environnement naturel comme source d'azote pour leur croissance. Cependant, l'urée est rapidement hydrolysée par des enzymes des microorganismes du sol. De ce fait, les concentrations en urée du sol dans des environnements naturels sont faibles (<70µM dans des sols agricoles; Becker-Ritt *et al.*, 2007). Les plantes se sont donc adaptées et ont développé des systèmes de transport spécifiques de l'urée.

Les processus impliqués dans l'absorption de l'urée et son assimilation chez les plantes ont été mis en évidence plus ou moins récemment à savoir :

- le transport actif et passif de l'urée,
- l'hydrolyse de l'urée catalysée par une uréase nickel-dépendante,
- l'activation de l'uréase nécessitant trois protéines accessoires.

B.1. Transport à haute affinité de l'urée

Les plantes possèdent un transporteur actif (DUR3), impliqué dans le prélèvement de l'urée à partir du milieu extérieur, mais également dans son transport endogène. AtDUR3 a récemment été cloné et identifié chez *Arabidopsis*, par homologie avec le transporteur

ScDUR3 de levure *Saccharomyces cerevisiae*, comme le transporteur majeur à haute affinité, apportant pour la première fois la preuve du transport actif H^+ /urée chez les plantes (Liu *et al.*, 2003a ; Kojima *et al.*, 2007). AtDUR3 comporte 14 domaines transmembranaires, alors que les extrémités C- et N-terminales sont situées dans la partie extracellulaire. Des mutants d'insertion T-DNA *AtDUR3* présentent des symptômes de carence azotée, une accumulation d'anthocyanes ainsi qu'une plus faible accumulation d'urée dans les tissus racinaires, comparativement aux témoins sauvages (Kojima *et al.*, 2007). Les mesures d'influx d'urée marquée au ^{15}N , montrent également l'implication d'une composante linéaire dans le transport de l'urée chez les mutants, alors que l'absorption de l'urée chez les plantes sauvages suit une cinétique de saturation, avec une constante apparente d'affinité de $4\mu M$ (Kojima *et al.*, 2007).

Afin d'étudier les fonctions physiologiques d'AtDUR3, des études sur le changement de son niveau d'expression ont été effectuées dans différentes conditions de cultures (Liu *et al.*, 2003a). Lorsque les plantes d'*Arabidopsis* sont préalablement cultivées en présence d'azote, puis soumises, pendant trois jours, à une carence azotée, la quantité d'ARNm de *AtDUR3* augmente considérablement dans les racines, alors qu'aucun changement n'est observé dans les feuilles (fig. I-8a et b). Cette réponse transcriptionnelle rappelle la dépression des gènes codant les transporteurs à haute affinité de l'ammonium (AMT2) et du nitrate (NRT2) observée après une carence azotée chez *Arabidopsis thaliana* (Gazzarini *et al.*, 1999; Lejay *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'expression du gène *AtDUR3*, exprimé dans les racines lors d'une carence azotée, est réprimé en présence d'ammonium ou de nitrate dans le milieu de culture, alors qu'il est induit par l'urée (fig. I-8c; Kojima *et al.*, 2007; Mérigout *et al.*, 2008). Ceci suggère que le gène *AtDUR3*, est d'une part, induit en condition de carence azotée et d'autre part, inductible par son substrat comme ceci a déjà été démontré pour le transporteur de nitrate NRT2.1 (Lejay *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999).

Son rôle dans le transport endogène de l'urée est conforté par l'expression de AtDUR3 au niveau du xylème et des parties aériennes, avec une localisation dans la membrane plasmique des cellules épidermiques (Kojima *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003a). Le transport de l'urée des racines vers les parties aériennes a été observé chez les plantes cultivées sur de l'urée et en absence de nickel. Ces plantes accumulent des quantités importantes d'urée dans leurs tissus aériens (Gerendás *et al.*, 1998; Gerendás et Sattelmacher, 1999; Mérigout *et al.*, 2008). L'expression du gène *AtDUR3* lors de la germination des graines et dans les feuilles sénescents (Liu *et al.*, 2003a), suggère aussi son implication dans la remobilisation et le recyclage de l'azote lors de la production d'urée endogène.

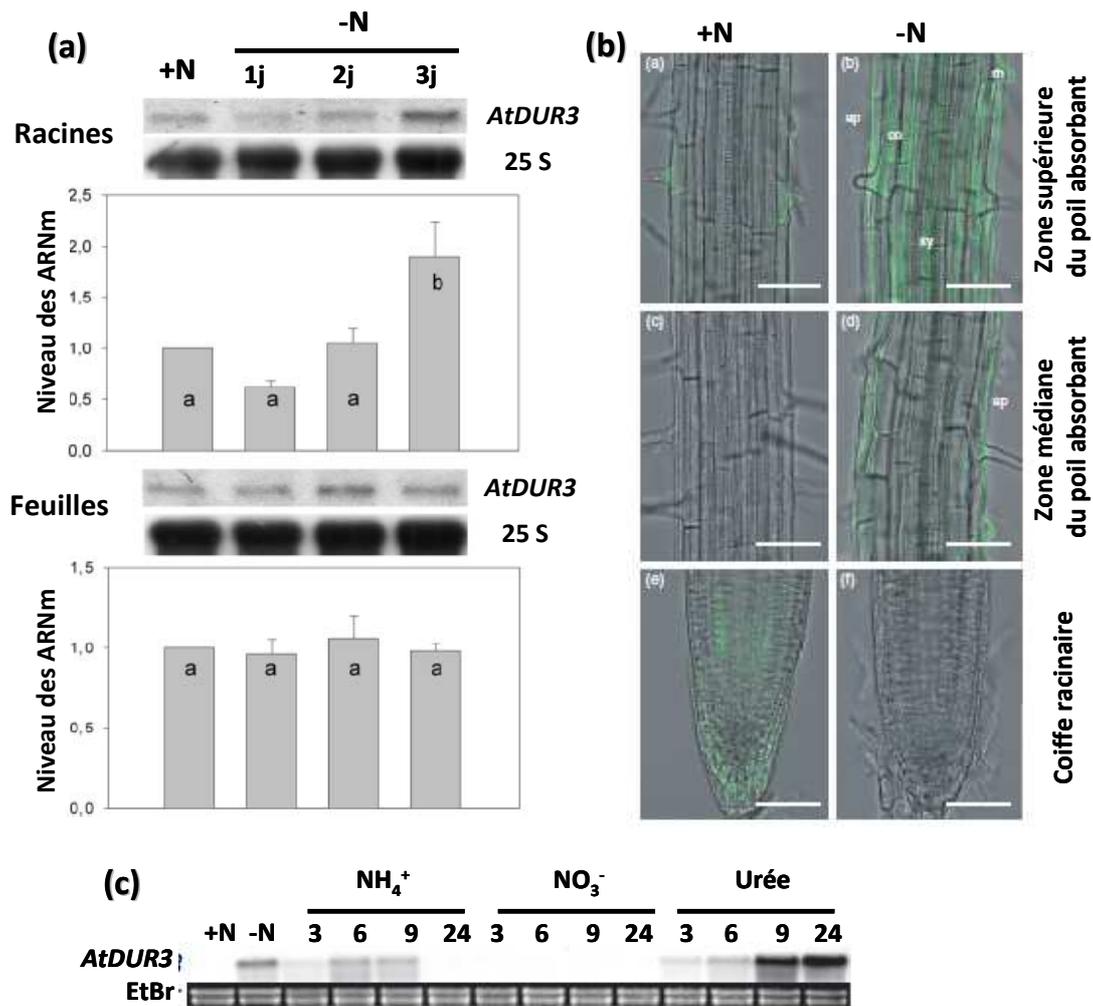


Figure I-8. Régulation de l'expression du gène *AtDUR3* chez *Arabidopsis*, lors d'une carence azotée (a et b) ou en fonction de différentes sources azotées (c).

- (a) : les plantes sont cultivées sur 2mM d'ammonium nitrate (+N) pendant 4 semaines, puis soumises à une carence azotée (-N) pendant 1, 2 ou 3 jours (Liu *et al.*, 2003a).
- (b) : localisation racinaire du promoteur du gène *AtDUR3* couplé à la GFP (Green Fluorescent Protein). Les plantes sont cultivées sur 2mM d'ammonium nitrate (+N) ou en absence de source azotée (-N), pendant 4 jours (Kojima *et al.*, 2007).
- (c) : les plantes Les plantes sont cultivées sur 2mM d'ammonium nitrate (+N) ou en absence de source azotée (-N), pendant 4 jours. Les plantes carencées en azote sont ensuite transférée sur 2mM NH₄⁺ ou NO₃⁻, ou sur 1mM d'urée, pendant 3, 6, 9 ou 24 heures (Kojima *et al.*, 2007).

B.2. Transport passif de l'urée

Le transport passif de l'urée est assuré par les protéines intrinsèques majeures (MIPs), également appelées aquaporines. Ces protéines facilitent le passage de l'eau et des petites molécules neutres, au travers des membranes cellulaires. 35 MIPs répartis en 4 sous-classes ont été recensées chez *Arabidopsis* : les protéines intrinsèques de la membrane plasmique (PIPs), les protéines intrinsèques tonoplastiques (TIPs), les protéines intrinsèques membranaires noduline-26-like (NIPs) et les petites protéines membranaires intrinsèques de base (SIPs ; Forrest et Bhave, 2007).

Le criblage génomique des transporteurs putatifs de l'urée, montre l'existence de quatre TIPs chez *Arabidopsis* (AtTIP1.1, AtTIP1.2, AtTIP2.1, et AtTIP4.1) impliqués dans le transport de l'urée (Liu *et al.*, 2003b). Des membres de la sous-famille PIP et NIP facilite également le transport de l'urée (Dynowski *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 1999). Les protéines PIPs ont un canal relativement étroit et sélectif pour l'eau, permettant un passage lent de l'urée. Tous les canaux de type TIP et NIP transportent suffisamment d'urée pour assurer la croissance du mutant déficient *DUR3* de levures, cultivées en présence d'urée comme source unique d'azote (Dynowski *et al.*, 2008). Par une approche de complémentation hétérologue de mutant de transport de l'urée *ScDUR3* chez la levure, il a été par ailleurs montré que les transporteurs AtTIPs sont insensibles à la concentration en urée et au pH extérieur (Liu *et al.*, 2003b). En parallèle, l'expression hétérologue du gène *AtTIP2.1* dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, accroît l'accumulation du ¹⁴C-urée dans celui-ci indépendamment du pH externe dans une gamme allant de 5 à 8, confirmant ainsi l'approche effectuée par complémentation chez la levure (Liu *et al.*, 2003b). L'accumulation de l'urée dans l'ovocyte de xénope exprimant *AtTIP2.1*, augmente de façon linéaire pour des concentrations en urée dans le milieu externe comprises entre 0 et 30mM (Liu *et al.*, 2003b). Cette cinétique linéaire dépendante de la concentration est typique du transport de substrat par un canal ionique et elle est communément observée chez les transporteurs à faible affinité (LATS).

Les quatre protéines TIP d'*Arabidopsis*, visualisées grâce à la protéine de fusion GFP (Green Fluorescence Protein), sont principalement localisées au niveau des tonoplastes. Cependant, un signal de fluorescence de la protéine GFP-TIP apparaît faiblement au niveau de la membrane plasmique (Liu *et al.*, 2003b). Les quatre protéines sont distribuées dans l'ensemble de la plante. Au niveau des racines, *AtTIP1.1*, *AtTIP1.2*, *AtTIP2.1*, et *AtTIP4.1* sont régulés à l'échelle transcriptionnelle par le statut azoté de la plante, et sont induits lors d'une carence azotée et pendant les premiers jours de la germination (Liu *et al.*, 2003b). Par ailleurs, deux MIPs (At2g29870 et At2g34390) sont spécifiquement induites par l'urée au

niveau des racines et des feuilles d'*Arabidopsis*. Cette induction est accompagnée d'un prélèvement de l'urée par les plantes, mais seulement si aucune autre source d'azote n'est présente dans le milieu (Mérigout *et al.*, 2008). L'expression de TIP1.5, dans le tube pollinique et sa localisation mitochondriale, suggère également un rôle des aquaporines dans le transport de l'urée générée par l'action de l'arginase au niveau des mitochondries (Soto *et al.*, 2010).

C. Les ureases

Les uréases (amidohydrolases urée; E.C. 3.5.1.5) sont un groupe d'enzymes très répandues dans la nature. Elles sont synthétisées par de nombreux organismes incluant les plantes, les bactéries, les champignons, les algues et les invertébrés (Cox *et al.*, 2000; Hirayama *et al.*, 2000; Mobley et Hausinger, 1989; Polacco et Havir, 1979). Elles sont également présentes dans le sol en tant qu'enzymes libres ou liées aux particules colloïdales du sol. Leur fonction essentielle est de permettre aux organismes d'utiliser l'urée comme source d'azote pour leur croissance (Andrews *et al.*, 1984; Mobley et Hausinger, 1989). L'uréase exerce une fonction catalytique aboutissant à l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. La première étape est une dégradation enzymatique de l'urée en ammoniac et carbamate. Ce dernier est ensuite spontanément hydrolysé formant une deuxième molécule d'ammoniac, et du dioxyde de carbone (fig. I-9A; Dixon *et al.*, 1975). La présence d'un centre métallique dans son site actif, qui requiert deux atomes de nickel pour son activation est la principale caractéristique commune à toutes les uréases (Dixon *et al.*, 1975).

Toutes les uréases ont une structure trimérique de base. Chez les bactéries, chaque unité de ce trimère est lui-même un hétérotrimère constitué de trois sous-unités : [UreA, UreB, et UreC], formant une structure (UreABC)₃ avec un seul site actif (Carter *et al.*, 2009). En terme de séquences et de structure, les uréases des plantes sont similaires à celles des bactéries (Balasubramanian et Ponnuraj, 2010; Witte *et al.*, 2005), mais chez les végétaux, les sous-unités UreA, UreB, et UreC sont fusionnées de façon colinéaire formant une seule chaîne polypeptidique d'environ 90kDa.

L'activité uréasique a été détectée chez de nombreuses plantes (Hogan *et al.*, 1983; Witte et Medina-Escobar, 2001). C'est une enzyme ubiquiste, présente dans tous les tissus des plantes, comme par exemple chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et le soja (*Glycine max*; Polacco et Winkler, 1984; Witte *et al.*, 2001), et elle serait inductible par l'urée chez le riz (*Oryza sativa*; Matsumoto *et al.*, 1966), le haricot sabre (*Canavalia ensiformis*; Matsumoto

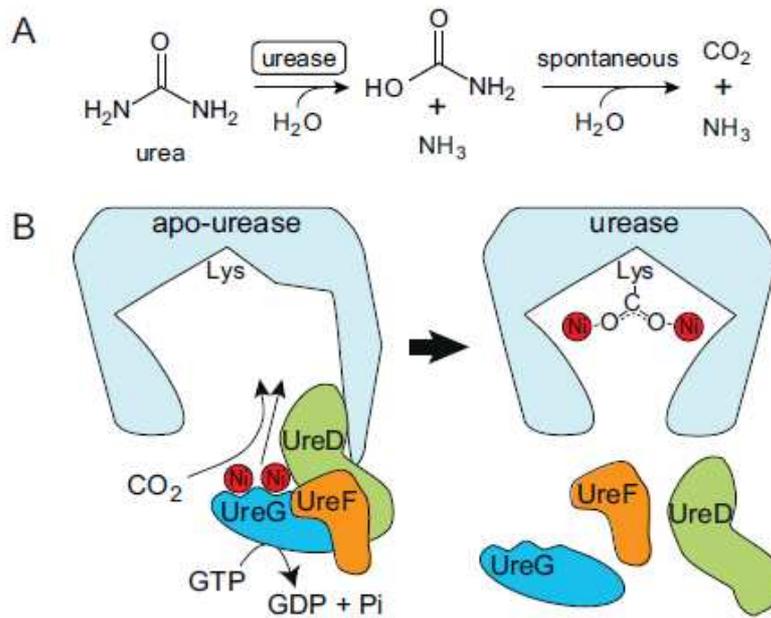


Figure I-9. Réaction de l'uréase (A) et modèle d'activation de l'uréase chez les plantes (B), impliquant la liaison des trois protéines accessoires (UreD, UreF et UreG) à l'apo-uréase, la carboxylation d'un site actif au niveau de la lysine et l'incorporation de deux atomes de nickel par site actif (Witte, 2011).

et al., 1968), et l'orge (*Hordeum vulgare*), chez qui il existe différentes isoformes d'uréases (Chen et Ching, 1988). Par ailleurs, il est généralement admis que l'uréase est cytosolique car elle ne contient pas de cible subcellulaire apparente ni de peptide signal, et du fait que ses protéines accessoires soient également cytosoliques (Witte, 2011).

Le soja (*Glycine Max*), qui est la plante modèle pour l'étude de l'uréase, contient deux uréases : une uréase embryon-spécifique codée par le gène *Eu1* (*Glyma05g27840*; Meyer-Bothling *et al.*, 1987) et une uréase ubiquiste retrouvée dans tous les tissus et codée par le gène *Eu4* (*Glyma11g37250*; Torisky *et al.*, 1994). L'isoenzyme embryonnaire représente 0,2% à 0,5% des protéines totales de la graine, et son activité est 1000 fois plus importante que l'uréase ubiquiste (Goldraij *et al.*, 2003; Polacco et Holland, 1993). L'étude des mutants des gènes *Eu1* et *Eu4* chez le soja montre que la perte de l'activité uréasique conduit à une accumulation de l'urée dans les tissus végétaux et à des nécroses aux extrémités des feuilles (Stebbins *et al.*, 1991). L'uréase ubiquiste est à l'origine de l'assimilation de l'urée exogène et du recyclage de l'urée dérivée du métabolisme de la plante. Par ailleurs, les mutants de soja, qui ne possèdent pas d'uréase embryonnaire, ne présentent aucune anomalie associée à l'accumulation de l'urée. Par conséquent, il a été suggéré que l'uréase embryonnaire n'a pas de rôle physiologique essentiel lié à l'hydrolyse de l'urée (Stebbins *et al.*, 1991). Des études *in vitro* avec des cotylédons de pois (Lea *et al.*, 1979) et des plantules de soja (Stebbins et Polacco, 1995; Thompson *et al.*, 1977) indiquent que cette uréase ne joue aucun rôle nutritionnel et n'est pas impliquée dans l'assimilation de l'azote uréique. Il a été suggéré que cette isoenzyme serait impliquée dans la défense des plantes (Polacco et Holland, 1993). La blessure de l'embryon immature générerait la libération d'arginase par dégradation des mitochondries. L'urée issue de l'action de l'arginase serait alors hydrolysée par l'uréase puis convertie en ammoniac, qui serait toxique pour les champignons et certains insectes (Carlini et Polacco, 2008; Follmer *et al.*, 2004).

D. Les protéines accessoires de l'uréase

L'activation des uréases constitue un processus complexe. Pour les apo-uréases des bactéries et des plantes, la participation de plusieurs protéines accessoires, ainsi que la présence de nickel, est indispensable afin de former une uréase active (fig. I-9B). Ces protéines semblent agir comme des protéines chaperonnes uréase-spécifiques (Mobley *et al.*, 1995). Le processus d'activation le mieux caractérisé est celui de *Klebsiella aerogenes*. Quatre protéines accessoires (UreD, UreF, UreG et UreE) sont nécessaires pour l'activation de

l'uréase, impliquant la carboxylation d'un site actif de lysine et l'incorporation de deux atomes de nickel par site actif, qui sont liés à la lysine par un groupe carboxyle (Mobley *et al.*, 1995).

L'apo-uréase (codée par les gènes *ureA*, *ureB*, et *ureC*) forme un complexe avec UreD, le complexe U-UreD (uréase-UreD) qui peut à son tour se lier à UreF, puis le complexe U-UreDF est capable de se lier avec UreG formant ainsi un complexe stœchiométrique U-UreDFG, pouvant être isolé à partir de cellules cultivées en absence de nickel (Park et Hausinger, 1995). Enfin, la protéine UreE aurait un rôle dans le transfert du nickel vers le complexe U-UreDFG (Soriano *et al.*, 2000). Après formation du complexe U-UreDFGE, l'hydrolyse du GTP, effectuée par la protéine UreG, est requise pour l'activation de l'uréase (Soriano et Hausinger, 1999). Le complexe se dissocie ensuite, libérant l'uréase active.

Les plantes semblent ne pas posséder de gène présentant des similitudes avec celui de UreE chez les bactéries (Witte *et al.*, 2005). La fonction de la protéine chaperonne UreE des bactéries pourrait être assurée par la protéine UreG (fig. I-9B; Witte, 2011). Comparée aux protéines UreG des bactéries, celles des plantes contiennent une extrémité N-terminale riche en résidus histidine et aspartate qui vont fixer le nickel (Witte *et al.*, 2001). L'identification de la protéine Eu3 est la première preuve fonctionnelle de la présence des protéines accessoires de l'uréase chez les plantes. Le mutant *Eu3* de soja déficient en protéine *ureG* (*Glyma02g20690*) est caractérisé par l'absence des deux activités uréasiques, ubiquiste et embryonnaire (Freyermuth *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, un ensemble de protéines accessoires de l'uréase a été identifié. L'étude de mutant knockout d'*Arabidopsis* pour UreD (At2g35035), UreF (At1g21840), UreG (At2g34470) et uréase (At1g67550), et la perte d'une seule de ces protéines provoque une perte de l'activité et ces mutants sont alors incapables de croître sur de l'urée (Witte *et al.*, 2005). Il semblerait que UreF et UreG forment un noyau catalytique structurellement conservé, nécessaire à l'activation de l'uréase, alors que UreD permet la fixation de ce noyau à l'uréase (fig. I- 9B; Witte, 2011).

E. Sources métaboliques de l'urée

Dans les cellules végétales, les uréases participent au métabolisme des composés azotés (Follmer, 2008; Wang *et al.*, 2008). En plus de sa provenance du milieu extérieur, l'urée est un composé intermédiaire important résultant de deux processus métaboliques : la dégradation de l'arginine par les arginases (Zonia *et al.*, 1995), et la dégradation des purines et des uréides (Todd *et al.*, 2006; Winkler *et al.*, 1988). En combinaison avec l'arginase, l'uréase participe à l'utilisation des réserves protéiques des graines lors de la germination (Thompson, 1980).

Le catabolisme de l'arginine par l'arginase (L-Arg amidinohydrolase; E.C. 3.5.3.1) dans la mitochondrie génère l'ornithine et l'urée (fig. I-10). L'ornithine est ensuite convertie en glutamate par le métabolisme mitochondrial (Funck *et al.*, 2008). L'urée est exportée vers le cytoplasme probablement par des aquaporines (Soto *et al.*, 2010), puis hydrolysée par les uréases cytosoliques en ammonium. Ce dernier est assimilé par la glutamine synthétase (GS1 cytosolique). L'azote contenu dans la molécule d'arginine est incorporé dans la glutamine par cette réaction, l'uréase jouant un rôle majeur dans la mobilisation de cet azote. L'arginine est également un précurseur pour la biosynthèse des polyamines, molécules impliquées dans la croissance, le développement et les réponses aux stress abiotiques (Martin-Tanguy, 2001). Beaucoup de graines de fabacées sont riches en canavanine, un acide aminé structurellement proche de l'arginine et impliqué dans la défense des plantes (Rosenthal, 2001). Ce composé peut également être dégradé par l'arginase en canaline et en urée (Dabir *et al.*, 2006). Le catabolisme de l'arginine est central pour la remobilisation de l'azote des tissus sources. Chez les arbres, l'arginine est un acide aminé important pour le stockage et le transport de l'azote (Rennenberg *et al.*, 2010). Il est également le métabolite majeur de stockage de l'azote dans les graines de plusieurs espèces végétales (Vanetten *et al.*, 1967). La biosynthèse de l'arginine au cours du développement de la graine s'effectue au niveau des plastides (Slocum, 2005).

Lors de la germination, l'activité arginase augmente (Cao *et al.*, 2010; Goldraij et Polacco, 1999) et l'arginine est dégradée au niveau de la mitochondrie (Goldraij et Polacco, 2000; Polacco et Holland, 1993). L'importance de l'uréase dans le recyclage du N-arginine durant la germination a été mise en évidence (Zonia *et al.*, 1995). Chez *Arabidopsis*, la germination des graines est inhibée lorsqu'elles sont traitées avec un inhibiteur d'uréase, et cette inhibition est levée par l'ajout d'une autre source azotée. L'urée s'accumule aussi dans les feuilles sources des plantes âgées, probablement générée par la dégradation des protéines et de l'arginine lors de la remobilisation de l'azote dans les tissus en sénescence (Gerendás *et al.*, 1999).

Le second processus majeur de la production d'urée chez les plantes est le catabolisme des uréides, principalement l'allantoïne et l'allantoate (fig. I-11). Ils sont issus de la dégradation des purines qui sont des composés organiques très riches en azote et structurellement proches de l'urée (Muñoz *et al.*, 2006). Les uréides sont une forme majeure du transport de l'azote chez certaines fabacées.

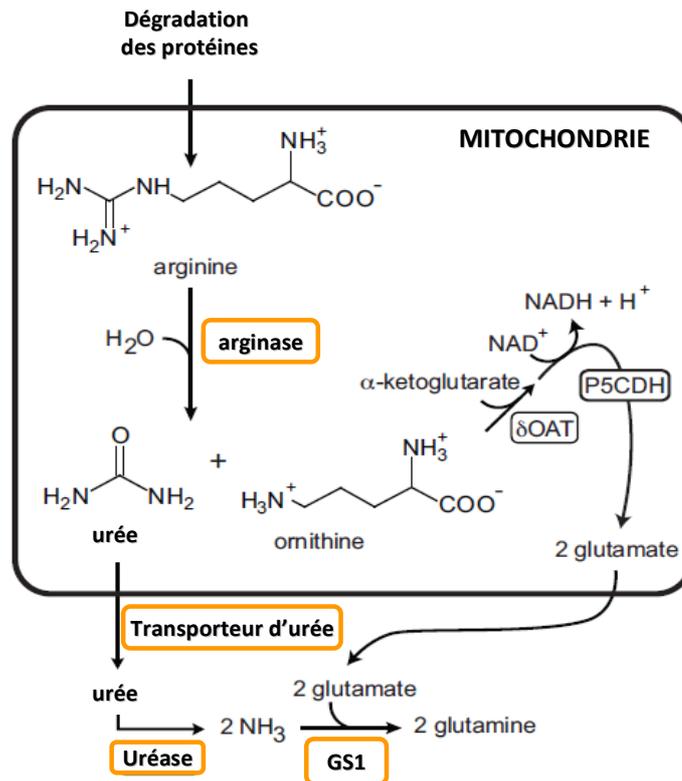


Figure I-10. Voie de dégradation de l'arginine chez les plantes (Witte, 2011).

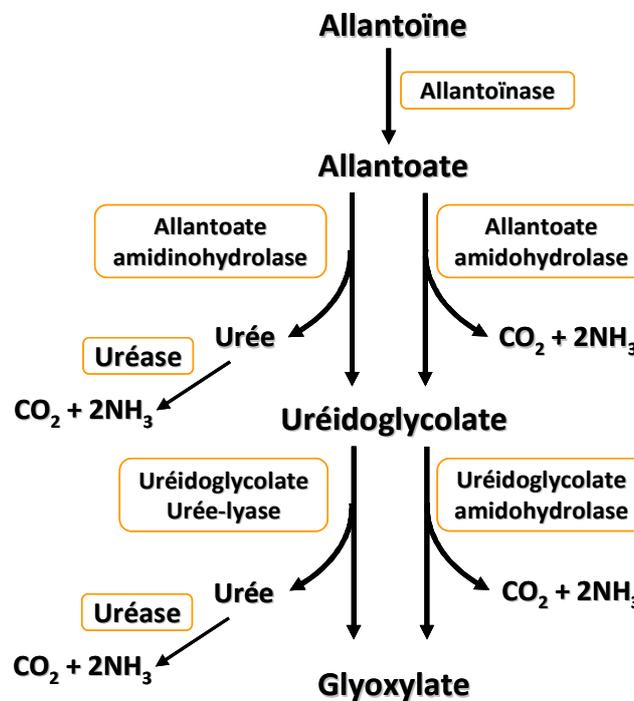


Figure I-11. Voies de dégradation des uréides chez les plantes (Todd et Polacco, 2004).

III. Fertilisation azotée et questions environnementales

Mal maîtrisée, la fertilisation perturbe fortement l'ensemble du cycle de l'azote. Les pertes d'azote du système sol-plante via la lixiviation, le ruissellement ou l'érosion se produisent lors d'une mauvaise synchronisation entre l'offre et la demande en N couplée à des pluies excessives ou des irrigations. L'importance relative de chacune de ces pertes varie d'un site à l'autre et d'année en année. Sous les climats où les précipitations dépassent l'évapotranspiration ou dans le cas des champs irrigués, les pertes par lixiviation peuvent être considérables. Enfin, la perte d'azote par voie gazeuse constitue le mécanisme dominant dans beaucoup d'agrosystèmes. Les processus de perte incluent la volatilisation, la nitrification et la dénitrification, et ont pour résultat le dégagement d'ammoniac (NH_3), de monoxyde d'azote (NO), de protoxyde d'azote (N_2O) et du diazote (N_2) dans l'atmosphère.

III.1. Les émissions atmosphériques d'oxydes d'azote et d'ammoniac

- Emission d'oxydes d'azote (N_2O , NO)

Le N_2O est un des gaz dits à effet de serre, constituant 6% de l'effet de serre anthropique, et contribuant par ailleurs à l'épuisement de la couche d'ozone stratosphérique. Le NO joue également un rôle important dans la chimie atmosphérique en participant à la régulation de l'équilibre d'oxydation de l'atmosphère. Dans l'atmosphère, le NO s'oxyde en peroxyde d'azote (NO_2). Les retombées d'oxyde d'azote (sous forme de NO et NO_2) participent à l'acidification et à l'eutrophisation des écosystèmes.

Les sols agissent en même temps comme sources et puits de N_2O et de NO . La production et la consommation de ces deux éléments dans les sols impliquent des processus biotiques et abiotiques et de nombreux groupes de micro-organismes contribuent à la production et à la consommation de N_2O et de NO . La nitrification et la dénitrification biologiques sont les processus dominants impliqués (Bremner, 1997), mais seule la dénitrification est considérée comme un élément significatif de consommation biologique pour le N_2O et le NO (fig. I-12). Environ 0,5 à 0,8% de l'azote apporté par la fertilisation sont perdus sous forme de NO (Veldkamp et Keller, 1997) et 0,8% sous forme de N_2O (Mosier *et al.*, 1998). Ces valeurs sont nettement inférieures que celles émises lors de l'application de fumier. L'intensification de l'agriculture, le labour ainsi que l'élevage accroissent le stock d'azote du sol augmentant ainsi le potentiel d'émission d'oxydes d'azote. La formation de N_2O et de NO dépend fortement de l'humidité du sol. Lorsque le remplissage en eau des pores du sol est en dessous de 50%, c'est principalement le NO qui est produit par le processus de nitrification. Entre 50 et 80%, la formation de N_2O par dénitrification devient

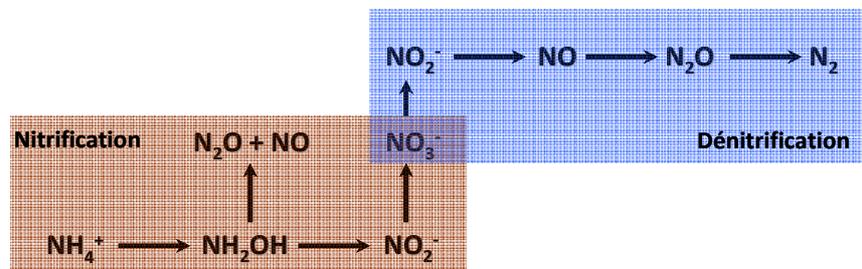


Figure I-12. Processus de nitrification et interaction avec la dénitrification.

importante, et à partir de 75%, la formation du diazote (N_2) par dénitrification est la plus dominante (Bouwman, 1998). Les facteurs les plus importants pour la formation d'oxydes d'azote sont la disponibilité de N, la température ainsi que la décomposition de la matière organique (Stevenson et Cole, 1999).

Les pertes d'azote par dénitrification peuvent atteindre 15% des intrants azotés et sont plus importantes dans les prairies ou lorsqu'un épandage de fumier est effectué (von Rheinbaben, 1990; Mosier *et al.*, 2002). Lorsque les températures sont élevées et que les teneurs en eau et en NO_3^- du sol sont importantes, les pertes peuvent aller jusqu'à 1 kg d'N/ha/jour (Peuples *et al.*, 1995). Meisinger et Randall (1991) montrent également que les pertes peuvent représenter de 2 à 25% des engrais apportés dans les sols bien drainés contre 6 à 55% lorsque les sols sont mal drainés.

- Emission d'ammoniac (NH_3)

L'ammoniac dégagé par volatilisation est le principal facteur d'origine agricole responsable de la pollution atmosphérique avec de nombreux impacts. Il est constamment formé dans les sols en raison de la dégradation biologique des composés organiques et des engrais minéraux et organiques apportant du NH_4^+ . Dans l'atmosphère, le NH_3 neutralise une grande partie des acides produits par des oxydes de soufre et d'azote. Une grande proportion d'aérosols atmosphériques, agissant comme des noyaux de condensation des nuages, se compose de sulfate neutralisé à des degrés divers par l'ammoniac. Les retombées atmosphériques ramènent la plus grande partie du NH_3 à la surface de la terre, où elles peuvent contribuer à l'acidification et à l'eutrophisation des écosystèmes. Globalement, les pertes de N du sol par volatilisation de l'ammoniac ont été estimées à 54 millions de tonnes/an et 75% sont d'origines anthropiques (Sutton *et al.*, 1998). L'ammoniac est également un métabolite des tissus végétaux, et les plantes peuvent contribuer aux émissions ammoniacales avec des pertes pouvant aller jusqu'à 2kg N/ha, ceci varie en fonction de la teneur en azote des résidus. L'épandage de lisier et l'activité d'élevage constituent également une source importante d'ammoniac, 30% de l'azote issu des urines et des fécés peuvent être perdus sous forme d' NH_3 . L'autre source majeure est l'application en surface des engrais uréiques, et d'autres fertilisants contenant du NH_4^+ . Etant l'engrais le plus utilisé dans le monde (cf. II.3), l'urée contribue aux très importantes pertes ammoniacales, surtout si elle est appliquée en surface (tableau I-1). Cette volatilisation résulte de l'hydrolyse rapide de l'urée en NH_3 et en CO_2 par les uréases du sol. Il s'en suit une augmentation du pH du sol et une accumulation de NH_4^+ et de NO_2^- .

Tableau I-1. Pertes gazeuses à partir de différents types d'engrais apportés à 200 kg N/ha en fonction de la profondeur d'enfouissement (Hofman et Van Cleemput, 1995).

Fertilisation	Profondeur (cm)	Pertes N (%)
Ammonium sulfate	0	37,3
	2	3,8
	4	0,5
Ammonium nitrate (AN)	0	12,3
	2	1,3
	4	0,7
Urée (U)	0	30,8
	2	6,1
	4	0,6
Solution UAN*	0	20,4
	2	3,9
	4	0,5

*Solution urée ammonium nitrate (50% U + 50% AN)

L'ammonium dans le sol se trouve en équilibre avec l'ammoniac de l'air (fig. I-13). La volatilisation correspond au transfert de l'azote ammoniacal présent sous forme gazeuse à la surface du sol vers l'atmosphère. La vitesse du vent (régulant les échanges entre le sol et l'air), la température et le pH de l'eau de la solution du sol ou de l'eau d'irrigation sont des déterminants importants. Les pertes d'azote issues de l'urée par volatilisation ammoniacale sont favorisées dans les sols à pH élevé, avec un faible pouvoir tampon, et par les fortes températures (Hofman et Van Cleemput, 1995). En particulier, le pH affecte l'équilibre entre NH_4^+ et NH_3 , de sorte que la concentration relative de NH_3 augmente de 0,1% à 1, 10 et 30% quand le pH passe respectivement de 6 à 7, 8 et à 9 (fig. I.14; Court *et al.*, 1964). D'autres variables telles que la capacité d'échange cationique (CEC, du fait qu'elle fixe les ions NH_4^+ chargés positivement), le niveau d'activité de l'uréase (dans le cas de l'application d'urée, ou d'urine), l'humidité disponible, la texture du sol, le taux de nitrification et la présence de plantes ou de résidus de plantes, influencent également la volatilisation du NH_3 .

Compte tenu de l'importance des pertes d'N par volatilisation, des recherches ont été menées afin trouver des méthodes efficaces et économiques permettant de contrôler les pertes ammoniacales. Ainsi, le recours à l'utilisation des inhibiteurs d'uréases, l'enrobage des engrais avec des sulfures afin de ralentir leur vitesse de dissolution, l'acidulation des engrais ou le traitement des fertilisants avec des sels tel que le CaCl_2 ou le KCl permettent de réduire ces pertes d'N par volatilisation (Bremner, 1995; Reddy et Sharma, 2000). Ces approches ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherches et se sont toutes avérées efficaces dans des conditions bien particulières. Cependant, un grand intérêt a été porté durant ces dix dernières années aux approches visant à réduire les émissions ammoniacales grâce à l'utilisation des inhibiteurs d'uréases (cf. IV.3).

III.2. Le lessivage du nitrate

Le nitrate (NO_3^-) issu des engrais ou du processus de nitrification de l'ammonium (NH_4^+) des engrais ou de la matière organique du sol, est sujet au lessivage constituant ainsi le facteur prépondérant de la pollution des aquifères par l'azote et l'eutrophisation des milieux aquatiques, océaniques ou continentaux. La quantité et l'intensité des précipitations, la quantité et la fréquence de l'irrigation, l'évapotranspiration, la température, la texture et la structure du sol, le labour et les pratiques culturales, la quantité et la forme de l'engrais azoté utilisé sont des paramètres influençant les quantités de NO_3^- présent dans le sol et leur lessivage vers les eaux souterraines (Asselin, 1993). Les sols légers et sablonneux présentent un risque de lessivage plus important que les sols argileux. Les sols sous cultures horticoles

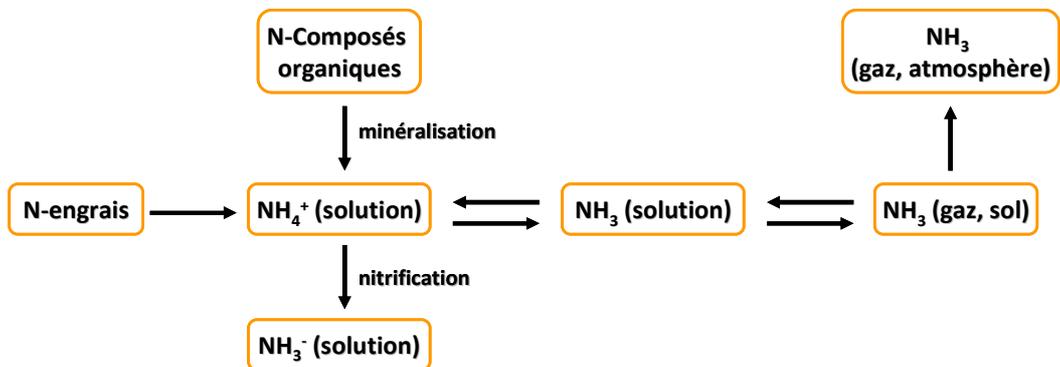


Figure I-13. Présentation schématique du processus et de l'équilibre du NH_4^+ par rapport à la volatilisation de l'ammoniac.

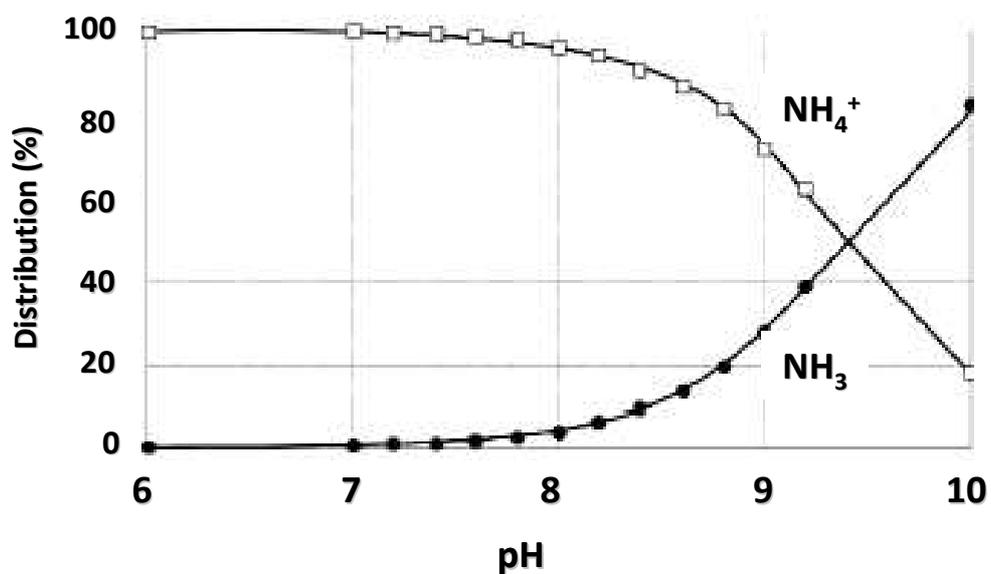


Figure I-14. Influence du pH sur l'équilibre $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ du sol (Court *et al.*, 1964).

sont également susceptibles de lessiver du nitrate en raison de leur perméabilité, de la période de présence du couvert végétal qui est relativement courte, et de l'intensité du travail du sol qui favorise la minéralisation (Zilliox *et al.*, 1990). Deux fractions peuvent être distinguées: l'azote dissout et l'azote adsorbés par les particules du sol. En raison de sa forte solubilité, l'azote dissout se trouve souvent en petites quantités dans les eaux de ruissellement, et en plus grandes quantités dans les eaux souterraines. Par ailleurs, de grandes quantités d'azote adsorbé par les particules du sol (en particulier l'azote organique et le NH_4^+) peuvent être transportées lors de l'érosion des terres. Ces pertes sont, avec les pertes par lessivage, responsables de l'eutrophisation des eaux de surface.

Les concentrations naturelles de nitrate dans les eaux souterraines sont généralement inférieures à 1mg/L d'eau, mais de nombreuses activités humaines ont pour effet d'augmenter leur concentration dans l'eau et le sol. La pollution azotée retrouvée à de plus grandes profondeurs peut être la conséquence d'actions datant de cinq, dix voir vingt ans (Zilliox *et al.*, 1990). En France, le Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques (SCEES) estime qu'au moins 55% des apports d'azote proviennent de l'agriculture, 35% des rejets domestiques et 10% des rejets industriels.

Réduire les pertes de nitrate nécessite par ailleurs une approche intégrée impliquant le développement et l'adoption des bonnes pratiques culturales afin d'optimiser l'efficacité d'utilisation de l'azote par les plantes pour une production optimale, tout en minimisant les risques de lessivage. L'objectif est d'empêcher l'accumulation de l'azote minéral dans le sol qui excéderait les besoins des plantes, en particulier durant les périodes de drainage. Outre les méthodes dites d'agriculture de précision, l'une des solutions actuellement envisagées pour réduire le lessivage du nitrate repose sur l'utilisation d'engrais à libération lente, ou encore l'utilisation des inhibiteurs de la nitrification dans le sol, qui ont pour action de retarder la nitrification de l'ammonium des engrais (cf. IV.2).

IV. Stratégies pour limiter les risques environnementaux

Les bonnes pratiques culturales et la gestion optimale des engrais doivent avoir pour objectif d'éviter les excédents de nutriments dans le sol. Cela permet d'accroître l'efficacité d'utilisation des nutriments par les plantes et de minimiser les risques environnementaux.

L'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) peut être définie comme la quantité d'azote prélevée par les plantes et les cultures pendant une certaine période de temps par rapport à la quantité d'azote disponible dans le sol ou appliquée durant cette même période. Améliorer l'EUA en agriculture a été la préoccupation majeure durant des décennies (Dobermann,

2005), et de nombreuses technologies ont été développées pour atteindre cet objectif. Les types d'engrais et leur gestion dans l'agriculture font partis des mesures destinées à améliorer l'équilibre global du cycle de l'azote à court et à long terme, et la tâche la plus importante pour l'avenir est d'améliorer d'avantage l'EUA (Grant, 1996), car une part importante de l'engrais azoté (50 à 60%) est perdue pendant l'année d'application. Pour ce faire, l'industrie des fertilisants, en particulier des engrais azotés, fait continuellement face au défi d'améliorer ses produits pour augmenter l'efficacité de leur utilisation par les plantes et de minimiser les éventuels effets négatifs sur l'environnement. Ceci est réalisé soit par l'amélioration des engrais existants, ou via le développement de nouveaux types d'engrais spécifiques (Maene, 1995; Trenkel *et al.*, 1988).

Un "engrais idéal" protège les nutriments contre les processus de dégradation et les rend disponibles pour les cultures. Les caractéristiques d'un tel engrais sont :

- Seule une application durant toute la saison de culture doit être effectuée afin de fournir la quantité nécessaire de nutriments pour une croissance optimale.
- Un minimum d'effets néfastes sur les milieux (sol, eau et atmosphère) doit être observé.

La figure I-15 donne une description schématique de la libération des éléments nutritifs d'un engrais idéal dont le prélèvement est synchronisé avec la demande des plantes.

Les technologies pour la mise au point de ce type d'engrais comprennent deux stratégies principales, reposant sur l'utilisation :

- d'engrais à libération lente et contrôlée, avec une libération des nutriments sur plusieurs mois,
- d'engrais stabilisés (engrais associés aux inhibiteurs de nitrification ou d'uréase), retardant soit la nitrification de l'ammonium ou l'hydrolyse de l'urée.

IV.1. Engrais à libération lente et contrôlée

Un engrais à libération lente et contrôlée est un engrais contenant un principe nutritif sous une forme qui retarde sa libération et son utilisation par les végétaux après son application, ou qui prolonge sa disponibilité pour les plantes pendant une période de temps plus longue que dans le cas d'un engrais dont les éléments nutritifs sont rapidement

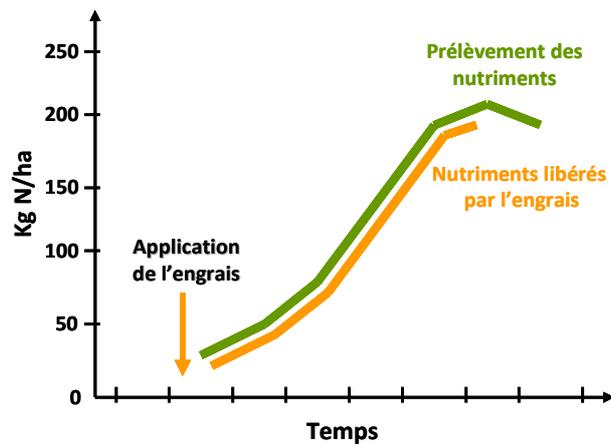


Figure I-15. "L'engrais idéal" : la libération des nutriments est synchronisée avec la demande des cultures (Lammel, 2005).

disponibles, comme le nitrate d'ammonium, l'urée, le phosphate d'ammonium ou le chlorure de potassium (AAPFCO, 1997). Le principe général de cette libération lente ou contrôlée repose sur des mécanismes et des caractéristiques chimiques et physiques particuliers; il s'agit notamment de contrôler la solubilité dans l'eau de la molécule par des revêtements protecteurs semi-perméables, des occlusions, des composés protéiques, ou d'autres formes chimiques pour contrôler l'entrée d'eau et la libération des éléments nutritifs afin qu'elle soit synchronisée avec les besoins de la plante (Fujita *et al.*, 1992).

Shaviv (2005) a proposé la classification des engrais à libération lente et contrôlée suivante:

- Engrais à libération contrôlée par une barrière physique, sous forme de granules enrobés par des polymères hydrophobes ou sous forme de matrice, dans laquelle le matériau actif soluble est dispersé dans un continuum qui limite la dissolution de l'engrais (fig. I-16). Ces revêtements sont des polymères de nature organique ou minérale. Il existe trois principaux groupes d'engrais enrobés basés sur les matériaux de revêtement suivants: le soufre, des polymères (y compris les polymères de cire), et la polyoléfine. Le polymère utilisé dépend principalement de ses propriétés chimiques et physiques, et de son coût. L'urée enrobée de soufre (Sulphur-coated urea : SCU) est l'engrais à libération contrôlée le plus important dans cette catégorie.
- Les composés azotés organiques à faible solubilité, qui peuvent être subdivisés en produits à décomposition biologique, généralement basée sur des condensats d'urée-aldéhyde, tels que l'urée-formaldéhyde (UF), et en produits à décomposition chimique, tels que l'isobutylidène-diurée (IBDU). Le mécanisme de libération se fait par l'hydrolyse progressive des IBDU en urée, qui est ensuite transformée par les bactéries du sol en ions ammonium, puis en nitrate. Enfin, la cyclo diurée (CDU) qui se décompose dans le sol par hydrolyse microbienne, la température, l'humidité du sol et l'activité biologique affectent le taux de libération et sa dégradation est plus lente que celle des IBDU, même dans les sols acides.
- Les composés minéraux à faible solubilité, tels que les "metal ammonium phosphates" (par exemple le magnésium phosphate d'ammonium, $MgNH_4PO_4$), et la roche phosphatée partiellement acidifiée (Partially Acidulated Phosphate Rock - PAPR), qui sont caractéristiques de ce type d'engrais à libération lente.

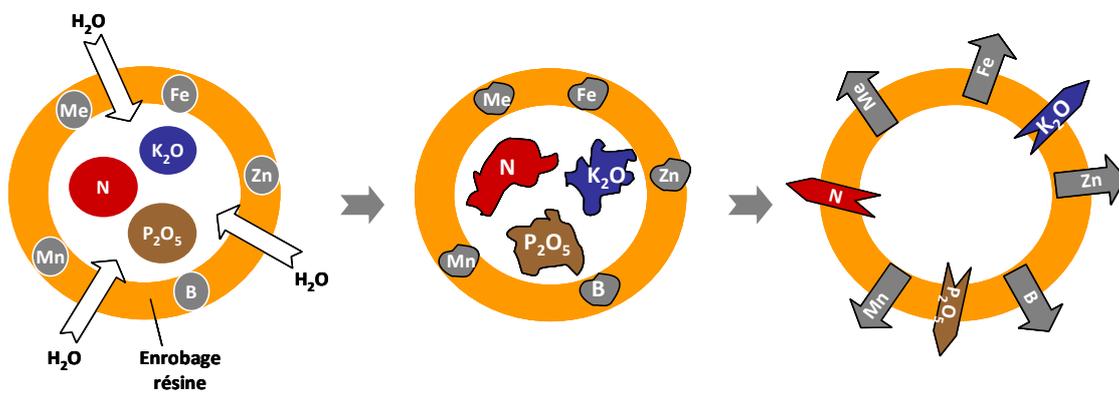


Figure I-16. Mode d'action des engrais encapsulés à libération contrôlée (Hähndel, BASF, 1997).

Les produits azotés à décomposition biologique et microbienne, comme l'urée-formaldéhyde (UF), sont communément appelés des engrais à libération lente, alors que les engrais encapsulés sont considérés comme des engrais à libération contrôlée. Dans le cas des engrais à libération lente, la libération des nutriments dépend principalement du sol et des conditions climatiques, et elle ne peut pas être prédite. Avec les engrais à libération contrôlée, le schéma de libération, la quantité et le temps peuvent être prédits dans une certaine limite.

L'utilisation d'engrais à libération lente et contrôlée diminue les pertes d'éléments nutritifs et améliore l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA). Ils réduisent également les risques de toxicité, en particulier au moment du semis, qui peuvent résulter des fortes concentrations en ions issus de l'hydrolyse d'engrais conventionnels, donnant ainsi la possibilité d'augmenter sensiblement les quantités d'engrais et de réduire leur fréquence d'application. Il en résulte une plus grande commodité d'utilisation des engrais et d'importantes économies de main-d'œuvre, de temps et d'énergie. Ces facteurs constituent le plus grand avantage pour la majorité des consommateurs actuels des engrais à libération lente et contrôlée (Trenkel, 2010). Cependant, le prix de fabrication de ce type d'engrais reste relativement plus élevé que les engrais minéraux classiques (Lammel, 2005). En Europe, Seulement 8% de ces produits sont appliqués (fig. I-17), les jardins, le gazon et les pépinières étant les principaux segments du marché.

IV.2. Les inhibiteurs de la nitrification

Les inhibiteurs de la nitrification sont des composés qui retardent l'oxydation bactérienne de l'ammonium (NH_4^+) en nitrite (NO_2^-) dans le sol (première étape de la nitrification) pour une certaine période de temps en réduisant l'activité des bactéries *Nitrosomonas*. La deuxième étape de la nitrification n'est en principe pas affectée (Amberger, 1996).

A. Caractéristiques et modes d'action des inhibiteurs de nitrification

Comme le montre la figure I-18, les enzymes ammonium monooxygénase (AMO) et l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) jouent un rôle important dans l'oxydation de NH_4^+ en NO_2^- . La plupart des inhibiteurs de nitrification développés pour les applications agricoles, ciblent la voie enzymatique AMO. L'hydroxylamine, s'il s'accumule, devient toxique pour les bactéries *Nitrosomonas*, la voie HAO est donc rarement ciblée (Arp et Stein, 2003). Le mécanisme de base d'un inhibiteur d'une enzyme repose sur le principe d'une inhibition

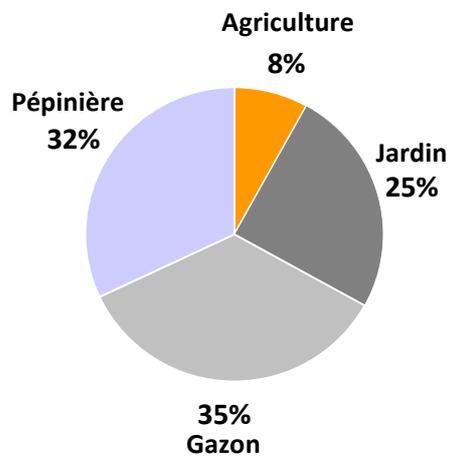


Figure I-17. Marché des engrais à libération lente et contrôlée en Europe en 1998 (Lammel, 2005).

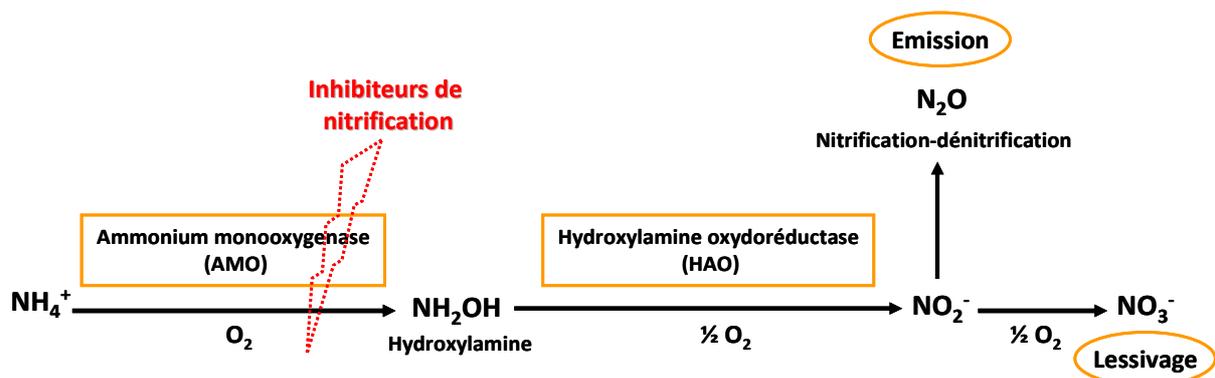


Figure I-18. Réactions enzymatiques catalysées par l'ammonium monooxygenase (AMO) et l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) chez *Nitrosomonas europaea* (adapté par McCarty, 1999).

durable, où l'inhibiteur forme un complexe stable avec l'enzyme qui l'inactive de façon permanente.

L'intérêt d'utiliser des inhibiteurs de la nitrification est de réduire les pertes de nitrate par lessivage ou, de façon indirecte, réduire les émissions d'oxyde nitreux (N_2O) par dénitrification en maintenant plus longtemps l'azote sous sa forme ammoniacale et d'augmenter par ailleurs l'efficacité de son utilisation par les plantes. Les ions ammonium, retenus par le sol, sont peu mobiles contrairement au nitrate qui est facilement lessivé (Amberger, 1993b). Ces pertes par lessivage dépendent de la concentration en nitrate de la solution du sol (Shaviv 2005). L'ajout d'un inhibiteur de la nitrification aux engrais azotés va diminuer la concentration en nitrate et donc réduire les risques de lessivage ainsi que les pertes par dénitrification.

Des études montrent également que les inhibiteurs de la nitrification ont un effet sur la suppression des émissions de méthane (CH_4 ; Bronson et Mosier, 1993, 1994). Ce dernier est un gaz à effet de serre, produit lors de la fermentation microbienne de la cellulose dans des conditions anaérobiques. L'utilisation conjointe d'engrais azotés et des inhibiteurs de nitrification, permet de réduire le nombre d'application de fertilisants, donc une économie d'argent et de travail sans augmenter les pertes d'azote, mais aussi une meilleure mobilisation et absorption de phosphate et de micronutriments à partir de la rhizosphère (Rahmatullah *et al.*, 2006; Sarker et Jones, 1982). Elle favorise par ailleurs la nutrition ammoniacale, dont l'absorption et l'assimilation présentent un faible coût énergétique, et donc une alimentation mixte (nitrate d'ammonium) qui conduit à une meilleure productivité (Amberger, 2008a). L'absorption et l'assimilation de l'ammonium ont un effet positif sur la synthèse des polyamines, des cytokinines et des gibbérellines. Les teneurs en nitrate des plantes sont réduites, et la qualité nutritionnelle des légumes et des plantes fourragères est améliorée (Montemurro *et al.*, 1998; Pasda *et al.*, 2001a,b).

Enfin, dans les prairies, et les prairies pâturées en particulier, il n'existe aucune pratique culturale qui permet de réduire les pertes d'azote provenant du sol et des fumiers. L'application régulière d'un inhibiteur de la nitrification est donc la méthode la plus prometteuse pour limiter ces pertes.

Ces aspects environnementaux positifs, montrent l'importance de l'utilisation d'inhibiteurs de la nitrification. La réduction des pertes d'azote protège non seulement l'environnement, mais conduit également à une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) en accroissant les rendements des cultures (fig. I-19), notamment dans les zones écologiquement sensibles. En effet, l'impact des inhibiteurs de nitrification est difficile

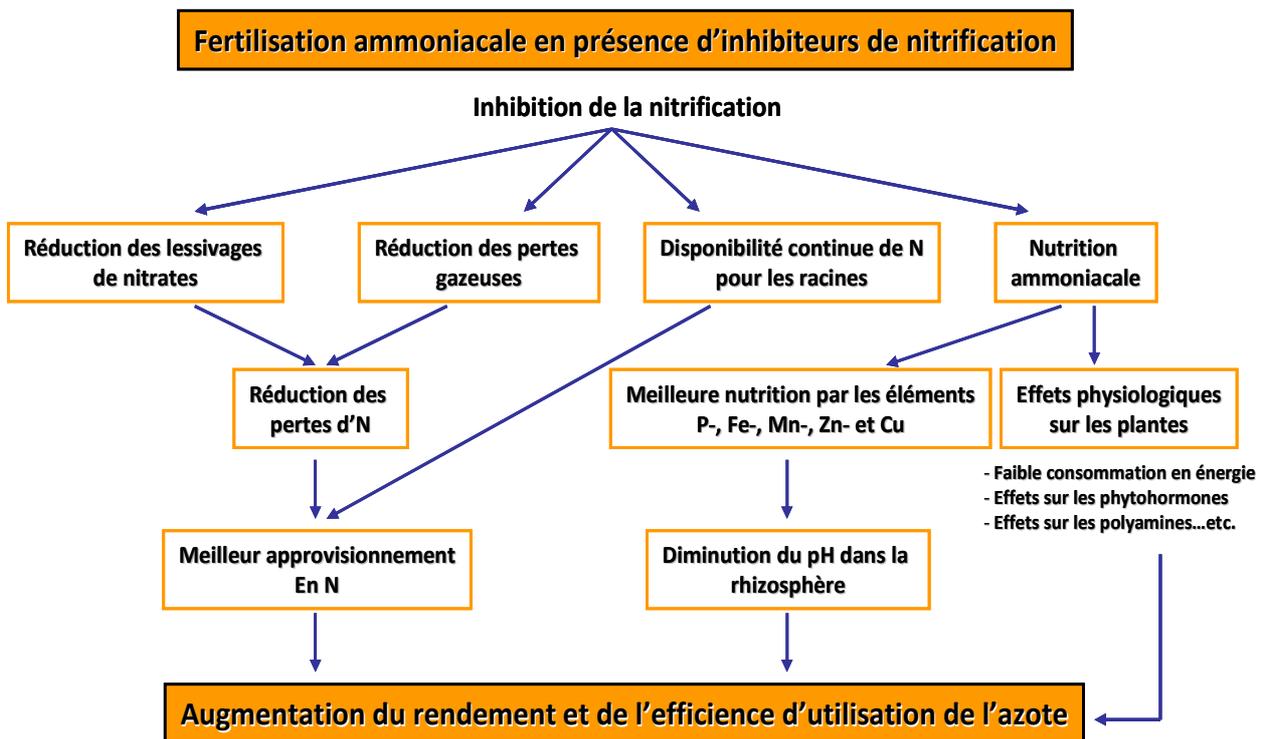


Figure I-19. Nutrition ammoniacale en présence d'un inhibiteur de nitrification (Trenkel, 2010).

à prévoir et leurs effets positifs sont davantage observés lorsqu'ils sont appliqués à des sols riches en azote où les pertes d'azote, dues au lessivage et à la dénitrification, sont importantes (Edmeades, 2004). Par ailleurs, plusieurs facteurs physiques, chimiques et biologiques déterminent l'efficacité des inhibiteurs de nitrification lorsqu'ils sont appliqués au champ. Pour qu'ils soient efficaces, les inhibiteurs de nitrification doivent conserver à la fois leur persistance et leur activité. Certains facteurs influençant l'efficacité des inhibiteurs de nitrification sont reportés dans le tableau I-2. De façon générale, ces inhibiteurs présentent une meilleure efficacité dans les sols à texture légère, pauvres en matière organique et lorsque les températures sont basses. En revanche, ils sont moins efficaces dans les sols à texture lourde, riches en matière organique et lorsque les températures sont élevées (Sahrawat, 1980b; Sahrawat et Keeney, 1985).

L'utilisation des inhibiteurs de nitrification dans l'agriculture présente par ailleurs des limites et un certain nombre de contraintes. Le coût des inhibiteurs de nitrification constitue environ 25 à 30% du coût des engrais azotés. Dès lors, pour que leur utilisation soit économiquement rentable, les pertes moyennes d'azote à long terme doivent dépasser 40 à 50 kg-N ha⁻¹ (Nelson et Huber, 1980). Cependant, plusieurs études montrent des résultats contradictoires quant à l'augmentation du rendement et de l'EUA. En effet, certaines plantes sont sensibles à une alimentation ammoniacale stricte et peuvent présenter des signes de toxicité lorsque les niveaux d'ammonium sont élevés. Les inhibiteurs de nitrification ne seraient donc pas adaptés pour ces cultures (Sahrawat, 1980b). Associés à des engrais, ils peuvent favoriser, dans certains cas, la volatilisation de l'ammoniac (Davies et Williams, 1995; Natri *et al.*, 2000; Gioacchini *et al.*, 2002). Cela nécessite donc leur incorporation dans le sol immédiatement ou peu après l'application. Selon le type d'inhibiteur de nitrification, l'activité des bactéries du sol peut être inhibée pendant une longue période de temps. Ces inhibiteurs peuvent donc avoir une action bactéricide et être considérés comme néfastes pour l'environnement, même si elle est circonscrite dans la zone où l'inhibiteur de nitrification est appliqué (Trenkel, 2010).

B. Types d'inhibiteurs de nitrification disponibles sur le marché

De nombreux composés ont été brevetés et proposés comme inhibiteurs de nitrification mais seulement quelques-uns ont été testés dans des conditions de champ et approuvés pour leur efficacité dans le contrôle de la nitrification dans le sol et utilisés, dans une certaine mesure, aux Etats-Unis, en Europe et au Japon (tableau I-3; Subbarao *et al.*, 2006). Le Nitrapyrin, le 2-amino-4-chloro-6-méthyl-pyrimidine (AM), le Dicyandiamide

Tableau I-2. Facteurs déterminant l'efficacité des inhibiteurs de nitrification dans le sol (d'après Keeney, 1986).

Facteurs	Remarques
<u>I. Propriétés de l'inhibiteur</u>	
a. Solubilité dans l'eau	• Détermine les modalités d'application et le lessivage de l'inhibiteur
b. Volatilité	• Détermine le mouvement de l'inhibiteur dans le sol
c. Adsorption par les colloïdes (argiles et matière organique)	• Limite le lessivage et de mobilité dans le sol
d. Stabilité (taux de dégradation)	• Persistance de l'inhibiteur dans le sol
<u>II. Propriétés physico-chimiques du sol</u>	
a. Le pH	• Affecte la stabilité et la solubilité de l'inhibiteur
b. Richesse en matière organique (MO)	• Affecte l'adsorption de l'inhibiteur, sa mobilité et sa stabilité
c. La porosité	• Affecte les niveaux d'oxygène du sol, l'activité nitrifiantes ainsi que la volatilité de l'inhibiteur
d. Azote du sol issus de la minéralisation de la MO	• La minéralisation de la MO est par fois pas empêchée par l'inhibiteur
<u>III. Propriétés biologiques du sol</u>	
a. Population des bactéries nitrifiantes	• Affecte l'efficacité de l'inhibiteur. Une activité nitrifiante élevée nécessite d'importantes concentrations en inhibiteur, dont l'efficacité est modulée par la diversité génétique des souches de <i>Nitrosomonas</i> .
b. Niveau du carbone du sol	• Affecte les bactéries hétérotrophes et le taux d'immobilisation de l'ammonium
<u>IV. Facteurs abiotiques</u>	
a. Température	• Les inhibiteurs sont plus efficaces à basses températures. De nombreux inhibiteurs sont biologiquement instable à des températures supérieurs à 15°C
b. Eau	• Affecte l'activité nitrifiante, la mobilité de l'inhibiteur et l'aération du sol

(DCD), et plus récemment le 3,4-Diméthylpyrazol-phosphate (DMPP), sont les principaux composés commercialisés et utilisés dans l'agriculture aujourd'hui (tableau I-3; fig. I-20). D'autres composés ont une utilisation restreinte à certaines régions. Un inhibiteur de nitrification doit présenter certaines caractéristiques : une facilité d'application, une persistance, une stabilité et efficacité sur de longues périodes et à des températures relativement élevées. Différents inhibiteurs peuvent être distingués :

- **Le Nitrapyrin [2-chloro-6-(trichlorométhyl) pyridine]**, appartient au groupe des composés organiques chlorés. Il est produit exclusivement par Dow Chemical Company aux États-Unis et distribué par Dow Agro Sciences sous le nom commercial N-Serve®. C'est le premier inhibiteur de nitrification à avoir été approuvé par l'Agence de Protection de l'Environnement (APE). Son utilisation est autorisée pour trois cultures : le maïs, le sorgho et le blé (Dow Agro Sciences, 2007). Cet inhibiteur a été largement utilisé comme stabilisateur d'azote en Amérique du nord. Il peut être mélangé avec plusieurs types d'engrais tels que le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, l'urée, les solutions urée-ammonium-nitrate (UAN), et l'ammoniac anhydre. Cependant, en raison de sa volatilité (tableau I-3), le « Nitrapyrin » est incorporé dans le sol à une profondeur d'au moins 5 à 10 cm, pendant ou immédiatement après l'application de l'engrais. Aux États-Unis, il est surtout appliqué par injection dans le sol en combinaison avec l'ammoniac anhydre. La dose d'application recommandée est de 1,4 à 5,6 l/ha. (McCall et Swann, 1978; Slangen et Kerkhoff, 1984).

Sur des cultures pures de *Nitrosomonas europaea*, le Nitrapyrin, utilisé à la concentration de 1 mg/kg de sol, inhibe de façon efficace la nitrification (Zacheri et Amberger, 1990). En outre, cet inhibiteur n'a pas d'effet sur le groupe *Nitrobacter* des bactéries du sol.

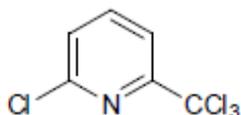
L'action inhibitrice serait donc spécifique au groupe *Nitrosomonas* (Goring, 1962a,b). Des études d'incubation en laboratoire, montrent également que sur plusieurs types de sols testés, le « Nitrapyrin » (lorsqu'il est utilisé à la teneur de 2 mg/kg de sol) peut inhiber le processus de nitrification pendant 6 semaines (Goring, 1962a,b). La décomposition du « Nitrapyrin » dans le sol est complète au bout de 30 jours. Cependant, il est plus stable dans les sols frais. Son utilisation est donc recommandée à l'automne où une fertilisation azotée pratiquée sans inhibiteur se traduit par des pertes importantes d'azote, notamment dans les sols à texture légère.

Un nouvel inhibiteur appelé Instinct™ contenant le « Nitrapyrin » comme substance active vient d'être récemment mis sur le marché. Il est utilisé avec les solutions urée-ammonium-nitrate (UAN) lors des applications printanières et automnales. C'est une

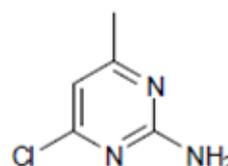
Tableau I-3. Principaux inhibiteurs de nitrification utilisés en agriculture (Subbarao *et al.*, 2006).

Nom (Chimique, commercial)	Solubilité dans l'eau (g/l)	Volatilité	Mode d'application
2-chloro-6-(trichlorométhyl) pyridine (Nitrapyrin; N-Serve)	0,04 (à 20°C)	Haute	Injection dans le sol en combinaison avec l'ammoniac anhydre
2-amino-4-chloro-méthyl-pyrimidine (AM)	1,25 (à 20°C)	Haute	En revêtement sur des engrais azotés solides
Dicyandiamide (DCD)	23 (à 13°C)	Faible	En mélange avec l'urée ou autre engrais solide
<u>3,4-Diméthylpyrazol-phosphate</u> (DMPP)	-	Faible	En mélange avec l'urée ou autre engrais solide

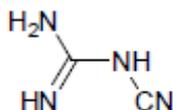
Inhibiteurs de la nitrification



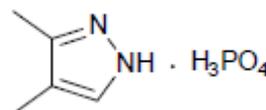
[2-chloro-6-(trichlorométhyl) pyridine]-(Nitrapyrin)



2-amino-4-chloro-6-méthyl-pyrimidine (AM)



Dicyandiamide (DCD)



3,4-Diméthylpyrazol-phosphate (DMPP)

Figure I-20. Structure chimique des principaux inhibiteurs de la nitrification utilisés en agriculture.

formulation encapsulée qui permet de limiter les pertes par volatilité du « Nitrapyrin » jusqu'à dix jours suivant son application (Dow Agro Sciences, 2009; Schwab et Murdoch, 2010).

- **Le 2-amino-4-chloro-methyl-pyrimidine (AM)**, est un produit développé par Toyo Koatsu Industries Inc et Mitsui Toatso Chemicals Inc au Japon. C'est une substance cristalline blanche, soluble dans l'eau et fortement volatile. Du fait de sa stabilité (sauf pour un $\text{pH} < 4$), il peut être utilisé avec plusieurs types d'engrais et il est généralement appliqué comme revêtement sur des engrais azotés solides à des températures pouvant aller jusqu'à 35°C (Slangen et Kerkhoff, 1984). L'ajout de 4 à 10 mg/kg de AM est efficace pour ralentir la nitrification dans le sol pendant 20 à 30 jours (Slangen et Kerkhoff, 1984). Comme le Nitrapyrin, l'AM a un effet bactéricide sur *Nitrosomonas*, et environ 5 à 6 kg de AM/ha sont recommandés pour une meilleure efficacité (Prasad *et al.*, 1971). Cependant, les évaluations sur le terrain sont limitées et ont été faites seulement sur quelques espèces (Slangen et Kerkhoff, 1984).

- **Le Dicyandiamide (DCD)**, est produit par plusieurs fabricants en Chine, en Allemagne, au Japon et en Norvège. Son utilisation dans l'agriculture a été testée dès 1917, non pas comme un inhibiteur de nitrification, mais comme un engrais azoté (cyanamide de calcium; Trenkel, 2010). Le DCD, produit à partir de cyanamide de calcium, de l'eau et du dioxyde de carbone (CO_2), se présente sous forme de cristaux (blancs ou incolores) soluble dans l'eau et non-volatile. Il contient au moins 65% d'azote et peut être mélangé avec tous types d'engrais solide, liquide ou en suspension, contenant de l'ammonium. Dans le sol, le DCD est dégradé par des enzymes spécifiques, et convertis en guanilylurée, guanidine puis en urée (ODDA, 1995). Contrairement au « Nitrapyrin », il a un effet bactériostatique sur *Nitrosomonas*. Ainsi, l'activité bactérienne est ralentie ou inhibée pendant une durée plus ou moins importante (Zacheri et Amberger, 1990). Selon la quantité d'azote minéral appliquée, l'humidité, la température et le pH du sol, l'azote ammoniacal des engrais peut être stabilisé pendant plusieurs semaines (4 à 10) grâce à l'inhibition de la nitrification par le DCD. Par ailleurs, 200 mg/kg de sol sont nécessaires pour atteindre la même efficacité que le Nitrapyrin (1 mg/kg; Zacheri et Amberger, 1990). Cependant, 5 à 10% de N-DCD par rapport à la teneur en azote total de l'engrais apporté sont normalement requis pour inhiber la nitrification (Amberger, 1989, 1993b). Afin de réduire le nombre d'application et de maintenir une activité complète, des combinaisons de DCD avec d'autres inhibiteurs de nitrification ont été

développées, comme avec le 3-méthyl pyrazole (DCD + 3-MP; Weber *et al.*, 2004a), certaines combinaisons montrant un effet synergique (Michel *et al.*, 2004).

L'efficacité du DCD sur la réduction du lessivage du nitrate, des émissions d'oxyde nitreux ainsi que l'amélioration de l'EUA a été testée chez diverses cultures et diverses conditions climatiques (Amberger, 1989; Di et Cameron, 2002, 2004). Des études récentes montrent son utilité chez les espèces fourragères. Il augmente leur rendement ainsi que la qualité de l'herbe, tout en diminuant significativement le lessivage du nitrate (Di et Cameron, 2007a; Moir *et al.*, 2007). Au Japon, le DCD est associé aux engrais NPK et commercialisé sous le nom de "Yodel" pour la production de feuilles de thé de qualité supérieure. En outre, la société a développé un engrais à libération contrôlée avec le DCD (Dd-Meister[®]), combinant l'effet inhibiteur de la nitrification et celle de la libération contrôlée de l'azote (Trenkel, 2010).

L'une des principales limites de l'utilisation du DCD est son lessivage hors de la zone d'enracinement (McCarty et Bremner, 1989). Il pourrait s'avérer phytotoxique pour certaines cultures telles que le coton, le maïs, le sorgho et la pomme de terre, si les teneurs utilisées dépassent 20mg/kg de sol (Prasad et Power, 1995).

- **Le 3,4-Dimethylpyrazol-phosphate (DMPP)**, est un nouvel inhibiteur de nitrification, développé en 1995 par BASF (Allemagne), et commercialisé depuis 1999 par COMPO EXPERT sous le nom commercial Entec[®]. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche à grisâtre et peut être utilisé avec des engrais solides, liquides ou en suspension. Des applications de 0,5 à 1,5 kg/ha sont suffisantes pour atteindre une inhibition optimale de la nitrification (Zerulla *et al.*, 2001a,b). Le DMPP ne cause aucun dommage phytotoxique et ne laisse pas de résidus dans la plante, ni même dans le sol (Fettweis *et al.*, 2001).

Le DMPP est un inhibiteur spécifique de la nitrification et efficace pendant 4 à 10 semaines. La durée et son efficacité d'action varient selon les conditions pédologiques et climatiques (Zerulla *et al.*, 2001a,b). Comme pour les autres inhibiteurs (DCD et Nitrapyrin), il est stable et efficace à des températures de 5°C, mais à 20°C, son effet inhibiteur ne dure que 40 jours (Zerulla *et al.*, 2001a,b). Cependant, contrairement au DCD, le DMPP est relativement immobile dans le sol et reste proche des zones d'adsorption de l'ammonium, ce qui lui confère d'être plus efficace (Azam *et al.*, 2001). Des études menées au champ montrent également les effets de cet inhibiteur dans la diminution du lessivage du nitrate et les émissions d'oxyde nitreux, avec des impacts positifs sur la biomasse et le rendement en grains des cultures (Weiske *et al.*, 2001). Le DMPP a été testé sur diverses cultures agricoles et

horticoles (136 essais au champ à travers l'Europe; Pasda *et al.*, 2001a). Les engrais azotés mélangés avec le DPPM améliorent considérablement l'EUA, ce qui conduit à des augmentations du rendement pouvant aller de 7 à 16%, selon les espèces (Zerulla *et al.*, 2001a,b).

Le DPPM distribué sous le nom commercial Entec[®], est incorporé dans plusieurs engrais N, NP, NK et NPK (avec 0,8% de DMPP par rapport à l'azote total de l'engrais). Ces engrais contiennent souvent une faible proportion de nitrate et une plus grande proportion d'ammonium. Par ailleurs, en plus de leur effet inhibiteur, ils apportent de l'azote aux jeunes plantules (Trenkel, 2010).

IV.3. Les inhibiteurs d'uréases

Les inhibiteurs d'uréases sont des composés qui empêchent la transformation de l'urée en ammonium carbamate et en ammoniac par l'action hydrolytique de l'enzyme uréase. En ralentissant l'hydrolyse de l'urée dans le sol, les pertes d'ammoniac par volatilisation dans l'air sont réduites, ainsi que les pertes du nitrate par lessivage. L'efficacité d'utilisation de l'urée ou des engrais azotés contenant de l'urée, par les plantes, est alors augmentée sans conséquences environnementales (Trenkel, 2010).

A. Caractéristiques et modes d'action des inhibiteurs d'uréases

L'utilisation des inhibiteurs d'uréases, ainsi que des inhibiteurs de la nitrification, pourrait contribuer à améliorer les pratiques culturales et la gestion des apports azotés. Exprimé en pourcentage de l'azote uréique appliqué, selon les auteurs, ces pertes peuvent aller de 20% (Bundy, 2001), à 47% (Watson, 2005) voire dépasser les 50% (Amberger, 1996). Dans les prairies, ces pertes se produisent lorsque le pH du sol est supérieur à 7. Lorsque l'urée est appliquée, son hydrolyse engendre une alcalinisation du sol. Par conséquent, les pertes se produisent principalement en surface lorsque l'urée n'est pas absorbée. Les principaux facteurs favorisant ces pertes sont l'absence de pluie ou d'irrigation après l'application, la présence de résidus de culture en surface du sol, les températures élevées et un pH élevé du sol avec une forte capacité d'échange cationique (Bundy, 2001 ; Watson, 2005). L'apport d'un inhibiteur d'uréases devient indispensable dans les sols où les pertes d'ammoniac sont importantes.

L'application d'un inhibiteur d'uréases avec de l'urée, ou un autre engrais contenant de l'urée, retarde de 7 à 14 jours la dégradation de l'urée en ammonium. L'application des inhibiteurs d'uréases est également importante dans les fermes où sont pratiquées des

épandages de lisier, ce dernier constituant la source principale des émissions ammoniacales (Leinker *et al.*, 2005; Varel *et al.*, 1999). Les inhibiteurs d'uréases, en minimisant les pertes azotées, offrent pour l'agriculteur, plus d'options et plus de flexibilité dans la gestion du calendrier des applications des engrais uréiques et du travail du sol.

Comme pour les inhibiteurs de nitrification, les inhibiteurs d'uréases, en retardant la formation de l'ammonium et donc la nitrification, peuvent réduire les concentrations en nitrate du sol mais également dans les plantes, améliorant ainsi leur qualité nutritionnelle, notamment celle des plantes fourragères. L'utilisation des inhibiteurs d'uréases prolonge la disponibilité de l'urée, ce qui favorise son absorption puis son hydrolyse au niveau racinaire ou son transport vers les parties aériennes (Gerendás *et al.*, 1998; Méricout *et al.*, 2008). L'hydrolyse de l'urée entraîne la formation d'ammonium et la synthèse d'acides aminés, comme l'arginine qui aurait un effet positif sur la synthèse des polyamines, et des phytohormones. Selon Gerendás et Sattelmacher (1999), les polyamines et les phytohormone, auraient un rôle important dans la stimulation de la croissance induite par l'ammonium.

L'ammoniac issu de l'hydrolyse de l'urée induit une augmentation du pH du sol, et peut provoquer des dommages sur les jeunes plantules, en causant des brûlures aux extrémités des feuilles, ou sur la germination des graines (Edmeades 2004; Watson, 2005). L'application d'un inhibiteur d'uréase minimise considérablement ces risques (Malhi *et al.*, 2003; Xiaobin *et al.*, 1994).

A contrario, l'application des inhibiteurs d'uréases en combinaison avec l'urée n'engendre pas souvent une augmentation du rendement, notamment lorsque le sol est riche en azote (Edmeades, 2004). Des études montrent également que cette combinaison peut avoir des effets phytotoxiques, qui se manifestent par des nécroses et des chloroses au niveau des feuilles (Bremner et Krogmeier, 1990; Watson et Miller, 1996; Watson, 2005; Artola *et al.*, 2011; Cruchaga *et al.*, 2011). Cet effet serait dû à l'absorption de l'inhibiteur qui bloquerait les uréases des plantes, provoquant ainsi une accumulation de l'urée dans les tissus végétaux (Cruchaga *et al.*, 2011). Cependant, cet effet est transitoire et survient principalement lorsque de grandes quantités d'urée et d'inhibiteurs sont apportées (Artola *et al.*, 2011).

B. Types d'inhibiteurs d'uréases disponibles sur le marché

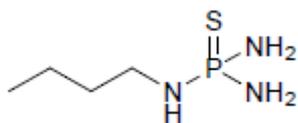
Des centaines de composés chimiques ont été testés et proposés comme inhibiteurs d'uréases dans le sol (Kiss et Simihăian, 2002). Cependant, seuls quelques-uns répondent à certains critères, à savoir qu'ils doivent être non toxiques, efficaces à faible concentration, stables mais dégradables dans le sol et se combiner avec l'urée (solides ou en solution). Ils

peuvent être classés en fonction de leurs structures et de leur interaction avec l'enzyme uréase (Watson, 2005). Les inhibiteurs d'uréases les plus étudiés sont le N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT), le phénylphosphorodiamidate (PPD/PPDA), et l'hydroquinone (HQ, fig. I-21). Ce sont des analogues structuraux de l'urée, qui en se substituant à celle-ci, bloquent le site actif de l'enzyme (Kiss et Simihăian, 2002; Watson, 2005). Des tests ont été également conduits avec le N-(2-nitrophenyl) phosphoric acid triamide (2-NPT), et le thiosulphate d'ammonium (ATS).

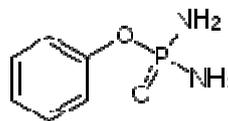
- **Le N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT)**, est le dérivé butyle des triamides thiophosphoriques. Hormis l'hydroquinone utilisée en Chine, le NBPT est aujourd'hui l'inhibiteur d'uréase le plus commercialisé et le plus employé en agriculture. Il a d'abord été commercialisé en 1996 par IMC-Agrico aux Etats-Unis sous le nom Agrotain[®]. En 2000, la société Agrotain International a été créée, et s'occupe aujourd'hui du développement et de la commercialisation d'Agrotain dans le monde entier.

Agrotain, est une formulation liquide de NBPT non-aqueuse. Il peut être incorporé à l'urée solide ou mélangé au nitrate d'ammonium et d'urée en solution. Dans le sol, il se dégrade en ses éléments constitutifs (N, P, S, C et H), et ne présente aucun risque pour l'environnement (Byrnes *et al.*, 1989b). L'inhibition de l'activité uréasique dans le sol par le NBPT est associée à sa conversion en son analogue oxygéné, l'oxon [NBPTO; N-(n-butyl) phosphoric triamide; Phongpan *et al.*, 1995], qui inhibe temporairement la transformation de l'urée en ammonium, réduisant ainsi les pertes d'azote par volatilisation (fig. I-22), en particulier lorsque l'épandage est réalisé en surface (Gardner, 1995), tout en prolongeant la disponibilité de plusieurs formes azotées dans le sol. Selon Watson *et al.* (2008), la demi-vie du NBPT est d'environ six mois lorsqu'il est apporté en surface, et de plus d'un an s'il est injecté dans l'urée avant granulation. En pratique, l'Agrotain est surtout appliqué comme un traitement de surface (en granules) juste avant l'application de l'urée et les concentrations apportées varient entre 0,11 et 0,14 % de matière active par rapport au poids de l'urée. Des études d'incubation sur plusieurs types de sols, montrent que l'efficacité du NBPT à réduire les pertes par volatilisation de l'ammoniac est plus grande dans les sols à pH élevé, alors qu'elle est largement plus faible dans les sols acides à cause de la décomposition rapide du NBPT dans ce type de sols (Watson *et al.*, 1994b). Ceci constitue le principal inconvénient de l'Agrotain en tant qu'inhibiteur d'uréases. L'action du NBPT est par ailleurs favorisée par les teneurs en argile du sol et son contenu en matière organique (San Francisco *et al.*, 2011).

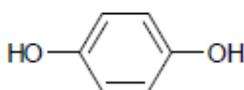
Inhibiteurs d'uréases



N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT)



Phénylphosphorodiamidate (PPD/PPDA)



Hydroquinone (HQ)

Figure I-21. Principaux inhibiteurs d'uréases utilisés en agriculture.

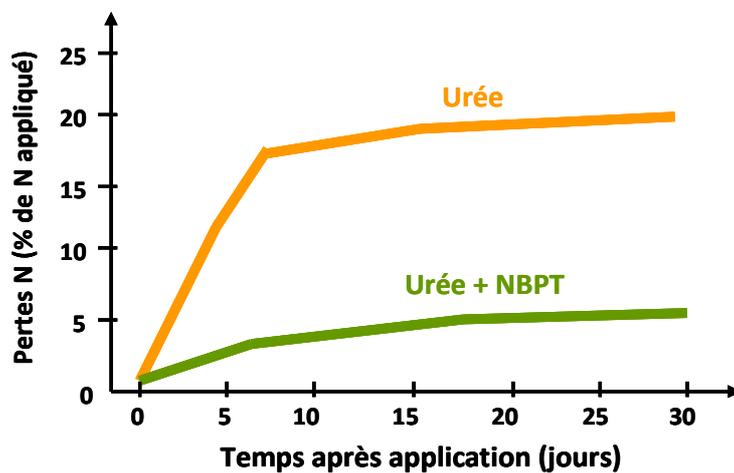


Figure I-22. Effet du N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) sur la réduction des pertes d'azote par volatilisation (d'après Basten *et al.*, 2005).

Les expériences réalisées au champ sur plusieurs sites (France, Allemagne, Italie, Espagne et Royaume-Uni) et sur plusieurs espèces (blé d'hiver et maïs notamment) montrent que l'apport du NBPT améliore l'EUA. Les concentrations optimales de NBPT pour obtenir une efficacité maximale sur les différents types de sols et les différentes cultures se situent entre 0,04% et 0,1% du poids de l'engrais (Basten *et al.*, 2005). Chez le blé, une meilleure disponibilité en azote avec le traitement urée + NBPT augmente le rendement en grains de 2% ainsi que les teneurs en protéines. Globalement, l'efficacité d'utilisation de l'urée en présence de NBPT est supérieure à 7% par rapport au traitement urée sans inhibiteur (Basten *et al.*, 2005). Au Brésil, le rendement des prairies tropicales augmente de 15% en présence de NBPT. Cantarella *et al.* (2005) ont montré qu'en fonction des conditions environnementales, les pertes par volatilisation peuvent être réduites de 30 à 90% grâce à l'ajout de NBPT aux engrais uréiques. Ces études montrent que le NBPT constitue une option majeure pour réduire les pertes d'ammoniac et augmenter le rendement en grains, notamment pour la production de maïs dans les zones subtropicales du Brésil. Cependant, ces résultats obtenus en condition de plein champ n'ont pas été reproduits en Asie du Sud. Chez le riz, l'application du NBPT (0,5% du poids de l'urée) ralentit l'hydrolyse de l'urée et augmente le prélèvement de l'azote, mais pas le rendement en grain. L'application de l'urée 15 à 25 jours après le repiquage, maximise les effets de l'inhibiteur d'uréases. La réduction des pertes ammoniacales de quelques jours, entraîne une augmentation de l'absorption de l'azote appliqué. L'absence d'un effet sur le rendement peut s'expliquer par la faible efficacité du NBPT en conditions anaérobiques. En effet, des conditions aérobies sont nécessaires pour la conversion du NBPT en son analogue oxygéné, l'oxon (Byrnes et Freney, 1995).

Parmi les différentes formulations de cet inhibiteur, « Agrotain Plus » et « Super U » semblent être les plus intéressantes. Agrotain Plus est un concentré sec contenant à la fois l'inhibiteur d'uréases NBPT et l'inhibiteur de nitrification DCD. Il est facilement mélangé avec la solution UAN et réduit les pertes par volatilisation de l'ammoniac ainsi que les pertes d'azote par dénitrification et par lessivage. De ce fait, il offre une meilleure performance environnementale. Super U est de l'urée granulée contenant du NBPT et du DCD. Ce produit est classé comme engrais azoté stabilisé.

- **Le Phénylphosphorodiamidate (PPD/PPDA)**, est le premier analogue structural de l'urée et le plus étudié des inhibiteurs d'uréase de la famille des phosphoroamides (Kiss et Simihăian, 2002). Il a été breveté par des chercheurs Allemands en 1976. Il s'avère très efficace dans l'inhibition de l'activité uréasique sur une période pouvant aller jusqu'à 14

jours. Avec de faibles concentrations de PPD (0,5 à 1% par rapport au N-Urée), et à une température de 20°C, l'inhibition est de 100% après 7 jours d'incubation, 50% après 10 jours et 25% après 12 jours. Cependant, son efficacité diminue avec l'augmentation de la température.

Des tests *in vitro* effectués sur l'uréase du haricot sabre (jackbean, *Canavalia ensiformis*) montrent que le PPD présente une efficacité dans l'inhibition de l'activité uréasique similaire à celle du NBPT. Cependant, le PPD se dégrade rapidement dans le sol, avec la formation de phénol qui ne présente aucun effet inhibiteur. Cette dégradation est favorisée par des conditions aérobies, par la présence d'argiles et de matières organiques, mais elle est peu affectée par le pH du sol (Byrnes et Freney, 1995).

En condition d'anaérobiose, et en particulier au sein de rizières inondées, les mesures de volatilisation de l'ammoniac effectuées au champ, ont montré que les pertes sont réduites pendant seulement 2 à 4 jours en présence du PPD. La principale raison serait l'hydrolyse rapide du PPD et la perte de son efficacité due aux conditions alcalines, générées par le développement d'algues (Byrnes *et al.*, 1989b). Des valeurs de pH supérieures à 10 ont été enregistrées dans les champs de riz en Australie, en Chine et en Malaisie. La dégradation du PPD serait donc contrôlée par le pH, car cet inhibiteur présente une action prolongée, pendant au moins 7 jours, lorsque le pH est stabilisé par l'addition d'un algicide (Freney *et al.*, 1993). Dans de telles conditions, une inhibition optimale de l'activité uréasique a été obtenue en combinant les deux inhibiteurs PPD et NBPT. Il apparaît que le PPD inhibe initialement l'activité uréase pendant qu'une partie du NBPT est convertie en son composé actif. Les concentrations en PPD vont alors diminuer, et les concentrations en NBPTO deviennent suffisamment élevées pour inhiber l'hydrolyse de l'urée (Lu *et al.*, 1989). L'utilisation combinée des deux inhibiteurs donne de meilleurs résultats dans les rizières inondées de Thaïlande, notamment lorsque l'action du PPD est prolongée par l'ajout d'un algicide. Ce traitement réduit les pertes d'ammoniac de 15% à 30% d'azote appliqué et augmente le rendement de 3,6 à 4,1 t/ha (Phongpan *et al.*, 1995).

- **L'hydroquinone (HQ)** : est également un inhibiteur d'uréases. Kiss et Simihăian (2002) ont souligné que de grandes quantités de cet inhibiteur sont utilisées en Chine où il est recommandé de l'appliquer en combinaison avec le DCD (Xu *et al.*, 2000). Ces auteurs concluent également, qu'un apport d'urée avec les deux inhibiteurs (DCD + HQ), améliore la croissance des cultures de riz et réduit les pertes d'azote sous forme d'oxyde nitreux (N₂O). Cependant, les effets de l'hydroquinone sur le rendement, l'absorption de l'azote et l'EUA

sont controversés (Trenkel, 2010). L'hydroquinone est photosensible, et présente une toxicité apparente. Des effets négatifs sur la germination ont été également observés (Bremner et Krogmeier, 1990).

V. Contexte et objectifs de recherche

L'analyse bibliographique précédente, fait notamment apparaître la nécessité pour l'agriculture de demain de s'inscrire dans une démarche de progrès, prenant en compte l'affinement progressif des objectifs économiques et environnementaux. Les engrais uréiques comptent pour 57% des fertilisants azotés les plus utilisés à l'échelle mondiale. La richesse en azote de l'urée, en fait potentiellement un produit de choix pour les agriculteurs. Des quantités moindres peuvent être apportées permettant ainsi de réduire les coûts, parfois de façon significative. Cependant, l'utilisation d'urée conduit à des pertes d'azote, tels que les émissions ammoniacales, le lessivage du nitrate ou la dénitrification ; raisons pour lesquelles son utilisation en France reste marginale, occupant ainsi la troisième place des engrais les plus utilisés, après l'ammonitrate et les solutions azotées. Afin de limiter les risques environnementaux liés à l'utilisation de l'urée, et d'optimiser son prélèvement par les plantes, des inhibiteurs d'uréase et/ou de nitrification sont souvent associés aux engrais uréiques. Cette stratégie semble être la plus efficace et la plus répandue dans le monde. L'objectif principal de ce travail de thèse était donc de mettre au point de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de nitrification, et d'étudier les mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'urée chez le colza (*Brassica napus* L.), prenant en compte l'impact physiologique d'un inhibiteur d'uréases sur le métabolisme azoté, mais aussi sur le rendement d'une culture de colza.

Pour répondre à ces objectifs, trois projets de recherche ont été développés :

- Le premier projet consistait à cribler des nouveaux inhibiteurs d'uréases et de nitrification modifiés par glycosylation, par l'intermédiaire de tests *in vitro*, puis *in vivo* en utilisant des sols nus présentant des caractéristiques différentes, notamment des pH contrastés. Cette démarche a permis de sélectionner les molécules qui présentent des caractéristiques potentiellement intéressantes comme une meilleure solubilité dans l'eau, une plus faible écotoxicité tout en gardant un potentiel d'inhibition de l'activité uréasique (pour les inhibiteurs d'uréases) ou nitrifiante (pour les inhibiteurs de nitrification). Les deux premières séries de tests ont été réalisées par les chercheurs de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes 1 (ENSCR, thèse de doctorat de D. PRO). Seuls deux inhibiteurs de nitrification ont été choisis pour étudier ensuite leurs effets sur l'absorption de l'azote ammoniacal et le

lessivage du nitrate, grâce à l'utilisation de microlysismètres. La mobilité de ces deux inhibiteurs et leur devenir dans le sol et les eaux de percolation ont été également étudiés grâce à un dispositif reposant sur l'utilisation de colonnes de sol.

- Le deuxième projet avait pour objectif d'étudier les aspects physiologiques et moléculaires de l'absorption et l'assimilation de l'urée chez le colza. L'analyse bibliographique a fait apparaître que le nickel est un élément indispensable dans l'activation de l'enzyme uréase, dont la fonction essentielle est de permettre aux plantes d'utiliser l'urée comme source d'azote pour leur croissance. Par ailleurs, les connaissances se rapportant aux effets d'un inhibiteur d'uréases sur la physiologie et le métabolisme azoté des plantes restent incomplètes. L'étude conjointe, menée en conditions contrôlées, de l'effet d'une carence en nickel et de la présence d'un inhibiteur d'uréases dans le milieu de culture, nous a permis de mettre en évidence leurs impacts sur la croissance et le métabolisme azoté des plantes. Cette étude physiologique a été complétée par une analyse transcriptomique des gènes intervenants dans le transport (*BnDUR3*) et l'assimilation (*BnUréase*, *BnGDH1*, *BnGDH2*) de l'urée.

Une autre partie de ce projet a porté sur la nutrition mixte, type nitrate-urée et nitrate-ammonium. La littérature indique que, ces formes combinées d'azote entraînent une meilleure croissance des plantes, comparativement à celles ayant reçues de l'urée ou de l'ammonium comme seule source d'azote. Ces études indiquent également que la présence de nitrate contribue à la levée de toxicité liée à une alimentation uréique ou ammoniacale stricte. Cependant, les mécanismes responsables de cette levée de toxicité restent encore peu connus. Nous avons donc tenté d'étudier les effets d'une alimentation combinée sur la croissance du colza. L'absorption et l'assimilation des différentes formes azotées ont été étudiées aux niveaux physiologique et moléculaire.

- Le troisième projet, qui constitue une approche « terrain » de ce travail de thèse, est venu compléter et apporter des éléments physiologiques et agronomiques supplémentaires par rapport aux deux premières études. Il s'agissait d'établir des bilans azotés, grâce à un dispositif de cases lysimétriques, et d'appréhender l'effet de différents types d'engrais azotés sur le rendement de la culture de colza et leur impact sur l'environnement. L'objectif était d'évaluer plus clairement l'intérêt d'une fertilisation uréique combinée ou non à l'utilisation d'un inhibiteur d'uréase, comparativement à un engrais plus couramment utilisé, comme l'ammonitrate.

Chapitre II

CRIBLAGE DES INHIBITEURS D'UREASES ET DE LA NITRIFICATION

CHAPITRE II. CRIBLAGE DES INHIBITEURS D'UREASES ET DE LA NITRIFICATION

A. MATERIELS ET METHODES

I. Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification

Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification ont été synthétisés par l'ENSCR et leur criblage a été effectué grâce à un système de fioles (cf. III.1), qui permet de réaliser des tests rapides. L'efficacité des inhibiteurs est évaluée d'une part sur l'inhibition de l'activité uréasique ou nitrifiante dans le sol, et d'autre part par comparaison de leur effet inhibiteur à celui des inhibiteurs d'uréases et de nitrification couramment utilisés en agriculture, à savoir l'Agrotain (NBPT) et le Dicyandiamide (DCD). Ces deux derniers seront utilisés comme « **témoin de référence** » tout au long de cette étude.

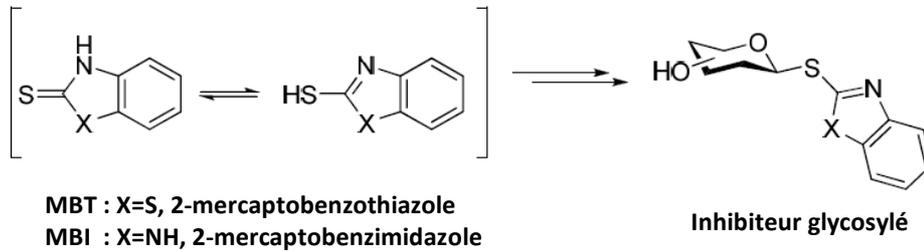
I.1. Les inhibiteurs de nitrification

Les inhibiteurs de nitrification sont synthétisés à partir de deux molécules : le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) et le 2-mercaptobenzimidazole (MBI), auxquels sont greffés différents sucres simples dont le glucose (Glc), le lactose (Lac), le cellobiose (Cel) et le gentiobiose (Gent; fig. II-1). La glycosylation directe de ces inhibiteurs a pour but d'accroître leur solubilité dans l'eau favorisant ainsi leur migration à travers les particules du sol, mais aussi potentiellement de réduire l'écotoxicité des molécules d'origine.

I.2. Les inhibiteurs d'uréases

Les inhibiteurs d'uréases, sont tous formulés à base de NBPT qui correspond à la partie active de la molécule. Différents composés, comme la cyclodextrine et la wollastonite ont été utilisés comme produit d'enrobage afin de protéger le NBPT et d'accroître sa durée d'action, notamment en sol acide. En effet, un excès de protons affecterait l'efficacité et/ou la durée de vie des inhibiteurs d'uréases, en favorisant notamment la conversion du NBPT en son analogue oxygéné, l'oxon [N-(n-butyl) phosphoric triamide], inhibiteur potentiel des uréases, qui présenterait une efficacité réduite en sol acide.

Glycosylation des molécules cibles



Structure des nouveaux inhibiteurs glycosylés

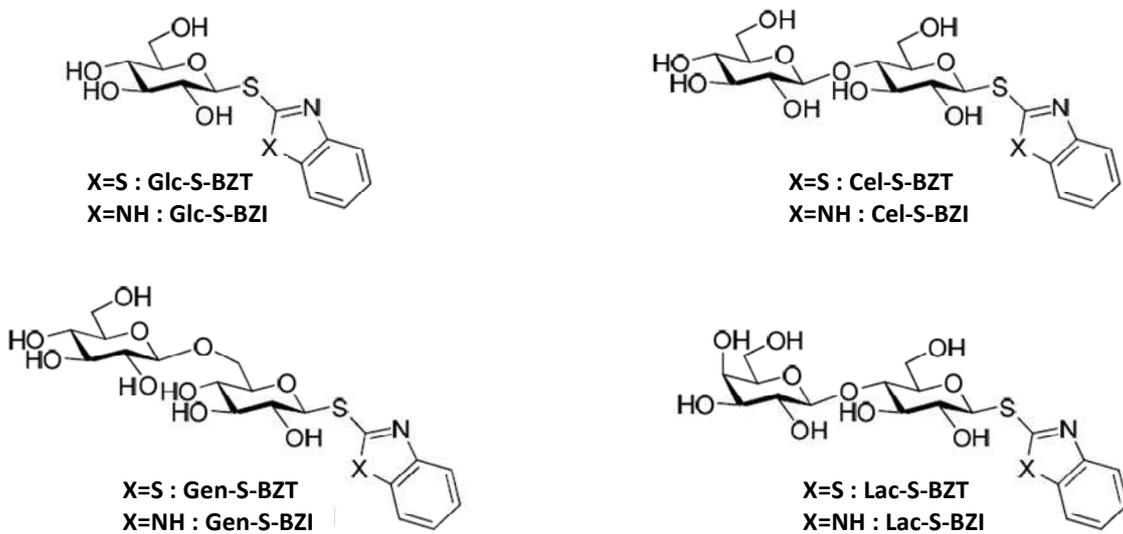


Figure II-1. Glycosylation des molécules cibles et structure des nouveaux inhibiteurs de nitrification. MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Glc = Glucose; Cel = Cellobiose; Gen = Gentiobiose; Lac = Lactose.

II. Les sols utilisés et leurs caractéristiques

Afin de tester *in-vivo* les molécules nouvellement synthétisées et d'évaluer leur efficacité, deux types de sol ont été retenus : un sol alcalin (pH 8,2) et un sol acide (pH 5,5), prélevés respectivement dans la plaine de Caen (sur la commune de Courseulles, Calvados), et dans l'Orne (sur la commune de Mortrée). Ces sols ont été séchés puis tamisés (diamètre des mailles du tamis : 2 mm). Un échantillon de chaque sol a ensuite été envoyé au Laboratoire Agronomique de Normandie (LANO) à Saint-Lô (Manche) afin d'en déterminer les principales caractéristiques (tableau II-1).

III. Criblage et mise en place des traitements

III.1. Tests des inhibiteurs *in vitro*

10 g de sol sec tamisé sont placés dans des flacons en verre de 60 ml auxquels sont ajoutés 3 ml d'eau, ce volume permettant d'atteindre la capacité au champ du sol étudié (fig. II-2). Après 1 h d'incubation, temps nécessaire pour que l'activité microbienne se stabilise, 1 ml d'une solution contenant 10 mg d'urée ou de sulfate d'ammonium est ensuite ajouté (Kiss et Simihăian, 2002).

Les inhibiteurs d'uréases sont appliqués à raison de 0,4% (par rapport au poids de l'urée). L'ensemble des inhibiteurs d'uréases présente des teneurs différentes en NBPT. Afin de comparer leur efficacité, la même quantité de molécule active (NBPT) a donc été apportée. Les inhibiteurs de nitrification quant à eux, sont appliqués à 4,5% par rapport à la teneur en azote de l'engrais apporté (21% d'azote pour le sulfate d'ammonium ; nouvelle réglementation CE N°1107/2008).

Les flacons sont ensuite hermétiquement fermés pour éviter toute perte d'azote par volatilisation, puis mis à incuber à 20°C pendant une période pouvant aller jusqu'à 40 jours, selon le type de sol utilisé. Au cours de cette période, les cinétiques de dégradation de l'engrais (urée ou sulfate d'ammonium) sont établies en effectuant des dosages d'urée, d'ammonium et de nitrate tous les deux ou trois jours.

III.2. Tests des inhibiteurs en microlysimètres

A la suite des criblages, deux inhibiteurs de nitrification (Gent-S-BZI et Gent-S-BZT) ont été choisis pour des tests en microlysimètre, dont le but est d'étudier l'effet de ces deux inhibiteurs sur l'absorption de l'azote ammoniacal chez le colza et sur le lessivage du nitrate. Les graines de colza *Brassica napus* L. (var. Capitol) sont semées sur un mélange terreau/perlite (2/3 terreau et 1/3 perlite), puis laissées à germer pendant 15 jours. Les

Tableau II-1. Caractéristiques des sols utilisés pour les diverses expérimentations portant sur l'utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de nitrification.

Caractéristiques du sol	Sol 1	Sol 2
• pH	8,2	5,5
• Texture	Limoneuse	Limono-argilo-sableuse
• Matière organique (g/kg)	21	32
• Taux de saturation (%)	230 (sursaturé)	66 (faible)
• Chaux (CaO; g/kg)	6,06 (élevé)	1,48 (insuffisant)

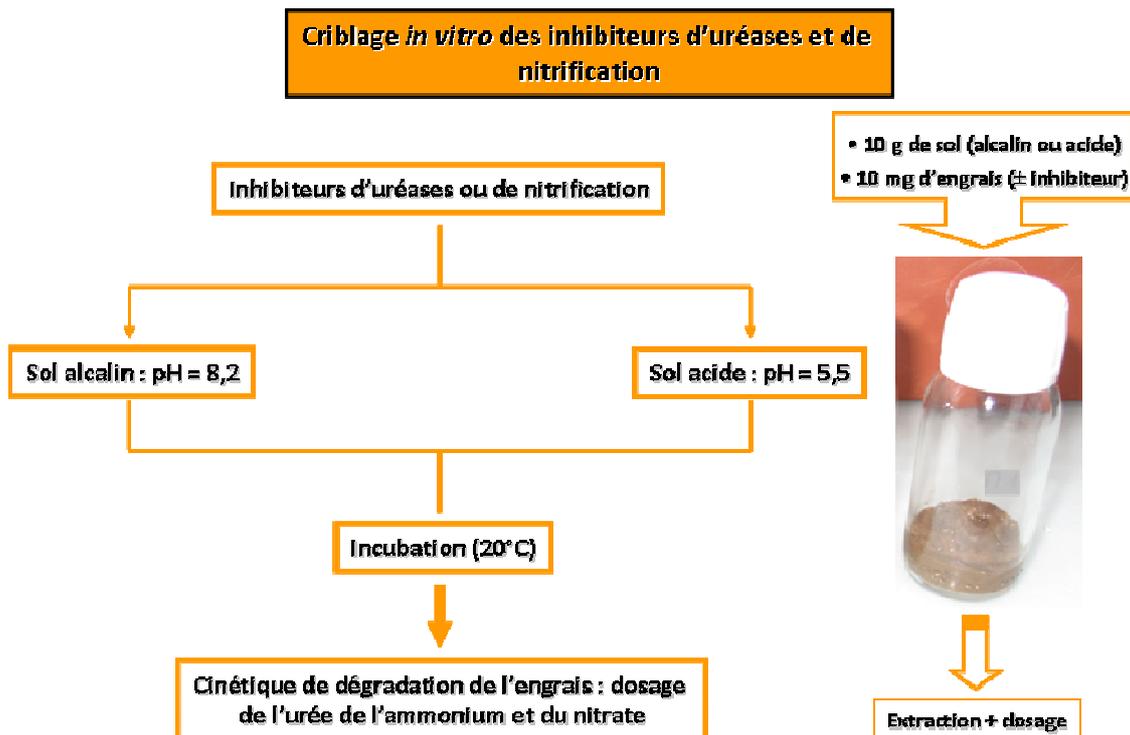


Figure II-2. Description du dispositif de criblage *in vitro* des inhibiteurs d'uréases et de la nitrification.

plantules sont ensuite repiquées dans des pots (une plante par pot) contenant 1,5 kg d'un mélange sol/perlite (1/2 sol et 1/2 perlite) et acclimatées pendant 10 jours. Pendant cette période, les plantules sont arrosées avec une solution de Hoagland dépourvue d'azote avant le début des traitements. L'engrais est ensuite apporté sous forme d'ammonium-nitrate marqué ($^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, excès isotopique = 5%) à raison de 150 kg-N/ha soit 0,26g-N/pot. Les inhibiteurs de nitrification (Gent-S-BZI, Gent-S-BZT, BZT, BZI et DCD) sont quant à eux apportés à 4,5% par rapport à la quantité d'azote de l'engrais. Des arrosages successifs sont effectués à 2, 5, 8, 11, et 15 jours (en sol alcalin) et à 3, 5, 9, 13 et 16 jours (en sol acide), après le début du traitement (fig. II-3). Les percolats sont collectés à chaque point de cinétique afin de quantifier les pertes d'azote par lixiviation. L'expérience est réalisée sous serre à 20°C avec une photopériode de 16/8h. Le sol et les plantes, récoltés après 20 jours, sont pesés (MF), séchés à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, pesés à nouveau (MS) puis réduits en poudre fine grâce à un broyeur à bille (MM301 moulin mélangeur; Retsch). Les analyses isotopiques sont effectuées en utilisant un analyseur (EA 300; Eurovector) couplé à un spectromètre de masse (spectromètre de masse Isoprime; GV Instrument). Les quantités d'azote total (N_{tot}) pour un échantillon donné "i", et les quantités de ^{15}N absorbées par les plantes (N_{upt_i}) sont calculées de la façon suivant :

- $N_{tot_i} = (\%N_i \times MS_i)/100$
- $N_{upt_i} = (N_{tot_i} \times E_i)/E_s$

Où E_i (%) correspond à l'excès isotopique de l'échantillon, et E_s à l'excès isotopique de la solution de marquage (5%). La quantité de ^{15}N liée à l'abondance isotopique naturelle dans la plante est retranchée.

Les pertes d'azote par volatilisation sont ensuite estimées par un défaut de bilan et sont calculées de la façon suivante :

$$^{15}\text{N}_{\text{volatilisé}} = ^{15}\text{N}_{\text{engrais}} - (^{15}\text{N}_{\text{percolat}} + ^{15}\text{N}_{\text{sol}} + ^{15}\text{N}_{\text{plante}})$$

III.3. Tests des inhibiteurs sur des colonnes de sol

Afin d'étudier la mobilité et le devenir des molécules dans le sol et dans les eaux de percolation, un dispositif « colonnes de sol » a été mis en place (fig. II-4). Il s'agit de colonnes en PVC de 8 cm de diamètre et 70 cm de hauteur, contenant 2,5 kg d'un mélange sol/sable (2/3 sol et 1/3 sable). A la base de chaque colonne, le sol est séparé par une couche de 1 cm de sable, un feutre de drainage, et une grille en PVC pour faciliter le lessivage, le tout étant soutenu par un manchon. Le sol est maintenu à une humidité constante correspondant à

Tests des inhibiteurs dans les systèmes de microlysimètres

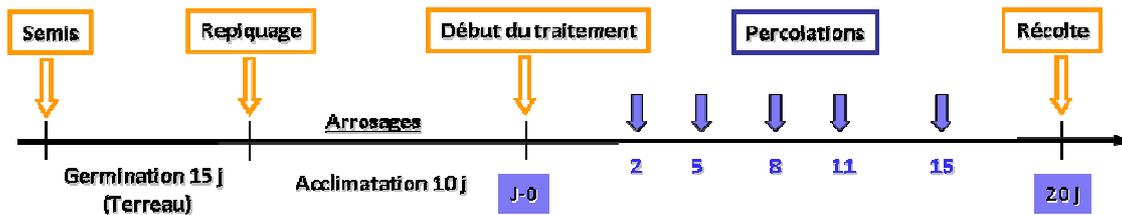
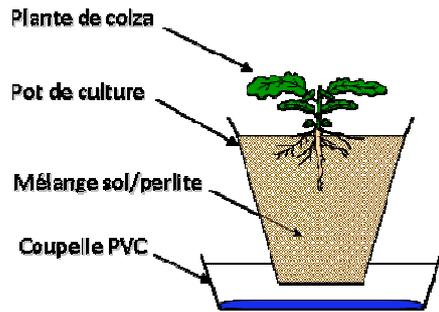


Figure II-3. Dispositif expérimental reposant sur l'utilisation de microlysimètre, l'apport ou non d'inhibiteurs de nitrification, et permettant de quantifier leur efficacité et leur effet sur la nutrition azoté du colza (*Brassica napus* L.).

Tests des inhibiteurs dans les colonnes de sol

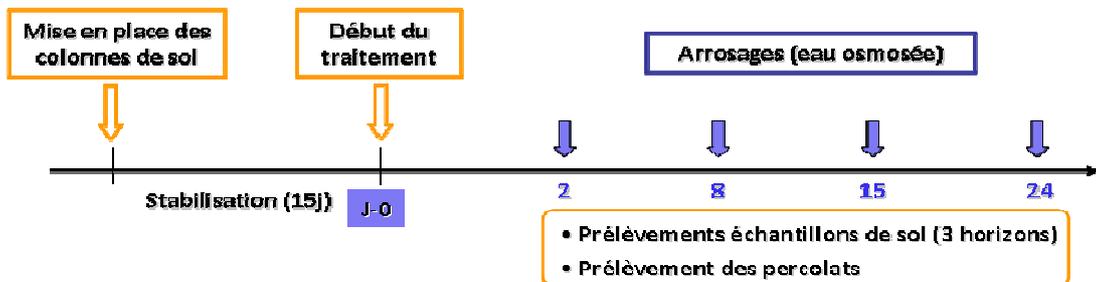
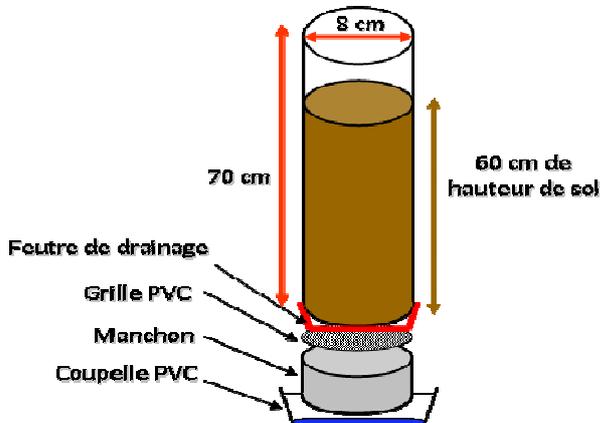


Figure II-4. Dispositif expérimental utilisant des colonnes de sol, permettant de quantifier l'effet d'inhibiteurs de la nitrification, leur mobilité et leur dégradation.

la capacité au champ. Les colonnes sont ensuite placées en serre à 20°C et à l'obscurité pendant toute la durée de l'expérience. Les traitements ont été pratiqués 15 jours après le remplissage des colonnes afin que le sol se stabilise. L'azote est apporté sous forme de sulfate d'ammonium à raison de 75 kg-N/ha et les inhibiteurs de nitrification (Gent-S-BZI, Gent-S-BZT, BZT, BZI et DCD) à 4,5% par rapport à la quantité d'azote de l'engrais. Des apports d'eau osmosée sont ensuite effectués à 2, 8, 15, et 24 jours après l'apport du traitement. A chaque point de cinétique, et pour chaque colonne, les eaux de percolation ainsi que les 3 horizons de sol (0 - 20, 20 - 40 et 40 - 60 cm) sont récoltés pour les dosages de l'ammonium, des inhibiteurs de nitrification et de leurs éventuels produits de dégradation.

IV. Extractions et dosages de l'urée, du NH_4^+ , du NO_3^- et des inhibiteurs de la nitrification

IV.1. Extraction

L'extraction de l'ammonium et de l'urée est effectuée par agitation continue des échantillons de sol pendant 1 h dans une solution de KCl à 1 M (30 ml pour 10 g de sol) tandis que celle du nitrate est réalisée en plaçant les échantillons de sol dans une solution de $\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2$ à 8 mM. Les échantillons de sol sont ensuite filtrés sur filtre Wattman sans cendre.

L'extraction des inhibiteurs de nitrification est réalisée à partir de 5g de sol auxquels sont ajoutés 5 ml de méthanol. Après 1 h d'agitation, les échantillons sont placés sous ultrasons (bac à ultrason) pendant 1 h puis centrifugés pendant 5 min à 3000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$. Le surnageant est filtré sur des filtres en polypropylène (Acrodisc®) de 0,2 μm de diamètre des pores. Le méthanol est évaporé et le résidu sec est repris soit dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (90/10), pour le dosage des molécules non glycosylées, soit dans un mélange $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (90/10) pour le dosage des molécules glycosylées ou le DCD.

IV.2. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée est réalisé à l'aide de la méthode mise au point par Mulbaney et Bremmer (1979). 0,5 ml du filtrat sont prélevés auxquels sont rajoutés 1,25 ml de réactif*. Les échantillons sont ensuite placés au bain-marie à 85°C pendant 30 minutes puis placés à 4°C pendant 20 minutes pour stopper la réaction. La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 545 nm et la teneur en urée déterminée à partir d'une courbe d'étalon.

Le réactif est composé des produits suivants :

- Diacetylmonoxim (DAM) : 2,5 g DAM dans 100 ml d'eau.
- Thiosemicarbazide (TSC) : 0,25 g TSC dans 100 ml d'eau.
- Réactif acide : 20 ml de H_2SO_4 + 500 ml de PO_4H_3 85% dans 100 ml d'eau.

*Réactif = 7,5 ml DAM + 4,5 ml TSC, compléter à 150 ml avec le réactif acide.

IV.3. Dosage de l'ammonium

Le dosage de l'ammonium est réalisé à l'aide du kit Ammonium test-Spectroquant (Merck). Après avoir dilué le filtrat 200 fois, 5 ml sont utilisés pour effectuer le dosage. La Densité Optique (DO) des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 692 nm et la teneur en NH_4^+ estimée à partir d'une courbe d'étalonnage.

IV.4. Dosage du nitrate

La concentration en nitrate des échantillons obtenus après extraction est déterminée par Chromatographie Ionique Haute Performance (CIHP) Dionex ICS-3000. Les anions sont séparés par une colonne échangeuse d'ions (IONPAC AS4A-SC 4 mm- polystyrène polyacrylate) par compétition avec l'éluant (KOH) en fonction de leur masse moléculaire et de leur valence. Ils sont détectés par conductimétrie puis identifiés en fonction de leur temps de rétention par comparaison avec un standard.

IV.5. Dosage des inhibiteurs de la nitrification

Les dosages du DCD, des molécules glycosylées ainsi que leurs parties actives et les sous-produits de dégradation ont été réalisés par les chercheurs de l'ENSCR (Samuel Huguet) par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC/MS/MS) sur un système de la société Waters (Milford, USA) de type UPLC/MS/MS constitué d' :

- une pompe binaire Acquity UPLC[®] dont le débit est fixé à 400 μl /min,
- un passeur d'échantillons Acquity UPLC[®] où les échantillons sont conservés à 5°C et le volume d'injection est de 5 μl (injection complète de la boucle d'injection),
- un four thermostaté à 45°C pour les colonnes chromatographiques, équipé d'un système de préchauffage de la phase mobile,
- un spectromètre de masse Quattro Premier de Micromass (Manchester, UK), équipé d'une source electrospray (ESI Z-sprayTM) et deux analyseurs quadripolaires. Le gaz

de nébulisation et de désolvatation est constitué d'azote, obtenu par un générateur d'azote NM30LA de chez Peak scientific (Inchinnam, UK).

- le système UPLC/MS/MS est piloté par le logiciel Mass Lynx. Le traitement des données est effectué à l'aide du programme Target Lynx inclus dans le logiciel.

V. Mesure de la solubilité et de l'écotoxicité des inhibiteurs de nitrification

Ces mesures ont été effectuées par les chercheurs de l'ENSCR (thèse de doctorat de D.Pro).

V.1. Mesure de la solubilité

Une solution aqueuse (500 μ L) saturée par le composé étudié est conservée à 25°C pendant 24 heures, puis filtrée sur un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 μ m. Après lyophilisation d'un volume connu du filtrat, le produit sec est pesé afin de déterminer l'hydrosolubilité. Celle-ci est considérée comme supérieure à 200 g/L (donc soluble) lorsqu'il n'y a aucune précipitation à partir de 100 mg pour 500 μ l d'eau.

V.2. Mesure de l'écotoxicité

Le Microtox[®] Toxicity Analyser Model 500 (R-Biopharm, Réf SD686018A), développé par Azur Environmental (Carlsbad, CA, USA) a été utilisé par les chercheurs de l'ENSCR pour mesurer la toxicité des inhibiteurs de nitrification. Les bactéries gram-négatives, *Vibrio fischeri* (R-Biopharm, Réf SD686018A), bioluminescentes et sensibles aux composés toxiques, sont utilisées pour ces tests. Les résultats obtenus sont exprimés en EC₅₀, correspondant à la concentration causant la mort de 50% de la population bactérienne. La survie des bactéries restantes est mesurée à 490 nm. Des valeurs faibles d'EC₅₀ indiquent que la substance est toxique.

VI. Quantification des pertes ammoniacales par volatilisation

VI.1. Description du dispositif utilisé

Le dispositif mis au point par Zhengping *et al.*, (1991) a été utilisé pour la quantification des pertes d'ammoniac par voie gazeuse. Il a cependant été amélioré afin de limiter le plus possible les pertes d'ammoniac (fig. II-5). 150 g de sol sec tamisé sont placés dans des fioles en verre de 250 ml, puis laissés pendant 24 h à température ambiante avant de rajouter 10 ml d'eau répartie de façon homogène sur la surface, et 5 ml d'une solution contenant l'engrais (250 kg N-Urée/ha) ainsi que l'inhibiteur d'uréases. Le dispositif est placé à 20°C et les mesures sont effectuées toutes les 24 h pendant 12 jours.

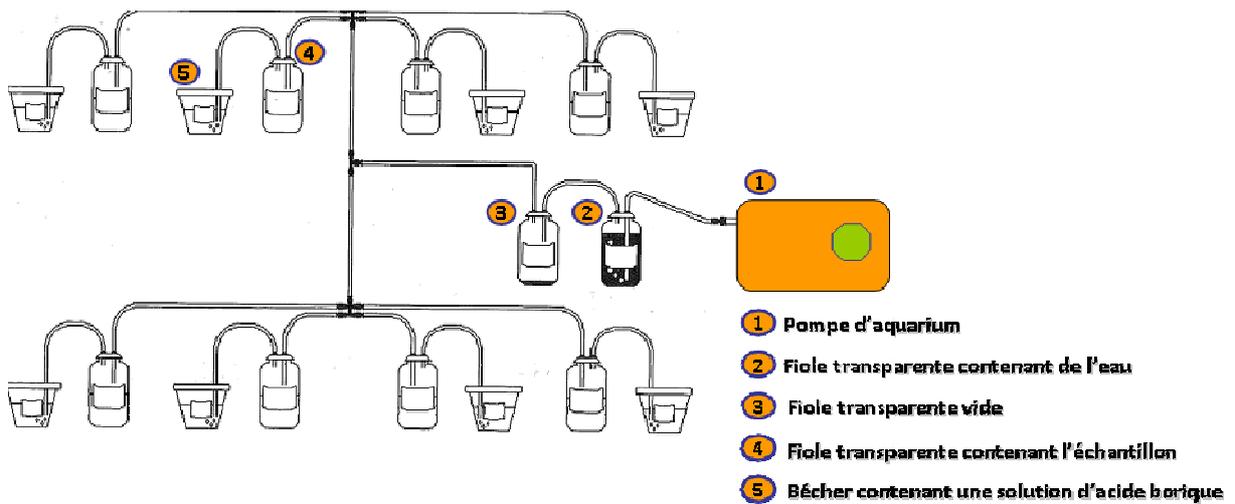


Figure II-5. Dispositif utilisé pour quantifier les pertes ammoniacales par volatilisation (d'après Zhengping *et al.*, 1991). Les expérimentations ont été effectuées à une température $T=20^{\circ}\text{C}$ en serre.

Un courant d'air est généré par une pompe d'aquarium, humidifié en passant à travers une fiole contenant de l'eau osmosée, puis dirigé vers une autre fiole afin de piéger l'eau condensée dans les tuyaux. L'air humidifié est ensuite acheminé jusqu'aux fioles (250 ml) contenant les divers échantillons de sol. Après s'être chargé en NH_3 , l'air est entraîné vers une solution d'acide borique à 1% au niveau de laquelle l'ammoniac est fixé selon la réaction suivante :



VI.2. Dosage de l'ammoniac

La solution d'acide borique est titrée à l'aide une solution de HCl 0,1 N selon la réaction suivante :



Le volume d'acide versé afin de revenir au pH initial de l'acide borique permet de déduire la masse d'azote présent dans chaque échantillon et donc la quantité d'ammoniac volatilisé.

VII. Traitement statistique des données

L'ensemble des traitements est réalisé systématiquement avec quatre répétitions. Les données obtenues sont présentées sous forme de moyenne et la variabilité des résultats est donnée sous la forme de l'écart-type de la moyenne pour $n=4$. Une analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant le test de Student.

B. RESULTATS

I. Les inhibiteurs d'uréases

I.1. Effet du NBPT sur la volatilisation de l'ammoniac

Afin d'estimer l'impact d'une fertilisation uréique en sol alcalin, et de quantifier les pertes d'ammoniac par voie gazeuse, le dispositif de Zhengping *et al.* (1991) a été mis en place. Les résultats présentés dans la figure II-6 montrent que lorsque l'urée est apportée seule, les pertes ammoniacales débutent immédiatement après son application. Exprimées en pourcentage de l'azote appliqué, ces pertes atteignent 15% après 6 jours d'incubation et plus de 20% après 12 jours. En présence de NBPT, aucune perte d'azote par volatilisation n'est observée pendant les 4 premiers jours qui suivent l'application de l'urée. Après 12 jours d'incubation, les pertes s'élèvent seulement à 8%. De ce fait, la présence d'un inhibiteur d'uréases en combinaison avec l'urée contribue à une réduction importante (-60%) des émissions ammoniacales.

I.2. Effet du NBPT et du NBPTO sur l'hydrolyse de l'urée et l'accumulation de l'ammonium

L'objectif de ces tests était d'évaluer l'effet de ces deux inhibiteurs d'uréases sur l'inhibition de l'activité uréasique dans le sol et de comparer, sur deux types de sol, les deux formulations du NBPT. Ce dernier est apporté soit sous forme d'Agrotain (contenant 23% de NBPT) ou directement sous sa forme oxygéné, le NBPTO, inhibiteur potentiel des uréases.

A. En sol alcalin

Les résultats obtenus montrent que l'application du NBPT ou de son analogue oxygéné, le NBPTO (à 0,4% du poids de l'urée) inhibe de 40% l'activité uréasique du sol pendant au moins les 16 premiers jours qui suivent leur application (fig. II-7a), passant de 0,46 à 0,37 mg N-urée/g de sol. L'hydrolyse de l'urée en présence des inhibiteurs n'est complète qu'après 24 jours d'incubation, tandis que chez le témoin, l'urée est complètement hydrolysée après seulement 4 jours d'incubation. Dans nos conditions expérimentales, l'absence de différence observée lors de l'apport du NBPT et du NBPTO résulte du fait, qu'ils ont été utilisés de façon à apporter le même nombre de mole de la molécule active. Le suivi des teneurs en NH_4^+ du sol confirme également ces résultats. Chez le témoin, un pic de N- NH_4^+ issu de la dégradation de l'urée, suivi d'une chute progressive liée à l'activité nitrifiante

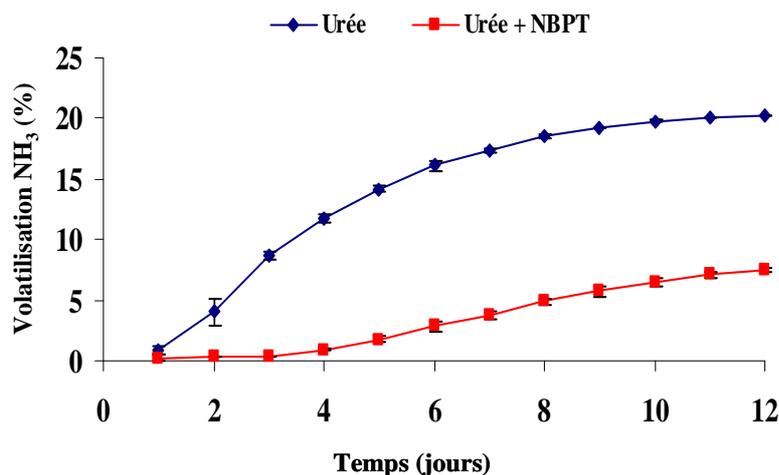


Figure II-6. Effet du NBPT sur la volatilisation de l'ammoniac (NH_3) en sol alcalin (pH 8,2). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour $n=4$. Le traitement NBPT est significativement différent du témoin (urée) au seuil $P<0,01$.

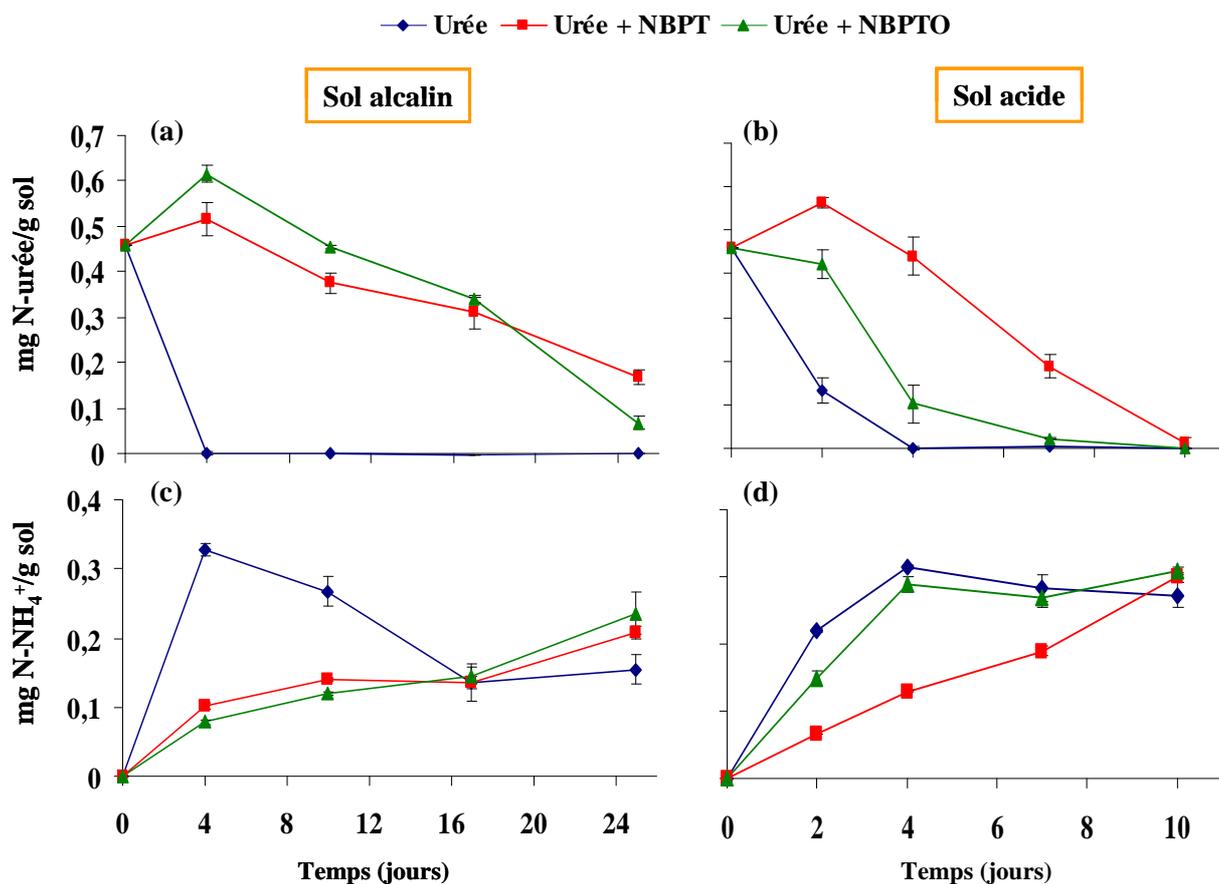


Figure II-7. Effet du NBPT et du NBPTO sur l'hydrolyse de l'urée (a et b) et sur l'accumulation de NH_4^+ (c et d) en sol alcalin (pH 8,2 ; a et c) et en sol acide (pH 5,5 ; b et d). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour $n=4$. Le traitement NBPT est significativement différent du témoin (urée) au seuil $P<0,01$.

du sol, est observé 4 jours après le début du traitement (fig. II-7c). En présence des inhibiteurs, les teneurs en N-NH_4^+ restent relativement faibles tout au long de l'expérimentation. Après 10 jours d'incubation, les teneurs en ammonium du sol sont de 0,13 mg N-NH_4^+ /g de sol contre 0,28 mg N-NH_4^+ /g de sol chez le témoin.

B. En sol acide

En sol acide (pH = 5,5), l'hydrolyse de l'urée a lieu au cours des 4 premiers jours d'incubation chez le témoin et celle-ci est retardée de 6 jours en présence de NBPT et de 2 jours seulement en présence du NBPTO (fig. II-7b). Chez le témoin ou en présence du NBPTO, la teneur en ammonium du sol est maximale (0,32 mg N-NH_4^+ /g de sol) après 4 jours de traitement alors qu'elle ne s'élève qu'à 0,12 mg N-NH_4^+ /g de sol en présence de NBPT (fig. II-7d). Cependant, les teneurs en NH_4^+ sont identiques après 10 jours d'incubation quel que soit le traitement considéré.

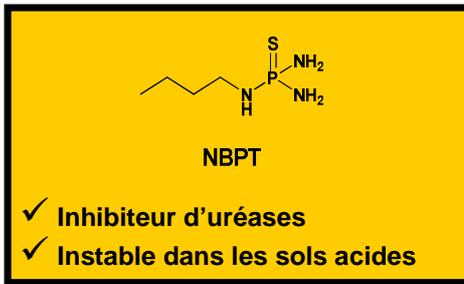
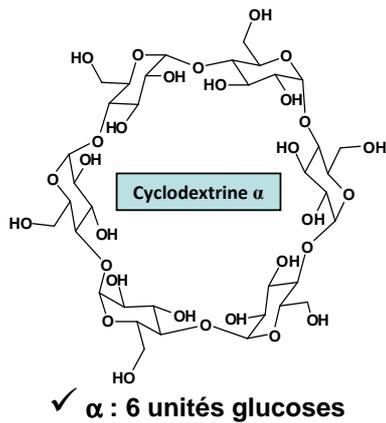
Il est intéressant de constater que l'efficacité des deux inhibiteurs testés diffère en fonction du pH du sol. L'inhibition de l'activité uréasique par le NBPT, serait plus importante en sol alcalin qu'en sol acide. En effet, en présence de NBPT, l'hydrolyse de l'urée est retardée de 15 à 20 jours en sol alcalin et de 6 jours seulement en sol acide. Par ailleurs, les tests avec le NBPTO, qui représente l'inhibiteur potentiel des uréases, montrent que celui-ci n'est efficace qu'en sol alcalin. L'acidité du sol serait donc un paramètre qui influence la stabilité du NBPT et sa durée d'action en favorisant sa conversion en son analogue oxygéné, le NBPTO.

En se basant sur ces résultats, de nouveaux inhibiteurs d'uréases ont été synthétisés (par l'ENSCR) afin d'accroître l'efficacité du NBPT et de prolonger sa durée d'action en sol acide. Il s'agit de nouvelles formulations à base de NBPT qui se trouve dans un produit d'enrobage comme la cyclodextrine (fig. II-8) ou la wollastonite, lui conférant un effet protecteur et une meilleure stabilisation. Différents rapports pondéraux cyclodextrine/NBPT et wollastonite/NBPT ont été testés : C/NBPT (1/1), C/NBPT (2/1) et C/NBPT (5/1)] ainsi que W/NBPT (1/1), W/NBPT (2/1), et W/NBPT (4/1).

I.3. Stabilisation du NBPT par la cyclodextrine et la wollastonite en sol acide

Le suivi de la dégradation de l'urée dans le sol et l'accumulation de l'ammonium en présence des différents inhibiteurs est présenté dans la fig. II-9. Ces résultats montrent que l'hydrolyse de l'urée a lieu au cours des 4 premiers jours d'incubation chez le témoin, alors qu'elle est différée de 6 jours en présence des inhibiteurs d'uréases (fig. II-9a et b). En effet, les teneurs en urée du sol restent relativement stables (0,40 mg N-urée/g de sol) durant les 4

✦ Les cyclodextrines :



✦ Principe de stabilisation :

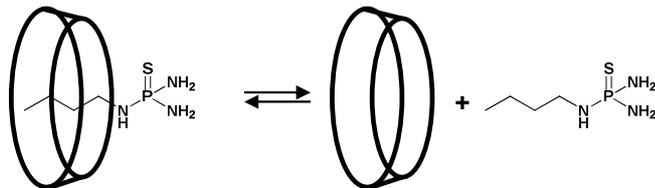


Figure II-8. Stabilisation du NBPT par la cyclodextrine.

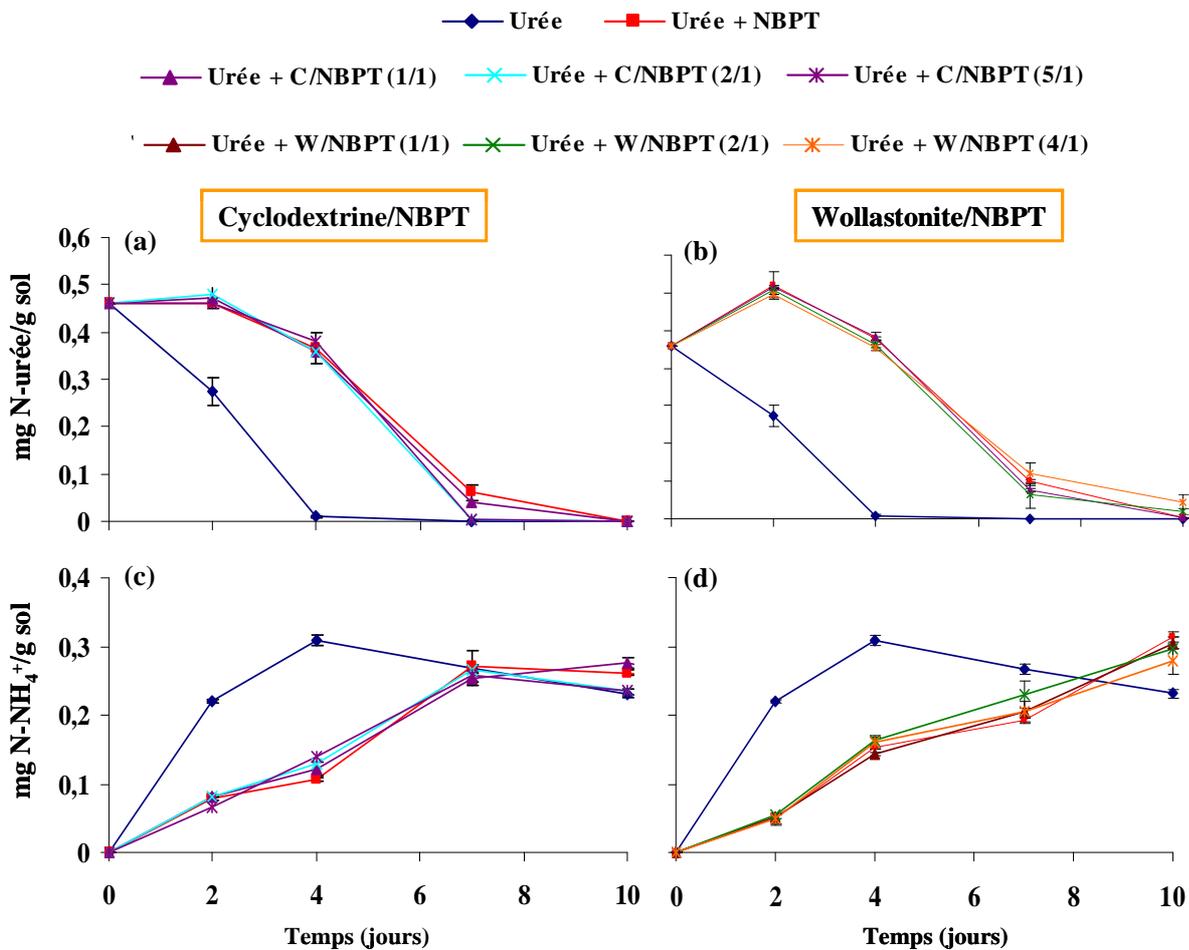


Figure II-9. Effet du NBPT stabilisé par la cyclodextrine (a et c) et par la wollastonite (b et d) sur l'hydrolyse de l'urée (a et b) et sur l'accumulation de NH₄⁺ (c et d) en sol acide (pH 5,5). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4.

premiers jours d'incubation avant de diminuer pour atteindre 0,08 mg N-urée/g de sol à 7 jours. Les résultats montrent également que quel que soit la formulation de l'inhibiteur testé et rapport cyclodextrine/NBPT ou wollastonite/NBPT, l'ensemble des molécules ont le même effet inhibiteur sur l'activité uréasique du sol. Ceci est confirmé par l'évolution des teneurs en ammonium (fig.II- 9c et d). Ces dernières atteignent respectivement, après 4 jours d'incubation, 0,32 et 0,15 mg N-NH₄⁺/g de sol en absence et en présence des inhibiteurs pour devenir similaire (0,26 mg N-NH₄⁺/g de sol) après 7 jours d'incubation pour l'ensemble des traitements effectués. Cependant, aucune différence n'est observée entre les différentes formulations d'inhibiteurs d'uréases testés.

I.4. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus sur sol alcalin, montrent l'importance des inhibiteurs d'uréases dans la réduction des émissions ammoniacales (fig. II-6).

Le NBPT (commercialisé sous le nom Agrotain), est l'inhibiteur d'uréase le plus utilisé en agriculture (Trenkel, 2010). Dans nos conditions expérimentales, il réduit de 60% les pertes d'azote par voie gazeuse. Ces résultats sont conformes aux travaux rapportés par la littérature (Basten *et al.*, 2005; Cantarella *et al.*, 2005; Zhengping *et al.*, 1991), et montrent que l'utilisation du NBPT en combinaison avec des engrais uréiques, constitue une approche intéressante pour réduire les risques environnementaux liés à l'hydrolyse de l'urée.

Par rapport au témoin (urée sans inhibiteur), la présence du NBPT retarde également la dégradation de l'urée en ammonium, pendant au moins les 16 premiers jours de traitement (fig. II-7a et c). Des travaux menés avec le LCN (autre formulation du NBPT), montrent que cet inhibiteur réduit de 50% l'activité uréasique dans la première couche du sol (0-2 cm ; Giovannini *et al.*, 2009), ce qui évite l'augmentation du pH du sol généralement observés lors de l'hydrolyse de l'urée et qui aurait pour conséquence d'inhiber l'activité nitrifiante des bactéries du sol (Zaman *et al.*, 2008 ; Giovannini *et al.*, 2009).

L'inhibition de l'activité uréasique par le NBPT semble être moins efficace en sol acide (fig. II-7b et d). En effet, la dégradation de l'urée est différée de 15 à 20 jours en sol alcalin (fig. II-7a) et de 6 jours seulement en sol acide (fig. II-7b). Des études d'incubation menées sur plusieurs types de sols, montrent que la réduction des pertes par volatilisation en présence de NBPT est plus importante dans les sols à pH élevé, que dans les sols acides à cause de la dégradation du NBPT (Watson *et al.*, 1994b). En effet, l'action du NBPT sur l'inhibition de l'activité uréasique du sol est associée à sa conversion en son analogue oxygéné l'oxon (NBPTO), qui est l'inhibiteur potentiel des uréases (Phongpan *et al.*, 1995). Par ailleurs, nos

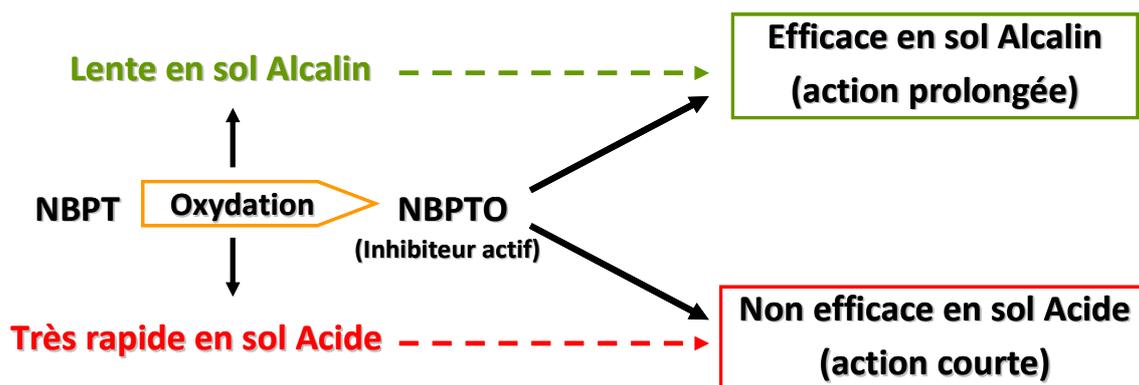


Figure II-10. Efficacité du NBPT dans l'inhibition de l'activité uréasique en fonction du pH du sol.

résultats montrent que le NBPTO ne présente aucun effet inhibiteur en sol acide (fig. II-7a et b), cette perte d'efficacité dans ce type de sol, serait donc liée à l'oxydation rapide du NBPT en NBPTO (fig. II-10). Le pH du sol est donc un paramètre important qui influence l'efficacité et/ou la durée d'action des inhibiteurs d'uréases. Cependant, d'autres paramètres, comme la teneur en argile et le contenu en matière organique (tableau II-1), peuvent avoir un impact sur l'action des inhibiteurs d'uréases (San Francisco *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent également que les nouvelles formulations de NBPT avec la cyclodextrine ou la wollastonite, ne permettent pas sa stabilisation en sol acide (fig. II-9), et n'améliorent donc pas son efficacité. Ce dernier résultat pouvant s'expliquer par l'hydrolyse ou l'instabilité du complexe cyclodextrine-NBPT ou wollastonite-NBPT dans le sol. En effet, ces composés qui sont d'origine naturelle, peuvent subir des dégradations liées à l'activité de la microflore du sol.

Ce travail préliminaire montre par ailleurs, qu'il est nécessaire de poursuivre la mise au point de nouveaux inhibiteurs d'uréases présentant une efficacité aussi bien sur sol acide que sur sol alcalin.

II. Les inhibiteurs de nitrification

La plupart des inhibiteurs de nitrification sont des composés hétérocycliques comportant de l'azote (McCarty et Bremner, 1989) parmi lesquels figurent le 2-mercaptobenzothiazole (MBT), produit et commercialisé principalement au Japon (Bundy et Bremner, 1973; Nelson et Huber, 1992), et le 2-mercaptobenzimidazole (MBI) qui est structurellement proche du MBT. Afin d'augmenter la solubilité dans l'eau du MBT et de son analogue structural, le MBI, des mono- ou disaccharides sont greffés sur ces molécules. La glycosylation a également pour but de favoriser leur migration à travers les particules du sol, et réduire l'écotoxicité liée aux molécules d'origine.

II.1. Effets du MBI et du MBT sur l'activité nitrifiante dans le sol

L'objectif des tests réalisés était d'évaluer l'effet de ces deux inhibiteurs sur l'inhibition de l'activité nitrifiante et de comparer ces effets sur sol alcalin (pH = 8,2) et sol acide (pH = 5,5).

A. En sol alcalin

Les résultats montrent qu'en présence ou en absence d'inhibiteurs de nitrification, les teneurs en N-NH_4^+ du sol restent relativement stables pendant les 4 premiers jours d'incubation (fig. II-11a), puis diminuent progressivement pour devenir nulles après 20 jours d'incubation chez le témoin ne recevant que du sulfate d'ammonium (AS). La présence d'un inhibiteur de nitrification en combinaison avec le sulfate ammonium (AS+MBT et AS+MBI), retarde le processus de nitrification de 10 jours en présence du MBT et d'au moins 12 jours en présence du MBI, atteignant 0,1 mg d' N-NH_4^+ /g de sol après 30 jours d'incubation. Les résultats montrent également que l'effet inhibiteur du MBI semble être plus efficace que celui du MBT. En effet, les teneurs en N-NH_4^+ du sol sont respectivement de 0,19 et 0,10 mg d' N-NH_4^+ /g de sol en présence du MBI contre 0,11 et 0,02 mg d' N-NH_4^+ /g de sol en présence du MBT après 14 et 30 jours d'incubation.

B. En sol acide

Comparativement à un sol alcalin, le processus de nitrification en conditions acides est beaucoup plus lent (fig. II-11b). En sol acide, les résultats montrent qu'après 30 jours d'incubation, seulement la moitié de l'azote ammoniacal apporté au début du traitement est dégradée chez le témoin, passant de 0,21 à 0,10 mg d' N-NH_4^+ /g de sol (fig. 11b), tandis que la totalité de l'ammonium est dégradée après 20 jours d'incubation en sol alcalin (fig. II-11a). Les faibles pH retarderaient donc l'oxydation de l'ammonium en nitrate. En présence du MBT, la nitrification est fortement inhibée et les teneurs en azote ammoniacales dans le sol restent stables (0,21 mg d' N-NH_4^+ /g de sol) jusqu'au 30^{ème} jour d'incubation, alors qu'elles diminuent progressivement en présence du MBI, passant de 0,21 à 0,16 mg d' N-NH_4^+ /g de sol. Ces résultats montrent que le MBT présente une meilleure efficacité que le MBI en sol acide.

- L'ensemble de ces résultats montrent que les deux inhibiteurs de nitrification, MBI et MBT, présentent un effet inhibiteur différentiel en fonction du pH du sol (fig. II-11). Le MBI serait plus efficace en sol alcalin, alors que le MBT est plus efficace en sol acide. En se basant sur ces observations, les criblages de molécules glycosylées, dérivées du MBI et du MBT seront respectivement effectués sur sol alcalin et acide.

- L'ensemble des inhibiteurs glycosylés ont été synthétisés par les chercheurs de l'ENSCR. Cependant, les tests *in vitro* (sur sol), ont été réalisés à différentes périodes en fonction du temps requis pour leur synthèse et de leur réception. Le calendrier des criblages est présenté dans la fig. II-12. Ces inhibiteurs ont été testés sur trois périodes et leur effet inhibiteur a été comparé au DCD (témoin de référence) et aux molécules natives (MBI et MBT).

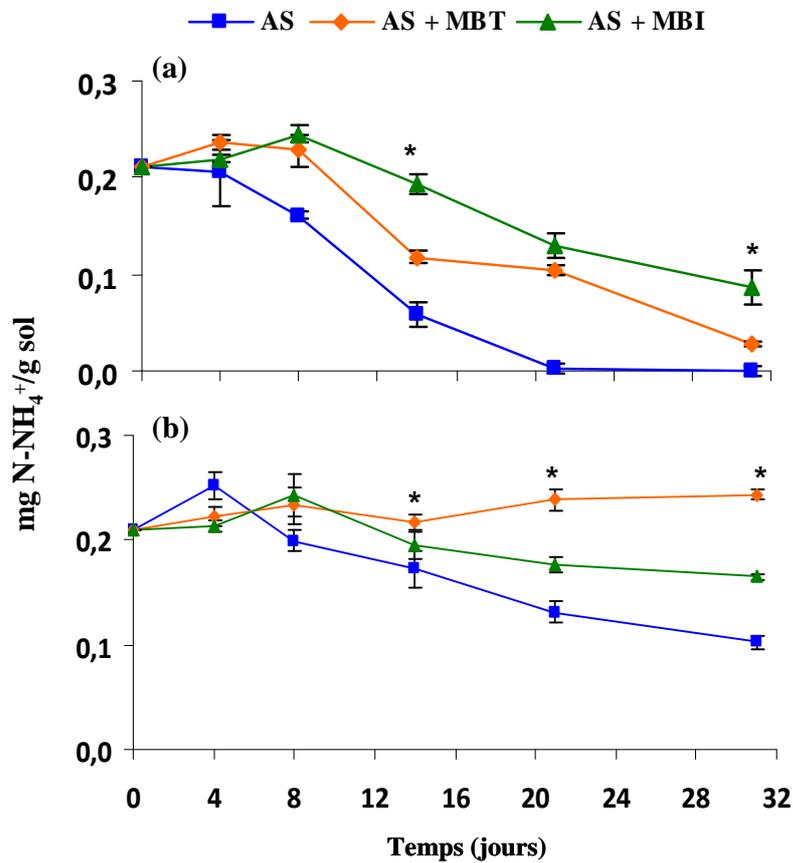


Figure II-11. Effet du MBI et du MBT sur l'inhibition de la nitrification dans un sol alcalin (a) pH = 8,2 ; et un sol acide (b) pH = 5,5. Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4. * Le traitement MBI est significativement différent du traitement MBT au seuil P<0,05. AS = Ammonium sulfate, MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole.

Calendrier des criblages des inhibiteurs de nitrification

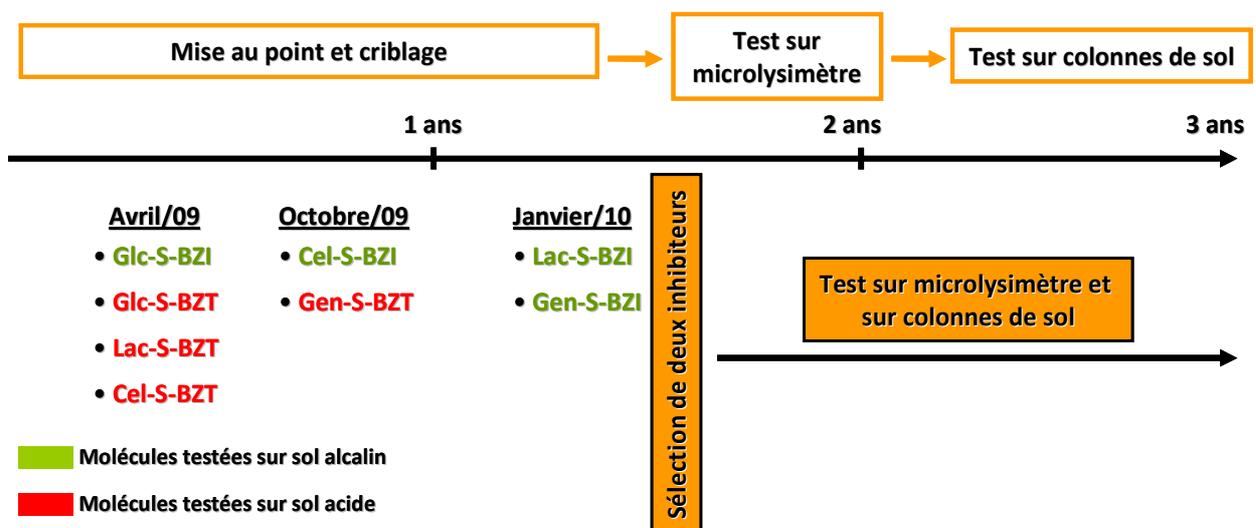


Figure II-12. Calendrier des criblages des inhibiteurs de nitrification synthétisés par D. Pro , doctorante à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR).

II.2. Test des inhibiteurs de nitrification glycosylés dérivés du MBI

Les résultats présentés sur la fig. II-13 montrent l'effet de 4 inhibiteurs de nitrification glycosylés sur la dégradation du sulfate d'ammonium (AS) dans un sol alcalin.

Chez le témoin ne recevant qu'une solution de sulfate d'ammonium (AS), les teneurs en $N-NH_4^+$ diminuent progressivement et la totalité de l'ammonium apporté est dégradée après 23 jours d'incubation.

Le dosage de l'ammonium montre que, quel que soit le traitement, aucune dégradation de l'ammonium n'est observée pendant les 7 premiers jours d'incubation (fig. II-13a).

La présence d'un inhibiteur de la nitrification en combinaison avec le sulfate d'ammonium, retarde d'au moins 8 jours le processus de nitrification.

En effet, les teneurs en ammonium du sol passent de 0,21 à 0,15 mg d' $N-NH_4^+$ /g de sol après 23 jours d'incubation. Les résultats montrent également que l'ensemble des molécules testées (DCD, MBI et Glc-S-BZI) présentent la même efficacité sur l'inhibition de l'activité nitrifiante.

Le suivi des teneurs en azote nitrique du sol confirme en partie ces résultats (fig. II-13b). Chez le témoin, les teneurs en $N-NO_3^-$ augmentent suite à l'activité nitrifiante, passant de 0,02 à 0,15 mg d' $N-NO_3^-$ /g de sol après 18 jours d'incubation. Cette augmentation correspond à la diminution des teneurs en $N-NH_4^+$ du sol. En présence du MBI ou du Glc-S-BZI, les teneurs en $N-NO_3^-$ restent relativement faibles jusqu'à 18 jours d'incubation, puis augmentent progressivement pour atteindre des teneurs équivalentes à celle du témoin après 27 jours d'incubation. L'utilisation du DCD en combinaison avec le sulfate d'ammonium empêche l'apparition de nitrate pendant toute la durée de l'expérience.

Seuls des dosages d'ammonium ont été effectués pour la suite des criblages des inhibiteurs glycosylés (fig. II-13c et d). Globalement, les effets de ces inhibiteurs sur la nitrification, sont relativement similaires à ceux du premier test.

Les résultats montrent que la totalité de l'ammonium apporté est dégradée après 20 jours de traitement et que l'activité nitrifiante du sol est différée pendant au moins 12 jours en présence des molécules MBI, DCD, Cel-S-BZI, Lac-S-BZI et Gen-S-BZI. Cependant, le DCD semble être l'inhibiteur le plus efficace.

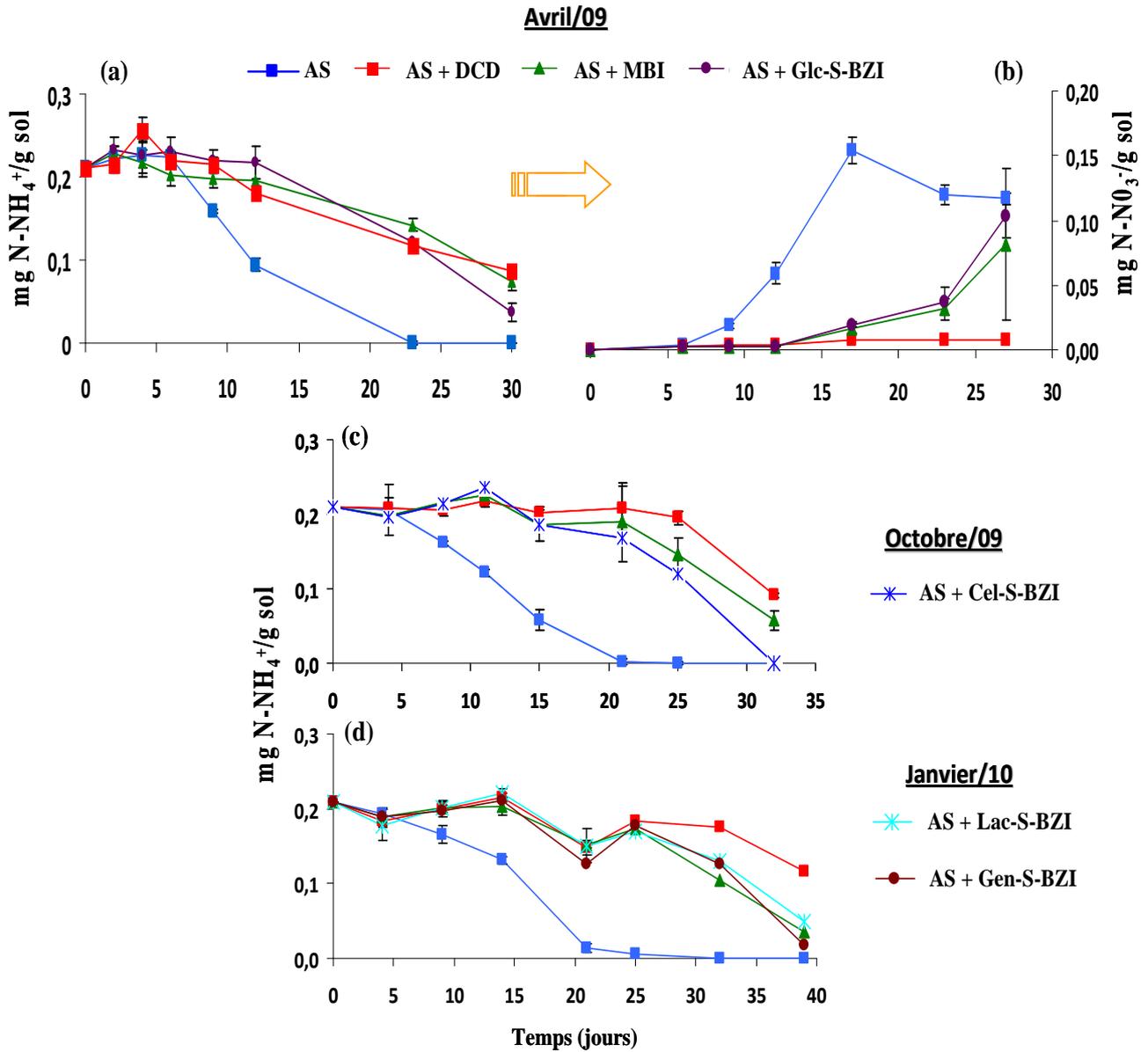


Figure II-13. Effet des molécules glycosylées sur l'inhibition de la nitrification dans un sol alcalin (pH = 8,2). **(a, c et d)** teneurs en N-NH₄⁺ du sol, **(b)** teneur en N-NO₃⁻. Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4. (AS = Ammonium sulfate; DCD = Dicyandiamide; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Glc = Glucose; Cel = Cellobiose; Lac = Lactose; Gen = Gentiobiose). L'ensemble des traitements sont significativement différents du témoin (AS) au seuil P<0,01.

II.3. Test des inhibiteurs de nitrification glycosylés dérivés du MBT

Les résultats obtenus sur un sol acide montrent que l'application des inhibiteurs de nitrification inhibe fortement l'activité nitrifiante du sol (fig. II-14a et b). En effet, la teneur en ammonium reste relativement stable, passant de 0,21 mg d' N-NH_4^+ /g de sol (quantité qui correspond à la totalité de l' N-NH_4^+ apportée au début de l'expérience), à seulement 0,18 mg d' N-NH_4^+ /g de sol au 30^{ème} jour d'incubation, alors que celle-ci s'élève à 0,1 mg d' N-NH_4^+ /g de sol chez le témoin. Les résultats montrent également que les inhibiteurs testés sur sol acide, à savoir le DCD, le MBT, le Glc-S-BZT, le Lac-S-BZT, le Cel-S-BET et le Gen-S-BZT, retardent de façon similaire la dégradation de l'engrais dans le sol et présentent la même efficacité sur l'inhibition de la nitrification.

- Les résultats des tests avec les molécules glycosylés, dérivées du MBI et du MBT et testées respectivement sur sol alcalin et acide, montrent que l'ensemble de ces molécules présentent la même efficacité sur l'inhibition de l'activité nitrifiante, et que la glycosylation ne prolonge pas la durée d'action des molécules natives et n'accroît pas leur efficacité. A ce stade, le choix d'un inhibiteur de nitrification devrait se justifier en se basant sur des critères autres que l'inhibition de la nitrification. De ce fait, des mesures de solubilité (tableau II-2) et des tests d'écotoxicité (fig. II-15) ont été réalisés dans le cadre de la thèse D. Pro (2011) et sont rapportés pour information.

II.4. Tests de solubilité et d'écotoxicité des inhibiteurs de nitrification

Les résultats montrent que le MBI et le MBT sont très peu solubles dans l'eau, et le greffage d'un mono- (glucose) ou d'un disaccharide (lactose, cellobiose ou gentiobiose), accroît considérablement l'hydrosolubilité de ces molécules (tableau II-2), jusqu'à plusieurs centaines de fois. Cependant, la solubilité des dérivés glycosylés est fonction de la fraction glucidique. Les disaccharides, tels que le gentiobiose et le cellobiose accroissent plus fortement la solubilité que le lactose par exemple.

L'impact de la glycosylation sur la toxicité des inhibiteurs (fig. II-15), évalués sur *Vibrio fischeri* (bactérie particulièrement sensible aux composés toxiques), montre que l' EC_{50} (concentration causant la mort de 50% de la population bactérienne) la plus faible est observée pour le MBI et le MBT, dissous dans l'eau en présence de polyéthylène glycol non toxique (PEG). Les résultats montrent également que l'effet toxique diminue considérablement (EC_{50} élevée) lors de la glycosylation du MBI ou du MBT, et plus particulièrement avec le gentiobiose.

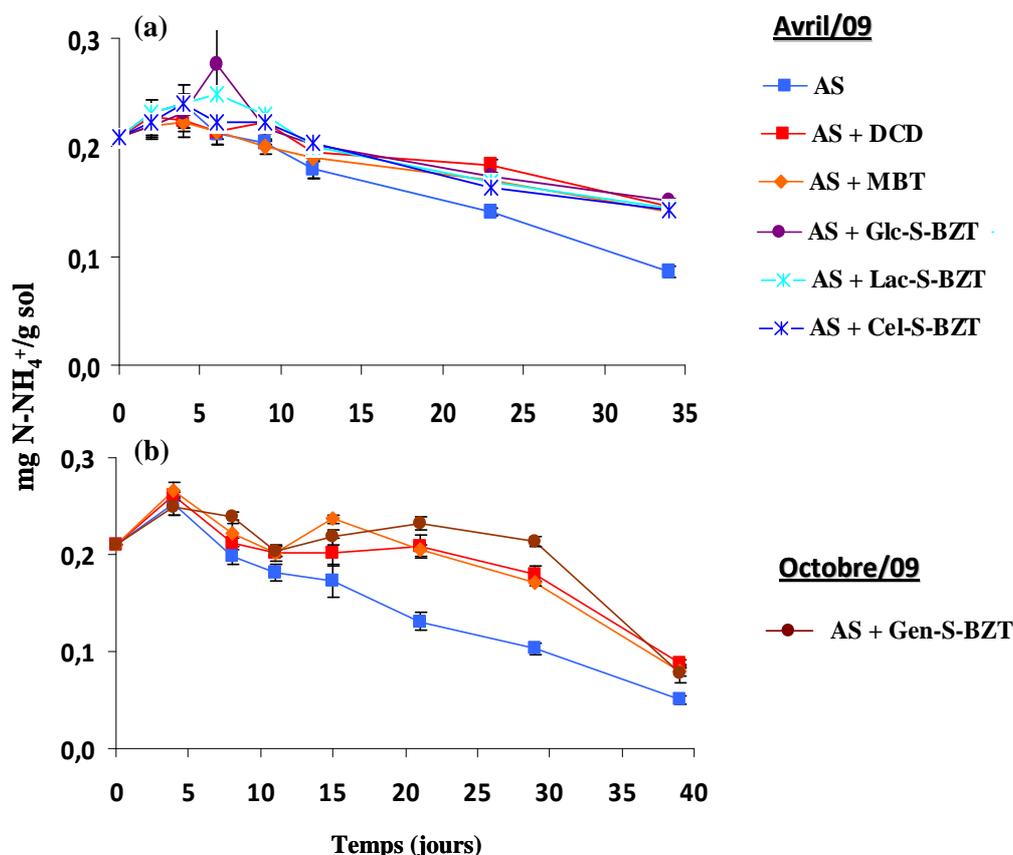


Figure II-14. Effet des molécules glycosylées sur l'inhibition de la nitrification dans un sol acide (pH = 5,5). (a) période d'avril/2009, (b) période d'octobre/2009. Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4. (AS = Ammonium sulfate; DCD = Dicyandiamide; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Glc = Glucose; Cel = Cellobiose; Lac = Lactose; Gen = Gentiobiose). L'ensemble des traitements sont significativement différents du témoin (AS) au seuil $P < 0,05$.

Tableau II-2. Solubilité dans l'eau des inhibiteurs de nitrification glycosylés (à 25°C) dérivés du 2-mercaptobenzimidazole (MBI) et du 2-mercaptobenzothiazole (MBT).
Thèse D.Pro.

Composés	Solubilité (g/L)	Composés	Solubilité (g/L)
• MBI	0,25	• MBT	< 0,03
• Glc-S-BZI	>200	• Glc-S-BZT	123
• Lac-S-BZI	59	• Lac-S-BZT	5
• Cel-S-BZI	>200	• Cel-S-BZT	19
• Gen-S-BZI	>200	• Gen-S-BZT	21

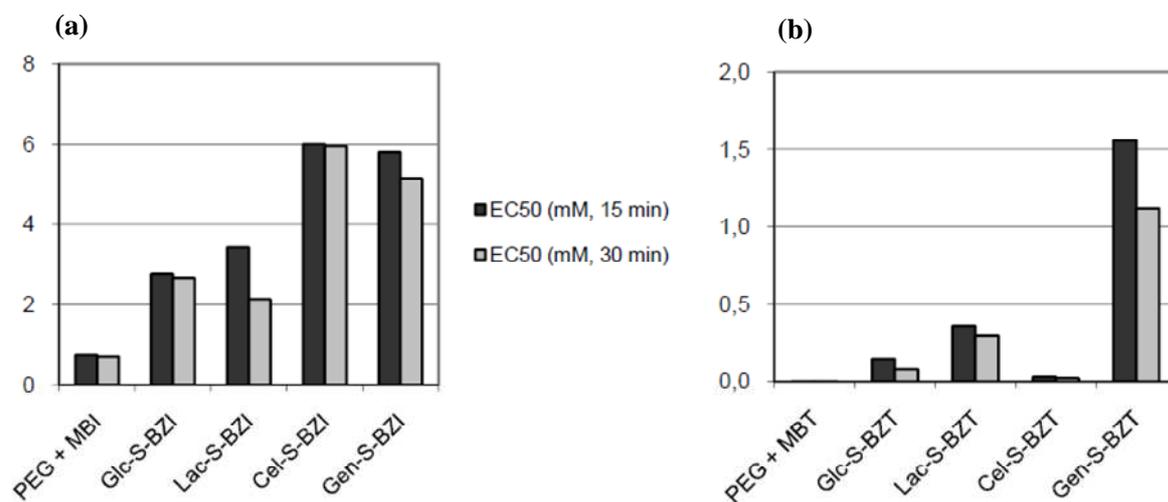


Figure II-15. Ecotoxicité des inhibiteurs de nitrification glucosylés dérivés du MBI **(a)** et du MBT **(b)**. PEG = polyéthylène glycol; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Glc = Glucose; Lac = Lactose; Cel = Cellobiose; Gen = Gentiobiose (Thèse D.Pro).

- Sur la base des tests portant sur l'inhibition de l'activité nitrifiante dans le sol, la solubilité dans l'eau et l'écotoxicité des molécules, le Gent-S-BZI et le Gen-S-BZT ont été retenus pour la suite des essais en microlysimètre et sur les colonnes de sol, en raison d'un accroissement de la solubilité de ces molécules et d'une réduction de leur écotoxicité.

II.5. Test des inhibiteurs en microlysimètres

L'objectif de cette expérience était de quantifier l'efficacité des inhibiteurs de nitrification et leurs effets sur la nutrition azotée du colza (*Brassica napus* L.). Les molécules MBI et Gen-S-BZI ont été testées sur sol alcalin (pH = 8,2) alors que le MBT et Gen-S-BZT l'ont été sur sol acide (pH = 5,5). Le DCD, qui constitue un « témoin de référence », a été testé sur les deux types de sol. L'engrais est apporté sous forme d'ammonium-nitrate marqué ($^{15}\text{NH}_4^+$ - $^{15}\text{NO}_3^-$, excès isotopique = 5%) à raison de 150 kg-N/ha. La croissance des plantes, la distribution de l'azote (fig. II-16) et les pertes d'azote par lessivage (fig. II-17) ont été analysées au cours de 15 jours de culture.

A. Essai en sol alcalin

Les résultats ne montrent aucune différence entre les traitements (témoin et inhibiteurs) sur la production de matière sèche (MS) des plantes (fig. II-16a), avec en moyenne 2,8 g de MS par plante pour l'ensemble des traitements. L'absorption de l'azote n'est également pas affectée par la présence d'un inhibiteur de nitrification et aucune différence n'est observée entre les différents traitements effectués (fig. II-16c). Cependant, comparativement au témoin (AN) et aux autres traitements, AN+MBI et AN+Gen-S-BZI, les quantités d'azote du sol sont deux fois plus importantes lorsque le DCD est appliqué en combinaison avec l'engrais (AN+DCD; fig. II-16c), elles s'élèvent à 30 mg ^{15}N chez le témoin, le MBI et le Gen-S-BZI contre 60 mg ^{15}N en présence du DCD. Par ailleurs, les pertes d'azote par volatilisation sont moins importantes en présence de ce dernier (53 mg ^{15}N ; 20% de l'azote total), et représentent respectivement 33, 36, et 27% de l'azote total apporté, pour les traitements AN, AN+MBI et AN+Gen-S-BZI (fig. II-16c).

Le dosage de l'azote marqué (^{15}N) dans les eaux de percolation, montre que les pertes cumulées par voie de lessivage augmentent en fonction du temps pour se stabiliser après 11 jours de traitement (fig. 17a). Par ailleurs, les quantités d'azote lessivées sont plus importantes pour le traitement AN+DCD, atteignant 3,7 mg de ^{15}N après 15 jours de traitement contre 3,2 mg de ^{15}N chez le témoin (AN). Les résultats montrent que, comparativement au témoin, ces pertes sont réduites respectivement de 3,3 à 2,7 mg ^{15}N (-18%) et de 3,3 à 2,2 mg ^{15}N (-33%) en présence du MBI et du Gen-S-BZI.

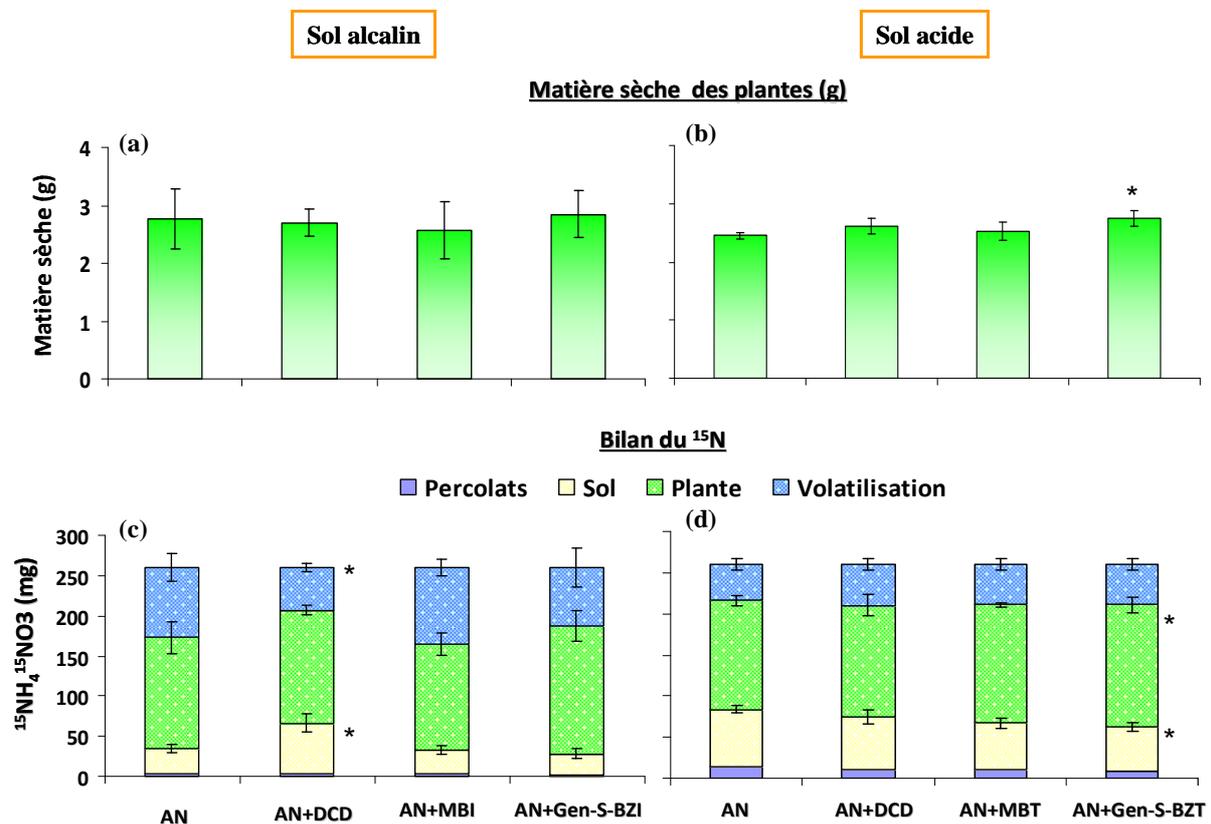


Figure II-16. Production de matière sèche (a et b) chez le colza (*Brassica napus*), et bilan du ^{15}N -engrais (c et d). Les plantes sont cultivées sur deux types de sol : alcalin (pH = 8,2 ; a et c) et acide (pH = 5,5 ; b et d). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4.

* : traitement significativement différent du témoin (AN) au seuil P<0,05. AN = Ammonium nitrate; DCD = Dicyandiamide; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Gen = Gentiobiose.

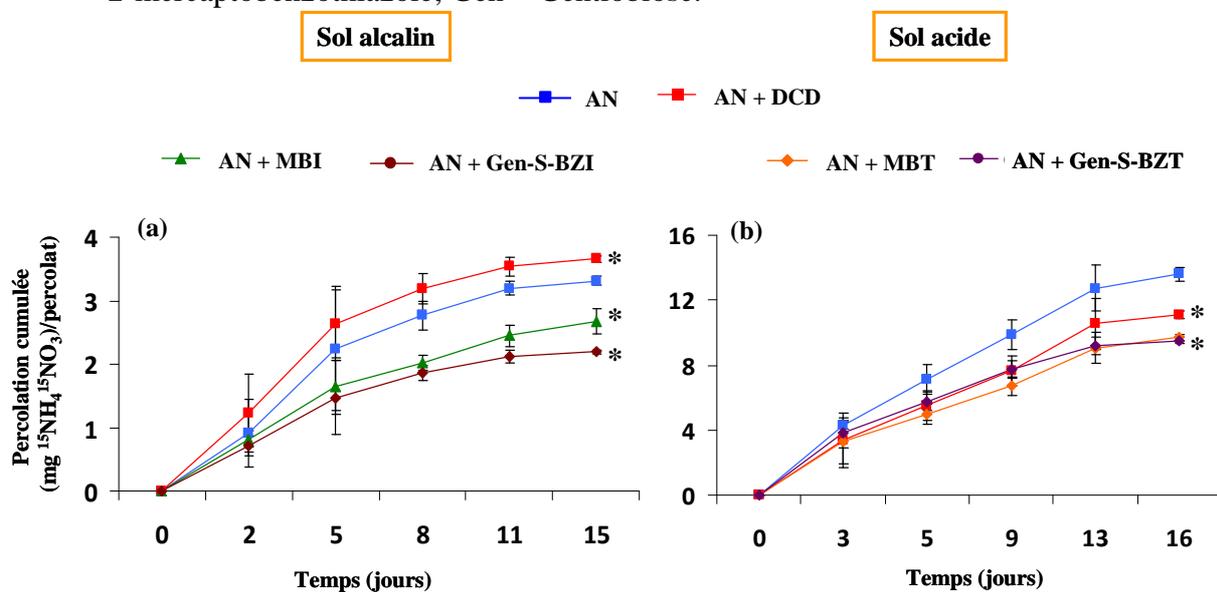


Figure II-17. Suivi des quantités de ^{15}N -engrais dans les eaux de percolation en sol alcalin (a) et en sol acide (b). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4. * Le traitement est significativement différent du témoin (AN) au seuil P<0,05 ; ** P<0,01. AN = Ammonium nitrate; DCD = Dicyandiamide; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Gen = Gentiobios

B. Essai en sol acide

Pour l'ensemble des paramètres analysés, seul le traitement Gen-S-BZT se distingue du témoin (AN) et des autres traitements AN+DCD et AN+MBT. Comparativement aux plantes témoins, celles ayant reçues du Gen-S-BZT en combinaison avec l'engrais (AN+Gen-S-BZT), sont caractérisées par une augmentation significative de la production de biomasse sèche (+12%), passant de 2,4 à 2,7 g MS par plante (fig. 16b). Une augmentation de l'absorption de l'azote est également observée pour le traitement Gen-S-BZT (+16%, de 110 à 128 mg ^{15}N par plante; fig. 16d). Cependant, par rapport au témoin (AN), les quantités d'azote du sol diminuent en présence du DCD ou du MBT, et elles sont encore plus faibles en présence du Gen-S-BZT (-28%, de 70 à 50 mg ^{15}N). Les pertes d'azote par voie gazeuse représentent 18% de l'azote total apporté pour l'ensemble des traitements.

Pour l'ensemble des traitements, les quantités ^{15}N perdues par lessivage augmentent en fonction du temps (fig. 17b). Comparativement au témoin (AN), les pertes d'azote sont réduites de 19% (de 13,6 à 11 mg ^{15}N) en présence du DCD, et de 30% (passant de 13,6 à 9,5 mg ^{15}N), en présence des inhibiteurs MBT et Gen-S-BZT.

II.6. Test des inhibiteurs sur des colonnes de sol

L'effet des inhibiteurs sur l'activité nitrifiante, leur mobilité et leur dégradation dans le sol et les eaux de percolation, ont été étudiés grâce à ce dispositif s'affranchissant de la présence de végétaux et visant à déterminer la mobilité des inhibiteurs et leur persistance. Seul, le sol alcalin a été utilisé pour cette expérience, et l'ensemble des inhibiteurs (DCD, MBI, MBT, Gen-S-BZI et Gen-S-BZT) a été testé sur ce même sol. L'engrais est apporté sous forme de sulfate d'ammonium (AS) à raison de 75 kg-N/ha. Des dosages d'ammonium, d'inhibiteurs et de leurs produits de dégradation, ont été réalisés pour chaque traitement sur 3 horizons de sol (0 - 20, 20 - 40 et 40 - 60 cm) et dans les eaux de percolation.

A. Effet des inhibiteurs sur l'activité nitrifiante

Les résultats des dosages d'ammonium dans l'horizon 1 (0 - 20 cm) montrent une diminution des teneurs en N-NH_4^+ du sol chez le témoin (AS), passant de 40 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de sol au début du traitement, à 10 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de sol après 8 jours, puis elles restent stables jusqu'à la fin de l'expérimentation (fig. II-18). La présence du Gen-S-BZI ou du Gen-S-BZT en combinaison avec l'AS, n'a aucun effet sur l'inhibition de l'activité nitrifiante dans le sol. Cependant, cette dernière est inhibée en présence des autres inhibiteurs. Après 2 et 8 jours d'incubation, les teneurs en azote ammoniacal du sol pour le traitement AS+DCD, sont 2 fois

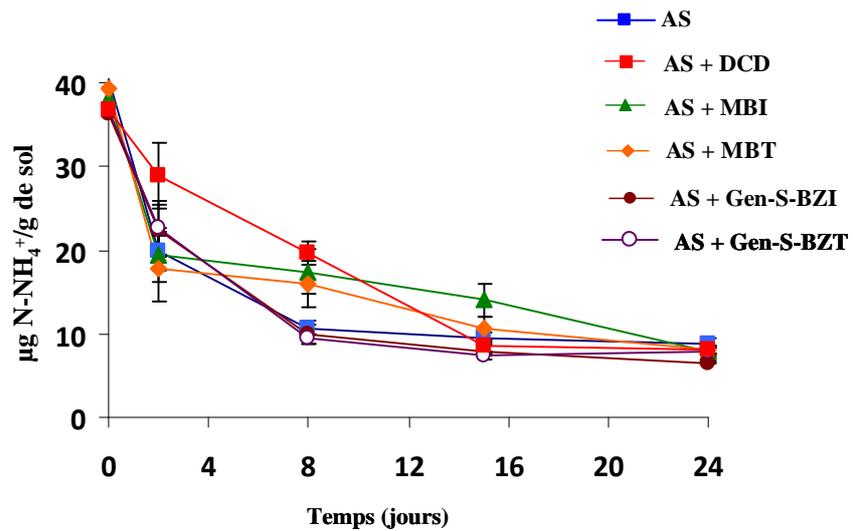


Figure II-18. Effet des molécules glycosylées sur l'inhibition de la nitrification dans l'horizon 1 (0 – 20 cm) d'un sol alcalin (pH = 8,2). Les barres verticales, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole, indiquent \pm l'écart type de la moyenne pour n=4. (AS = Ammonium sulfate; DCD = Dicyandiamide; MBI = 2-mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; Gen = Gentiobiose).

plus importantes que celles du témoin (de 30 à 20 et de 20 à 10 $\mu\text{g N-NH}_4^+$ /g de sol, respectivement). Après 8 jours de traitement, les teneurs en N-NH_4^+ sont également supérieures à celles du témoin en présence du MBI ou du MBT, puis deviennent équivalentes après 15 jours d'incubation.

B. Devenir du DCD dans le sol et les eaux de percolation

Les concentrations en DCD dans le sol varient en fonction de la durée d'incubation et de la profondeur du sol (fig. II-19). Elles sont 2 fois plus importantes dans l'horizon H1 (0 - 20 cm) et H2 (20 - 40 cm) que dans l'horizon H3 (40 - 60 cm) pendant les 8 premiers jours. Les plus faibles concentrations sont observées dans les eaux de percolation.

Les résultats des dosages montrent également qu'à partir du 8^{ème} jour d'incubation, le DCD devient indétectable dans tous les horizons et dans les percolats du fait de sa dégradation.

C. Devenir du MBI, MBT et leur dérivé gentiobiosyl, dans le sol et les eaux de percolation

Les résultats de la fig. II-20 montrent qu'après 2 jours de traitement, les molécules natives (MBI et MBT) et glycosylées (Gen-S-BZI et Gen-S-BZT) sont dégradées en leurs différents sous produits. Ces derniers sont peu mobiles puisqu'ils sont principalement retenus dans la couche supérieure du sol (H1) pendant toute la durée de l'expérience (24 jours), et aucune trace d'inhibiteur n'est détectée dans les eaux de percolation (P).

Au niveau de l'horizon superficiel H1, les différents produits et sous produits retrouvés sont le 2-mercaptobenzimidazole (MBI), le benzimidazole (BI), le 2-hydroxybenzimidazole (OHBI) et le 2-(méthylthio)benzimidazole (MTBI). Le BI et quelques traces de MTBI sont également retrouvés au niveau des horizons H2 et l'H3.

Par ailleurs, aucun composé glycosylé (Gen-S-BZI ou Glc-S-BZI) n'est détecté (fig. II-20b et d). Le MBT et le Gen-S-BZT sont également dégradés en benzothiazole (BT), 2-hydroxybenzothiazol (OHBT) et 2-(méthylthio)benzothiazole (MTBT) dans l'horizon H1. Ils sont seulement détectés à l'état de traces dans les autres horizons (fig. II-20c et d).

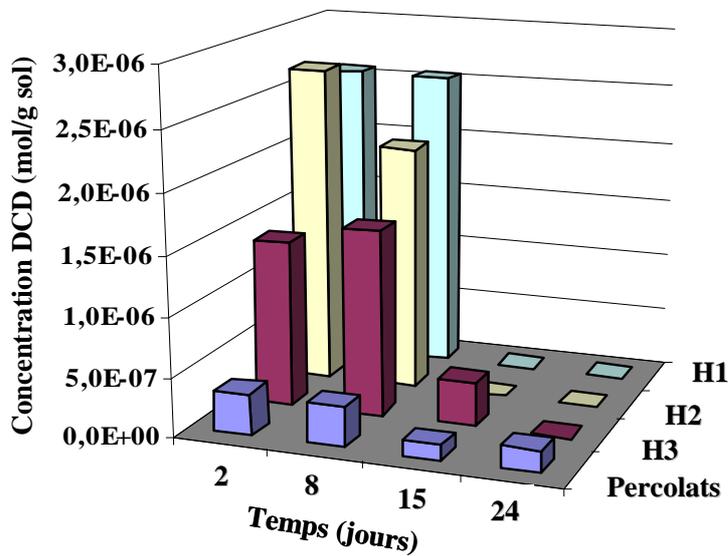


Figure II-19. Devenir du Dicyandiamide (DCD) dans les eaux de percolation et dans un sol alcalin (pH = 8,2) en fonction du temps et des différents horizons du sol (H1 : 0-20 cm ; H2 : 20-40 cm ; H3 : 40-60 cm).

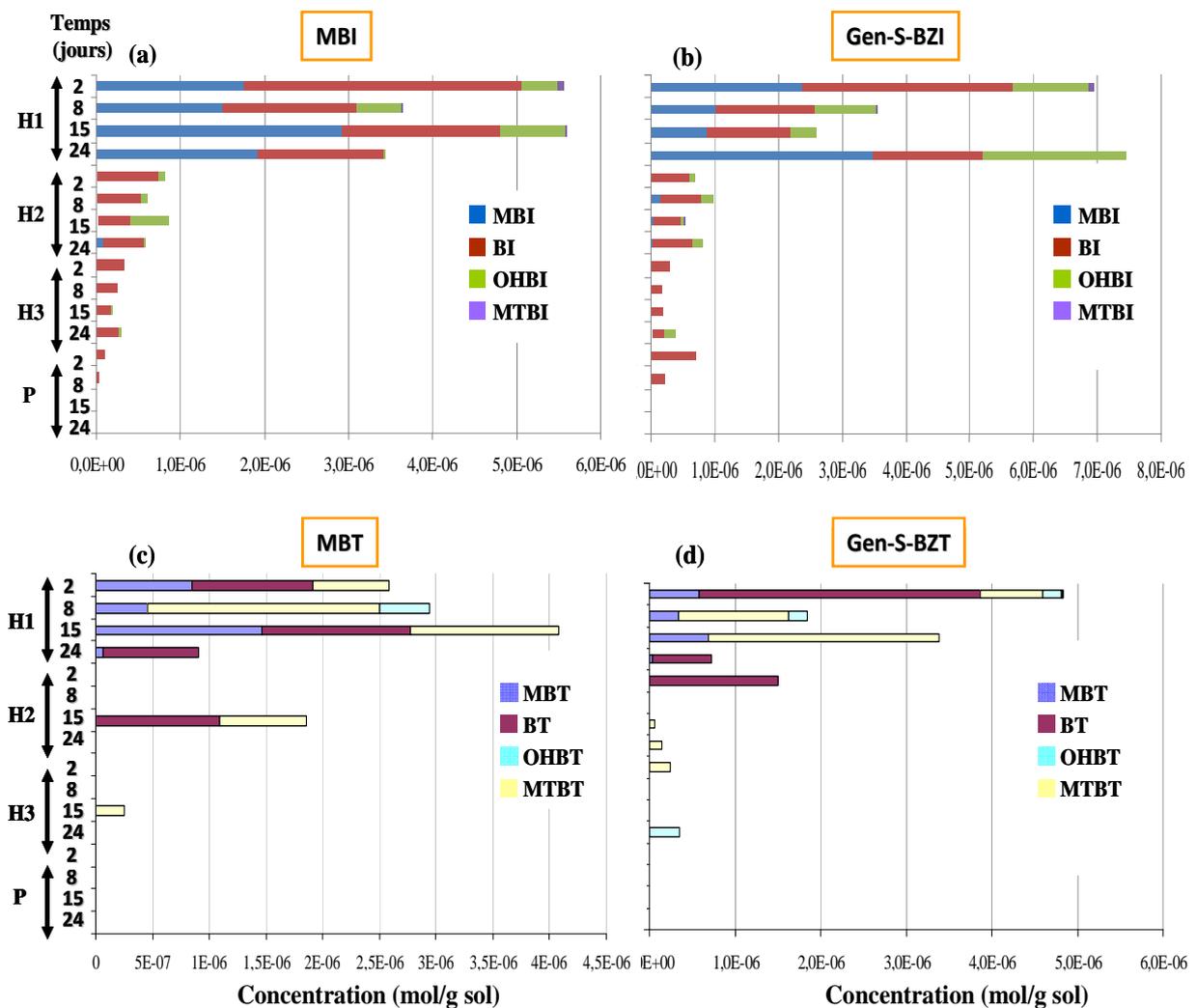


Figure II-20. Devenir du MBI (a), du MBT (c) et de leurs dérivés glucosylés, le Gen-S-BZI (b) et le Gen-S-BZT (d) dans les eaux de percolation (P) et dans les différents horizons du sol (H1 : 0-20 cm ; H2 : 20-40 cm ; H3 : 40-60 cm) en fonction du temps. MBI = 2 mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; BI = benzimidazole; OHBI = 2-hydroxybenzimidazole; MTBI = 2-(methylthio)benzimidazole, BT = benzothiazole; OHBT = 2-hydroxybenzothiazol; MTBT = 2-(méthylthio)benzothiazole; Gen = Gentiobiose.

II.7. Discussion et conclusion

Généralement, la nitrification est rapide dans les sols faiblement acides ou alcalins ($\text{pH} \geq 6,0$) mais plus lente dans les sols à faible pH ($\text{pH} \leq 5,0$). En condition acides, l'ammoniac est essentiellement présent sous forme de NH_4^+ , substrat pour lequel l'enzyme monooxygénase a le moins d'affinité (Suzuki *et al.*, 1974). Les travaux portant sur les tests d'inhibiteurs de nitrification connus, le 2-mercaptobenzimidazole (MBI) et le 2-mercaptobenzothiazole (MBT), montrent que ces molécules présentent un effet inhibiteur différentiel en fonction du pH du sol (fig. II-11), le MBI présente une forte inhibition dans le sol alcalin, tandis que le MBT montre une forte action dans un sol acide. L'efficacité des deux inhibiteurs serait donc affectée par le pH du sol, celui-ci étant un facteur déterminant pour l'activité biologique, la stabilité et la solubilité des inhibiteurs de la nitrification (Keeney, 1986).

La glycosylation du MBI et du MBT ne prolonge pas leur durée d'action et n'accroît pas leur efficacité. Cependant, l'ensemble des inhibiteurs glycosylés présente la même efficacité sur l'inhibition de la nitrification (fig. II-13 et II-14). Les résultats montrent que l'utilisation de ces inhibiteurs en combinaison avec un engrais ammoniacal, retarde la dégradation de l'ammonium en nitrate (de 60%) pendant au moins les 20 premiers jours de traitement en sol alcalin et plus de 30 jours en sol acide. Cela aurait pour effet de réduire les pertes de nitrate par lessivage (fig. II-17), mais aussi des émissions d'oxyde nitreux, en maintenant plus longtemps l'azote sous sa forme ammoniacale (Edmeades, 2004). Des résultats similaires ont été observés, en utilisant d'autres inhibiteurs de nitrification, comme le DCD (Prasad et Power, 1995; Zacheri et Amberger, 1990; Di et Cameron, 2007a) ou le DMPP (Barth *et al.*, 2001; Zerulla *et al.*, 2001a,b). Il est également intéressant de constater que les molécules nouvellement synthétisées, présentent une efficacité sur l'inhibition de l'activité nitrifiante, similaire à celle du DCD, qui est un inhibiteur de nitrification largement utilisé au niveau mondial en agriculture (Trenkel, 2010). L'accumulation de N-NO_3^- observée après 17 jours d'incubation en présence du MBI ou du Glc-S-BZI (fig. II-13b) présente un intérêt pour les plantes qui peuvent profiter d'une alimentation mixte (ammonium-nitrate), cette dernière conduisant à une meilleure productivité (Amberger, 2008). En présence de DCD, aucune accumulation de nitrate n'est observée (fig. II-13b). Cependant, d'autres formes d'azote minéral provenant de l'oxydation de l'ammonium, telles que les nitrites (NO_2^-), pourraient être présentes dans le sol (Zaman *et al.*, 2008).

De nombreux composés hétérocycliques, qui présentent des effets avérés sur l'inhibition de la nitrification, sont toxiques pour l'environnement et ne peuvent être

commercialisés, ni appliqués en agriculture (McCarty et Bremner 1989; McCarty, 1999). La toxicité d'une molécule envers les organismes vivants est prise en considération lors du choix d'un inhibiteur de nitrification (Chien *et al.*, 2009). Le Gen-S-BZI et le Gen-S-BZI sont, respectivement, 7 et 150 fois moins toxique que le MBI et le MBT (fig. II-15). La glycosylation induit donc une meilleure tolérance des bactéries à ces inhibiteurs.

La modification du MBI et du MBT avait également pour but d'améliorer leur hydrosolubilité, qui est une caractéristique déterminante des modalités d'application des inhibiteurs en agriculture (Keeney, 1986). Ces molécules sont très peu solubles dans l'eau et le greffage d'un disaccharide (notamment le gentiobiose) entraîne une forte augmentation de leur solubilité (tableau II-2). Cependant, en termes de mobilité, aucune différence n'est observée entre les molécules natives (MBI et MBT) et leur dérivé glycosylé (Gen-S-BZI, Gen-S-BZT; fig. II-20), qui sont retenus dans l'horizon supérieur du sol. Cette absence de différence pourrait s'expliquer par le clivage très rapide de la fraction glucidique et la libération de la partie active qui continue à se dégrader dans le sol. Ces sucres sont en effet susceptibles d'être utilisés par les micro-organismes du sol pour leur propre métabolisme. Cette hypothèse est confirmée après le dosage des inhibiteurs glycosylés pendant les 3 premiers jours d'incubation (fig. II-21). Les résultats obtenus montrent que cette dégradation survient dans les heures qui suivent l'apport du traitement. Au contact du sol, le Gen-S-BZI (fig. II-21a) et le Gen-S-BZT (fig. II-21b) se dégradent respectivement en Glc-S-BZI et en Glc-S-BZT. Après 6h d'incubation, aucune trace des molécules glycosylées n'est détectée. En conséquence, l'augmentation de la solubilité des inhibiteurs apportés par une glycosylation ne présente un avantage que pour leur facilité d'application.

Le DCD qui présente une forte solubilité dans l'eau, devient très mobile dans le sol, et peut migrer au-delà de 40 cm de profondeur (fig. II-19). Cette forte mobilité pourrait constituer un inconvénient lié au lessivage du DCD et au risque d'une séparation spatiale entre l'inhibiteur et l'engrais ammoniacal, réduisant ainsi son action dans l'inhibition de la nitrification (McCarty et Bremner, 1989; Zerulla *et al.*, 2001a,b). Sur cet aspect, les inhibiteurs glycosylés pourraient constituer une meilleure alternative, car s'ils sont fortement solubles, leur durée de vie courte réduit le risque de lessivage de l'inhibiteur natif une fois la liaison glycosidique rompue..

L'impact de l'apport d'un inhibiteur de nitrification sur le rendement des cultures et sur l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA), a fait l'objet de plusieurs études sur de nombreuses espèces de grande culture (Prasad et Power, 1995; Trenkel, 2010). Les résultats des tests en microlysimètres (fig. II-16b et d), indiquent une augmentation des biomasses

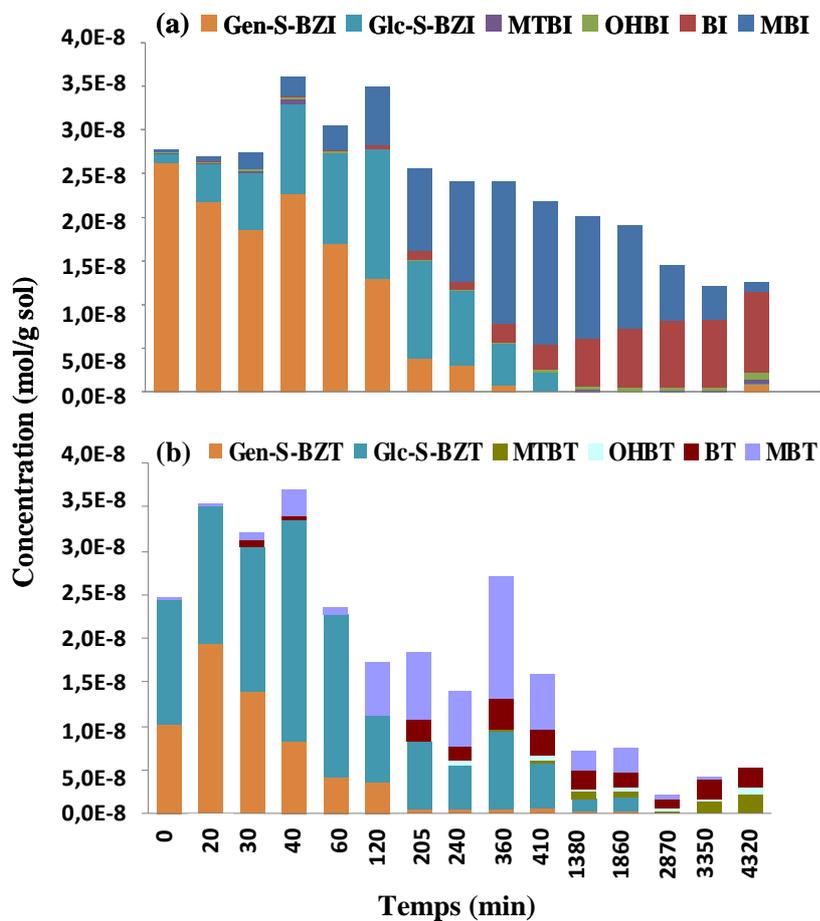


Figure II-21. Devenir des molécules glycosylées : Gen-S-BZI (a) et le Gen-S-BZT (b) dans le sol après 72 heures d'incubation. MBI = 2 mercaptobenzimidazole; MBT = 2-mercaptobenzothiazole; BI = benzimidazole; OHBI = 2-hydroxybenzimidazole; MTBI = 2-(methylthio)benzimidazole, BT = benzothiazole; OHBT = 2-hydroxybenzothiazol; MTBT = 2-(méthylthio)benzothiazole; Gen = Gentiobiose; Glc = Glucose.

sèches en présence du DCD ou du MBT, encore plus significative (+12%) en présence du Gen-S-BZT. Cette augmentation, qui mériterait par ailleurs d'être vérifiée dans le cadre d'autres expérimentations, se traduit également par une plus forte absorption de l'azote (+16%) pour ce traitement, qui serait due aux plus faibles pertes de nitrate par lessivage (fig. II-17b). Ces avantages liés à la présence d'un inhibiteur de nitrification ne sont pas observés chez les plantes cultivées sur sol alcalin (fig. II-16a et c). Certaines études menées au champ portant sur le rendement et l'EUA ont parfois montré des résultats contradictoires (Subbarao *et al.*, 2006; Trenkel, 2010). Plusieurs facteurs physiques, chimiques et biologiques déterminent l'efficacité des inhibiteurs de nitrification. Les effets bénéfiques d'un inhibiteur de nitrification sur les pertes d'azote et le rendement sont généralement observés dans des sols à texture grossière (sols drainés) ou à texture fine, présentant respectivement, des risques de perte par lessivage ou par dénitrification (fig. II-22). Par ailleurs, le sol acide utilisé lors de cette expérience (tableau II-1), présentant un faible pH (nitrification lente) et une texture limono-argilo-sableuse, serait plus favorable pour répondre aux avantages d'un apport d'engrais combiné à un inhibiteur de nitrification. Les apports d'eau réalisés (>100mm) pour favoriser le lessivage pourraient également participer au lessivage des inhibiteurs de nitrification, notamment du DCD (fig. II-19).

En conclusion, la glycosylation du MBI et du MBT semble non seulement augmenter leur hydrosolubilité, mais aussi diminue considérablement le risque de toxicité. Ces inhibiteurs glycosylés réduisent les pertes d'azote et peuvent contribuer à l'amélioration de l'EUA. Leurs formulations simplifiées pourraient constituer une nouvelle alternative pour le développement de nouveaux engrais à libération lente. Leur utilisation en conditions de cultures lysimétriques, n'a toutefois pas pu être testée en raison des délais requis pour la synthèse des quantités nécessaires dans ce dispositif.

Une partie des ces résultats ont fait l'objet d'une publication :

Pro D., Arkoun M., Daniellou R., Nugier-Chauvin C., Morvan J., Ourry A., Yvin J.C., Ferrières V. (2011). Water soluble nitrification inhibitors: Impact of glycosylation. Soumise à *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

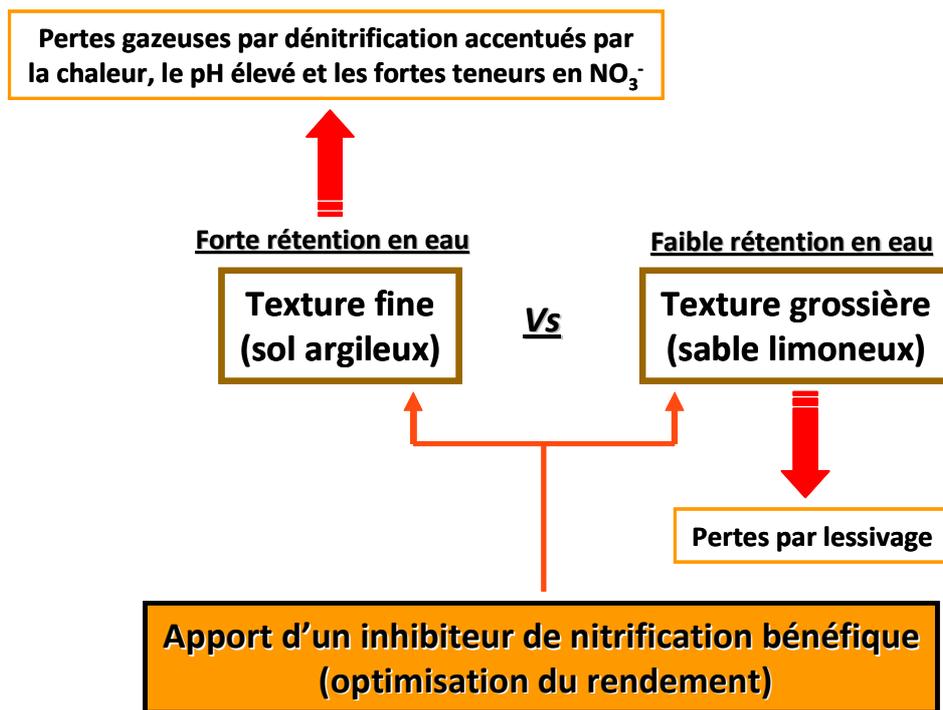


Figure II-22. Principales caractéristiques du sol pouvant répondre à un apport d'inhibiteur de nitrification (adapté d'après Nelson *et al.*, 1992).

Chapitre III

ALIMENTATION UREIQUE CHEZ LE COLZA D'HIVER (*BRASSICA NAPUS*
L.) : IMPORTANCE DU NICKEL ET EFFET D'UN INHIBITEUR D'UREASES

**CHAPITRE III. ALIMENTATION UREIQUE CHEZ LE COLZA
D’HIVER (*BRASSICA NAPUS* L.) : IMPORTANCE DU NICKEL ET
EFFET D’UN INHIBITEUR D’UREASES**

Article 1:

A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and Phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.).

Mustapha Arkoun^{1,2}, Laëtitia Jannin^{1,2}, Philippe Laîné^{1,2}, Philippe Etienne^{1,2}, Céline Masclaux-Daubresse³, Sylvie Citerne⁴, Maria Garnica⁵, José-Maria Garcia-Mina⁵, Jean-Claude Yvin⁶, Alain Ourry^{1,2,7}

¹ Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex, France

² INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex, France

³ Institut Jean-Pierre Bourgin, IJPB, UMR1318 INRA-AgroParisTech Bâtiment 2 INRA Centre de Versailles-Grignon Route de St-Cyr (RD10) 78026 Versailles Cedex France

⁴ Plateau Technique de Chimie du Végétal, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech Bâtiment 1, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St-Cyr (RD10), 78026 Versailles Cedex France

⁵ Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32 E-31160 Orcoyen, Spain

⁶ Timac Agro International, 27 avenue Franklin Roosevelt 35408 Saint-Malo, France

⁷ Corresponding author, alain.ourry@unicaen.fr.

Keywords

Urea, *BnDUR3*, ¹⁵N-labeling, nickel, Phenylphosphorodiamidate (PPD), enzymatic activities, gene expressions.

Soumise à *Plant and Soil* : en révision

Abstract

Urea is the major nitrogen (N) form supplied as fertilizer in agriculture. However, urease, a nickel-dependent enzyme, allows plants to use external or internally generated urea as a nitrogen source. Since a urease inhibitor is frequently applied in conjunction with urea fertilizer, the N-metabolism of plants may be affected. The aim of this study was to determine physiological and molecular effects of nickel deficiency and a urease inhibitor on urea uptake and assimilation in oilseed rape. Plants were grown on hydroponic solution with urea as the sole N source under three treatments: plants treated with nickel (+Ni) as a control, without nickel (-Ni) and with nickel and phenylphosphorodiamidate (+Ni+PPD). Urea transport and assimilation were investigated. The results show that Ni-deficiency or PPD supply led to reduced growth and reduced ^{15}N -uptake from urea. This effect was more pronounced in PPD-treated plants, which accumulated high amounts of urea and ammonium. Thus, Ni-deficiency or addition of PPD, limit the availability of N and decreased shoot and root amino acid content. The up-regulation of *BnDUR3* in roots indicated that this gene is a component of the stress response to nitrogen-deficiency. A general decline of glutamine synthetase (GS) activity and activation of glutamate dehydrogenase (GDH) and increases in its expression level were observed in control plants, thus alleviating the toxic effects of ammonium. At the same time, in (-N) or (+Ni+PPD) treated plants, no increases in GS or GDH activities and expression level were found. Overall results showed that plants require Ni as a nutrient (while most widely used nutrient solutions are devoid of Ni), whether they are grown with or without a urea supply, and that urease inhibitors may have deleterious effects at least in hydroponic grown oilseed rape.

Abbreviations

Ni: nickel, PPD: phenylphosphorodiamidate, NBPT: N-(n-butyl) thiophosphoric triamide, GS: glutamine synthetase, GDH: glutamate dehydrogenase.

I. Introduction

The use of urea as a nitrogen (N) fertilizer has increased considerably over the last 30 years, and nowadays is the major worldwide N form supplied as fertilizer in agricultural plant production, ahead of nitrate and ammonium ([http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)). The main advantages of this compound are its high N content (46%), the relative low cost of production per unit of N, as well as the easiness of handling.

To our knowledge and because of its fast soil hydrolysis, only a small fraction of urea fertilizer is taken up as urea by plant roots. To date, only DUR3 homologues and aquaporins are undoubtedly linked to urea transport in plants. Recently, AtDUR3 was demonstrated to serve as a major high affinity transporter for urea uptake by N-deficient roots of *Arabidopsis* (Kojima et al. 2007), suggesting that urea transport activity of AtDUR3 is of physiological significance in higher plants. The regulation of its expression is tissue specific and linked to the N status in *Arabidopsis* (Liu et al. 2003). This gene is expressed at low levels in shoots and is up-regulated during early germination and under N deficiency in roots. It was proposed by Liu et al. (2003) that AtDUR3 plays a role in urea uptake by plant cells at low external urea concentrations.

Urea in soils is hydrolyzed by urease, a nickel-dependent enzyme produced by soil microorganisms (Watson et al. 1994), into ammonium (NH_4^+), with often a concurrent nitrification to nitrate (NO_3^-). Besides being the predominant N form used for fertilizer application to crop plants, urea is also an important N metabolite in plants. Two major biochemical pathways, arginine degradation and ureide catabolism, together with root and leaf applications of urea, are the three major sources of urea in plants. Since urea accumulates in source leaves of older plants and in germinating seeds (Zonia et al. 1995), the first pathway is thought to be used during N recycling after protein degradation. Urea-derived ammonium is assimilated into glutamine *via* glutamine synthetase (GS); then, glutamate synthase (GOGAT) catalyzes the formation of glutamate *via* the GS-GOGAT cycle. However, glutamate dehydrogenase (GDH) may play a complementary role to GS/GOGAT in the reassimilation of excess ammonia released during stress conditions or during specific stages of development (Rhodes et al. 1989; Yamaya et al. 1986).

The reaction catalyzed by urease is essential to make N in urea accessible to plant metabolism (Gerendás et al. 1998). Urease activity has been detected in many plants (Hogan et al. 1983) and is reported to be inducible by urea in rice (*Oryza sativa*; Matsumoto et al. 1966), jack bean (*Canavalia ensiformis*; Matsumoto et al. 1968), and barley (*Hordeum vulgare*), where different urease isoforms have also been found (Chen and Ching 1988).

Whereas the regulation of its expression is not well understood in plants, different pathways for the regulation of this enzyme have been described in bacteria, including regulation by a global N control system. Urease is a nickel metalloenzyme that in *Arabidopsis thaliana* requires three urease accessory proteins (AtUreD, AtUreF, and AtUreG) for activation (Witte et al. 2005). Therefore, nickel is considered to be an important element for plants supplied with urea as an N source due to its role in the activation of the urease enzyme (Gerendás et al. 1998).

It is well known that the rapid hydrolysis of urea-based fertilizers by bacterial ureases in the soil results in substantial N loss that results from ammonia volatilization and after nitrification from nitrate leaching. Indeed, it has been estimated that more than 50% of the N fertilizer applied can be lost (Bremner 1995; Terman 1979). One approach to improve the efficiency of urea is to combine its application with urease inhibitors, which delay the hydrolysis process and thereby extend urea availability by reducing nitrate leaching and NH₃ loss during the first weeks following application. However, recent studies have demonstrated an adverse effect of urease inhibitors on plant growth and on their nitrogen metabolism (Artola et al. 2011; Cruchaga et al. 2011; Watson and Miller 1996). When urease activity is low due to inadequate Ni supply or urease inhibitor application, urea may accumulate to considerable levels, particularly in urea-treated plants (Gerendás and Sattelmacher 1997; Krogmeier et al. 1991). Nickel deficiency potentially disrupts N metabolism in plants, thus causing an accumulation of urea in foliage of soybean (*Glycine max* L.; Eskew et al. 1984) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.; Walker et al. 1985). Nickel deficiency also affects amino acid metabolism in cowpea (Walker et al. 1985), reduces urease activity, induces metabolic nitrogen deficiency and affects amino acids, amides (glutamine and asparagine), and urea-cycle intermediates (arginine, ornithine, and citrulline) in several species such as rye (*Secale cereale* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), soybean (*Glycine max* L.), rape (*Brassica napus* L.), zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and sunflower (*Helianthus annuus* L.; Gerendás and Sattelmacher 1997). Similar disruptions occur in barley (*Hordeum bulbosum* L.) where Ni deficiency disrupts metabolism of amino acids, malate, and some inorganic anions (e.g., SO₄⁻, Cl⁻, and NO₃⁻; Brown et al. 1990). Plants grown with urea and the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) have been also shown to have higher urea content within tissues (Watson and Miller 1996). This accumulation of urea could be the cause of the phytotoxicity observed in plants grown with urea and the urease inhibitor, Phenylphosphorodiamidate (PPD; Krogmeier et al. 1989). Moreover, the high urea concentration observed in leaves was associated with the development of necrotic leaf

margins. A decrease in the ammonium content in pea plant roots was also observed and consequently, total amino acid content was drastically reduced upon NBPT treatment, indicating a strong alteration of N metabolism. In contrast, ammonium content increased in spinach plant leaves (Cruchaga et al. 2011), and a reduction of glutamine synthetase in the cell contents has been reported in wheat (*Triticum aestivum* L.) in the presence of NBPT (Artola et al. 2011). For these reasons, it could be a disadvantage to use this inhibitor since it has been shown recently that it is taken up by plants (Cruchaga et al. 2011). In pea (*Pisum sativum* L.) and spinach (*Spinacea oleracea* L.), it has been demonstrated by the use of ^{15}N -labeled urea, that NBPT reduced the incorporation of labeled urea in roots of both plant species. Whereas NBPT had no effect on ^{15}N levels in pea plant leaves, higher ^{15}N levels were found in control spinach plants than in those treated with inhibitors (Cruchaga et al. 2011). This suggests an effect on the uptake systems and urea transport in plants.

The influences of both, Ni deficiency and urease inhibitor on the N uptake and metabolism described above indicate that Ni deficiency or the use of a urease inhibitor can potentially influence N use efficiency as well as N management of agricultural systems. Although winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the dominant oilseed crop in northern Europe, it requires high amounts of nitrogen (N) but is characterized by low real harvested N-fertilizer use efficiency, defined as produced seed dry weight per unit of applied N-fertilizer. While oilseed rape is considered as a nitrophilic crop, it receives a large amount of N fertilizer as urea under actual agricultural management and therefore there is a strong need to review all the relevant information on its N metabolism to improve the efficiency of rape production and reduce its environmental impact.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the influences of Ni deficiency and urease inhibitor (phenylphosphorodiamidate, PPD) on urea N metabolism of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.), at the physiological (urea uptake, ammonium, urea and amino acid contents) and molecular levels (Urease, DUR3 and GDH transcript levels).

II. Materials and Methods

II.1. Growth conditions and experimental design

Seeds of *Brassica napus* var. Capitol were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over deionized water for 2d in the dark. Then, plants were grown in the greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred for one week to a plastic tank (20 L) and supplied with a continuously

aerated nutrient solution containing: CaCl₂ 1.25 mM, KCl 0.25 mM, KH₂PO₄ 0.25 mM, MgSO₄ 0.5 mM, EDTA-2NaFe 0.2 mM, H₃BO₃ 14 μM, MnSO₄ 5 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0.7 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.7 μM and CoCl₂ 0.1 μM.

Next, seedlings were divided into three sets and placed in a plastic tank (10 L, 27 seedlings) containing the nutrient solution described above and 2 mM ¹⁵N-urea (atom % ¹⁵N, 4.11%) to measure cumulative nitrogen uptake. Two sets of seedlings were treated with (+Ni, Control) or without (-Ni) 40 nM NiCl₂ for 21 days. The remaining set was treated with NiCl₂ (40 nM) and 75 μg L⁻¹ of Phenylphosphorodiamidate (+Ni + PPD), a urease inhibitor that prevents hydrolysis of urea, which was renewed every two days at the same time as the nutrient solution. The absence of urea hydrolysis was verified by following the ammonium concentration in the nutrient solution. No trace was detected for all treatments (data not shown). The natural light from the greenhouse was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m⁻².s⁻¹ at canopy height for 16 h per day. The thermoperiod was 20°C (day) and 17°C (night).

After different durations of treatment (0, 7, 15 and 21 days), plants were harvested and separated as shoot and root samples. Then, they were weighed (FW), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was weighed and dried (60°C) in a drying oven for dry weight (DW) determination and ground to fine powder with 0.4 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (mixer mill MM301; Retsch).

II.2. Determination of relative chlorophyll concentration

Measurements of relative chlorophyll concentrations in leaves were monitored at 15 and 21 days after treatment. They were performed using a non-destructive method with a SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japan).

II.3. Total N and ¹⁵N analysis

An aliquot from lyophilized dry mater of each plant organ (shoots or roots) was placed in thin capsules for isotopic analysis in order to analyze between 60 and 80 μg N. The total N amount and ¹⁵N excess in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

Total N (N_{tot}) content in a tissue 'i' at a given time was calculated as: $N_{tot_i} = (\%N_i \times DW_i)/100$. The natural ^{15}N abundance ($0.36636 \pm 0.0004\%$) of atmospheric N_2 was used as a reference for ^{15}N analysis. Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt_i}) in a given organ, at a given time, was calculated as: $N_{upt_i} = (N_{tot_i} \times E_i) / E_s$. Where E_i (%) is the atom ^{15}N excess in a given tissue (shoots or root), and E_s is the nutrient solution atom ^{15}N excess (4.11%).

II.4. Determination of urea and ammonium content

Shoot and root NH_4^+ and urea content was analyzed from frozen subsamples using an aqueous extraction performed at 80°C for 5 minutes as described by Witte et al. (2002). NH_4^+ and urea were determined by ion exchange chromatography (Dionex ICS-3000) and by the colorimetric method described by Kyllingsbaek (1975), respectively.

II.5. Enzyme activities

Enzymes were extracted from frozen shoot and root material stored at -80°C . All extractions were performed at 4°C . Glutamine synthetase (GS) was measured according to the method of O'Neal and Joy (1973). The glutamate dehydrogenase NAD(H)-GDH and NADP(H)-GDH were measured as described by Turano et al. (1996) except that the extraction buffer was the same as for GS measurements.

II.6. Gel electrophoresis and protein blot analysis

Proteins were extracted from frozen shoot and root material in cold extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 0.5% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.1% β -mercaptoethanol (v/v) and 4 μM leupeptin. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay. Proteins were separated on an SDS-PAGE acrylamide gel (Leammli 1970). Equal amounts of protein (10 μg) were loaded in each track.

The percentage of polyacrylamide in the running gel was 12%. Denatured proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Polypeptide detection was performed using polyclonal antiserum raised in rabbits against the synthetic peptide, AYGNERRLTG, by Eurogenetec (Seraing, Belgium) and they detected both GS1 and GS2 isoenzymes.

II.7. RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 to 400 mg of root and shoot fresh matter corresponding to three sets of seedlings for each treatment. Fresh root and shoot samples were

ground in liquid nitrogen with a mortar. The resulting powder was suspended in 750 μ L of extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS [w/v], pH8) and 750 μ L of hot phenol (80° C, pH 4). This mixture was vortexed for 30s. After addition of 750 μ L of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15000g, 5 min, 4° C).

The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4° C. After centrifugation (15000g, 30 min, 4° C), the pellet was suspended in 250 μ L of sterile water. Fifty microliters of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80° C. After centrifugation (15000g, 20 min, 4° C), the pellet was washed with 1mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15000g for 5 min at 4° C. The resulting pellet was dried for 5min at room temperature and resuspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed with a spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer Eppendorf, France) before RT-PCR analysis.

For RT, 1 μ g of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad). The genes and specific primers selected for the analysis were the following: *EF1* (Forward (F), 5'-tttcgagggtgacaacatga; Reverse (R), 5'-ccgtccaataaccaccaatc); and 18S (F, 5'-cggataaccgtagtaattctag; R, 5'-gtactcattccaattaccagac); as housekeeping genes. *BnDUR3* (F, 5'-gacgacgagggaaatcaaag; R, 5'-atgacaacaatgaggagagtga); *BnGDH1* (F, 5'-tgggacactagcgtcgttt; R, 5'-agagatgctgagcttgctcg); *BnGDH2* (F, 5'-ctcgtgacttgagcttgagc; R, 5'-caggggaatgaccatgaaac) and *BnUrease* (F, 5'-aagcatatgcttattggggc; R, 5'-cagataccatcgtgcggcaa); as target genes.

The subsequent PCR reactions were performed with 4 μ L of 200X diluted cDNA, 500 nM of the primers, 1XSYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a total volume of 15 μ L. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the melting curves after quantitative PCR reactions using the Chromo4 system (Bio-Rad, France) and by sequencing the quantitative PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal, France). For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expression of the target gene in each sample was compared to the control sample (corresponding to control plants at T=0) and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation: $2^{-[\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}]}$, with $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$ (For calculations, we considered the geometric mean between Ct of the two housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative

expression of the target gene in the control sample was equal to one (2^0), by definition (Livak and Schmittgen, 2001).

II.8. Determination of amino acid profile

Amino acids were extracted in a solution of 2% 5-sulfosalicylic acid (10 mg DW.ml⁻¹) from lyophilized dry matter of three individual plant repeats. Individual amino acid content was determined by ion-exchange chromatography using the AminoTac JLC-500/V amino acid analyzer according to the instructions of the manufacturer (JEOL Europe, Croissy sur Seine, France).

II.9. Data and statistical analysis

All experiments were performed with 3 replicates of nine seedlings. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm S.E. for n=3. A statistical analysis was performed using the Student test (p=0.05).

III. Results

III.1. Reduction of plant growth without Ni or with PPD supply

To characterize the effect of nickel and the urease inhibitor (PPD) on rapeseed growth and metabolism, seedlings were grown with diluted Hoagland solution without nitrogen for 1 week, and then supplied (T=0) with different nutrient solutions containing urea with nickel (+Ni), urea without nickel (-Ni) or urea supplemented with both nickel and PPD (+Ni + PPD) for 7, 15 and 21 days. Results of accumulated dry biomass revealed highly significant differences between treatments (fig. III-1a). Comparative to the control (+Ni), plant growth without nickel supplementation (-Ni) was characterized by a 29% decrease in shoot and root dry weights after 3 weeks (from 0.68 ± 0.12 to 0.48 ± 0.10 g DW.plant⁻¹ at 21 days; fig. III-1a). This effect was more pronounced when plants were treated with PPD (+Ni + PPD). In fact, the growth was reduced by 60% when the urease inhibitor was applied despite the presence of Ni (from 0.68 ± 0.12 to 0.27 ± 0.04 g DW.plant⁻¹ at 21 days of treatment). The SPAD values, which were used as indicators of the chlorophyll content, showed significant differences between control plants and those grown without nickel after 15 days of treatment (fig. III-1b). Moreover, plants treated with PPD showed visual symptoms of chlorosis as confirmed by their low SPAD values at 15 and 21 days after treatment.

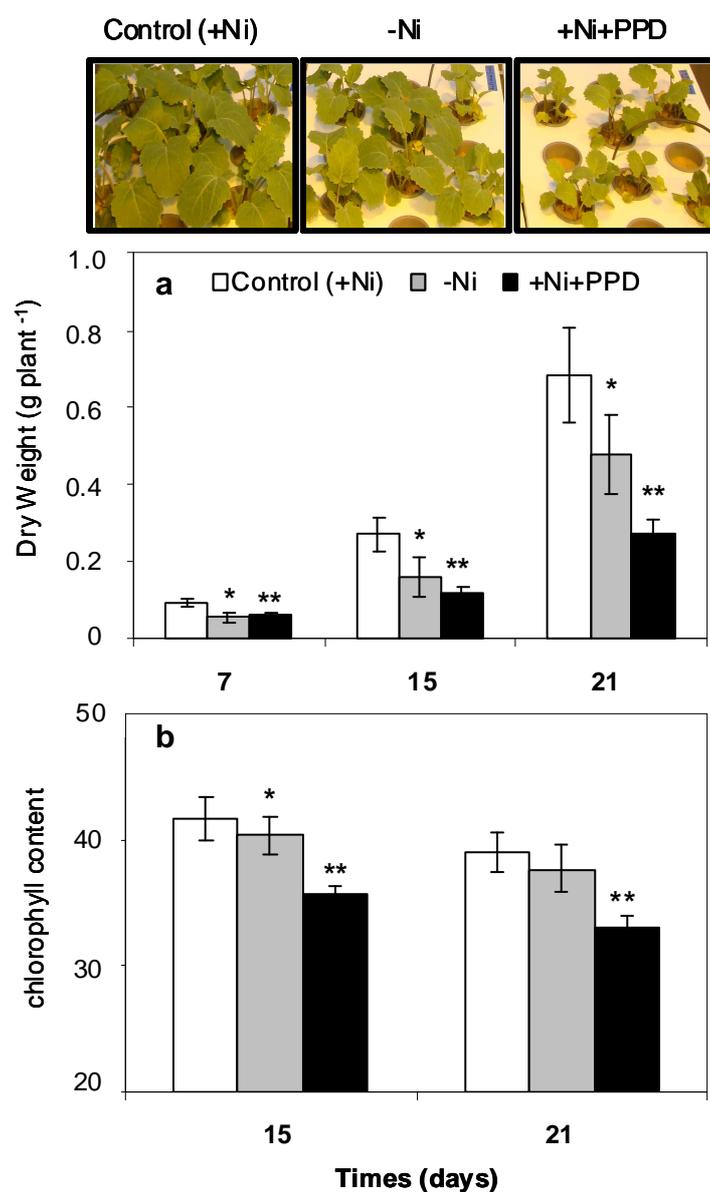


Fig. III-1 Distribution of plant biomass and the SPAD values. Plants were cultured hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution. Rapeseed plants were then transferred for 7, 15 or 21 days to different treatments: urea(+Ni)-fed plants (control treatment, white bars), urea(-Ni)-fed plants (grey bars) and urea (+Ni+PPD)-fed plants (black bars). Picture showed the appearance of oilseed rape plants after 21 days of treatment. **a** plant dry weights of 7, 15 and 21 day treated plants. **b** SPAD values of 15 and 21 day treated plants. Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)

III.2. Urea uptake was restricted without Ni or with PPD supply and inversely related to *BnDUR3* expression

The difference of growth might reflect differences in N-urea uptake or assimilation. The cumulative urea-N uptake was followed by the use of ^{15}N labeling (fig. III-2a). Results show the lower capacity of oilseed rape to take up urea when the medium was deficient in nickel (-Ni) whatever the time of treatment. Indeed, the cumulative N uptake was about 2 fold lower after 21 days of treatment (from 13.37 ± 1.44 to 6.44 ± 1.54 mg $^{15}\text{N} \cdot \text{plant}^{-1}$, respectively). The presence of PPD in the growth medium led to a dramatic reduction of urea uptake with a strong reduction at 15 (-91%, from 6.2 ± 1.5 to 0.5 ± 0.04 mg $^{15}\text{N} \cdot \text{plant}^{-1}$) and 21 (-94%, 13.4 ± 1.44 to 0.82 ± 0.15 mg $^{15}\text{N} \cdot \text{plant}^{-1}$) days of treatment. Overall, biomass accumulation (fig. III-1a) of treated rapeseed plants was less affected than ^{15}N -urea uptake (fig. III-2a).

In order to better characterize urea uptake, the relative expression of the gene encoding the urea transporter (*BnDUR3*) was quantified by qPCR analysis at the shoot and root levels (fig. III-2b and c). Comparative to plants grown for 1 week without N (T=0), the results showed a slight down-regulation (by 2 fold) of *BnDUR3* in roots of control plants (+Ni; fig. III-2c), while no change in the relative expression of *BnDUR3* was observed in shoots after 7, 15 and 21 days of treatment. Compared to control plants, *BnDUR3* was approximately 2.5 fold more expressed in shoots and roots of urea treated plants without Ni supplementation, and this up-regulation was more pronounced (3 fold) only 7 and 15 days after the urease inhibitor (+Ni + PPD) was added to the growth medium.

III.3. Urea and ammonium contents were accumulated without Ni or with PPD supply

Endogenous urea levels (fig. III-3a and b) were the highest in shoots and roots (180.95 ± 23.22 and 137.30 ± 17.89 $\mu\text{g N-urea} \cdot \text{g DW}^{-1}$, respectively) of plants grown for 1 week without N (T=0; fig. III-3a and b). The results showed a gradual decrease in the amount of urea in shoots and roots throughout the treatment. No significant differences were observed in shoots between the -Ni treatment and the control plants (fig. III-3a). However, addition of PPD to the nutrient solution led to an accumulation of urea, which was particularly noticeable after 7 days of treatment (106.89 ± 8.83 and 49.32 ± 5.71 $\mu\text{g N-urea} \cdot \text{g DW}^{-1}$ for PPD treated and control plants, respectively). Similar trends were found in roots (fig. III-3b), with a general decrease in urea content as a function of time, which was slower for PPD treated plants. The ammonium content in roots (fig. III-3d) was greater than in shoots (fig. III-3c). NH_4^+ levels increased during the first 7 and 15 days of treatment in shoots and roots, respectively,

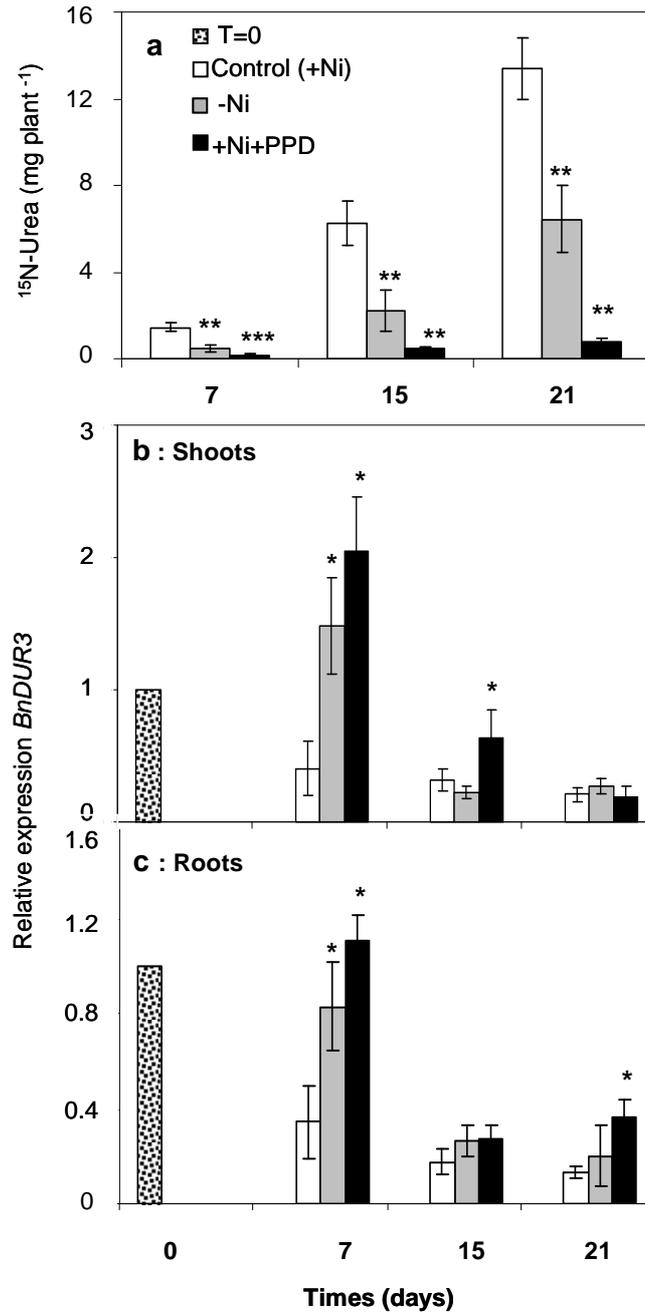


Fig.III-2 N-urea uptake (a) and relative expression of urea transporter *BnDUR3* in shoots (b) and roots (c). Plants were cultured hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution (T=0, dotted bars). Rapeseed plants were then transferred for 7, 15 or 21 days to different treatments: urea(+Ni)-fed plants (control treatment, white bars), urea(-Ni)-fed plants (grey bars) and urea(+Ni+PPD)-fed plants (black bars). Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

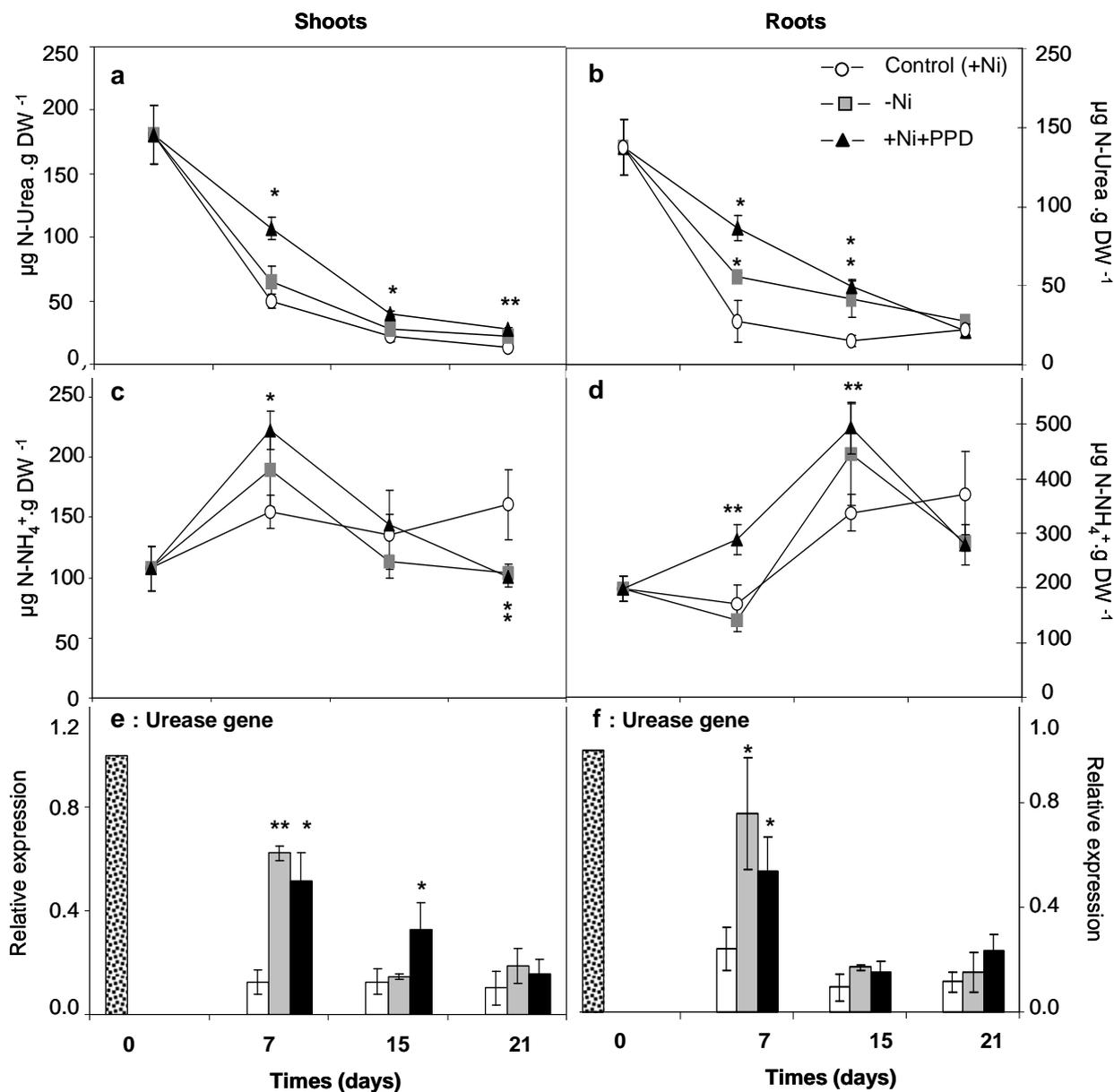


Fig. III-3 Urea assimilation and relative expression of the urease gene. Urea (**a** and **b**) and ammonium (**c** and **d**) content in shoots (**a** and **c**) and roots (**b** and **d**) of rapeseed plants at days 0, 7, 15 and 21 after application of treatments: urea(+Ni)-fed plants (\circ), urea(-Ni)-fed plants (\square) and urea (+Ni+PPD)-fed plants (\blacktriangle). **e** relative expression of the shoot urease gene. **f** relative expression of the root urease gene. Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)

whatever the treatment, respectively. Compared to control, shoot NH_4^+ content increased by 22 and 44% in the (-Ni) and the (+N+PPD) treated plants, while root NH_4^+ content increased by 31 and 46% (fig. III-3c and d), respectively. PPD addition increased NH_4^+ content significantly in shoots at 7 days and in roots at 7 and 15 days. Subsequently, NH_4^+ levels decreased, whereas the levels seemed to remain stable in control plants. The urease gene expression (fig. III-3e and f) decreased as a function of time in control plants, in roots and shoots. The same trend was found in roots of (-Ni) and (+N+PPD) plants, but with a significantly higher expression after 7 days. In shoots (fig. III-3e), urease gene expression was maintained at a significantly higher level in the (-Ni) and (+N+PPD) plants than in control plants.

III.4. Only PPD supply decreased GS activity and protein content

The glutamine synthetase (GS) activity in leaves (fig. III-4a) decreased slightly (from 163.8 ± 14.1 to approximately 115.2 ± 15.1 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) irrespective of the applied treatments during the first seven days. After this, it remained at a steady state level, whatever the treatment. In roots, the presence of the urease inhibitor in the growth medium led to a drastic decrease of GS activity, from 115.33 ± 1.58 to 38.47 ± 18.19 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein after 21 days (fig. III-4b). In the +Ni and the -Ni treated plant, GS activity increased slightly from day 0 and 7 days (reaching 168.43 and 137.92 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein), respectively. A progressive decrease in GS activity, similar to the +Ni +PPD treated plants, was observed in the control plants (+Ni) after 7 days of treatment, while plants grown without Ni showed no change in GS activity. Overall, plants treated with PPD have an activity 41, 47 and 62% lower than control plants, at 7, 15 and 21 days of treatment, respectively.

Antibodies raised against a conserved peptide domain of GS1 and GS2 allowed the detection of both GS isoenzymes using Western blots. Only the cytosolic isoform, GS1, with a molecular weight of 40 kDa was detected in roots (fig. III-4c). In the PPD treated plants, the GS1 content detected was clearly lower than control (+Ni) or the -Ni treatment, being then undetectable after 21 days of treatment. In shoots, two isoforms were detected: the cytosolic (GS1) isoform and a chloroplastic (GS2) isoform with a molecular weight of 45 kDa (fig. III-4d). There was no significant difference in the content levels of these two isoforms in shoots. However, the quantities of GS1 and GS2 appear to be lower in plants treated with the urease inhibitor than control plants after 15 days of treatment.

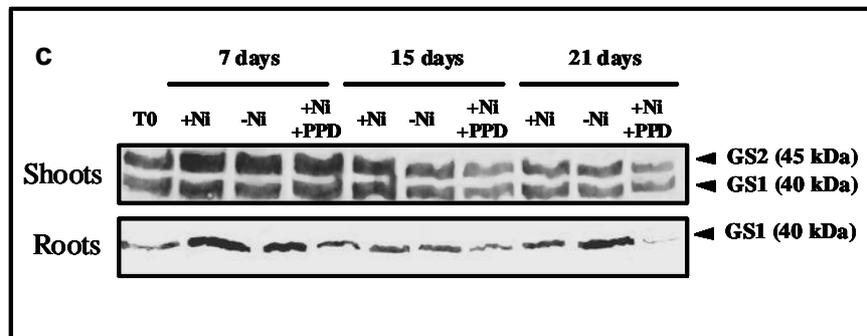
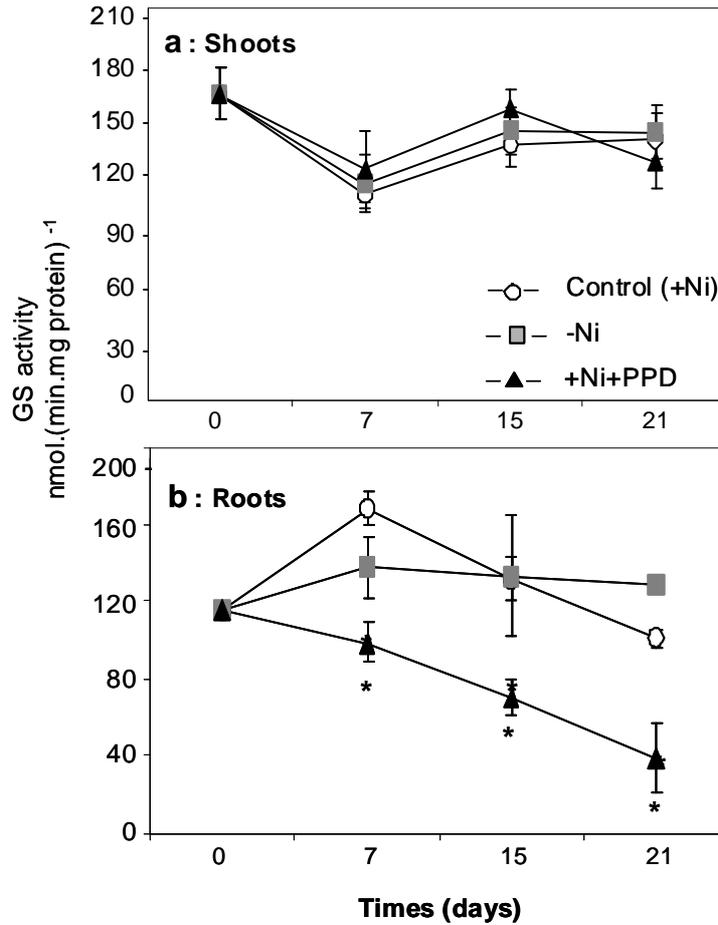


Fig. III-4 Glutamine synthetase (GS) activity and GS protein content. Shoot GS activity (a), root GS activity (b) of rapeseed plants at days 0, 7, 15 and 21 after application of treatments: urea(+Ni)-fed plants (○), urea(-Ni)-fed plants (■) and urea(+Ni+PPD)-fed plants (▲). Data represent mean ± standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at P<0.05 (*). c GS protein content in shoots and roots of rapeseed. For protein separation before Western blotting, an equal amount of soluble protein was loaded in each lane (10µg).

III.5. PPD increased shoot GDH activity but not its transcript levels

The supply of urease inhibitor had a significant influence on the GDH activity. In shoots (fig. III-5a), its presence led to a sharp drop of GDH activity during the first 7 days of treatment, followed by an increase up to 21 days of treatment. In contrast, control and -Ni plants exhibit a similar GDH activity with a slight decrease during the first 15 days of treatment, followed by a slight increase until day 21.

However, in shoots, the relative expression of the *BnGDH1* (fig. III-5c) and *BnGDH2* genes (fig. III-5e) was not closely related to enzymatic activities (fig. III-5a). Indeed, treatments had no effect on *BnGDH1* and *BnGDH2* gene expression, except a slight induction (3.5 fold) of *BnGDH2* in treated plants with or without Ni after 21 days of treatment (fig. III-5e). In roots, GDH activity (fig. III-5b) and *BnGDH1* (fig. III-5d) and *BnGDH2* (fig. III-5f) expression followed a very similar pattern of increase, whatever the treatment, being therefore closely correlated. However, both enzyme activity and gene expression in roots were reduced by the lack of Ni or even more strongly with PPD.

III.6. Lack of Ni or PPD addition reduced amino acid contents

Total content of amino acids in roots (fig. III-6), decreased significantly when the medium was deficient in nickel (-30%, from 48.2 ± 6.2 to 33.5 ± 0.7 nmol.mg DW⁻¹), and were further reduced in the presence of PPD (-65%, from 48.2 ± 6.2 to 16.5 ± 3.1 nmol.mg DW⁻¹). The same pattern was observed in shoots, with a reduction by 30 and 50% of amino acids content, respectively (fig. III-6).

Overall, all the individual amino acids were uniformly affected by nickel deficiency (-Ni) or by the presence of PPD in the growth medium, in shoots and roots of oilseed rape (fig. III-6a and b). The most represented amino acids were glutamate, glutamine, and aspartate and their content were significantly decreased upon nickel deficient conditions, and more intensely by applying the PPD, whatever the tissues. However, serine, asparagine and arginine contents were also affected.

IV. Discussion

Since urea is one of the most used nitrogen fertilizers world-wide (<http://faostat.fao.org>), its enzymatic hydrolysis is a process of great agricultural importance.

The primary role of urease is to allow the organisms to use external or internally generated urea as a nitrogen source (Mobley and Hausinger 1989; Mobley et al. 1995). Many studies have been reported on urea uptake and assimilation in several species and they have

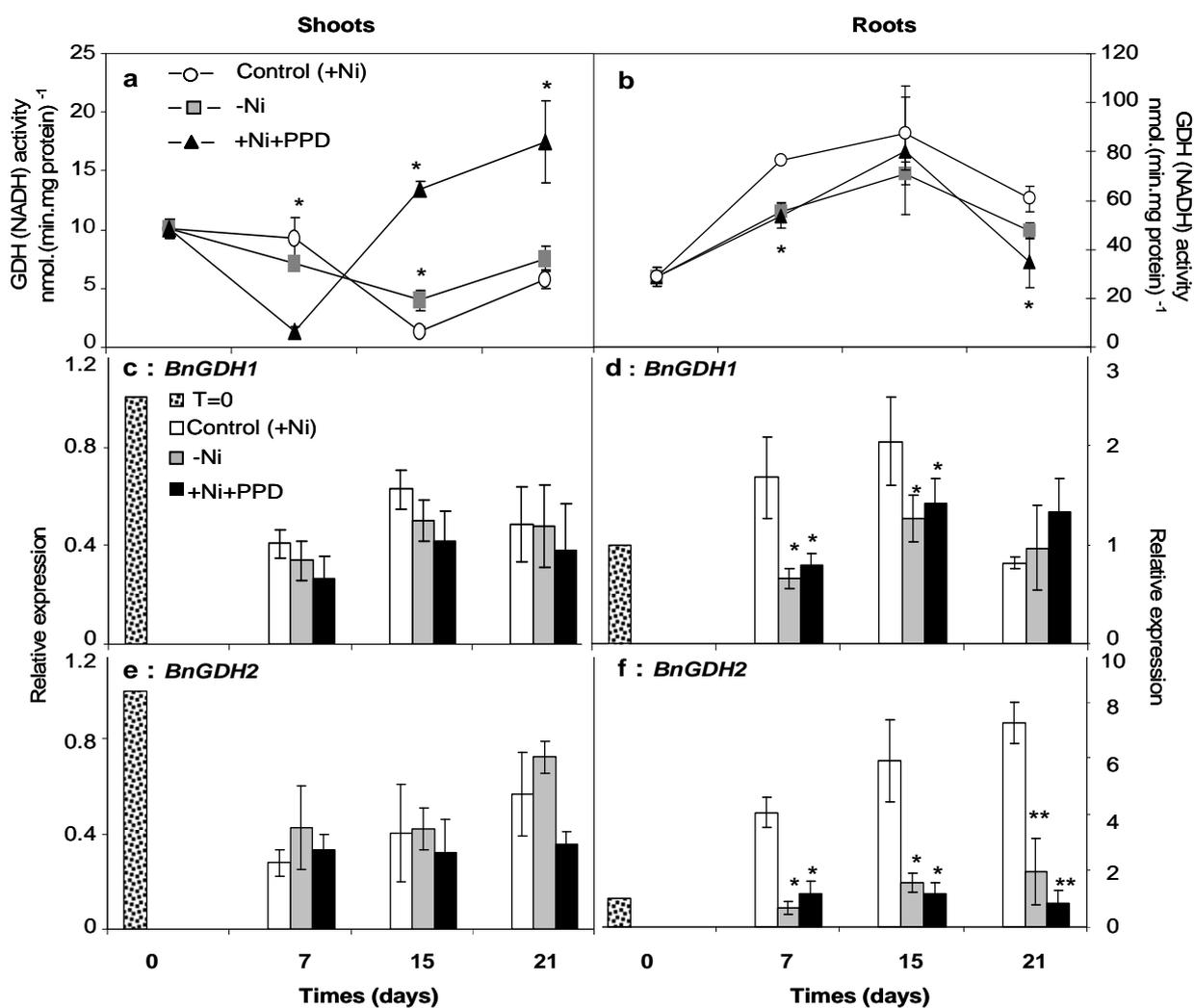


Fig. III-5 Glutamate dehydrogenase (GDH) activity and relative expression of the *BnGDH* genes. Shoot GDH activity (a), root GDH activity (b) of rapeseed plants at days 0, 7, 15 and 21 after application of treatments: urea (+Ni)-fed plants (○), urea (-Ni)-fed plants (■) and urea (+Ni+PPD)-fed plants (▲). Relative expression of shoot *BnGDH1* (c) and *BnGDH2* (e) and root *BnGDH1* (d) and *BnGDH2* (f). Data represent mean ± standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at P<0.05 (*), P<0.01 (**).

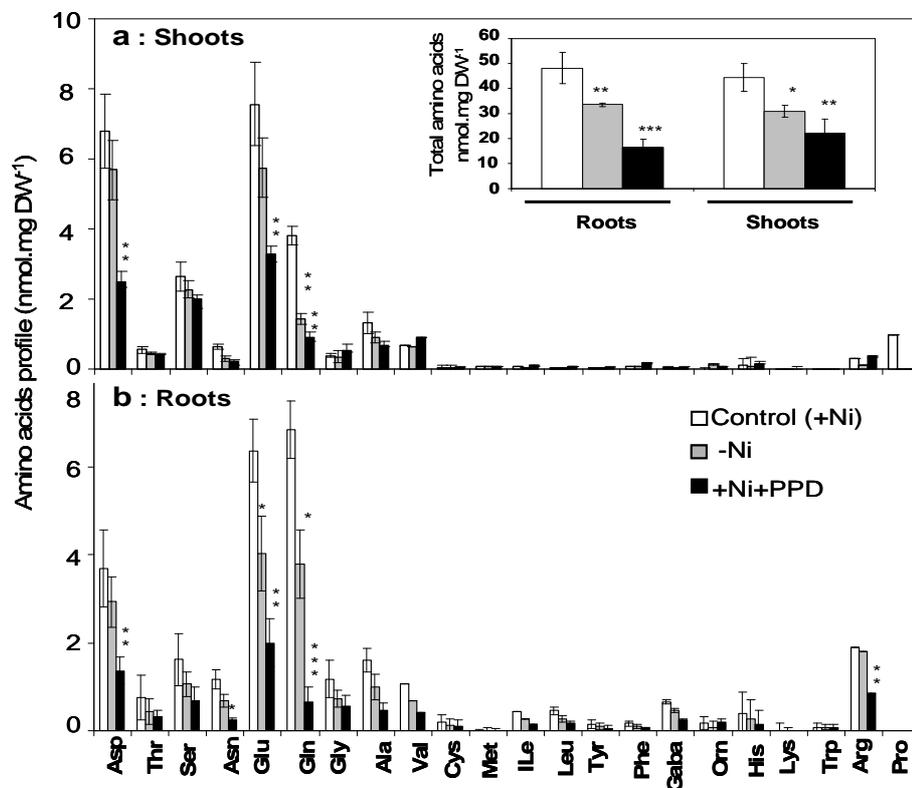


Fig. III-6 Amino acid profile in shoots (a) and roots (b) of rapeseed plants after 21 days of treatment: urea(+Ni)-fed plants (control treatment, white bars), urea(-Ni)-fed plants (gray bars) and urea(+Ni+PPD)-fed plants (black bars). Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 9 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)

highlighted the importance of nickel for N metabolism in plant (Gerendás and Sattelmacher 1997; Mérigout et al. 2008). However, the investigation of the physiological effects of a urease inhibitor on plants is a recent topic, and its potential uptake by plants is a factor that must be taken into account when the application of urea as fertilizer is combined with urease inhibitors (Cruchaga et al. 2011). This study aims to identify jointly, the effect of nickel and a urease inhibitor on nitrogen metabolism.

To our knowledge, it is the first study to combine physiological and molecular analyses of urea grown rapeseed plants, under nickel deficiency conditions or treated with a urease inhibitor, Phenylphosphorodiamidate (PPD), whose expected effects could be very closed: synthesis of inefficient urease or its inhibition, respectively.

IV.1. Plant growth is reduced by Ni deficiency or exposure to a urease inhibitor

Plants grown with urea without Ni supplementation were affected and showed reduced growth (-29%) and leaf chlorophyll content compared with control (+Ni, fig. III-1b) while exposure to PPD causes a greater effect on growth (-60% compared to control). While these findings support earlier reports of Gerendás and Sattelmacher (1997) using Ni-deficient urea-grown zucchini, rye, rapeseed, wheat, soybean, and sunflower plants with reduced growth and appearance of chlorotic leaves, they were not in agreement with those of Cruchaga et al. (2011) and Artola et al. (2011), who showed a transient positive effect of NBPT on growth and nitrogen metabolism in wheat, pea, and spinach plants .

This difference may be the result of how the PPD was provided in the nutrient solution during the experiment. NBPT is usually supplied only at the beginning of the experiment (Artola et al. 2011; Cruchaga et al. 2011), while PPD was supplied at each renewal of nutrient solution in this study. Our results further showed that Ni is required for plants grown without N or urea supply. Internally produced urea was accumulated, in shoots (fig. III-3a) and roots (fig. III-3b) and its content decreased in all tissues no matter what the treatment.

This focuses attention on the fact that Ni is required whatever the N nutrition of plants, while most current laboratory cultures of plants are carried out without Ni supply, resulting, for example, in the wide use of Hoagland nutrient solution.

IV.2. Urea uptake is impaired by the lack of Ni or the addition of PPD while the expression of BnDUR3 is up-regulated

Using ¹⁵N-labeled urea, we have shown a reduced capacity for urea uptake by Ni-deficient (-50%) or PPD-supplied plants (-94%; fig. III-2a). These results are in agreement

with those of Cruchaga et al. (2011) who report that another urease inhibitor (NBPT) reduced the incorporation of labeled urea in pea and spinach plant species. Shoot and root analysis of *BnDUR3* expression gave some interesting results regarding urea uptake. This gene was expressed at a high level in N-deficient (T=0) roots (fig. III-2c, Kojima et al. 2007). Moreover, the transcript level decreased after resupply of urea and nickel (control plants) to N-deficient roots, suggesting that N deficiency up-regulates *BnDUR3* expression in a similar way to that of *AtAMT1.1* encoding the major root transporter for high-affinity ammonium uptake (Yuan et al. 2007). Also, there was no correlation between the increase in urea uptake (fig. III-2a) and *BnDUR3* expression levels as previously shown in *A. thaliana* (Mérigout et al. 2008). Thus, in Ni-deficient conditions or when PPD was supplied with urea, *BnDUR3* gene expression in roots tends to retain the same pattern of expression as under nitrogen deficient conditions, until at least 7 days after treatment (fig. III-2c).

IV.3. Despite a lower uptake, urea is accumulated during N or Ni deficiency or by PPD supply

The decrease in shoot and root urea-N content in urea-fed plants (fig. III-3a and b) indicated that a very rapid initial hydrolysis of urea is stimulated by the nickel supply in the nutrient solution and hence the synthesis of functional urease whereas the slowdown of urea hydrolysis observed in Ni-deprived or PPD treated plants, could be the result of the lack of urease synthesis (Artola et al. 2011; Cruchaga et al. 2011; Gerendás and Sattelmacher 1999) or its inhibition, especially in roots (fig. III-3b). The accumulation of urea found in this study has been reported previously in different species grown on urea-based nutrient solutions without Ni supplementation, such as soybean (*Glycine max* L. Eskew et al. 1984; Krogmeier et al. 1991), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walker et al. 1985) and rapeseed (*Brassica napus* L. Gerendás and Sattelmacher 1999) or in the presence of NBPT such as wheat (*Triticum aestivum* L. Artola et al. 2011), pea (*Pisum sativum* L.) and spinach (*Spinacea oleracea* L. Cruchaga et al. 2011). It is also noteworthy that shoots and roots of rapeseed accumulated large amount of urea when plants were grown for only 1 week without nitrogen supplementation (T=0; fig. III-3a and b) suggesting that this endogenous urea may be derived from arginase degradation of purines and ureides (Wang et al. 2008). The gene encoding urease was expressed in high levels in shoots and roots of N-deficient plants (T=0), and then was repressed in control plants (+Ni; fig. III-3e and f). Therefore, the maintenance of urease gene expression at significantly higher levels in the (-Ni) and (+N+PPD) plants than in control

plants after 7 days (fig. III- 3e and f) suggest that the urease gene, like *BnDUR3* or *AtAMT1.1*, is a component of the stress response to nitrogen-deficiency.

IV.4. Accumulation of Ammonium under Ni deficiency or PPD supply resulting from a lack of its assimilation ?

Surprisingly, NH_4^+ content increased during the first 7 and 15 days of treatment in shoots and roots respectively, of (-Ni) and (+Ni+PPD) treated plants (fig. III-3c and d), while as a result of reduced urea uptake and urease activity, a reduction of NH_4^+ -levels was expected. Cruchaga et al. (2011) reported similar observation in NBPT treated spinach and postulated an alteration of the main NH_4^+ assimilation pathways. Indeed, the most striking effect was observed in roots, where PPD led to a drastic decrease in GS activity (fig. III-4b) which seems to be a direct consequence of its lower synthesis (fig. III-4c) and was followed by an increase of NH_4^+ content in roots (fig. III-3d). As GS cannot fulfill its role in ammonium assimilation, GDH may play a major role in keeping the levels of NH_4^+ in the cytoplasm below toxicity (Skopelitis et al. 2006; Tercé-Laforgue et al. 2004), and could operate via amination. In this study, a correlation between the increase of NH_4^+ in roots and the increase in GDH aminating activity, whatever the treatment, has been observed (fig. III-5b). However, this activity was relatively low in (-Ni) and (+Ni+PPD) treated plants, indicating that Ni deficiency or PPD treatment alters this second pathway of ammonium assimilation. Thus, the apparent transcriptional up-regulation of *BnGDH1* and *BnGDH2* supports the large increase in enzyme activity found in roots of the control plants. GDH multiplicity is a result of the random assembly of two types of subunits, α and β , to form seven hexameric isoforms (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis 1991). Recently, the use of transgenic tobacco plants with modified expression of the GDH α and β polypeptide genes (Purnell et al. 2005; Skopelitis et al. 2007), has firmly established *in vivo* that under normal growth conditions, GDH1 (β -subunit homohexamer) solely deaminates glutamate (Purnell and Botella 2007), whereas GDH2 (α -subunit homohexamer) exhibits strong deaminating activity and only very low aminating activity (Skopelitis et al. 2007). Therefore, our results, and particularly the fact that *BnGDH2* is expressed at a level 5 times greater than *BnGDH1*, strengthen the hypothesis that the induction of root *BnGDH2* is a response to the internally provided NH_4^+ , preventing accumulation of this species. Also, the strongly reduced expression of this gene under Ni-lacking conditions or with PPD treatment leads to an accumulation of ammonium at least during the first 15 days of treatment (fig. III-3d). In shoots, GDH activity (fig. III-5a) and ammonium content (fig. III-3c) are closely correlated

only for (+Ni+PPD) treatment, whereas, the relative expression of shoot *BnGDH1* (fig. III-5c) and *BnGDH2* (fig. III-5e) was not closely related to enzymatic activity (fig. III-5a). All together, these observations indicate that the regulation of the ammonium assimilatory pathway in shoots is more complex than very often described and may well indicate a more complex regulation of GDH activities and expression than found in roots.

IV.5. As a consequence, amino acid content is reduced by Ni deficiency or PPD addition

Ni deficiency or PPD application lead to impaired usage of the N supplied and consequently to lower amino acid contents (fig. III-6). A similar effect has been reported by some authors (Cruchaga et al. 2011; Gerendás and Sattelmacher 1999). In this study, the mostly affected amino acids were glutamate, glutamine and aspartate, which serve as a major transport molecules of nitrogen (Galili et al. 2008). Thus, they reached high levels in nickel-treated plants, since these plants were able to use provided urea. This suggests high activity for aspartate aminotransferase, which catalyzes the bidirectional conversion of aspartate into glutamate (Galili et al. 2008). A reduction of aspartate level in PPD-treated plants, also suggests an impact on this enzyme and thereafter, on the whole chain of amino acid synthesis. Having observed a low ^{15}N -urea uptake (fig. III-2a), and a reduction in amino acids pool (fig. III-6) under these treatments, we suggest that up regulated expression of genes such as *BnDUR3* or urease are components of the stress response to nitrogen-deficiency in rapeseed (Kojima et al. 2007).

In conclusion, our data demonstrate that the lack of urease activation in low-Ni plants or by adding a urease inhibitor led plants to be metabolically deficient in N. Whether they are grown with or without urea, plants require Ni as a nutrient, because internal urea is generated. Moreover, urease inhibitors, at least when provided in hydroponic culture, may have deleterious effects on plant N metabolism and hence, plant growth. This suggest that PPD may be taken up by the plant, but its quantification *in planta* was below its detection limit using mass spectrometry analysis (unshown data). However, it cannot be excluded that very small contents of PPD in plant tissue may not be enough to cause a significant urease inhibition.

Acknowledgements:

We thank Marie-Paule Bataillé and Raphaël Ségura for IRMS analyses. We acknowledge Xavier Sarda for helping with plant culture and harvest and Laurence Cantrill for kindly improving the English of the manuscript. The authors thank the « Pôle de compétitivité Mer-Bretagne » and the FUI (“Fond Unique Inter-ministériel”) which supported this work conducted through the AZOSTIMER project.

Chapitre IV

ALIMENTATION AMMONIACALE, NITRIQUE ET/OU UREIQUE
CHEZ LE COLZA D'HIVER (*BRASSICA NAPUS* L.) : ETUDES EN
CONDITIONS HYDROPONIQUES OU LYSIMETRIQUES

**CHAPITRE IV. ALIMENTATION AMMONIACALE, NITRIQUE ET/OU
UREIQUE CHEZ LE COLZA D’HIVER (*BRASSICA NAPUS L.*) :
ETUDES EN CONDITIONS HYDROPONIQUES OU LYSIMETRIQUES**

Article 2:

Hydropony versus field lysimeter study of urea, ammonium and nitrate uptake by oilseed rape (*Brassica napus L.*).

Mustapha Arkoun^{1,2}, Xavier Sarda^{1,2}, Laëtitia Jannin^{1,2}, Philippe Laîné^{1,2}, Philippe Etienne^{1,2}, José-Maria Garcia-Mina³, Jean-Claude Yvin⁴, Alain Ourry^{1,2*}

¹ Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex, France

² INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex, France

³ Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C n°32 E-31160 Orcoyen, Spain

⁴ Timac Agro International, 27 avenue Franklin Roosevelt 35408 Saint-Malo, France

*For correspondence. E-mail alain.ourry@unicaen.fr

Keywords

Urea, ammonium, nitrate, ¹⁵N labelling, uptake, N losses, urease inhibitor, *BnDUR3*, *BnAMT1.1*, *BnNRT1.1*, *BnNRT2.1*, *Brassica napus*.

Number of text pages : 35

Number of tables : 1

Number of figures : 7

Number of references : 52

Soumis à *Annals of Botany*

Abstract

Background and Aims N-fertilizer use efficiencies are affected by their chemical composition and suffer from potential N-losses by volatilization. Consequently, the aims of this work were to assess in *Brassica napus* L. N uptake and dynamics at the whole plant level from different forms of mineral N fertilizers, under field and controlled conditions and quantify the advantage of using urease inhibitor.

Methods In a field lysimeter experiment, ^{15}N labelled fertilizers were used to follow N uptake and assessed N-losses by volatilization while in hydroponic conditions, *Brassica napus* L. were grown with different N-sources (Urea, Ammonium Sulfate, Nitrate + Urea, or Nitrate ammonium) to investigate N-uptake by ^{15}N -labelling and molecular analysis.

Key Results and Conclusions Use of urea with NBPT (urease inhibitor), showed the best efficiency with the lowest N losses (8% of N applied compared to 25% with urea alone). Plants receiving ammonium sulfate, had similar yield achieved through a better N mobilization from vegetative tissues to the seeds despite a lower N uptake resulting from a higher volatilization (43% of applied N). Amounts of ^{15}N in the plant were also higher when plants were fertilized with nitrate ammonium but N-losses reached 23% of applied N. Hydroponic experiments showed a deleterious effect of ammonium and urea on growth of oilseed rape, that was alleviated by nitrate supply which was preferentially taken up. *B. napus* was also characterised by a very low potential for urea uptake. *BnDUR3* like *BnAMT1*, encoding urea and ammonium transporters were up-regulated by urea suggesting that urea grown plants suffered from nitrogen deficiency. Results also suggest a role for nitrate as a signal on expression of *BnDUR3* additionally to its role as a major nutrient. Despite a better use efficiency for urea fertilizer which was further increased by application of urease inhibitor, overall results suggest that urea in itself do not contribute significantly to plant N nutrition.

I. Introduction

Nitrogen (N) is the most important plant nutrient for crop production and it is generally applied to the soil as a fertilizer. Three main forms of mineral N fertilizers are usually available as ammonium (NH_4^+), as nitrate (NO_3^-) and as urea [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] or in combined forms, and their effectiveness is influenced by the ion exchange principles. Because of its positive charge, NH_4^+ is adsorbed by soil negatively charged colloids and thus retained from leaching, whereas the negatively charged NO_3^- is subject to leaching (Hofman and Van Cleemput, 2004). However, depending on many factors, such as soil characteristics, climatic factors, crop type, and fertilisation management, the N-use efficiency of plants is generally low (Malhi and Nyborg, 1991; Malhi *et al.*, 2001).

Urea is the main N fertilizer used in agriculture throughout the world, accounting for about 50% of the total world N fertilizer consumption (<http://faostat.fao.org>). Its consumption has increased substantially because of its low manufacturing cost and its high nitrogen content (46%). However, after its hydrolysis by urease, a common enzyme in soil, the efficiency of urea can be decreased significantly by losses of N as ammonia gas (NH_3), which may reach up to 50% of N applied (Terman, 1979). Thereafter, NH_3 lost to the atmosphere will be deposited to land or water causing eutrophication and acidification of natural ecosystems (Sommer and Hutchings, 2001). The extent of ammonia volatilization can be affected by pH, temperature, organic matter, availability of water, and the form in which urea is applied (Vlek and Carter, 1983). Moreover, urea hydrolysis reaction leads to an increase of soil pH and to the accumulation of ammonium and nitrite, especially in alkaline sandy soils and with urea surface application (Nohrstedt *et al.*, 2000). Nitrite accumulation could be toxic for germinating seeds and seedling, and it could also favour gaseous N losses by denitrification (Bremner and Chai, 1989). To reduce ammonia volatilization and the adverse effect of urea hydrolysis, many compounds have been tested for their ability to inhibit soil urease activity (Trenkel, 2010). The use of urease inhibitors, that delay the rate at which urea is hydrolyzed and converted to ammonium, may reduce the problems associated with the use of urea-based fertilizer (Gill *et al.*, 1997). By slowing down urea hydrolysis, atmospheric volatilization of ammonia, as well as further losses from nitrate leaching, are either reduced or avoided. It also allows more time for plant N uptake.

Amongst the tested inhibitors, N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (NBPT, sold as Agrotain[®], Agrotain International) was found to be one of the most effective (Vittori Antisari *et al.*, 1989; Sanz-Cobena *et al.*, 2008; Trenkel, 2010). It has consistently demonstrated its effectiveness at low concentrations, and inhibits the activity of urease enzyme in a wide

variety of soil (Vittori Antisari *et al.*, 1989; Carmona *et al.*, 1990, Gill *et al.*, 1997; Trenkel, 2010). Its effect on urease activity is associated with the activity of its derivative, the oxygen analogue, *N*-(*n*-butyl) phosphoric triamide (Phongpan *et al.*, 1995). A previous study on soil incubation shows that the effect of NBPT on lowering ammonia volatilization was greatest in soils with a high pH and low buffering capacity (Watson *et al.*, 1994). In addition, compared to urea without inhibitor, when NBPT is applied to the soil together with urea fertiliser (Trenkel, 2010) decreased in nitrogen losses and reduced toxicity from ammonia, results in larger yields and better crop quality

Otherwise, the use of urease inhibitors implies that a significant soil concentration of stable urea and ammonium, as well as new mixed N forms such as $\text{NO}_3^- \text{-NH}_4^+$ (NA) and NO_3^- - urea (NU) are available for plants besides NO_3^- , the main N form present in cultivated soil (Marschner, 1995). All plants are able to take up either nitrate, ammonium or urea as a nitrogen source, and possess dedicated transmembrane transport systems in root cells for each form of nitrogen (Crawford and Forde, 2002; Liu *et al.*, 2003). Recently, AtDUR3 was demonstrated to serve as a major high affinity transporter for urea uptake by N-deficient roots of *Arabidopsis* (Kojima *et al.*, 2007), suggesting that urea transport activity of AtDUR3 is of physiological significance in higher plants. Ammonium uptake is mediated by transport systems that have been isolated and partially characterized in several plant species, such as *Arabidopsis thaliana* (AtAMT1.1, AtAMT1.2, AtAMT1.3 and AtAMT2; Ninnemann *et al.*, 1994; Gazzarrini *et al.*, 1999; Sohlenkamp *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 2002) and *Brassica napus* (BnAMT1.2; Pearson *et al.*, 2002). Two gene families namely, NRT1 and NRT2 have been identified in nitrate acquisition by plants (Forde, 2000). In *Arabidopsis thaliana*, AtNRT1.1 and AtNRT1.2, were characterized as low-affinity nitrate transporter, and considered to belong to the NO_3^- LATS (Low Affinity Transport System; Crawford and Glass, 1998), while NRT2.1 gene was shown to encode a major component of the NO_3^- HATS (High Affinity Transport System; Lejay *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001). Recently, it has been shown that NRT1.1 was involved in the signaling pathway responsible for stimulation of lateral root growth and facilitates uptake of auxin (Krouk *et al.*, 2010).

It has been established that efficiency of urea as a source of N seems to be lower than that of NO_3^- and NA (Tan *et al.*, 2000; Houdusse *et al.*, 2005, Mériçout *et al.*, 2008). NH_4^+ nutrition usually has deleterious effects on plant growth and can result in toxicity symptoms in many plants (Salsac *et al.*, 1985; Britto and Kronzucker, 1998). Therefore, NH_4^+ must be rapidly assimilated. It is widely accepted that the glutamine synthetase (GS)-glutamate synthase (GOGAT) cycle is the main pathway of NH_4^+ assimilation (O'Neal and Joy, 1973;

Lea and Miflin, 1974). However, the glutamate deshydrogenase (GDH) may play a complementary role to GS/GOGAT in the reassimilation of ammonium during stress conditions or during specific stages of development (Yamaya *et al.*, 1986; Rhodes *et al.*, 1989; Terce-Laforgue *et al.*, 2004). Experiments conducted in controlled conditions have shown that urea nutrition can also cause negative effects on wheat development, but less intensely than those associated with NH_4^+ nutrition (Houdusse *et al.*, 2005, 2007, Garnica *et al.*, 2008). However, several authors have demonstrated that the negative effects associated with ammonium and urea nutrition are corrected by the supply of nitrate in the nutrient solution (Britto and Kronzucker, 2002; Cruz *et al.*, 2003, Houdusse *et al.*, 2005; Garnica *et al.*, 2008). Physiological and molecular processes underlying this beneficial effect are only partially understood.

The influences of both, type of fertilizer and urease inhibitor on yield and N uptake described above indicate that these two parameters could influence N use efficiency as well as N management of agricultural systems, and are potentially of importance from the perspectives of pollution, cost and plant productivity. Although, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the dominant oilseed crop in northern Europe; it requires high amounts of nitrogen (N) but is characterized by low real harvested N-fertilizer use efficiency. It is considered as a nitrophilic crop, and receives a large amount of N fertilizer, for which urea is becoming predominant. Therefore, there is a strong need to review all the relevant information on its N metabolism to improve the efficiency of rape production and reduce its environmental impact.

The aims of this work were firstly to investigate, on undisturbed soil lysimeters, the effect of different types of nitrogen fertilizers on crop yield of spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their impacts on the environment. Assessment of NH_3^+ volatilization was determined by ^{15}N balance. This would assess more clearly the interest of urea fertilization combined or not with the urease inhibitor, NBPT, compared with a commonly used fertilizer such as ammonium nitrate. In addition to the field studies, the effects of mixed feeding (NA and NU) on the main nitrate (NRT1.1 and NRT2.1), ammonium (AMT1.1) and urea (DUR3) transporters comparatively with nitrate, urea and ammonium as sole nitrogen source was studied at the physiological and molecular level by the ^{15}N labelling and qPCR expression analysis. Moreover, another experiment on the possible role of nitrate as a signal was undertaken. One of the aims of the laboratory experiments was to identify mechanisms responsible for the patterns of N uptake observed in the field.

II. Materials and Methods

II.1. Site and lysimeter description

The lysimeter system is located in Lieury l'Oudon, in the North of France (00°00'34.3"W, 48°59'24.2"N). It's composed of 15 lysimeter boxes in polyester resin of 2m² and 110 cm of depth with 10 cm of fine stone for drainage. Each lysimeter box is connected to a bucket collecting water percolation through a PVC tube. All buckets are located in a concrete tunnel below the boxes.

II.2. Soil and crop culture

The soil in lysimeter boxes is a Calcaric Cambisols (World Reference Base for soil resources, 2006), with a fertile surface layer in terms of organic matter (6.3% in 0-20cm), a relatively basic pH (Tab. IV-1) and a high content of calcium carbonate increasing with depth.

A spring oilseed rape crop (*Brassica napus* L. 'Seven') was sown in 9 March 2011 at a density of 100-120 seeds.m², which was then controlled during all the crop cycle (from plants emergence to harvest), to obtain a plant density between 77-81 plants.m². The monthly water input, including rainfall and irrigation, and the monthly average temperature are shown in fig.IV-1. Water stress was not observed during the experimental period due to regular irrigation during March, April, May and June, while important rainfalls during July and August were observed.

II.3. Experimental treatment, labelling and harvest

A total of four ¹⁵N-labelled fertilizers (¹⁵N excess=10%), each with three replicates, were allocated to the lysimeters in a randomized design: ¹⁵NH₄¹⁵NO₃ (Ammonium Nitrate, AN), (¹⁵NH₄)₂SO₄ (Ammonium Sulfate, AS), CO(¹⁵NH₂)₂ (Urea, U), CO(¹⁵NH₂)₂ + NBPT (Urea + N-(n-butyl) thiophosphoric triamide, U+NBPT), and control (treatment without fertilizer). Fertilizers were applied one month after sowing (at the middle of April) at stage of development GS 1.4, and with an amount of 100 kg N.ha⁻¹. To facilitate uniformity of application, fertilizer were dissolved in osmosed water and spread with a watering can. After application, leaves were rinsed with osmosed water to prevent burns.

At harvest, in August 10th, plants were collected, weighed (fresh weight, FW), separated in three compartments: pods, stems and tap roots and dried (dry weight, DW).

Weeds and senescent leaves were also collected during developmental cycle, weighed (FW) and dried (DW). For soil analysis, five cores per lysimeter were realized down to 0.85 m. After drying at 60°C, samples were weighted and ground to a fine powder with inox beads

Table IV.1 Physical and chemical properties of the soil lysimeters.

Depth (cm)	Particle size distribution (%)			pH (water)	Organic C (mg C.g ⁻¹)	Total N (mg N.g ⁻¹)	C/N	CEC (cmol.kg ⁻¹)	Total CaCO ₃ (%)
	Sand	Silt	Clay						
0-20	32	38	30	7.9	25.4	3.21	7.9	16.5	10
20-40	34	38	28	8.1	15	1.87	8	11.5	12
40-65	41	35	24	8.3	7.6	0.93	8.2	7.2	28
65-100	49	34	17	8.4	3.4	0.4	8.5	4.6	38

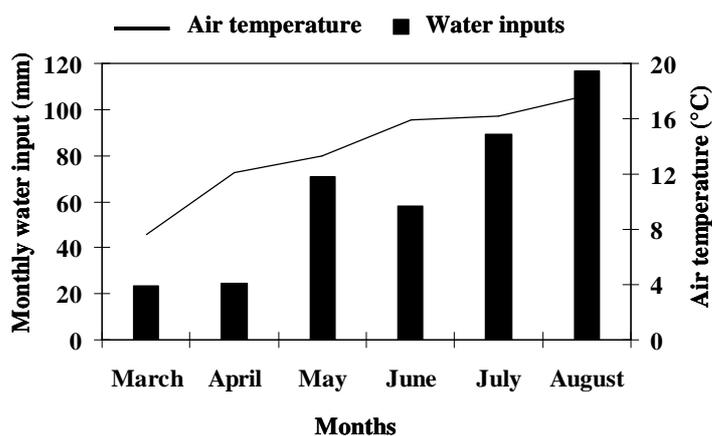


Fig. IV-1 Monthly water inputs (rainfall and irrigation) and monthly average air temperature recorded to the lysimeter site.

of 0.4 mm diameter in an oscillating grinder (mixer mill MM301; Retsch) before isotope analysis.

II.4. Plant material for laboratory experiments

Seeds of *Brassica napus* L. were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over deionized water for 2d in the dark. Then, plants were grown in the greenhouse. Just after the first leaf emergence, seedlings were transferred for one week to a plastic tank (20 L) and supplied with a continuously aerated nutrient solution containing: CaCl₂ 1.25 mM, KCl 0.25 mM, KH₂PO₄ 0.25 mM, MgSO₄ 0.5 mM, EDTA-2NaFe 0.2 mM, H₃BO₃ 14 μM, MnSO₄ 5 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0.7 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.7 μM, CoCl₂ 0.1 μM and NiCl₂ 0.04 μM.

Next, seedlings were divided into seven sets and placed in a plastic tank (10 L, 32 seedlings) containing the nutrient solution described above and supplied with 2 mM N-CO(¹⁵NH₂)₂ [U; atom % ¹⁵N, 4.11%], N-(¹⁵NH₄)₂SO₄ [AS; atom % ¹⁵N, 2.29%], N- K¹⁵NO₃ [Nitrate; atom % ¹⁵N, 2.25%], K¹⁵NO₃-CO(NH₂)₂ [NU; atom % ¹⁵N, 2.32%], KNO₃-CO(¹⁵NH₂)₂ [NU; atom % ¹⁵N, 5.17%], K¹⁵NO₃-(NH₄)₂SO₄ [NA; atom % ¹⁵N, 2.49%] and KNO₃-(¹⁵NH₄)₂SO₄ [NA; atom % ¹⁵N, 2.96%] to measure cumulative nitrogen uptake.

Two other sets of seedlings were treated with 2 mM N-CO(¹⁵NH₂)₂ [U; atom % ¹⁵N, 4.11%] or 2 mM N-(¹⁵NH₄)₂SO₄ [AS; atom % ¹⁵N, 2.29%] and received, every six hours, 150 nM of nitrate (KNO₃) as a pulse until the end of the experiment. The natural light from the greenhouse was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m⁻².s⁻¹ at canopy height for 16 h per day. The thermoperiod was 20°C (day) and 17°C (night), and nutrient solution was renewed every 2 days.

After different durations of treatment (0, 24, 72h and 15 days), plants were harvested and separated as shoot and root samples. Then, they were weighed (FW), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was weighed and dried (60°C) in a drying oven for dry weight (DW) determination and ground to a fine powder with 0.4 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (mixer mill MM301; Retsch) before isotope analysis.

II.5. Total N, ^{15}N analysis and ^{15}N balance

An aliquot of each soil or plant sample was placed in a tin capsule for ^{15}N isotopic analysis. The total N amount and ^{15}N excess in plant or soil samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

Total N (N_{tot}) content in the different compartment 'i' was calculated as: $N_{\text{tot}} = (\%N_i \times DW_i)/100$. The natural ^{15}N abundance ($0.36636 \pm 0.0004\%$) of atmospheric N_2 was used as a reference for ^{15}N analysis of plant grown in hydroponic conditions, while the natural ^{15}N abundance of unfertilized lysimeter soil ($0.3816\% \pm 0.015\%$) was used for plants grown in lysimeters. Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt_i}) in 'i' compartment was calculated as: $N_{\text{upt}_i} = (N_{\text{tot}_i} \times E_i) / E_s$. Where E_i (%) is the atom ^{15}N excess in the different compartment, and E_s is the nutrient solution or fertilizer atom ^{15}N excess.

Fertilizer Use Efficiency (FUE) was calculated as: $^{15}\text{N}_{\text{uptake}} / ^{15}\text{N}_{\text{applied}} \times 100$, while nitrogen losses by volatilization were estimated using the ^{15}N balance and calculated by the following formula: $^{15}\text{N}_{\text{volatilized}} = ^{15}\text{N}_{\text{fertilizer}} - (^{15}\text{N}_{\text{plant}} + ^{15}\text{N}_{\text{soil}} + ^{15}\text{N}_{\text{percolated}})$.

II.6. RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 to 400 mg of root and shoot fresh matter corresponding to three sets of seedlings for each treatment. Fresh root and shoot samples were ground in liquid nitrogen with a mortar. The resulting powder was suspended in 750 μL of extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS [w/v], pH8) and 750 μL of hot phenol (80°C , pH 4). This mixture was vortexed for 30s. After addition of 750 μL of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15000g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C . After centrifugation (15000g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 μL of sterile water. Fifty μL of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C . After centrifugation (15000g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15000g for 5 min at 4°C . The resulting pellet was dried for 5min at room temperature and resuspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed with a spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer Eppendorf, France) before RT-PCR analysis.

For RT, 1 μg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad). The genes and specific primers selected for the analysis were the following: *EF1* (Forward (F), 5'-tttcgagggtgacaacatga; Reverse (R), 5'-

ccgttccaataccaccaate); and 18S (F, 5`-cggataaccgtagtaattctag; R, 5`-gtactcattccaattaccagac); as housekeeping genes. *BnNrt2.1* (F, 5`-tggtggaataggcggctcgagttg; R, 5`-gtatacgtttgggtcattgccat); *BnNrt1.1* (F, 5`-atggtaacccaagtgccttg; R, 5`-tgattccagctgttgaagc); *BnDUR3* (F, 5`-gacgacgagggaatcaaag; R, 5`-atgacaacaatgaggagagtga); and *BnGDH2* (F, 5`-ctcgtgacttgagcttgagc; R, 5`-caggggaatgaccatgaaac); as target genes.

The subsequent PCR reactions were performed with 4 µL of 200X diluted cDNA, 500 nM of the primers, 1X SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a total volume of 15 µL. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the melting curves after quantitative PCR reactions using the Chromo4 system (Bio-Rad, France) and by sequencing the quantitative PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal, France). For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expression of the target gene in each sample was compared to the control sample (corresponding to control plants at T=0) and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation: $2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$, with $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$ (For calculations, we considered the geometric mean between Ct of the two housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the target gene in the control sample was equal to one (2⁰), by definition (Livak and Schmittgen, 2001).

II.7. Data and statistical analysis

All experiments were performed with 3 replicates. For laboratory experiment, each replicates contains nine seedlings. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm S.E. for n=3. A statistical analysis was performed using the Student test (p=0.05).

For qPCR analysis, the normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to compare the means was performed using MINITAB13 on *Windows* (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was done. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$.

III. Results

III.1. Fertilizer net uptake and N partitioning under lysimeter conditions

A. Environmental conditions

Monthly air temperature at the experimental site varied from 7.6°C in March to 17.6°C in August (fig. IV-1). Cumulative water input, including rainfall and irrigation, was 24mm at the beginning of the experiment, and reached 71.1, 58.3 and 89.3mm during May, June and July, respectively. The highest rate of rainfall was recorded at the end of the experiment (August) with 116.4mm (fig. IV-1). During the spring and summer period, the irrigation and rainfall inputs was mostly lost to the atmosphere as evapotranspiration, and no leaching occurred during this period.

B. Yield and fertilizer use efficiency (FUE)

A lysimeter device was used to investigate the effect of different types of nitrogen fertilizer and assessing the interest of urea fertilization combined or not with the urease inhibitor on yield of oilseed rape (*Brassica napus* L.), N uptake and their impact on the environment. Results of crop yield, expressed in tons per hectare, revealed highly significant differences between control (without N fertilizer) and other treatments (Urea, U; Urea + N-(n-butyl) thiophosphoric triamide, U+NBPT; Ammonium Sulfate, AS and Nitrate-Ammonium, NA; fig. IV-2A). Comparatively to control, fertilized plants were characterized by a 35% increase in yield (from 1.72±0.04 to 2.31 tons.ha⁻¹ on average; fig. IV-2A). Results also show that the type of nitrogen fertilizer applied to plants had no effect on yield since the final crop yield did not change (2.31 tons.ha⁻¹ on average) whatever the fertilizer treatments. However, fertilizer use efficiency (FUE), which measures efficiency of nitrogen uptake by plants from fertilizer, varied depending on the fertilizer provided (fig. IV-2B). In fact, AS treatment has the lowest FUE (29%), while U + NBPT treatment showed the highest FUE (46%). U and NA treatments had a FUE of 37 and 41%, respectively (fig. IV-2B). Furthermore, compared to urea fertilizer, an increase by 24% in FUE is observed when a urease inhibitor was combined with urea (U+NBPT treatment).

C. Partitioning of N taken up

By labelling fertilizers with ¹⁵N, it was possible to quantify N distribution in each compartment (fig. IV-3A), cumulated N uptake and allocation to each plant parts (fig. IV-3B). The amount of residual ¹⁵N in soil was highest in U+NBPT treatment and lowest in AS treatment, with 45.44±4.77 and 26.97±6.05 kg ¹⁵N.ha⁻¹, respectively (fig. 3A). Compared to

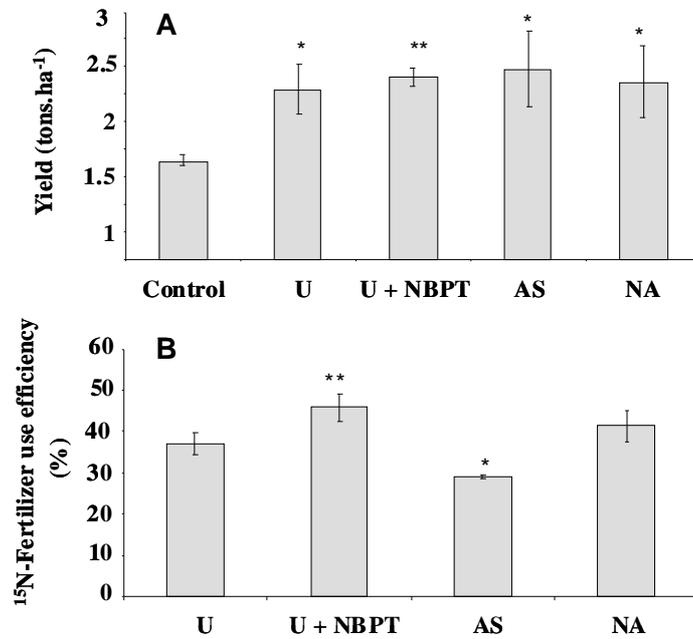


Fig. IV-2 Agronomic parameters. A: Yield of oilseed rape and B: Fertilizer Use Efficiency (FUE). Fertilizers were applied as Ammonium Nitrate (AN), Ammonium Sulfate (AS), Urea (U), Urea + N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (U+NBPT), and control (treatment without fertilizer). Data represent mean \pm standard error (n=3). Asterisks represent significant differences from the control at *P<0.05 or **P<0.01.

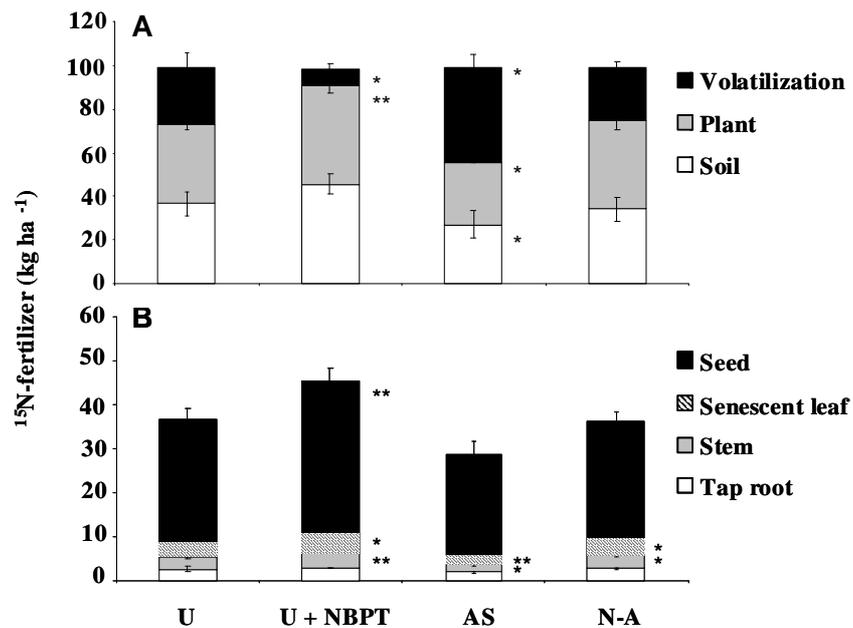


Fig. IV-3 N-fertilizer uptake and partitioning estimated by ¹⁵N-labelling. A: partitioning of ¹⁵N in the different compartments (soil, plant and volatilized form). B: distribution of ¹⁵N into the plants and their components (taproot, stem, senescent leaves and seeds). Fertilizers were applied as Ammonium Nitrate (AN), Ammonium Sulfate (AS), Urea (U), Urea + N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (U+NBPT), and control (treatment without fertilizer). Data represent mean \pm standard error (n=3). Asterisks represent significant differences from the control at *P<0.05 or **P<0.01.

plants receiving urea (U, $36.43 \pm 2.87 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$) as fertilizer, those grown in the presence of an urease inhibitor (U+NBPT treatment) were characterized by a larger nitrogen content in the plant compartment (+23%, $44.98 \pm 3.38 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$), while those receiving AS, have the lowest level ($28.73 \pm 0.51 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$, fig. IV-3A). Amounts of ^{15}N in the plant compartment were also increased compared to AS when plants were fertilized with nitrate ammonium (NA), with a nitrogen content of $40.86 \pm 4.04 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Nitrogen losses by volatilization were assessed using the ^{15}N balance, in the absence of any leaching. Results show that, comparatively to U, AS and NA treatments, the application of the urease inhibitor, NBPT, with urea fertilizer, reduce substantially the losses of nitrogen by volatilization (fig. IV-3B). In fact, with NBPT, losses were reduced by 68%, when compared to U treatment (from 25.60 ± 6.94 to $8.07 \pm 1.89 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$), and by 81 and 65% when compared to AS ($43.33 \pm 6.11 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$) and NA ($23.58 \pm 3.31 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$, fig. IV-3A) treatments. N that remained in the soil can be interpreted as the balance between volatilization process and plant uptake. No significant differences were observed in ^{15}N -soil contents between the U and NA treatments (36.62 ± 5.33 and $34.06 \pm 5.64 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$, respectively), while it was the lowest in AS fertilized plants (fig. IV-3B).

The quantification of labelled N into each organ reveals that distribution of nitrogen in the plant varies with the distribution of N between soil and volatilization, hence with the type of fertilizer. Overall, most of the ^{15}N was allocated to the seeds, while tap root, stem and senescent leaves, were the organs that have the lowest ^{15}N content (fig. IV-3B). Regarding taproots, and comparatively to U ($2.52 \pm 0.28 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$), U+NBPT ($2.86 \pm 0.28 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$) and NA ($2.65 \pm 0.28 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$) treatments, AS-treated plants are characterized by the lowest ^{15}N content ($1.87 \pm 0.28 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$, fig. IV-3B). Results also show that ^{15}N content decreased significantly in stem (-30%) and senescent leaves (-36%) of plants amended with ammonium sulphate (AS), compared with those received urea as fertilizer. Furthermore, compared with the same treatment (U), stem and senescent leaves- ^{15}N content increased in U+NBPT and NA-treated plants. However, this increase was higher with the U+NBPT treatment (+29% for stem and senescent leaves, from 2.56 ± 0.13 to $3.32 \pm 0.11 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$ and from 3.58 ± 0.48 to $4.63 \pm 0.24 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$, respectively). Similar trends were found in seeds, with a significant increase of ^{15}N content in the U+NBPT treated plants (+22%, from 28.05 ± 2.09 to $34.42 \pm 2.91 \text{ kg } ^{15}\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$), and a general decrease in the AS (-18%) and NA (-4%) treated plants (fig. IV-3B). Taken together, these results show that with a lower N availability resulting from higher volatilization (AS treatment), a similar seed yield was achieved by a better mobilization of N from senescing leaves, stems and taproots to the seeds.

III.2. Nitrate, ammonium and urea net uptake under hydroponic culture

A. Dry matter and N content

In order to study mechanisms of nitrate's beneficial effect, rapeseed seedlings were grown with diluted Hoagland solution (amended with Ni; 40 nM) without nitrogen for 1 week, and then supplied (T=0) with different nitrogen compounds supplied as sole (Urea, U; Ammonium Sulfate, AS and Nitrate) or mixed forms: Nitrate-Ammonium (NA) and nitrate-urea (NU) for 24 h, 72h and 15 days. Urea analysis of the nutrient solution was regularly performed to check that no significant hydrolysis occurred. Plant growth (i.e. dry matter production) was not significantly affected during the first 24 and 72 hours of treatment (data not shown). After 15 days of treatment, the analysis of the accumulated dry biomass revealed highly significant differences (fig. IV-4A). Comparatively to nitrate fed plants, plants treated with ammonium (AS) were characterized by a 50% decrease in shoot and root dry weights after 2 weeks (from 1.37 ± 0.12 to 0.68 ± 0.03 g DW.plant⁻¹). This effect was more pronounced when plants were treated with urea (U) and symptoms of N starvation appeared. In fact, the growth was reduced by 75% when urea was supplied as a sole N source (from 1.37 ± 0.12 to 0.35 ± 0.01 g DW.plant⁻¹ compared to NO₃⁻ fed plants). Results also show that the addition of nitrate to urea (NU) or ammonium (NA) fed plants reduces significantly this negative effect compared with provision of either N source alone, since plants dry weights were similar to those of nitrate fed plants (fig. IV-4A).

This difference of growth might reflect differences in N uptake related to N nutrition. The cumulative N uptake was followed by ¹⁵N labelling (fig. IV-4B). To distinguish nitrogen provided in the mixed nutrient forms (NA and NU), only one element was labelled each time [K¹⁵NO₃-(NH₄)₂SO₄ or KNO₃-(¹⁵NH₄)₂SO₄, and K¹⁵NO₃-CO(NH₂)₂ or KNO₃-CO(¹⁵NH₂)₂, fig. IV-4C]. Results show the lower capacity of oilseed rape to take up urea (U) when the medium was supplied with this element as the sole N source. Indeed, the cumulative N uptake was about 12 fold lower than for nitrate treatment (from 50.31 ± 2.82 to 4.27 ± 0.24 mg ¹⁵N.plant⁻¹, fig. IV-4B). Also, regarding AS, its uptake by plant was about 1.5 fold lower than nitrate. Comparatively to nitrate fed plants, those treated with Nitrate-Urea (NU) or Nitrate-Ammonium (NA), were also characterize by a 22% decrease in ¹⁵N content. However, nitrate seems to be preferentially taken up by plants (fig. IV-4C). In fact, only 8.6% of total ¹⁵N were provided by urea (3.36 ± 0.19 mg ¹⁵N.plant⁻¹) and 91.4% by nitrate (35.94 ± 2.02 mg ¹⁵N.plant⁻¹) in NU fed plants, while in NA fed plant (fig. IV-4C), 45.5 and 54.4% of total ¹⁵N were provided by ammonium (17.81 ± 1.82 mg ¹⁵N.plant⁻¹) and nitrate (21.32 ± 1.42 mg ¹⁵N.plant⁻¹). Furthermore, urea and ammonium uptake were reduced by 45% (from 32.43 ± 3.13 to

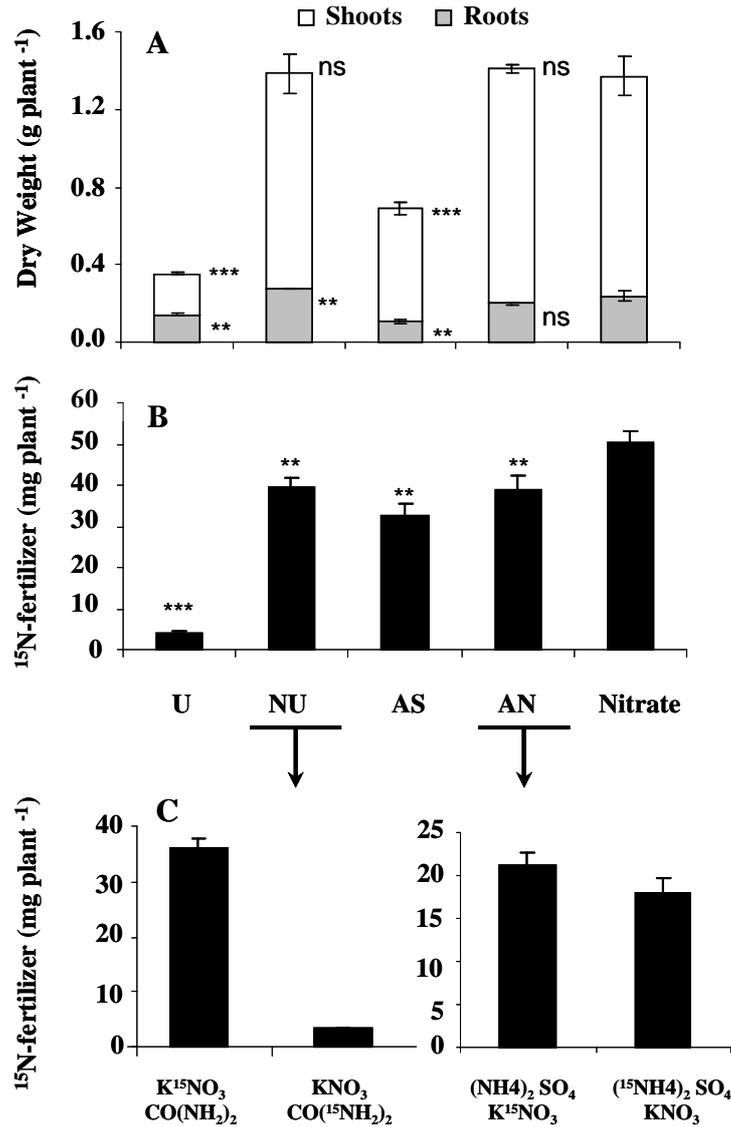


Fig. IV-4 Distribution of plant biomass and ¹⁵N-uptake. Plants were cultured hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution. Rapeseed plants were then transferred for 15 days to different treatments: CO(¹⁵NH₂)₂ (U), (¹⁵NH₄)₂SO₄⁻ (AS), K¹⁵NO₃⁻ (Nitrate), K¹⁵NO₃⁻-CO(NH₂)₂ (NU), KNO₃⁻-CO(¹⁵NH₂)₂ (NU), K¹⁵NO₃⁻-(NH₄)₂SO₄⁻ (NA) and KNO₃⁻-(¹⁵NH₄)₂SO₄⁻ (NA). A: Shoot and root dry weights of 15 day treated plants. B: plants nitrogen content. Data represent mean ± standard error (n=3) with a bulk of 32 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 or ns=non significant.

17.81±1.82 mg ¹⁵N.plant⁻¹) and 21% (from 4.27±0.24 to 3.36±0.19 mg ¹⁵N.plant⁻¹), respectively, by the presence of nitrate, whose uptake was itself inhibited by 32% in the presence of urea or ammonium (fig. IV-4B and C).

B. Uptake rate and analysis of *BnNRT1.1*, *BnNRT2.1*, *BnAMT1.1* and *BnDUR3* transcript levels

In order to better characterize urea, ammonium and nitrate transport in plant, uptake rate was analysed (fig. IV-5A) and the relative expression of the genes encoding the urea (*BnDUR3*), ammonium (*BnAMT1.1*) and nitrate (*BnNRT1.1* and *BnNRT2.1*) transporters was quantified by qPCR analysis at the root level, after 24 and 72h of treatment (fig. IV-5B-E). Net uptake rate by roots supplied with urea remained very low during all the duration of experiment, reaching 0.09 µg ¹⁵N.h⁻¹.mg⁻¹ root DW after 24h of treatment, and then decreasing to 0.06 µg ¹⁵N.h⁻¹.mg⁻¹ root DW after 72h (fig. IV-5A). Net uptake rates by roots uniformly supplied with NU, NA or Nitrate followed the same pattern with time. However, during an induction period (24h) uptake rate increased and reached 2.98, 3.31 and 3.29 µg ¹⁵N.h⁻¹.mg⁻¹ root DW, respectively, and was then slightly down regulated during the following 48h at 2.31, 2.50 and 2.80 µg ¹⁵N.h⁻¹.mg⁻¹ root DW at 72h, respectively. No significant differences were found between the NA treatment and Nitrate fed plants (fig. IV-5A). A general increase in uptake rate as a function of time, which was slower than NU, NA and Nitrate, was observed in AS fed plants suggesting a lack of down regulation of ammonium uptake. The relative expression of the *BnNRT1.1* (fig. IV-5B) and *BnNRT2.1* genes (fig. IV-5C) was closely related to uptake rates. Indeed, comparatively to plants grown for 1 week without N (T=0), the results showed a significantly higher expression of *BnNRT1.1* (10 to 16 fold) in the presence of NU, AS, NA and Nitrate after 24h of treatment, while no change in the relative expression was observed for urea (U) treated plants (fig. IV-5B). After 72h of treatment, *BnNRT1.1* expression followed a similar pattern whatever the treatment. The expression of *BnNRT2.1* gene was induced only when nitrate was provided i.e. in roots of NU (4.5 fold) and Nitrate (3 fold) treated plants (fig. IV-5C). The same trend was found at 72h, but with lower levels of expression suggesting a down regulation mostly for NA treated plants. In the presence of urea (U), Ammonium Sulfate (AS) *BnNRT2.1* gene expression was maintained in a low steady state of un-induction and slight repression for NA grown plants.

Regarding ammonium transporter, the results showed a strong down regulation (by 5 fold) of *BnAMT1.1* after 24 and 72h, whatever the treatments (fig. IV-5D). However, the level

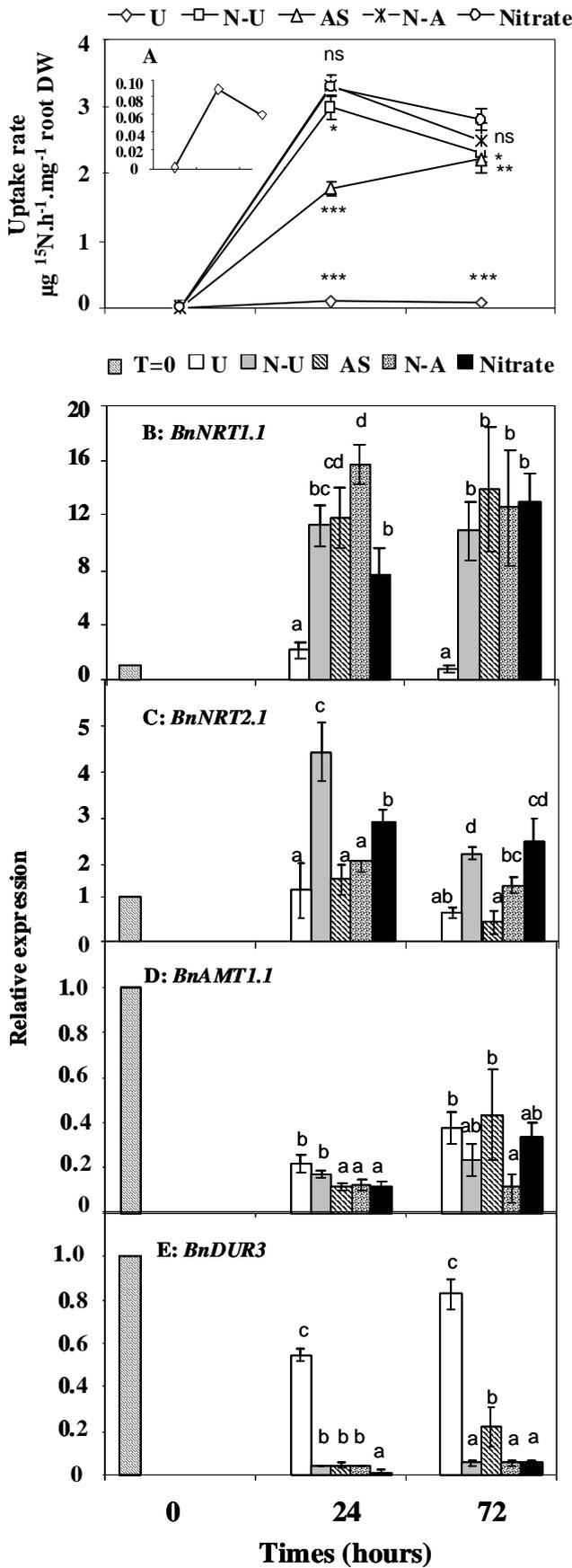


Fig. IV-5 Net uptake rate (A) and relative expression of *BnNRT1.1* (B), *BnNRT2.1* (C), *BnAMT1.1* (D) and *BnDUR3* (E). Plants were grown hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution (T=0). Rapeseed plants were then transferred for 24 and 72 hours to different treatments: $\text{CO}(\text{}^{15}\text{NH}_2)_2$ (U), $(\text{}^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^-$ (AS), $\text{K}^{15}\text{NO}_3^-$ (Nitrate), $\text{K}^{15}\text{NO}_3^- \text{-CO}(\text{}^{15}\text{NH}_2)_2$ (NU), $\text{KNO}_3^- \text{-CO}(\text{}^{15}\text{NH}_2)_2$ (NU), $\text{K}^{15}\text{NO}_3^- \text{-(NH}_4)_2\text{SO}_4^-$ (NA) and $\text{KNO}_3^- \text{-(}^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^-$ (NA). Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 32 seedlings. Asterisks represent significant differences from the control at *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 or ns=not significant. Different superscript letters indicate significant (P<0.05) differences between treatments within each period of treatment.

of repression is lower after 72 h of treatment, except for NA treatment. *BnDUR3* gene expression was maintained at a significantly higher level in root of U fed plants, after 24 and 72h of treatment, while it was significantly repressed in the presence of NU, AS, NA and Nitrate in the growth medium (fig. IV-5E).

C. Ammonium assimilation: Analysis of *BnGDH2* transcript level

The expression in shoots and roots of *BnGDH2* was followed after 15 days of treatment (fig. IV-6A and B) as no significant level of expression were found between treatments at 24 and 72h (data unshown). Comparative to plants grown for 1 week without N (T=0) or those grown with urea (U), the results showed a slight induction of *BnGDH2* in shoots (by 2.8 fold) and roots (by 4 fold) of NU fed plants, while it was strongly induced by AS treatment (by 6 and 30 fold, respectively, fig. IV-6A and B). A supply in the growth medium of Nitrate Ammonium (NA) or Nitrate has no significant effect on the expression of *BnGDH2* in roots (fig. IV-6B); despite a slight up-regulation in shoots (fig. IV-6A). However, no significant differences were observed between the two treatments.

D. A signalling role of nitrate: Effect of nitrate pulse on urea and ammonium uptake

To investigate the possible role of nitrate as a signal affecting urea or ammonium uptake, rapeseed seedlings were supplied (at T=0), with Urea (U) or Ammonium Sulfate (AS) for 24 and 72h. A pulse of 150nM nitrate (KNO_3) was added to the nutrient solution every six hours for all the duration of the experiment. The cumulative ^{15}N -urea (U) and ammonium (AS) uptake was not affected by the nitrate pulse, nor at 24h, neither after 72h of treatment (fig. IV-7A and B). However, in comparison with the plants at t_0 (T=0), pulsing U and AS-plants with nitrate, strongly induces roots *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* genes (fig. IV-7C and D). Indeed, exposures of U and AS-plants to the nitrate pulse, induced, respectively, by 10 and 15 folds *BnNRT1.1*, and by 3 folds *BnNRT2.1*, after 24h of treatment. Only pulsing AS-plants increased by 23 the relative expression of *BnNRT1.1* after 72h of treatment (fig. IV-7C), while pulsing U-plants increased by 1.6 expression of *BnNRT2.1* at the same time (fig. IV-7D). The results also showed that the *BnDUR3* gene appears to be sensitive to the nitrate signal (fig. IV-7E). Compared to urea fed plants (U), exposing U-plants to a nitrate pulse (U+150nM nitrate) results in a down-regulation of *BnDUR3*, by 3.5 and 1.4 after 24 and 72h of treatment, respectively. Whereas, AS and pulsing AS-plants maintained *BnDUR3* expression in a state of repression throughout the duration of the experiment (fig. IV-7E). *BnAMT1.1* was mostly up-

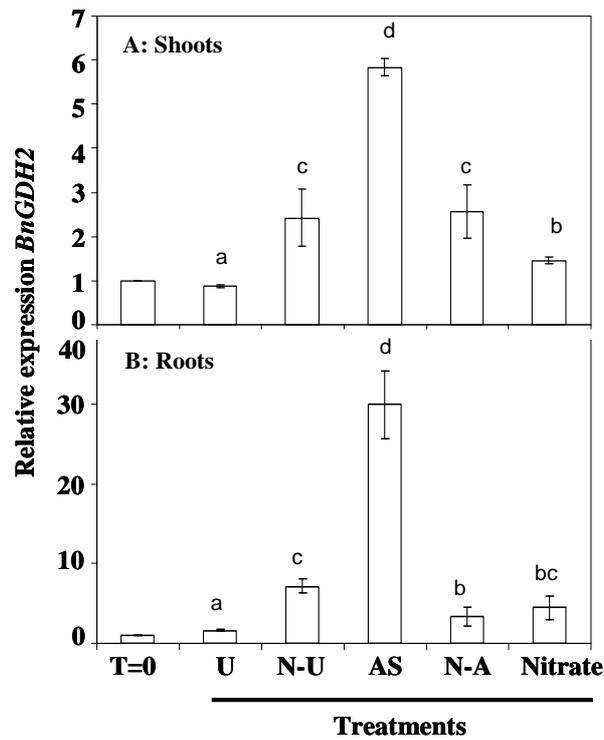


Fig. IV-6 Relative expression of *BnGDH2* in shoots (A) and roots (B). Plants were cultured hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution (T=0). Rapeseed plants were then transferred for 15 days with different treatments: urea (U), ammonium sulfate (AS), nitrate (Nitrate), nitrate urea (NU), and nitrate ammonium (NA). Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 32 seedlings. Different superscript letters indicate significant ($P < 0.05$) differences between treatments.

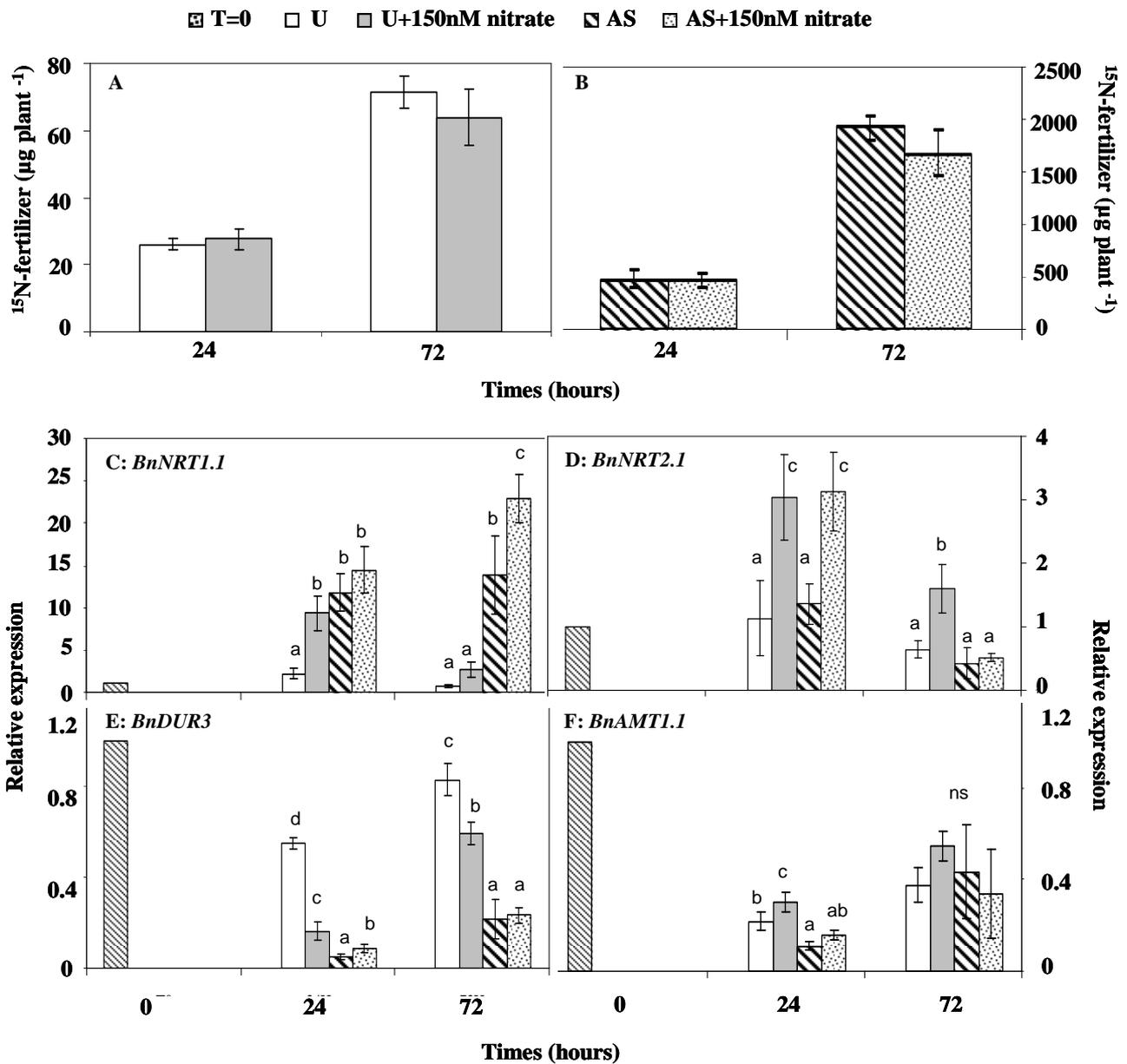


Fig. IV-7 N-urea (A) and N-ammonium (B) uptake, and relative expression of *BnNRT1.1* (C), *BnNRT2.1* (D), *BnDUR3* (E) and *BnAMT1.1* (F) in the presence of a pulse of 150nM nitrate (KNO_3). Plants were cultured hydroponically for 1 week with continuous supply of a nitrogen-deficient solution (T=0). Rapeseed plants were then transferred for 24 and 72 hours to different treatments: Urea (U) or Ammonium Sulfate (AS). A pulse of nitrate was added to the nutrient solution every six hours for all the duration of the experiment. Data represent mean \pm standard error (n=3) with a bulk of 32 seedlings. Different superscript letters indicate significant ($P < 0.05$) differences between treatments within each period of treatment.

regulated in the starved plants (t_0), and then repressed after exposing to the different treatments. However, a nitrate pulse had no effect on *BnAMT1.1* gene expression whether plants were grown on U or AS (fig. IV-7F).

IV. Discussion

The use of N fertilizers is essential to keep and/or increase the productivity of cultivated plants. However, excessive N-fertilization may potentially lead to N-losses, and subsequently, lead to economic and environmental impact. Therefore, to sustain crop production, the fertilizer industry faces a continuing challenge to improve its products, particularly of nitrogenous fertilizers, and to minimize any possible adverse environmental impacts. This study aims to highlight the effect of different forms of mineral-fertilizer (urea vs. ammonium vs. nitrate) and of the use of urease inhibitor, on the physiological efficiency of N, considering specific preferences of certain forms of N, and on the avoidance of N-losses caused by specific N-forms. Experiments were conducted in field (using lysimeter device), to provide some agronomic aspect and performance of N-fertilization, and laboratory conditions, to identify physiological and molecular mechanisms involved in the nitrogen uptake processes.

IV.1. Yield, N uptake and its distribution in plant organs

Plants grown without fertilizer supplementation were characterized by a low yield (-35%) compared with those receiving fertilizers (fig. IV-2A). Furthermore, the final yield of 2.3 tons.ha⁻¹ was recorded whatever the N-form of fertilizers. In Europe, the average seed yield of winter oilseed rape is expected to be between 3 and 4 tons.ha⁻¹ (Rathke *et al.*, 2006). Hence, the low yields obtained in our experiments are not unusual and may be related to the type of cultivar used (spring oilseed rape), which compared to winter oilseed rape, shows differences in growth and development. Our results further showed that, Fertilizer Use Efficiency (FUE), varies with the nitrogen form (fig. IV-2B), and this is closely correlated with the N uptake, its partitioning within the plant (fig. IV-3A and B) and risk of N volatilization. Urea combined with the urease inhibitor (U+NBPT) shows the best N use efficiency by the plant (46%, fig. IV-2B), and it is of interest to note that under the effect of urease inhibitor, a higher proportion of ¹⁵N remained in the soil when plants have been harvested (45.4% compared to 36.6% in the absence of inhibitor, fig. IV-3A) which correspond to a more effective immobilization of applied N-fertilizer. Hence, this translates into a better nitrogen uptake (44.9%; in contrast to 36.4% in the absence of inhibitor, fig. IV-

3A) and better seed filling (+ 22%, compared with urea treatment, fig. IV-3B). These findings support earlier reports of Basten *et al.*, (2005), which showed an increase of N use efficiency (+7%) of urea + NBPT compared to urea without inhibitor. However, mobilization of N from stem and senescing leaves was lower compared to urea and AS treatment (fig. IV-3B). Indeed, as a result of a lower N availability resulting from higher volatilization (fig. IV-3A), AS treatment was characterized by a lower FUE (29%, fig. IV-2B) and hence better mobilization of N from senescing leaves, stems and taproots to the seeds (fig. IV-3B), to achieve a similar seed yield. Thus, ammonium sulfate (AS) is not an optimal fertilizer in terms of plant N nutrition when compared to nitrate ammonium (NA), urea alone (U), or combined with urease inhibitor (U+NBPT). Moreover, it is widely accepted that combination of nitrate and ammonium (NA treatment) represents the optimum in plant N nutrition and growth (Bloom *et al.*, 1993; Trenkel, 2010). Nitrate promotes organ elongation more than ammonium because of higher accumulation of osmotic substances, whereas ammonium nutrition increases the number of yield components of several crop plants, especially of cereals (Camberato and Bock, 1990; Gerendás and Sattelmacher, 1990). On the other hand, considering the potential benefits of urea as a fertilizer (in cost and high N content: 46% N vs. 34% for NA) and according to our results, the use of urease inhibitor added to urea, may be an interesting option for oilseed rape production.

IV.2. N losses and effect of NBPT

Besides the higher FUE and better N recovery of plants, the use of urea as N-source combined with urease inhibitor prevent N loss by emission of ammonia (NH₃) or dinitrogen oxide (fig IV-3A). It is generally accepted that NH₃ volatilization problem results largely from the rapid enzymatic hydrolysis of urea to ammonium carbonate by soil urease (Bremner, 1995; Harrison and Webb, 2001). While this losses may reach 50% of the applied-N (Terman, 1979), our results shows that NBPT reduce significantly (by 68%) the loss of N by volatilization (fig IV-3A), and are in agreement with those observed by Grant *et al.*, (1996) and Sanz-Cobena *et al.*, (2008), who reported a reduction of 36 and 42% in the emitted NH₃, respectively. This reduction was associated with the slowdown in urease activity, promoting a decrease of NH₄⁺ availability (Sanz-Cobena *et al.*, 2008). Expressed in percentage of the N applied, other authors observed under laboratory conditions that reduction in losses can range from 22, 39 to 51% after fertilising with a mixture of urea and NBPT. (Carmona *et al.*, 1990; Christianson *et al.*, 1990; Antisari *et al.*, 1996). Surprisingly, N-losses with AN treatment are also high (23%), whereas, almost half of N applied are lost to the atmosphere (44%) when AS

was supplied as fertilizer (fig. IV-3A). After surface application, NH_4^+ reaches equilibrium with the dissolved NH_3 near soil surface, increasing the likelihood of gaseous NH_3 losses to the atmosphere, particularly when soil pH is high (Table IV-1, Zhengping *et al.*, 1991; Zaman *et al.*, 2008). N-losses as dinitrogen oxide (N_2O) should not be excluded. Zaman *et al.*, (2008) reported that, larger amount of (N_2O) may be emitted from NH_4^+ and NO_3^- , as a result of nitrification and denitrification, along with the high moisture soil content (Fig. IV-1).

Overall, a substantial reduction in N-losses was achieved by NBPT-treated urea. This result suggests that the uses of urease inhibitor could be considered as an interesting fertilizer strategy to improve the performance of urea, along with lower risks for the environment.

IV.3. Net nitrate, ammonium and urea uptake under controlled conditions and effect of urea and ammonium on growth

Our results showed that strict ammonium (AS treatment) and urea (U treatment) causes a decrease (-50 and -75%, respectively) of the oilseed rape growth when compared with strict nitrate nutrition, after 15 days from the onset of the treatments (fig. IV-4A). These results were in agreement with those reported by other authors in various plant species (Bradley *et al.*, 1989; Gerendás and Sattelmacher, 1997; Tan *et al.*, 2000; Houdusse *et al.*, 2005; Merigout *et al.*, 2008; Garnica *et al.*, 2009). Furthermore, this negative effect was correlated with a reduced capacity for ammonium and urea uptake by plants (-35 and -90%, respectively; fig. IV-4B). Hence, it appears that the deleterious effects on growth associated with urea may differ, at a physiological level, from those associated with ammonium. The later may have a toxic effects, while urea treated plants seems to suffer from nitrogen deficiency. Indeed, it is widely accepted that, in most higher plants, excessive ammonium is known for its toxicity (Britto and Kronzucker, 2002). This fact has been related to the accumulation of NH_4^+ in plant tissues, leading to its rapid assimilation into the amino acid glutamate by the glutamine synthetase/glutamate synthase pathway (Lea and Miflin, 1974). At the sight of NH_4^+ uptake rate (AS treatment, fig. IV-5A), after 24 and 72h of treatment, the results shows lower ammonium uptake rates, when compared to nitrate fed plants. This is correlated with the down-regulation of *BnAMT1.1* in the roots, when plants were shifted from nitrogen-deficient to nitrogen-sufficient nitrogen conditions (fig, IV-5D). *AtAMT1.1* encodes for the major ammonium high-affinity transport system, and it generally repressed under nitrogen sufficiency (Yuan *et al.*, 2007). Hence, a rapid decrease of its relative expression (fig. IV-5D), may leads to a decrease of ammonium uptake capacities to avoid cellular toxicity (Britto and Kronzucker 2002). GDH may play a major role in keeping the NH_4^+ levels

in the cytoplasm below toxicity (Skopelitis et al. 2006; Tercé-Laforgue et al. 2004), and could operate via amination. It has been established *in vivo* that GDH1 solely deaminates glutamate (Purnel and Botella 2007), while GDH2 exhibits strong deaminating activity and only very low aminating activity (Skopelitis et al. 2007). Recently, a transcriptomic analysis of *Arabidopsis* roots supplied with nitrate or ammonium showed that GDH2 was specifically induced by ammonium (Patterson *et al.*, 2010). Correspondingly, we observed, in the long term (15 days), a strong up-regulation of root and shoot *BnGDH2* of AS treated plants (by 30 and 6 fold, respectively, fig. IV-6A and B). Taken together, we hypothesize that the induction of this gene is a response to the externally provided NH_4^+ , preventing its accumulation. The higher expression of *BnGDH2* in root (by 5 folds) than in shoot, suggests that the roots are the main NH_4^+ assimilatory organ in oilseed rape.

Comparatively to nitrate treatment, plants grown on AS are characterized by root growth inhibition (fig. IV-4A). Li *et al.*, (2010) showed that NH_4^+ supplied to roots in *Arabidopsis* affect cell elongation, and that growth inhibition was associated with NH_4^+ efflux in the elongation root zone. Other studies have also proposed that the auxin signal is involved in NH_4^+ toxicity leading to growth inhibition (Cao *et al.*, 1993). Thus, induction of *BnNRT1.1* by AS (fig. IV-5B), which was unexpected at first glance; make an interesting parallel with the recent demonstration of auxin influx facilitation by NRT1.1 (Krouk *et al.*, 2010).

As for ammonium fed plants, it has been reported that nitrogen nutrition based on urea leads to reduced growth because of its accumulation in a toxic amounts, causing subsequently leaf-tip necrosis (Krogmeier et al., 1989; Gerendás and Sattelmacher, 1998). Also, compared to plants receiving nitrate or nitrate-ammonium, plants receiving urea as the sole N source are characterized by symptoms of N-starvation (Merigout et al., 2008; Cao et al., 2010). The low N-urea content in the plant (fig. IV-4B) and a drastic reduction of its uptake rate (fig. IV- 5A), confirms the hypothesis of a nitrogen deficiency in oilseed rape. The molecular reason for the inefficient use of urea by plants remains misunderstood but the extremely low urea uptake rate that we measured may be the reason. However, analysis of *BnDUR3* expression in root gave some interesting results in regard to urea uptake (fig. IV-5E). In a similar way to that of *AtAMT1.1*, *BnDUR3* was expressed at a high level in N-deficient roots (fig. IV-5E, Kojima *et al.*, 2007). This gene tends to retain the same pattern of expression as under nitrogen deficient conditions when plants were resupplied with urea during 72 h (fig. IV-5E). Hence, having observed a very low urea uptake rate (fig. IV-5A), we suggest that such gene expression patterns indicated that *BnDUR3* is a component of the stress response to nitrogen-deficiency in rapeseed.

IV.4. Nitrate correct the negative effect of urea and ammonium fed plants

Many studies have reported that the negative effects associated with NH_4^+ and urea nutrition are corrected by the presence of nitrate in the growth medium (Britto and Kronzucker, 2002; Garnica *et al.*, 2009). Comparatively to ammonium and urea fed plants, the presence of nitrate along with NH_4^+ (NA) and urea (NU) increases by 1.2 and 9 fold the N-uptake, respectively (fig. IV-4B), and therefore restores growth of oilseed rape (fig. IV-4A). However, enhancement of NH_4^+ and urea uptake by NO_3^- was not observed (fig. IV-4C). This finding is contrary with the results reported by Garnica *et al.*, (2009), who showed significant enhancement of NH_4^+ and urea uptake in wheat by NO_3^- supply. Indeed, in such mixed strategies of nutrition (NA and NU), oilseed rape preferentially take-up NO_3^- , and this is shown especially in the case of NU treatment, where 91% of N derived from nitrate, in contrast to 54% in the case of NA treatment (fig. IV-4C). This may be partly related to the nitrophilic character of *Brassicaceae*. Lainé *et al.*, (1993) reported that the peak rate of nitrate uptake is higher in many *Brassicaceae* than in many other crop plants (e.g. members of the *Poaceae* and *Legumineae*). Also, these results are closely correlated with expression pattern of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* genes, that are significantly up-regulated in NA and NU fed plants (fig. IV-5B and C), and especially *BnNRT1.1* (fig. IV-5B). On the other hand, we also observed that the presence of NH_4^+ or urea greatly delayed NO_3^- uptake (fig. IV-4B and C). This result was expected, since it has been described by many authors in various plant species (Criddle *et al.*, 1988; Kronzucker *et al.*, 1999; Garnica *et al.*, 2009), and this could be attributed to the down-regulation of *BnNRT2.1* by urea and ammonium (fig. IV-5C), and *BnNRT1.1* by urea only (fig. IV-5B). In summary, the results indicate that the beneficial effect of nitrate in the development of plants fed with ammonium or urea seems to be related to the nutritional character of nitrate. The increase in root growth observed in the mixed nutrition should be also a specific effect of nitrate, which involves the *NRT1.1* gene (fig. IV-5B; Krouk *et al.*, 2010). However, effects on the flow of assimilation of ammonium and urea should not be excluded.

IV.5. Nitrate as a signal molecule

Nitrate is not only the main nitrogen source for plant nutrition but also play a major role as a signal molecule modulating plant metabolism and growth (Crawford, 1995). Our results showed a strong but expected induction of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* gene when ammonium (AS) and urea (U)-plants received NO_3^- pulses (fig. IV-7C and D), confirming the efficiency of the low concentration of nitrate provided as a pulse (150 nM). *NRT1.1* is

considered as a dual affinity nitrate transporter, belonging to both HATS and LATS (Liu *et al.*, 1999) and dual affinity nitrate sensor, depending on its phosphorylation (Liu and Tsay, 2003). Therefore, Ho *et al.*, (2009) demonstrate that the sensing function of NRT1.1 may be separate from its NO_3^- transport activity. Indeed, it has been established that NRT1.1 is involved not only in transport nitrate, but also facilitates uptake of auxin, and favors its basipetal transport in lateral roots, at low nitrate availability (Krouk *et al.*, 2010). Surprisingly, *BnDUR3* expression also seems to be sensible to extremely low concentration of NO_3^- (fig. IV-7E). This suggest another additional role for nitrate as a signal. Our results show no effect of nitrate pulsing on ammonium or urea uptake (fig. IV-7A and B).

IV.6. From controlled conditions to the field : any significant uptake of urea ?

From hydroponic experiment, it can be postulated that urea uptake do not contribute significantly to N nutrition of a nitrophilic species such as *Brassica napus* L., because of an extremely low uptake rate potential, which triggers for urea fed plant, symptoms of N deficiency (reduced growth, up regulation of AMT1 and DUR3 genes). However, urea fertilization in the field combined with a urease inhibitor provide the best FUE with the lowest N volatilization, which mean that microbial hydrolysis of urea, even reduced, is sufficient to deliver nitrate and ammonium for plant N uptake, as it can be postulated that urea itself was not significantly taken up.

V. Conclusion

Contribution of different mineral N fertilizers to yield or N-use efficiency of oilseed rape is of special importance. Overall, ammonium sulfate fertilization showed the worst effects with a low N fertilizer use efficiency, increased volatilization leading to lower N availability while nitrate ammonium or urea fertilizations provided improvements of these parameters. Addition of NBPT with urea, a widely used urease inhibitor, restricted N volatilization and as a consequence, promoted a higher soil immobilization. However, in hydroponic conditions, urea grown plants showed a strong reduction of their growth, higher than with ammonium sulfate and compared to nitrate supply alone. This could be due to N deficiency effects resulting from very low urea uptake rates rather than to urea or ammonium derived toxicity *per s.e.* as illustrated by the fact that BNGDH2 (potentially involved in ammonium detoxification) which was strongly up-regulated with ammonium sulfate nutrition, was not affected in urea grown plants. Moreover, the expressions of BnAMT1 and BnDUR3, encoding ammonium and urea transporters, were up-regulated by N starvation as well as by

urea nutrition, the latter being sensitive to nitrate which act as a signal similarly as it does on BnNRT1.1 and BnNRT2.1 expressions. Overall results suggest that urea is not taken up in the field at a significant level even in the presence of an urease inhibitor, which however do not affect negatively fertilizer use efficiency resulting from delayed microbial hydrolysis of urea.

Acknowledgements:

Authors acknowledge Marie-Paule Bataillé and Raphaël Ségura for IRMS analyses, Dominique Ballois for helping with plant culture and harvests and Laurence Cantrill for kindly improving the English of the manuscript. The authors thank the « Pôle de compétitivité Mer-Bretagne » and the FUI (“Fond Unique Interministériel” from the French government) which supported this work conducted through the AZOSTIMER project.

Chapitre V

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE V. CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE

I. Développement de fertilisants azotés présentant une efficacité nutritionnelle améliorée et respectueux de l'environnement

Dans le contexte d'une agriculture qui se veut respectueuse de l'environnement, il devient impératif de développer de nouvelles stratégies, qui prennent en compte à la fois les préoccupations environnementales et économiques. Cela requiert des améliorations des pratiques culturales, et en particulier des modes d'apport des engrais azotés et de leur efficacité. L'utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de la nitrification constitue l'une des voies privilégiées permettant de réduire les pertes d'azote et les risques pour l'environnement qui en découlent. Cette stratégie devrait par ailleurs s'accompagner d'études sur les effets de la nutrition ammoniacale et uréique chez les plantes.

Ce travail de thèse visait donc à :

- Effectuer des **criblages de nouvelles molécules**, en testant leur efficacité sur l'inhibition de la nitrification et de l'activité uréasique dans le sol, et en évaluant leur **mobilité, leur dégradation** et leurs effets sur la nutrition azotée chez le colza. Ce premier objectif répond à la partie appliquée de ce travail de thèse, ayant potentiellement pour finalité, la mise sur le marché de nouveaux inhibiteurs.
- Etudier **l'absorption et l'assimilation de l'urée** chez le colza, en mettant en évidence **l'importance du nickel**, ainsi que **l'impact d'un inhibiteur d'uréases** sur la physiologie et le métabolisme azoté des plantes, ce deuxième objectif constituant un lien entre le premier, et le troisième à vocation plus fondamentale.
- Etablir des **bilans azotés** grâce au dispositif des cases lysimétriques, afin de comparer l'efficacité de différents types d'engrais sur **le rendement** et d'appréhender leur **impact sur l'environnement (volatilisation et lessivage si les conditions météorologiques le permettaient)**. Il s'agissait aussi de quantifier le prélèvement de l'urée en tant que fertilisant azoté en déterminant les conséquences d'un apport conjoint d'un inhibiteur d'uréases. De façon complémentaire, tout en étant conscient que la transition d'échelle était

importante, nous avons étudié en conditions de culture hydroponique les réponses du colza à une nutrition azotée, nitrique, ammoniacale, uréique ou mixte.

II. Efficacité et limites des nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification (*chapitre II*)

II.1. Inhibiteurs de la nitrification

Le criblage et les tests d'inhibiteurs de la nitrification nous ont permis d'évaluer l'impact de nouvelles molécules sur l'inhibition de l'activité nitrifiante dans le sol. Les deux molécules natives, le 2-mercaptobenzimidazole (MBI) et son analogue structural, le 2-mercaptobenzothiazole (MBT), ne répondent pas à tous les critères qui permettraient leur mise sur le marché (faible solubilité dans l'eau, toxicité réduite sur les organismes vivants et mobilité significative dans les sols ; Chien et *al.*, 2009). De ce fait, la voie d'amélioration retenue a consisté à glycosyler ces inhibiteurs afin d'accroître leur solubilité, leur mobilité dans le sol et de réduire potentiellement leur écotoxicité.

Quel que soit le glucide greffé (disaccharide ou monosaccharide), les inhibiteurs de la nitrification nouvellement synthétisés présentent une action efficace, similaire aux molécules natives, sur l'inhibition de la nitrification avec une diminution de 60% de l'activité nitrifiante pendant au moins 20 à 30 jours d'incubation, selon le type de sol (fig. II-13). Nous avons ainsi pu démontrer que l'efficacité de ces inhibiteurs est fonction **du pH du sol**, ce qui présente un intérêt sur le plan agronomique, de par l'existence de sols à pH contrastés (en France notamment), en permettant de cibler certains de ceux-ci en fonction des sols concernés et de leur pH.

L'hydrosolubilité des inhibiteurs glycosylés est nettement augmentée par rapport aux molécules natives. Une dissolution importante dans l'eau faciliterait leur utilisation en milieu agricole. En outre, la glycosylation du MBI et du MBT diminue considérablement leur **écotoxicité**, en particulier, avec le gentiobiose, qui aboutit à une réduction respective, de 7 et 150 fois de la toxicité des molécules d'origines. Il faut cependant remarquer que l'évaluation, *in vitro*, de l'écotoxicité sur une seule souche bactérienne (*Vibrio fischeri*), reste faiblement représentative de l'ensemble des populations bactériennes telluriques.

Notre choix s'est donc porté sur le Gen-S-BZI et le Gen-S-BZT afin d'évaluer leur efficacité sur **le lessivage du nitrate et sur la nutrition azotée** chez le colza en sols alcalin ou acide. Dans nos conditions expérimentales (i.e. cultures en pots), les pertes d'N par lessivage sont en moyenne réduites de 32% en présence de ces inhibiteurs. L'absorption de l'azote par les plantes augmente quant à elle de 16% en présence du Gen-S-BZT en sol acide aboutissant à une augmentation de 12% de la production de biomasse sèche (fig. II-16).

aboutissant à une augmentation de 12% de la production de biomasse sèche (fig. II-16). L'efficacité d'un inhibiteur de la nitrification sur l'augmentation du rendement des cultures a déjà fait l'objet d'études. Celle-ci dépend du type d'inhibiteur utilisé, des conditions pédoclimatiques rencontrées et de l'espèce cultivée (Prasad et Power, 1995; Zerulla *et al.*, 2001; Trenkel, 2010). Par exemple, les travaux de Weiske *et al.*, (2001) montrent qu'un apport de DMPP entraîne une diminution des pertes d'azote par lixiviation et une augmentation du rendement. En terme de mobilité dans le sol, Le DMPP présente une action plus efficace que le DCD du fait de sa plus faible mobilité (Azam *et al.*, 200; Zerulla *et al.*, 2001). En effet, nos résultats montrent que le DCD peut être entraîné par les eaux de drainage au-delà de 40 cm de profondeur dans le sol (fig. II-19). Cependant, la glycosylation n'affecte pas la mobilité des inhibiteurs sur colonnes de sol puisque les molécules natives sont retenues dans l'horizon supérieur (fig. II-20), principalement en raison d'un clivage très rapide de la liaison glucidique, très probablement d'origine biologique. Il en résulte que la principale limite d'utilisation de ces nouveaux inhibiteurs glycosylés serait due à une libération trop rapide de la partie active.

Globalement, malgré le fait que la glycosylation du MBT et du MBI ne prolonge pas leur action inhibitrice dans le temps, ils présentent néanmoins la **même efficacité que le DCD** (produit commercial utilisé comme référence). Par ailleurs, l'augmentation de la solubilité des inhibiteurs suite à leur glycosylation aurait pour principal avantage de faciliter leur application. Leur impact sur la réduction des pertes d'azote par lessivage, et leurs effets bénéfiques sur la nutrition azotée chez le colza que nous avons observés en conditions simplifiées (culture en pot), mériteraient donc d'être vérifiés.

II.2. Les inhibiteurs d'uréases

L'intérêt porté à l'étude et au développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases est à ce jour largement justifiée, d'une part parce que l'urée est l'engrais azoté le plus utilisé dans le monde et d'autre part, en raison des risques de volatilisation du NH_3 liés à son utilisation comme fertilisant. Nos résultats ont mis en évidence la **contribution significative du NBPT** dans la limitation des pertes azotées par voie gazeuse (chapitre II et IV). En effet, ces dernières sont réduites de 60% lorsque l'urée est apportée en combinaison avec le NBPT (fig. II-6). Il est également intéressant de constater que les travaux menés au champ, grâce au dispositif des cases lysimétriques, montrent que cet inhibiteur réduit de 68% la volatilisation d'azote (fig. IV-3A). Ce **passage en conditions de plein champ est important sur le plan expérimental et agronomique**, car cela permet de confirmer des résultats obtenus en

conditions contrôlées (dispositif amélioré de Zhengping *et al.*, 1991; fig. II-5), mais également leur validation au vu d'une utilisation du produit en agriculture.

Cependant, l'objectif principal de notre démarche était d'accroître l'efficacité du NBPT en sol acide. En effet, en présence du NBPT, la dégradation de l'urée est retardée de 20 jours en sol alcalin, et de 6 jours seulement en sol acide (fig. II-7). Cette perte d'efficacité est principalement liée à la **transformation rapide du NBPT en son analogue, le NBPTO**, qui ne présente aucune action sur l'inhibition de l'activité uréasique en sol acide (fig. II-7). Bien que les tests *in vitro* s'avèrent concluants (thèse D. Pro), les tentatives de **stabilisation du NBPT** par de nouvelles formulations grâce à son encapsulation par **les cyclodextrines ou les wollastonites**, n'ont pas abouti en condition de sol nu (fig. II-9). Les tests réalisés *in vitro* montrent que les cyclodextrines et les wollastonites présentent un pouvoir tampon et protège le NBPT de l'acidité du milieu, alors que dans un sol, l'activité microbienne contribue probablement à l'hydrolyse et/ou à la dissociation du complexe cyclodextrine-NBPT ou wollastonite-NBPT. Cependant, l'effet du pH sur l'instabilité du NBPT est plus important que celui lié à l'activité microbienne (Domínguez *et al.*, 2008).

Il est nécessaire de souligner que ces nouvelles formulations présentent la même efficacité que le NBPT sur l'inhibition de l'activité uréasique dans le sol. De plus, elles présentent une commodité de synthèse et une parfaite hydrosolubilité (thèse D. Pro), ce qui pourrait faciliter leur utilisation. Les cyclodextrines ou les wollastonites pourraient être utilisées pour remplacer certains additifs présents dans l'Agrotain (formulation commerciale du NBPT non divulguée). Ils constitueraient ainsi des produits nouveaux et concurrentiels pour le développement de nouveaux fertilisants, à condition de vérifier qu'ils sont conformes aux **critères exigés pour la mise sur le marché**.

III. Alimentation uréique chez le colza : aspects physiologiques, moléculaires et agronomiques

III.1. Une déficience en nickel ou la présence d'un inhibiteur d'uréases pénalisent le fonctionnement des plantes cultivées en hydroponie (chapitre III)

Afin d'évaluer **l'efficacité d'utilisation de l'urée par les plantes**, l'étude de son absorption et son assimilation chez le colza a d'abord été conduite en conditions d'hydroponie. Par rapport aux travaux de Gerendás et Sattelmacher (1997) portant sur le nickel, il nous paraissait pertinent de compléter cette approche grâce à certains outils moléculaires, ce qui par ailleurs rejoignait l'objectif de recherche précédent (criblage de

nouveaux inhibiteurs d'uréases). A notre connaissance, seules deux études effectuées chez le blé (*Triticum aestivum* L.; Artola *et al.*, 2011), l'épinard et le pois (Cruchaga *et al.*, 2011), rapportent les effets du NBPT sur le métabolisme azoté et la physiologie de la plante. Notre choix pour le PPD était purement expérimental. En plus de son importance agronomique, cet inhibiteur est le plus souvent utilisé dans des expérimentations en hydroponie afin d'empêcher l'hydrolyse de l'urée dans la solution nutritive.

A. Aspects physiologiques

Chez les végétaux, **l'uréase est une enzyme clé** qui intervient dans l'assimilation de l'urée que celle-ci soit générée de façon endogène ou prélevée dans la solution (Hogan *et al.*, 1983; Witte, 2011). Il est bien connu que cette enzyme est nickel-dépendante mais la majorité sinon toutes les solutions nutritives utilisées en laboratoire (Hoagland par exemple) sont dépourvues de cet oligo-élément. Le nickel est pourtant considéré comme un élément essentiel, surtout lorsque les plantes reçoivent l'urée comme seule source d'azote (Gerendás *et al.*, 1998). Par rapport aux plantes cultivées sur de l'urée et ayant reçu du nickel, celles cultivées en absence de cet élément présentent **des symptômes de carence en N**, avec des biomasses racinaires et foliaires plus faibles (-29%) et une réduction de 50% de la capacité d'absorption de l'urée chez le colza (fig. III-1 et III-2). A cela s'ajoute une **accumulation d'urée dans les tissus racinaires, et une réduction du pool des acides aminés libres** (fig. III-3 et III-6). Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres espèces comme le blé (*Triticum aestivum* L.), le soja (*Glycine max* L.), la courgette (*Cucurbita pepo* L.) et le tournesol (*Helianthus annuus* L. ; Gerendás et Sattelmacher, 1997). En l'absence de nickel, l'accumulation d'urée, observée principalement au niveau racinaire, serait donc principalement liée à un **défaut d'activation de l'enzyme uréase** (Gerendás et Sattelmacher, 1997).

Par ailleurs, la présence d'un inhibiteur d'uréases (PPD) affecte de façon drastique la physiologie de la plante malgré la présence de nickel dans le milieu de culture (traitement +Ni+IU). En effet, l'ajout de PPD entraîne une diminution de 60% de la production de biomasse et de 94% de l'absorption de l'urée. Ces résultats montrent que **l'impact d'un inhibiteur d'uréases est plus marqué qu'une déficience en nickel**. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de micro-traces de nickel dans la solution nutritive. Le PPD, potentiellement absorbé par la plante, **inhibe plus spécifiquement l'activité uréasique, et induit une plus forte accumulation d'urée dans les racines et les feuilles**. Les plantes présentent également des symptômes de carence azotée, qui sont par ailleurs confirmés par les

faibles teneurs (-70%) en acides aminés totaux des racines et des feuilles (fig. III-6). Celles-ci résultent principalement de la réduction des teneurs en glutamate, glutamine et aspartate, qui représentent 40% du total des acides aminés dans ces tissus. Cruchaga *et al.* (2011), ont montré que l'asparagine et la glutamine, qui représentent les acides aminés majoritaires chez le pois et l'épinard, sont fortement affectés par le NBPT. Cette différence de profils en acides aminés dépendrait donc des espèces, et les fortes teneurs en aspartate indiqueraient une forte activité aspartate aminotransférase chez le colza.

L'impact négatif du PPD sur la nutrition azotée n'explique pas à lui seul la diminution de croissance des plantes de colza. En effet, l'accumulation d'urée observée lors de l'inactivation de l'uréase, serait également **phytotoxique**. Des études ont montré qu'en présence de PPD ou de NBPT (Krogmeier *et al.*, 1989), ou lors d'une déficience en nickel (Krogmeier *et al.*, 1991), les plantes de sorgho (*Sorghum bicolor* L.), de blé (*Triticum aestivum* L.) ou de soja (*Glycine max* L.) présentent des nécroses au niveau des extrémités de leurs feuilles associées à de fortes accumulations en urée. De faibles teneurs en chlorophylle (fig. III-1b) et le début d'apparition de nécroses ont été également observés chez le colza, principalement en présence de PPD. L'hypothèse d'un stress phytotoxique n'est donc pas à exclure dans le cas de notre étude. Toutefois, nous avons recherché, sans succès, des traces de l'inhibiteur d'uréases *in planta* par analyse des tissus en spectrométrie de masse (données non présentées inférieures aux limites de détection). Ces analyses pourraient être affinées en utilisant des techniques plus résolutive.

B. Aspect moléculaire

Les résultats sur les analyses moléculaires apportent des éléments de compréhension supplémentaires étayant l'hypothèse d'un stress lié à une carence azotée, portent notamment sur :

- L'expression de *BnDUR3* :

Alors que la capacité d'absorption de l'urée est fortement réduite lors d'une déficience en Ni, ou en présence du PPD, l'expression du **gène *BnDUR3* est fortement induite dans les racines** après 7 jours de traitement (fig. III-2c; article 2). Cela indique qu'il n'existe pas de corrélation entre l'expression du gène et la capacité d'absorption de l'urée chez le colza. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que *AtDUR3* code le système de transport à haute affinité de l'urée (Liu *et al.*, 2003) et que son expression est corrélée avec le prélèvement de l'urée (Kojima *et al.*, 2007 ; Mérigout *et al.*, 2008). Par ailleurs, Kojima *et al.*, (2007) ont également montré que ce gène est fortement induit lors d'une carence azotée. Nous avons

donc émis l'hypothèse que, dans nos conditions, *BnDUR3* présente **un profil d'expression propre à un état de carence azotée, au moins pendant les 7 premiers jours de traitement**, cette dernière étant confortée par le fort niveau d'expression de *BnDUR3* observé chez les plantes (t_0) cultivées en absence d'azote.

Au niveau foliaire, nos résultats montrent que le gène *BnDUR3* présente le même profil d'expression qu'au niveau racinaire. **Toutefois, son rôle dans les tissus aériens serait d'assurer le transport de l'urée des racines vers les parties aériennes.** En absence de nickel, une translocation de l'urée des racines vers les feuilles a été observé chez le riz (*Oryza sativa* L.; Gerendás *et al.*, 1998). L'expression de *AtDUR3* au niveau des vaisseaux xylémiques et des cellules épidermiques conforte cette hypothèse (Kojima *et al.*, 2007).

- L'expression de *BnUréase* :

Les travaux menés par Polacco et Holland (1993) décrivent l'induction de l'enzyme uréase par l'urée chez plusieurs espèces. **Chez le colza, le gène *Uréase* ne semble pas induit par son substrat.** En effet, nos résultats montrent que *BnUréase* est réprimé lorsque les plantes sont placées au contact de l'urée et qu'il est maintenu dans un état de répression tout au long de l'expérience (fig. III-3e et III-3f), suggérant ainsi que **la synthèse de la protéine *Uréase* est plus faible.** D'autres travaux ont également montré que l'expression de l'Uréase n'est pas induite dans les feuilles de pomme de terre lorsque celles-ci sont pulvérisées avec de l'urée, le niveau d'expression de la protéine restant constant pendant une période de 6 heures de traitement (White *et al.*, 2002).

En condition de déficience en Ni ou en présence d'un inhibiteur d'uréases, le profil d'expression de *BnUréase* est similaire à celui des plantes carencées (T=0) après 7 jours de traitement. Mobley *et al.* (1995) ont montré une activation de l'enzyme dans des conditions de carence azotée chez les bactéries. Il peut donc être postulé que **le gène *Uréase* serait régulé par le statut azoté des plantes, et constituerait une composante de la réponse à une carence azotée.**

Globalement, les gènes *BnDUR3* et *BnUréase* sont réprimés après 15 et 21 jours de culture, quel que soit le traitement, ce qui suggère une autorégulation (« rétrocontrôle négatif ») par les produits de dégradation de l'urée (comme l'ammonium) ou les acides aminés. A notre connaissance, aucune étude portant sur le rétrocontrôle de ces gènes n'a été réalisée à ce jour.

III.2. L'enzyme GDH a un rôle important dans l'assimilation de l'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée

Bien que le rôle de la GDH chez les plantes soit controversé, des études ont montré son implication dans l'assimilation de l'ammonium, lorsque celui-ci est présent à des niveaux élevés dans la cellule (Dubois *et al.*, 2003). L'assimilation de l'urée génère également une production endogène d'ammonium. C'est pourquoi l'étude de l'activité et de l'expression de la GDH a été envisagée afin de mieux appréhender le processus d'**assimilation de l'urée chez les plantes, en particulier au niveau racinaire.**

Chez les plantes témoin (+Ni), une accumulation de l'ammonium (fig. III-3d), un déclin de l'activité GS, (fig. III-4b) ainsi qu'une augmentation de l'activité GDH aminante (fig. III-5b) corrélée avec une forte induction de l'expression du gène *BnGDH2* (fig. III-5f), suite à l'hydrolyse de l'urée, ont été observés au cours du temps. Parmi les différentes formes de GDH, seule la GDH2 présenterait une fonction aminante (Skopelitis *et al.*, 2007; Purnell et Botella, 2007) alors que son niveau d'expression 4 fois supérieur à celui de *BnGDH1* dans les racines (fig. III-5d) met clairement en évidence son implication dans l'assimilation de l'ammonium suite à l'hydrolyse de l'urée. La GDH aurait également un rôle important dans l'assimilation de l'ammonium issu de l'activité photorespiratoire (Osuji *et al.*, 1996). Les fortes teneurs en ammonium observées chez les plantes cultivées en absence de nickel ou en présence de PPD pourraient donc s'expliquer par une altération de cette voie d'assimilation lors de l'application de ces traitements. Par ailleurs, l'action aminante de la GDH expliquerait les fortes teneurs en glutamate observées chez ces plantes (fig. III-6), qui lui-même sera converti en aspartate *via* l'aspartate aminotransférase.

VI. Alimentation uréique vs ammoniacale : toxicité ou carence ? (chapitre III et IV)

Bien que notre première étude ait démontré que les plantes cultivées avec de l'urée et en présence de nickel, présentent une meilleure croissance, l'urée demeure une source d'azote moins efficace, comparativement à une nutrition ammoniacale, nitrique ou mixte (nitrate-ammonium, NA ou nitrate-urée, NU ; chapitre IV), en raison notamment d'une vitesse d'absorption racinaire extrêmement faible. Cependant, d'autres études effectuées chez *Arabidopsis thaliana* montrent qu'une nutrition uréique serait aussi efficace qu'une nutrition ammoniacale (Mérigout *et al.*, 2008). Il y aurait donc des réponses et des adaptations physiologiques différentes selon les espèces. **Chez le colza, l'hypothèse d'un état de**

carence lors d'une alimentation uréique, et d'un effet toxique en présence d'ammonium peut être avancée.

La carence azotée serait principalement associée aux faibles teneurs en acides aminés dans la plante, principalement le glutamate et la glutamine, ce qui explique les faibles vitesses d'absorption (fig. IV-5A) ainsi que les faibles teneurs en azote (fig. IV-4B), observés en présence d'urée. Par ailleurs, les travaux de Cao *et al.* (2011) montrent qu'un déséquilibre dans la distribution et la translocation des acides aminés (principalement les formes de transport d'N : glutamate et asparagine) des racines vers les feuilles serait à l'origine de cet état de carence. En effet, comparativement aux plantes cultivées avec de l'urée, celles ayant été alimentées avec du nitrate d'ammonium présentent de faibles teneurs en acides aminés dans les racines (Cao *et al.*, 2011).

Lorsque l'ammonium constitue la seule source d'azote, les plantes présentent également un défaut de croissance. Les raisons le plus fréquemment évoquées sont notamment, l'acidification du milieu provoquée par l'excrétion de protons issus de l'assimilation de l'ammonium, le détournement des molécules carbonés vers les racines ainsi qu'un déséquilibre hormonal (Britto et Kronzucker, 2002). La plus répandue se rapporte à l'auxine qui serait davantage transportée vers les racines avec simultanément une augmentation de la synthèse en cytokinines dans ces tissus. Ceci contribuerait en partie, à l'inhibition de la croissance racinaire, qui a par ailleurs été observée lors de notre étude (fig. IV-4A). **Les récents travaux de Krouk *et al.*, (2010), portant sur l'implication du gène *NRT1.1* dans le transport de l'auxine et la croissance des racines latérales, l'induction par l'ammonium (traitement AS) de *BnNRT1.1* dans les racines (fig. IV-5B), suggèrent un rôle important de ce gène dans la régulation de la croissance chez les plantes recevant l'ammonium comme seule source d'azote.** Cette hypothèse est confortée par des résultats préliminaires (non présentés) qui montrent une induction de *BnNRT1.1* dans les parties aériennes en présence d'ammonium, et qui suggère également son implication dans la régulation de la conductance stomatique lors d'un stress osmotique (Guo *et al.*, 2003).

Nos résultats montrent que le développement racinaire n'est pas affecté par une nutrition uréique. En effet, les plantes cultivées uniquement avec de l'urée présentent **un rapport feuilles/racines 4 fois inférieur** à celui des plantes alimentées avec de l'ammonium (1,5 contre 5,8; fig. IV-4A), indiquant un fort investissement des plantes dans le développement racinaire lors d'une alimentation uréique (Mérigout *et al.*, 2008). Ces deux sources d'azote (urée et ammonium) joueraient donc un rôle important dans la mise en place de l'architecture racinaire. A ce stade, il ne peut être affirmé qu'il s'agit d'un effet signal,

propre à l'urée ou à l'ammonium, ou d'une réponse à une limitation en azote ou encore liée à un phénomène de toxicité.

Outre l'impact sur la croissance racinaire, **l'effet toxique de l'ammonium se traduit par une surexpression de *BnGDH2*** dans les racines et les feuilles (fig. IV-6). La forte induction observée au niveau des racines, laisse supposer que l'ammonium est principalement assimilé au niveau du compartiment racinaire. Par ailleurs, comparativement à notre première étude (fig. III-5, chapitre III), l'expression de ce gène est très faiblement induite en présence d'urée (fig. IV-6). Il peut donc être postulé :

- d'une part, que l'expression de *BnGDH2* en réponse à un stress ammoniacal est plus importante lorsque celui-ci provient du milieu exogène que lorsqu'il est issu de l'hydrolyse *in planta* de l'urée.
- d'autre part, que l'activation de la GDH lors d'une alimentation uréique (traitement +Ni; fig. III-5f) ne suffit pas à elle seule pour assurer l'assimilation de l'ammonium issu de l'urée. Une réduction de l'assimilation peut être causée par à un feedback négatif assuré par les produits d'assimilation que sont l'ammonium, le glutamate ou la glutamine.

V. le nitrate présente un double rôle : nutritionnel et signalétique

Les plantes cultivées sur des sources mixtes d'azote contenant du nitrate (nitrate-urée, NU; nitrate-ammonium; NA), retrouvent une croissance normale, avec des biomasses racinaires et foliaires proches de celles alimentées avec du nitrate (fig. IV-4A). **Comparativement à une alimentation uréique ou ammoniacale stricte, la présence de nitrate dans le milieu nutritif augmente, respectivement de 9 et de 1,2 fois les teneurs en azote des plantes** (fig. IV-4B). Grâce à un marquage ^{15}N , nous avons pu distinguer la part d'azote provenant de chaque forme azotée. Ainsi, **91 et 54% de l'azote étaient respectivement issus du nitrate** en présence de NU et de NA (fig. IV-4C). La forte absorption de nitrate est également corrélée à la surexpression de *BnNRT1.1* (fig. IV-5B) et de *BnNRT2.1* (fig. IV-5C) en présence de ces deux types d'alimentation. Ce premier constat met en **évidence le rôle trophique du nitrate** lors d'une alimentation mixte. Cependant, le caractère nitrophile du colza (Lainé *et al.*, 1993) est un paramètre à prendre en considération pour justifier ces observations.

Nos résultats montrent également :

1- **L'effet inhibiteur du nitrate sur l'absorption de l'urée et de l'ammonium chez le colza**, contredisant les résultats de Garnica *et al.*, (2009), qui montrent chez le blé une augmentation du prélèvement de cette source azotée. Sur le plan moléculaire, cette inhibition serait liée à la répression des gènes *BnDUR3* (fig. IV-5E) et *BnAMT1.1* (fig. IV-5D) en présence de nitrate.

2- **L'inhibition de l'absorption du nitrate par l'urée et par l'ammonium**. Les mêmes observations ont été rapportées par d'autres auteurs (Criddle *et al.*, 1988; Kronzucker *et al.*, 1999). Cette inhibition s'expliquerait par la répression des gènes *BnNRT1.1* (fig. IV-5B) et *BnNRT2.1* (fig. IV-5C) en présence d'urée notamment. Ces gènes seraient potentiellement réprimés par les acides aminés (glutamine et glutamate), et non par l'urée elle-même.

Globalement, les régulations observées lors d'une alimentation mixte (nitrate-urée ou nitrate-ammonium) ou exclusivement nitrique semblent identiques. Ainsi, la levée de carence ou de toxicité, liée à une alimentation uréique ou ammoniacale stricte, par l'ajout de nitrate, confère à cet élément **une propriété bénéfique en termes de nutrition azotée**, qui est par ailleurs, principalement associée à son rôle trophique, du moins chez le colza.

Le nitrate n'a pas seulement un rôle nutritionnel, il joue également un rôle majeur en tant que molécule signal, modulant le métabolisme de la plante et sa croissance (Crawford, 1995). Nous avons donc voulu vérifier, à l'échelle moléculaire et physiologique, la réponse des plantes à un pulse nitrate. Bien qu'au niveau physiologique, aucun « effet pulse » n'a été observé sur l'absorption de l'urée ou de l'ammonium (fig. IV-7A et B), l'induction de *BnNRT1.1* (fig. IV-7C) et *BnNRT2.1* (fig. IV-7D), et la répression de *BnDUR3* (fig. IV-7E) **démontrent nettement la perception du signal nitrate par les plantes**. A ce stade, des analyses complémentaires portant sur l'aspect hormonal devraient apporter plus d'informations.

IV. Aspects agronomiques : Quels engrais pour demain ?

Grâce à la méthodologie reposant sur le marquage ^{15}N et au dispositif des cases lysimétriques, nous avons pu évaluer l'efficacité de 4 engrais azotés (urée, U; nitrate-ammonium, NA; sulfate d'ammonium, AS et urée+inhibiteur d'uréase -NBPT-), sur le rendement du colza, la distribution de l'azote dans la plante et dans les différents

compartiments sol-plante-air (le compartiment eau n'a pu être exploré de par l'absence de drainage) et estimer les pertes d'azote par un défaut de bilan.

Cette étude fait apparaître les effets de deux fertilisants présentant des impacts très contrastés :

- le sulfate d'ammonium (AS), caractérisé par **d'importantes pertes d'azote par voie gazeuse (44% de l'azote appliqué)**, qui se traduit par une **faible efficacité d'utilisation de l'engrais (29%)**, **de faibles teneurs en azote dans les plantes**, **un faible remplissage des graines**, et une **forte remobilisation** de l'azote à partir des feuilles sénescentes, des tiges et des pivots (fig. IV-3). Ces effets peuvent résulter du caractère légèrement alcalin des sols des cases lysimétriques (pH = 8).
- *A contrario*, le traitement urée+NBPT, présente les meilleures caractéristiques agro-environnementales. En effet, en termes d'impact sur l'environnement, ce traitement est le plus avantageux **car il réduit de 68% les pertes d'azote par voie gazeuse**. Par ailleurs, les plantes cultivées en présence de ce traitement, présentent **un plus grand contenu en azote (+25%, comparativement au traitement urée)**, et un **plus fort remplissage des graines** (fig. IV-3). La présence d'un inhibiteur d'uréases **augmente de 25% l'efficacité d'utilisation de l'urée par les plantes**.

Sur l'ensemble des paramètres analysés, nos résultats montrent également qu'une fertilisation à base d'urée ou d'ammonium nitrate présente les mêmes caractéristiques. Les pertes d'azotes sont principalement liées à l'hydrolyse rapide de l'urée suite à son application au sol, qui génère des émissions ammoniacales (Bremner, 1995). Lors de l'utilisation d'engrais à base d'ammonium sulfate ou d'ammonium nitrate, ces pertes peuvent être liées au processus de dénitrification (Zaman *et al.*, 2008). L'utilisation d'inhibiteurs de la nitrification permet généralement de limiter ces pertes. En effet, les résultats obtenus sur microlysismètres (i.e. cultures en pots, chapitre II), **montrent que l'utilisation du DCD ou du Gen-S-BZI en combinaison avec l'ammonium nitrate réduit, respectivement, de 40 et de 18% les pertes d'azote** par rapport au traitement AN seul (fig. II-6c, chapitre II). Nous n'avons cependant pu confirmer cet effet à l'échelle des cases lysimétriques compte tenu des disponibilités.

Les résultats apportés par notre étude ont une importance majeure, tant sur le plan agronomique qu'industriel. L'ammonitrate est l'engrais azoté le plus utilisé en France (3 Mt), il est suivi des solutions azotées à base d'urée-ammonium-nitrate (UAN, 2 Mt) puis de l'urée (0,9 Mt). **Dans la perspective d'une agriculture durable et respectueuse de**

l'environnement, l'utilisation de l'urée combinée à un inhibiteur d'uréase constitue un engrais de choix pour demain. Nos résultats à 2 échelles (hydroponie et cases) montrent clairement l'importance de la microflore tellurique et des interactions avec le sol. En hydroponie, l'absorption de l'urée par le colza est de loin, beaucoup trop faible et un inhibiteur d'uréases peut de plus présenter une certaine toxicité. Nous ne retrouvons donc pas quantitativement ces 2 aspects négatifs sur sol, ce qui montre que l'activité de minéralisation de l'urée reste suffisante en présence d'un inhibiteur d'uréases, et que la toxicité de celui-ci devient négligeable.

Chapitre VI

PERSPECTIVES DE RECHERCHES

CHAPITRE VI. PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Deux thématiques de recherche répondant à des objectifs bien précis ont été développées au cours de ce travail doctoral. La première, qui portait sur le criblage et la mise au point de nouvelles molécules inhibitrices de l'activité uréasique et nitrifiante dans le sol comportait une prise de risque non négligeable en terme de recherche doctorale. La deuxième, plus fondamentale et complémentaire, visait à caractériser les impacts d'une alimentation uréique et ammoniacale chez le colza. Nos résultats ont par ailleurs, soulevés de nombreuses questions débouchant sur des perspectives potentielles de recherche, tant sur le plan appliqué que fondamental.

I. Recherches finalisées

I.1. Les inhibiteurs de la nitrification

- Sur le plan agronomique, les deux inhibiteurs de la nitrification, Gen-S-BZI et Gen-S-BZT, présentaient des caractéristiques intéressantes en termes d'hydrosolubilité et d'écotoxicité. Cependant, **ce dernier paramètre, évalué sur une seule souche bactérienne (*Vibrio fisheri*), nécessite d'être élargi, d'une part, à d'autres souches bactériennes, comme *Nitrosomonas europaea*, responsables de l'oxydation de l'ammonium en nitrite (première étape du processus de la nitrification), et d'autre part, à la microfaune du sol. Cela permettrait de confirmer la faible écotoxicité de ces inhibiteurs sur un panel de populations bactériennes plus large, dans le cadre d'une éventuelle demande de mise sur le marché.**
- Un des buts recherchés *via* la glycosylation de ces inhibiteurs, était également d'accroître leur durée d'action et de prolonger leur effet inhibiteur au-delà de 20 jours, du moins en conditions alcalines. Il est probable que la liaison glucidique de ces inhibiteurs soit clivée par les micro-organismes du sol, permettant ainsi la libération trop rapide de la partie active. Il importerait donc de concevoir d'autres formulations, **en ayant recours, par exemple, aux encapsulations par des polysaccharides hydrosolubles, avec des structures plus complexes**, limitant ainsi leur dégradation par l'activité biologique du sol. Ce développement nécessiterait par ailleurs, des études physico-chimiques préalables afin d'évaluer les possibilités de synthèse de ces composés à partir de molécules actives.

- Dans une optique de développement de nouveaux inhibiteurs de la nitrification, il serait judicieux de s'inspirer des mécanismes **d'inhibition biologique de la nitrification (BNI, Biological Nitrification Inhibition)**, processus naturels de sécrétion racinaire de composés biologiques récemment découverts. Subbarao *et al.*, (2009) ont isolé une molécule chimique, la brachialactone à partir d'une plante fourragère tropicale (*Brachiaria humidicola*) qui serait responsable de l'inhibition de la nitrification au sein de la rhizosphère, en inactivant les deux voies enzymatique AMO et HAO. La sécrétion de cette molécule est déclenchée de façon locale par l'ammonium présent dans la rhizosphère. Par ailleurs, d'autres espèces, comme le sorgho (*Sorghum bicolor*), présentent des capacités identiques de sécrétions racinaires (Zakir *et al.*, 2008). La compréhension **des mécanismes physiologiques et moléculaires qui contrôlent la sécrétion des « BNI » en présence d'ammonium, leur mode d'action et leur éventuelle rémanence pourrait constituer des premières pistes d'exploration avec des applications potentielles (synthèse chimique, extraction à partir de tissus biologiques, transfert vers d'autres espèces d'intérêts agronomiques...).**

I.2. Les inhibiteurs d'uréases

- La principale difficulté rencontrée lors du criblage des inhibiteurs d'uréases, était de valider, en condition de sol nu, les effets observés lors des tests *in vitro*, notamment la stabilisation du NBPT par les cyclodextrines ou les wollastonites. D'autres formulations avec des composés tels que l'amidon, les polysaccharides algaux ou encore les acides humiques (résultats non présentés) ont rencontré le même échec sur sol acide. Toutefois, **le recours à de nouvelles formulations chimiques du NPBT élaborées à partir d'autres composés appartenant, par exemple, à la famille des phosphoramides connus pour inhiber efficacement l'activité uréasique devrait constituer une piste plus prometteuse.**
- **Le cyclohexylphosphoric triamide (CHPT)**, qui présente une meilleure efficacité sur l'inhibition des uréases du sol que le NBPT, ainsi que d'autres composés tels que le **thiophosphoryl triamide (TPTA)**, **sont capables de retarder l'hydrolyse de l'urée et d'inhiber l'activité nitrifiante dans le sol** (chien *et al.*, 2009). L'utilisation de tels composés pourrait aboutir à la conception d'inhibiteurs présentant une efficacité aussi bien sur sol acide que sur sol alcalin.

- Sur le plan agronomique, que ce soit pour les inhibiteurs d'uréases ou de la nitrification, il sera toujours nécessaire de valider **leur efficacité en conditions de plein champ**, *via* notamment, l'utilisation du dispositif des cases lysimétriques et une approche s'appuyant sur un marquage ^{15}N , dont l'efficacité s'est avérée concluante au vu des résultats obtenus (chapitre IV).
- Nos résultats ont démontré en conditions lysimétriques une meilleure efficacité d'utilisation de l'urée en présence d'un inhibiteur d'uréases mais il faut toutefois noter que celle-ci reste encore assez faible (de l'ordre de 50% sur colza de printemps). Par ailleurs, si l'efficacité d'utilisation du sulfate d'ammonium est moins importante en raison notamment d'une volatilisation plus forte, force est de constater que le colza atteint le même rendement grâce à une meilleure remobilisation de l'azote des tissus végétatifs. Ce processus reste agronomiquement peu exploité mais il peut être suggérer qu'une réduction des doses d'engrais apportés, notamment sous forme d'urée et d'inhibiteur d'uréases, permettrait d'accentuer cette remobilisation et d'améliorer dès lors son efficacité d'utilisation. Un point d'équilibre est certes à trouver, mais un pilotage précis de la fertilisation reposant sur l'utilisation d'indicateurs constitue une opportunité.

II. Recherches fondamentales

- Lors de nos expérimentations portant sur l'absorption et l'assimilation de l'urée, l'ammonium et le nitrate, nous avons noté la faible efficacité d'utilisation de l'urée chez le colza. Celle-ci semble davantage résulter d'une plus faible capacité d'absorption de l'urée que d'une plus faible assimilation de l'azote issu de celle-ci. L'hypothèse d'un rétro-contrôle négatif par les acides aminés sur l'absorption n'est pas à exclure. **Il paraît donc nécessaire d'étudier, dans un premier temps, la régulation de l'absorption de l'urée et de son assimilation par les acides aminés circulants au niveau physiologique et moléculaire (*BnDUR3*, *BnUréase*, *BnGDH2*), et d'examiner l'importance du pool d'acides aminés libres et de sa composition dans ce rétro-contrôle.** Dans un deuxième temps, la comparaison des profils d'acides aminés des plantes cultivées en présence d'urée, d'ammonium, de nitrate ou d'une nutrition mixte permettra de vérifier l'hypothèse d'un défaut de distribution et de translocation des acides aminés émise par Cao *et al.* en (2010). Cette perspective pourrait être menée rapidement à terme, puisqu'elle viserait à utiliser nos échantillons pour quantifier leurs teneurs en acides aminés.

- Bien que les travaux effectués aient apporté des éléments nouveaux sur la levée de l'état de carence ou de toxicité liée à la présence d'urée ou d'ammonium, par le nitrate, **il serait pertinent de les compléter en étudiant les voies d'assimilation de l'azote chez le colza pour chacune de ces sources azotées.** En effet, l'analyse des activités enzymatiques de la GS, GDH, uréase et NR pourrait apporter d'autres éléments de réponse sur l'effet bénéfique du nitrate. L'étude de **l'intervention possible des phytohormones dans la régulation de l'expression des gènes codant les systèmes d'absorption pourrait également être envisagée.** Ainsi, le dosage de phytohormones en collaboration avec le CIPAV de Pampelune permettrait une meilleure prise en compte de leur effet lors d'une alimentation uréique, ammoniacale ou mixte et pourrait être mené rapidement à partir des échantillons disponibles.

- Les effets contrastés, observés sur la croissance racinaire en présence d'urée ou d'ammonium, suscite un intérêt particulier sur le rôle de ces deux éléments dans la mise en place de l'architecture et la croissance racinaire. Outre l'implication d'un effet auxinique et des cytokinines très probable dans l'inhibition de la croissance racinaire en présence d'ammonium (Britto et Kronzucker, 2002), Li *et al.*, (2010) rapportent le rôle de la GDP-mannose pyrophosphorylase dans l'efflux de l'ammonium associé à une altération de l'élongation racinaire suggérant, par ailleurs, des modifications pariétales (Patterson *et al.*, 2010). **L'étude de ces modifications lors de la croissance racinaire en présence d'urée ou d'ammonium constituerait une approche originale et pluridisciplinaire pouvant être envisagée dans le cadre d'un partenariat avec le laboratoire Glyco-MEV de l'Université de Rouen.**

- Nos résultats sur l'effet signalétique du nitrate nous ont également permis de confirmer la perception du nitrate par les plantes et de montrer de façon originale la sensibilité du gène BnDUR3. Cette étude mériterait d'être approfondie par **une analyse transcriptomique comparative grâce à l'utilisation de « puces ADN ».** Cette approche apporterait une analyse complète de l'expression génique et permettrait de dresser un catalogue des gènes spécifiquement régulés par le nitrate en tant que signal *sensu stricto*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Alexander M.** (1977). Introduction to Soil Microbiology, pp. 467-469. JohnWiley and Sons, Inc., New York.
- Amberger A.** (1989) Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and Future outlook. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **20**, 1933-1955.
- Amberger A.** (1993b). Potential of the Nitrification Inhibitor Dicyandiamide to ControlNitrogen Management and Environmental Pollution. Proceedings: Dahlia Greidinger Memorial International Workshop on Controlled/Slow Release Fertilizers, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.
- Amberger A.** (1996). Pflanzenernährung (Plant Nutrition). 4th Edition. (German) Uni Taschenbüher 846, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany.
- Amberger A.** (2008a). 100 Jahre Kalkstickstoff - ein multifunktionaler N-Dünger. (German) AlzChem Trostberg GmbH, Chemiepark Trostberg, Germany.
- Andrews R-K., Blakeley R-L., Zerner B.** (1984). Urea and urease. *Advances in inorganic biochemistry* **6**,245-283.
- Antisari L-V., Marzadori C., Gioacchini P., Ricci S., Gessa C.** (1996). Effects of the urease inhibitor N-(n-butyl) phosphorothioic triamide in low concentrations on ammonia volatilization and evolution of mineral nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* **22**, 196-201.
- Arp D-J., Stein L-Y.** (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia oxidizing bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **38**, 471-495.
- Artola E., Cruchaga S., Ariz I., Moran J-F., Garnica M., Houdusse F., Garcia Mina J-M., Irigoyen I., Lasa B., Aparicio-Tejo P-M.** (2011). Effect of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. *Journal of plant growth regulation* **63**, 73-79.
- Asselin R.** (1993). Le lessivage des nitrates: brève revue de littérature. MAPAQ, Nicolet. 23 pp.
- Association of American Plant Food Control Officials (AAPFCO)** (1997): Official Publication No. 50. Association of American Plant Food Control Officials, Inc., West Lafayette, Indiana, USA.
- Aubert S., Bligny R., Douce R., Gout E., Ratcliffe R-G., Roberts J-K.** (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by (13)C and (31)P nuclear magnetic resonance. *Journal of experimental botany* **52**(354), 37-45.

Azam F., Benckiser G., Müller C., and Ottow J-C-G. (2001). Release, movement and recovery of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), ammonium, and nitrate from stabilized nitrogen fertilizer granules in a silty clay soil under laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 118-125.

-B-

Balasubramanian A., Ponnuraj. (2010). Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of Molecular Biology* **400**, 274-283.

Barth G., Tucher S., von and Schmidhalter U. (2001). Influence of soil parameters on the effect of 3,4-dimethylpyrazole-phosphate as a nitrification inhibitor. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 98-102.

Basten M., Brynildsen P., von Belzen R. (2005). Stabilized urea for enhanced nitrogen use efficiency. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.

Becker-Ritt A-B., Martinelli A-H-S., Mitidieri S., Feder V., Wassermann G-E., Santi L., et al. (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* **50**, 971-983.

Bernhard W-R., Matile P. (1994). Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant science* **98**(1), 7-14.

Blevins D-G. (1989). An overview of nitrogen metabolism. In recent Advances in Phytochemistry., Conn E.E., eds (New York), pp. 1-41.

Bøckman O-C., Kaarstad O., Lie O-H., Richards I. (1990) Agriculture and Fertilizers. Norsk Hydro, Oslo.

Bloom A-J., Jackson L-E., Smart D-R. (1993). Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant Cell and Environment* **16**, 199-206.

Bouwman A-F. (1998). Nitrogen oxides and tropical agriculture. *Nature* **392**, 866-867.

Bradley D-P., Morgan M-A., O'Toole P. (1989). Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fertilizer Research* **20**, 41-49.

Bremner J-M., McCarty G-W. in *Soil Biochemistry* (1993). Bollag, J. M. and Stotzky, G. (eds.) 8, 181-218, Dekker, New-York.

Bremner J-M. (1995). Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Fertilizer research* **42**, 321-329.

Bremner J-M. (1997). Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**, 7-16.

- Bremner J-M., Chai H-S.** (1989). Effects of phosphoroamides on ammonia volatilization and nitrite accumulation in soils treated with urea. *Biology and Fertility of Soils* **8**, 227-230.
- Bremner J-M., Krogmeier M-J.** (1990). Effects of urease inhibitors on germination of seeds in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **21**, 311-321.
- Britto D-T., Kronzucker H-J.** (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* **159**, 567-584.
- Bronson K-F., Mosier A-R.** (1993). Effect of Nitrogen Fertilizer and Nitrification Inhibitors on Methane and Nitrous Oxide Fluxes in Irrigated Corn. *Biochemistry of Global Change. Radioactive Trace Gases*. Chapman & Hall. New York / London.
- Bronson K-F., Mosier A-R.** (1994). Suppression of methane oxidation in aerobic soil by nitrogen fertilizers, nitrification inhibitors, and urease inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* **17**(4), 263-8. Springer-Verlag, Berlin.
- Brown P-H., Welch R-M., Cary E-E.** (1987) Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology* **85**, 801-803.
- Brown P-H., Welch R-M., Madison J-T.** (1990) Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. *Plant and Soil* **125**, 19-27.
- Brugière N., Cui Y., Bi Y., Arnoldo M., Jackman L., Rothstein S-J.** (2000). Molecular Genetics of Self-incompatibility in *Brassica napus*. *Annals Botany* **85** (Suppl. A), 133-139.
- Bundy L-G.** (2001). Managing Urea-Containing Fertilizers. 2001 Area Fertilizer Dealer Meetings, University of Wisconsin-Madison.
- Bundy L-G., Bremner J-M.** (1973). Inhibition of nitrification in soils. *Soil Science Society of America Proceedings* **37**, 396-398.
- Byrnes B-H., Freney J-R., Ahmad N.** (1995). Recent developments on the use of urease inhibitors in the tropics. *Fertilizer Research* **42**, 1-3.
- Byrnes B-H., Vilsmeier K., Austin E., Amberger A.** (1989b). Degradation of the Urease Inhibitor Phenyl Phosphorodiamidate in Solutions and Floodwaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**, 473-477.

-C-

- Camberato J-J., Bock B-R.** (1990). Spring wheat response to enhanced ammonium supply. I. Dry matter and nitrogen content. *Agronomy Journals* **82**, 463-467.
- Cambui C-A., Gaspar M., Mercier H.** (2009). Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species. *Physiologia Plantarum* **136** (1), 86-93.

- Canivenc G.** (2005). Implication des gènes PTR d'*Arabidopsis thaliana* dans le transport de nitrate. Thèse, Université de Montpellier II.
- Cantarella H., Bolonhezi D., Gallo P-B., Martins A-L-M., Marcelino R.** (2009). Ammonia volatilization and yield of maize with urea treated with urease inhibitor. 16th Nitrogen Workshop, Turin, Italy.
- Cantarella H., Quaggio J-A., Gallo P-B., Bolonhezi D., Rossetto R., Martins J-L M., Paulino V-J., Alcantara P-B.** (2005). Ammonia losses of NBPT-treated urea under Brazilian soil conditions. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.
- Cao F-Q., Werner A-K., Dahncke K., Romeis T., Liu L-H., Witte C-P.** (2010). Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. *Plant Physiology* **154**, 98-108.
- Cao Y-W., Glass A-D-M., Crawford N-M.** (1993). Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and auxin resistance mutations *aux1*, *axr1* and *axr2*. *Plant Physiology* **102**, 983-989.
- Carlini C-R., and Polacco J-C.** (2008). Toxic properties of urease. *Crop Science* **48**(5),1665-1672.
- Carmona G., Christianson C-B., Byrnes B-H.** (1990). Temperature and low concentration effects of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) on ammonia volatilisation from urea. *Soil Biology and Biochemistry* **22**, 933-937.
- Carter E-L., Flugge N., Boer J-L., Mulrooney S-B., Hausinger R-P.** (2009). Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* **1**, 207-221.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Muñoz S., Daniel-Vedele F., Gojon A.** (2001). Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**(1), 262-71.
- Chen Y-G., Ching T-M.** (1988). Induction of barley leaf urease. *Plant Physiology* **86**, 941-945.
- Chien S-H., Prochnow L-I., Cantarella H.** (2009). Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts. *Advances in Agronomy* **102**, 267-322.
- Christianson C-B., Byrnes B-H., Carmona G.** (1990). A comparison of the sulphur and oxygen analogs of phosphoric triamide urease inhibitors in reducing urea hydrolysis and ammonia volatilization. *Fertilizer Research* **26**, 21-27.
- Cooper H-D., Clarkson D-T.** (1989). Cycling of amino nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals: a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**, 753-762.

- Coruzzi G-M.** (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book*. Edited by Meyerowitz E., Somerville C., American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, **31**(1), 1-17.
- Coschigano K-T., Melo-Oliveira R., Lim J., Coruzzi G-M.** (1998). *Arabidopsis* gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* **10**(5), 741-52.
- Court M-N., Stephen R-C., Waid J-S.** (1964). Toxicity as a cause of the inefficiency of urea as a fertilizer. *Review of Journal of Soil Science* **15**, 42-48.
- Cox G-M., Mukherjee J., Cole G-T., Casadevall A., Perfect J-R.** (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity* **68**, 443-448.
- Crawford N-M.** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-868.
- Crawford N-M., Forde B-G.** (2002). Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. In *The Arabidopsis Book*. Edited by Meyerowitz E., Somerville C., American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0011, 1-25.
- Crawford N-M., Smith M., Bellissimo D., Davis R-W.** (1988). Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5006-5010.
- Criddle R., Ward M., Huffaker R.** (1988). Nitrogen uptake by wheat seedlings, interactive effects of four nitrogen sources: NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ and urea. *Plant Physiology* **86**, 166-175.
- Cruchaga S., Artola E., Lasa B., Ariz I., Irigoyen I., Moran J-F., Aparicio-Tejo P M.** (2011). Short term physiological implications of NBPT application on the N metabolism of *Pisum sativum* and *Spinacea oleracea*. *Journal of Plant Physiology* **168**, 329-36.
- Cruz C., Castillo M., Domínguez C-N., Juanarena N., Aparicio-Tejo P., Lamsfus C.** (2003). The importance of nitrate signalling in plant ammonium tolerance: Spinach as a case study. In Actas XV Reunion de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VIII Congreso Hispano-Luso, eds. by Sociedad Española de Fisiología Vegetal, Palma de Mallorca, p 297.

-D-

- Dabir S., Dabir P., Somvanshi B.** (2006). The kinetics of inhibition of *Vigna catjang* cotyledon and buffalo liver arginase by l-proline and branched-chain amino acids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **21**, 727-731.
- Davies D-M., Williams P-J.** (1995). The effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide on nitrate leaching and ammonia volatilization: A U.K. Nitrate Sensitive Areas Perspective. *Journal of Environmental Management* **45**, 263-272.

- Davis H-M., Shih L-M.** (1984). Urease from leaves of *Glycine max* and *Zea mays*. *Phytochemistry* **23**, 2741-2745.
- Di H-J., Cameron K-C.** (2002). Nitrate Leaching from Temperate Agroecosystems: Sources, Factors and Mitigating Strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **46**, 237-256.
- Di H.J., Cameron K-C.** (2004). Treating grazed pasture soil with a nitrification inhibitor, eco-nTM, to decrease nitrate leaching in a deep sandy soil under spray irrigation - a lysimeter study. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **47**, 351-361.
- Di H-J., Cameron K-C.** (2007a). Nitrate leaching losses and pasture yields as affected by different rates of animal urine nitrogen returns and application of a nitrification inhibitor - a lysimeter study. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **79**, 281-290.
- Dixon N-E., Gazzola C., Blakely R-L., Zerner B.** (1975). Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society* **97**, 4131-4133.
- Dobermann A.** (2005). Nitrogen use efficiency - state of the art. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.
- Doddema H., Telkamp G-P.** (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. III. Kinetics. *Plant Physiology* **43**, 343-350.
- Domínguez M-J., Sanmartín C., Font M., Palop J-A., San Francisco S., Urrutia O., Houdusse F., García-Mina J.** (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 3721-3731.
- Dow Agro Sciences.** (2007). N-Serve nitrogen stabilizer.
- Dow Agro Sciences.** (2009). Instinct™ nitrogen stabilizer.
- Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M-B., Estavillo M-B., Sangwan R., Gallais A., Hirel B.** (2003). Glutamate dehydrogenase in plants; is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 565 - 576.
- Dynowski M., Mayer M., O. Moran O., et al.** (2008). Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs. *FEBS Letters* **582**, 2458-2462.

-E-

- Eckert M., Biela A., Siefritz F, Kaldenhoff R.** (1999). New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1541-1545.
- Edmeades D-C.** (2004). Nitrification and Urease Inhibitors - A Review of the National and International Literature on their Effects on Nitrate Leaching, Greenhouse Gas

Emissions and Ammonia Volatilisation from Temperate Legume-Based Pastoral Systems. Environment Waikato Technical Report 2004/22.

Elliott W-H. (1953). Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. *Journal of Biological Chemistry* **201**, 661-672.

Eskew D-L., Welch R-M., Norvall W-A. (1984). Nickel in higher plants. Further evidence for an essential role. *Plant Physiology* **76**, 691-693.

-F-

Fettweis U., Mittelstaedt W., Schimansky C., Führ F. (2001). Lysimeter experiments on the translocation of the carbon-14-labelled nitrification inhibitor 3,4 dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in a gleyic cambosol. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 126-130.

Filleur S., Daniel-Vedele F., (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* **207**, 461-469.

Follmer C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* **69**, 18-28.

Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G-E., et al. (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry* **271**, 1357-1363.

Forde B-G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 219-235.

Forrest K-L., Bhave M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & Integrative Genomics* **7**, 263-289.

Frankenberger W-T., Tabatabai M-A. (1982). Amidase and urease activities in plants, *Plant and Soil* **64**, 153-166.

Frenay J-R., Chen D-L., Mosier A-R., Rochester I-J., Constable G-A., Chalk P-M. (1993). Use of nitrification inhibitors to increase fertilizer nitrogen recovery and lint yield in irrigated cotton. *Fertility Research* **34**, 37-44.

Freyermuth S-K., Bacanamwo M., Polacco J-C. (2000). The soybean *Eu3* gene encodes a Ni-binding protein necessary for urease activity. *The Plant Journal* **21**, 53-60.

Fujita T., Yamashita Y., Yoshida S., Yamahira K. (1992). Granular fertilizer with a decomposable coating and process for producing the same. Canadian Patent, No. CA 1, 295, 849, pp. 57. Issued Feb. 18, 1992. Applied in Japan on Aug. 5, 1986. Assigned to Chisso Corp. Japan.

Funck D., Stadelhofer B., Koch W. (2008). Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**, 40.

-G-

- Gansel X., Munos S., Tillard P., Gojon A.** (2001). Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes AtNRT2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal* **26**, 143-155.
- Gardner D.** (1995). Fertilizer Additive Stops Nitrogen Loss. *Ag Retailer*, Nov.1995.
- Garnica M., Houdusse F., Yvin J-C., Garcia-Mina J-M.** (2009). Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings. *Journal of Science and Food Agriculture* **89**, 55-62.
- Gazzarini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W-B.** (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **11**, 937-947.
- Gerendás J., Sattelmacher B.** (1990). Influence of nitrogen form and concentration on growth and ionic balance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and potato (*Solanum tuberosum*). In: Van Beusichem ML, eds. *Plant Nutrition-Physiology and Applications*. Kluwer Academic Publishers, 33-37.
- Gerendás J., Sattelmacher B.** (1997). Significance of Ni supply for growth, urease activity and the contents of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. *Plant and Soil* **190**,153-62.
- Gerendás J., Sattelmacher B.** (1999). Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. *Annal of Botany* **83**, 65-71.
- Gerendás J., Zhu Z., Sattelmacher B.** (1998). Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1545-1554.
- Gill J-S., Bijay-Singh, Khind C-S., Yadvinder-Singh.** (1997). Efficiency of N-(n butyl) thiophosphoric triamide in retarding hydrolysis of urea and ammonia volatilization losses in a flooded sandy loam soil amended with organic materials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **53**, 203-207.
- Gioacchini P., Nastri A., Marzadori C., Giovannini C., Vittori-Antisari L., Gessa C.** (2002). Influence of urease and nitrification inhibitors on N losses from soils fertilized with urea. *Biology and Fertility of Soils* **36**, 129-135.
- Giovannini C., Garcia-Mina J-M., Ciavatta C., Marzadori C.** (2009). Ureic nitrogen transformation in multi-layer soil columns treated with ureas and nitrification inhibitors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **57**, 4883-4887.
- Glass A-D-M., Siddiqi M-Y.** (1995). Nitrogen absorption by plants roots. In *Nitrogen Nutrition In Higher Plants*. Edited by H.S.Srivastava and R.P.Singh., Associated Pub.Co. New Delhi., 21-56.

- Glass A-D-M., Siddiqi M-Y., Ruth T-J., Rufty T-W.** (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. 11. Energetics. *Plant Physiology* **93**, 1585-1589.
- Glibert P-M., Harrisson J., Heil C., Seizinger S.** (2006). Escalating worldwide use of urea - a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry* **77**, 441-463.
- Goldraij A., Beamer L-J., Polacco J-C.** (2003). Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiology* **132**, 1801-1810.
- Goldraij A., Polacco J-C.** (1999). Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiology* **119**, 299-303.
- Goldraij A., Polacco J-C.** (2000). Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta* **210**, 652-658.
- Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dily F.** (2006). The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to environment. *Journal of experimental botany* **57**, 1949-1956.
- Gooding M-J., Davies W-P.** (1992). Foliar urea fertilization of cereals: a review. *Fertility Research* **32**, 209-222.
- Goring C-A-I.** (1962a) Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl)- pyridine. *Soil Science* **93**, 431-439.
- Goring C-A-I.** (1962b). Control of nitrification of ammonium fertilizers and urea by 2-chloro-6-(trichlororriethyl)pyridine. *Soil Science* **93**, 211-218.
- Grant C-A., Jia S., Brown K-R., Bailey L-D.** (1996). Volatile Losses of NH₃ from surface-applied urea and urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitors NBPT or ammonium thiosulphate. *Canadian Journal of Soil Science* **76**, 417-419.
- Guo F-Q., Wang R., Chen M., Crawford N-M.** (2001). The Arabidopsis dual affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* **13**, 1761-1777.
- Guo F-Q., Wang R., Crawford N-M.** (2002). The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* **53**, 835-844.

-H-

- Harrison R., Webb J.** (2001). A review of the effect of N fertilizer type on gaseous emissions. *Advances in Agronomy* **73**, 65-108.
- Hirayama C., M. Sugimura M., Saito H., et al.** (2000). Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry* **53**, 325-330.

Hirel B., Lea P.-J. (2001). Ammonia assimilation. In *Plant Nitrogen*. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF: Springer, 79-99.

Ho C.-H., Lin S.-H., Hu H.-C., Tsay Y.-F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184-1194.

Hofman G., Van Cleemput O. (1995). Ammoniakvervluchting uit kunstmest. Landbouwkundige Uitgeverij G.C. van den berg (ed.). Waddinxveen, The Netherlands, 27 pp.

Hogan M.-E., Swift I.-E., Done J. (1983). Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry* **22**, 663-667.

Houdusse F., Zamarreno A.-M., Garnica M., Garcia-Mina J.-M. (2005). The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with free polyamines and proline plant contents. *Functional Plant Biology* **32**, 1057-1067.

-I-

IFA. (2003). www.fertilizer.org.

IFA. (2009). www.fertilizer.org.

-J-

Jung J.S., Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B., Agre P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: the hourglass model. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 14648-14654.

-K-

Kaiser B.-N., Rawat S.-R., Siddiqi Y.-M., Masle J., Glass A.-D.-M. (2002). Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA “Knockout” of the high-affinity NH_4^+ transporter *AtAMT1.1*. *Plant Physiology* **130**, 1263-1275.

Kamachi K., Yamaya T., Mae T., Ojima K. (1991) A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiology* **96**, 411-41.

Keeney D.-R. (1986). Inhibition of nitrification in soils. In: *Nitrification*, pp. 99–115. Prosser, J.I., Ed., Special Publication of the Society for General Microbiology, IRL Press, Oxford.

Kiss S., Simihăian M. (2002). Improving Efficiency of Urea Fertilizers by Inhibition of Soil Urease Activity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Kojima S., Bohner A., Gassert B., Yuan L., Von Wirén N.** (2007). AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **52**, 30-40.
- Krogmeier M-J., McCarty G-W., Bremner J-M.** (1989). Potential phytotoxicity associated with the use of soil urease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1110-2.
- Krogmeier M-J., McCarty G-W., Shogren D-R., Bremner J-M.** (1991) Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar applied urea. *Plant and Soil* **135**, 283-286.
- Kronzucker H-J., Glass A-D-M., Siddiqi M-Y.** (1999). Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiology* **120**, 283-291.
- Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A.** (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* **18**, 927-937.
- Kuchar J., Hausinger R-P.** (2004). Biosynthesis of metal sites. *Chemical Reviews* **104**, 509-525.
- Kyllingsbæk A.** (1975). Extraction and colorimetric determination of urea in plants. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-soil and Plant Science* **25**, 109-12.

-L-

- Laemmli U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lainé P., Ourry A., Macduff J-H., Boucaud J., Salette J.** (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Plant Physiology* **88**, 85-92.
- Lammel J.** (2005). Cost of the different options available to the farmers: Current situation and prospects. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.
- Lea P-J., Mifflin B-J.** (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**, 516-614.
- Leinker M., Reinhardt-Hanisch A., Hartung E., Von Borell E.** (2005). Reducing Ammonia Emissions by Using Urease Inhibitors. *Landtechnik* **6**.
- Lejay L., Tillard P., Lepetit M., Olive F., Filleur S., Daniel-Vedele F., Gojon A.** (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* **18**, 509-519.

- Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, Shi WM.** (2010). Root growth inhibition by NH_4^+ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH_4^+ efflux and GMPase activity. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1529-1542.
- Liu K-H., Huang C-Y., Tsay Y-F.** (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**, 865-874.
- Liu K-H., Tsay Y-F.** (2003). Switching between the two action modes of the dual- affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal* **22**, 1005-1013.
- Liu LH., Ludewig U., Frommer W-B., von Wirén N.** (2003a). AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/ H^+ symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 790-800.
- Livak K-J., Schmittgen T-D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**, 402-408.
- Loulakakis K-A., Roubelakis-Angelakis K-A.** (1991). Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiology* **97**, 104-111.
- Lu W., Lindau C-W., Pardue J-H., Patrick W. H., Jr.-Reddy K-R., Khind C-S.** (1989). Potential of phenyl phosphorodiamidate and N-(n-butyl) thiophosphoric triamide for inhibiting urea hydrolysis in simulated oxidized and reduced soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **20**, 775-788.
- Ludewig U., von Wirén N., Rentsch D., Frommer W-B.** (2001). Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? *Genome Biology* **2**, reviews 1010.1-1010-5.

-M-

- Maene L-M.** (1995). Changing Perception of Fertilizer Worldwide. Fertilizer Industry Round Table, Oct. 1995.
- Malhi S-S., Grant C-A., Johnston A-M., Gill K-S.** (2001). Nitrogen fertilization management for no till cereal production in the Canadian Great Plains: a review. *Soil Tillage Research* **60**, 101-122.
- Malhi S-S., Nyborg M.** (1991). Recovery of ^{15}N -labelled urea: influence of zero tillage, and time and method of application. *Fertilizer Research* **28**, 263-269.
- Malhi S-S., Oliver E., Mayerle G., Kruger G., Gill K-S.** (2003). Improving effectiveness of seed row-placed urea with urease inhibitor and polymer coating for durum wheat and canola. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **34**, 1709-1727.
- Marschner H.** (1995). Functions of Mineral Nutrition: Macronutrients. In: Mineral Nutrition of Higher Plants, eds. by Marschner H. Academic Press, London.
- Martin-Tanguy J.** (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* **34**, 135-148.

- Matsumoto H., Hasegawa Y., Kobayashi M., Takahashi E.** (1968). Inducible formation of urease in *Canavalia ensiformis*. *Plant Physiology* **21**, 872-881.
- Matsumoto H., Yasuda T., Koayashi M., Takahashi E.** (1966). The inducible formation of urease in rice plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **12**, 239-244.
- McCall P-J., Swarm R-L.** (1978). Nitrapyrin volatility from soil. *Down to Earth* **34**, 21-27.
- McCarty G-W.** (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* **29**, 1-9.
- McCarty G-W., Bremner M-B.** (1989). Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds. *Fertiliser Research* **8**, 204-211.
- Meisinger J-J., Randall G-W.** (1991). Estimating nitrogen budgets for soil-crop systems. In: Follet, R.F. et al. (eds.). *Managing nitrogen for groundwater quality and farm profitability*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 85-124.
- Mérigout P., Lelandais M., Bitton F., Renou J-P., Briand X., Meyer C., Daniel Vedele F.** (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **147**, 1225-1238.
- Meyer-Bothling L-E., Polacco J-C.** (1987) Mutational analysis of the embryo specific urease locus of soybean. *Molecular and General Genetics* **209**, 439-444.
- Meyer-Bothling L-E., Polacco J-C., Cianzio S-R.** (1987). Pleiotropic soybean mutants defective in both urease isozymes. *Molecular and General Genetics* **209**, 432-438.
- Michel H-J., Grabarse M., Niclas, H-J.** (2004). Nitrification inhibitor compositions -their synergistic effect and mode of action. 12th World Fertilizer Congress of CIEC, August 2001, Beijing, China; Vol II, pp. 1080-1087.
- Mifflin B-J., Habash D-Z.** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**, 979-987.
- Mifflin B-J., Lea P-J.** (1980). Ammonium assimilation. *In the Biochemistry of Plants*. 5, Mifflin B., eds (New York), pp. 169-202.
- Mobley H-L., Hausinger R-P.** (1989). Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Revista de Microbiologia* **53**, 85-108.
- Mobley H-L., Island M-D., Hausinger R-P.** (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Revista de Microbiologia* **59**, 451-80.
- Moir J-L., Cameron K-C., Di H-J.** (2007). Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use and Management* **23**, 111-120.

- Montemurro F., Capotorti G., Lacertosa G., Palazzo D.** (1998). Effects of Urease and Nitrification Inhibitors Application on Urea Fate in Soil and Nitrate Accumulation in Lettuce. *Journal of Plant Nutrition* **21**(2), 245-252.
- Mosier A. R., Duxbury J-M., Freney J-R., Heinemeyer O., Minami K.** (1996). Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement, and mitigation. *Plant and Soil* **181**, 95-108.
- Mosier A., Kroeze C., Nevison C., Oenema O., Seitzinger S., van Cleemput O.** (1998). Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **52**, 225-248.
- Mosier A-R., Doran J-W., Freney J-R.** (2002). Managing soil denitrification. *Journal of Soil Water Water Conservation* **57**, 505-512.
- Mulbaney R-L., Bremmer J-M.** (1979) A modified diacetyl monoxime method for colorimetric determination of urea in soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **10**, 1163-1170.
- Muller B., Tillard P., Touraine B.** (1995). Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: An approach using ¹⁵N. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1267-1279.
- Muñoz A., Raso M-J., Pineda M., Piedras P.** (2006). Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta* **224**(1), 175-184.

-N-

- Nastri A., Toderi G., Bernati R., Govi G.** (2000). Ammonia volatilisation and yield response from urea applied to wheat with urease (NBPT) and nitrification (DCD) inhibitors. *Agrochimica* **44**, 231-239.
- Nelson D-W., Huber D-M.** (1980). Performance of nitrification inhibitors in the Midwest (east). In: *Nitrification Inhibitors—Potentials and Limitations*, pp. 75–88. ASA Special Publ. 38, Madison, Wisconsin.
- Nelson D-W., Huber D-M.** (1992). Nitrification inhibitors for corn production. *National Corn Hand- book* **55**.
- Nicoulaud B-A-L., Bloom A-J.** (1996). Absorption and assimilation of foliarly applied urea in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 1117-1121.
- Nicoulaud B-A-L., Bloom A-J.** (1998). Nickel supplements improve growth when foliar urea is the sole nitrogen source for tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123**, 556-559.
- Ninnemann O., Jauniaux J-C., Frommer W-B.** (1994). Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO Journal* **13**, 3464-3471.

Nohrstedt H., Jacobson S., Sikström U. (2000). Effects of repeated urea doses on soil chemistry and nutrient pools in a Norway spruce stand. *Forest Ecology and Management* **130**, 47-56.

-O-

O'Neal D., Joy K-W. (1973). Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. *Nature New Biology* **246**, 61-62.

ODDA. (1995). Dicyandiamide - General Data/Product Range/Applications. Publisher: Odde Smelteverk AS, Odde, Norway.

Okamoto M., Vidmar J., Glass A-D-M. (2003). Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiology* **44**, 304-317.

Oliveira I-C., Coruzzi G-M. (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **121**(1), 301-10.

Orsel M., Krapp A., Daniel-Vedele F. (2002). Analysis of the *NRT2* nitrate transport family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**(2), 886-896.

Osuji G-O., Braithwaite C., Fordjour K., Madu W-C., Beyene A., Roberts P-S., Wright V. (2003). Purification of glutamate dehydrogenase isoenzymes and characterization of their substrate specificities. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **33**(1), 13-28.

Osuji G-O., Madu W-C. (1996). Ammonium ion salvage by glutamate dehydrogenase during defence response in maize. *Phytochemistry* **42**, 1491-1498.

-P-

Park I.S., Hausinger R.P. (1995). Requirement of carbon dioxide for in-vitro assembly of the urease nickel metallocenter. *Science* **267**, 1156-1158.

Pasda G., Händel R., Zerulla W. (2001a). The new nitrification inhibitor DMPP (ENTEC) - Effects on yield and quality of agricultural crops. In: *Plant Nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. W.J. Horst *et al.* (eds.) 758-759.

Pasda G., Händel R., Zerulla W. (2001b). Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 85-97.

Patterson K., Cakmak T., Cooper A., Lager I., Rasmusson A-G., Escobar M-A. (2010). Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1486-1501.

- Pearson J-N., Finnemann J., Schjoerring J-K.** (2002). Regulation of the high affinity ammonium transporter (*BnAMT1.2*) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Molecular and Biology* **49**, 483-490.
- Peat L-J., Tobin A-K.** (1996). The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. *Plant Physiology* **111**, 1109-1117.
- Peuples M-B., Freney J-R., Mosier A-R.** (1995). Minimizing gaseous losses of nitrogen. In P.E. Bacon, ed. *Nitrogen fertilization and the environment*, 565-602 pp. New York, the United States, Marcel DekkerInc.
- Peuples M-B., Gifford R-M.** (1993). Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Edited by DT Dennis DT, Turpin DH. New York, 434-47.
- Peterman T-K., Goodman H-M.** (1991). The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Molecular and General Genetics* **230**(1-2), 145-54.
- Phongpan S., Freney J-R., Keerthisinge D-G., Chaiwanakupt P.** (1995). Use of phenylphosphorodiamidate and N-(n-butyl)thiophosphorictriamide to reduce ammonia loss and increase grain yield following application of urea to flooded rice. *Fertilizer Research* **41**(1), 59-66.
- Polacco J.C., Winkler R.G.** (1984). Soybean leaf urease - a seed enzyme. *Plant Physiology* **74**, 800-803.
- Polacco J-C., Freyermuth S-K., Gerendás J., Cianzo S-R.** (1999). Soybean genes involved in nickel insertion into urease. *Journal of Experimental Botany* **50**(336), 1149-1156.
- Polacco J-C., Havir E-A.** (1979). Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 1707-1715.
- Polacco J-C., Holland M-A.** (1993). Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology* **145**, 65-103.
- Pourtau N., Jennings R., Pelzer E., Pallas J., Wingler A.** (2006). Effect of sugar induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**(3), 556-68.
- Powell S-J., Prosser J-I.** (1986). Effect of copper on inhibition by nitrapyrin of growth of *Nitrosomonas europaea*. *Current Microbiology* **14**, 177-179.
- Prasad R., Power J.** (1995). Nitrification inhibitors for agriculture, health and the environment. *Advances in Agronomy* **54**, 233-281.
- Pro D.** (2011). Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires. PhD thesis. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Renne, Université de Rennes, France.

Prasad R., Rajale G-B., Lakhdive B-A. (1971). Nitrification retarders and slow release nitrogen fertilizers. *Advance in Agronomy* **23**, 337-383.

Purnell M-P., Skopelitis D-S., Roubelakis-Angelakis K-A., Botella J-R. (2005). Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of β subunit levels. *Planta* **222**, 167-180.

Purnell M-P., Botella J-R. (2007). Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo. *Plant Physiology* **143**, 530-539.

-Q-

Quesada A., Leganés F., Fernández-Valiente E. (1997). Environmental factors controlling N_2 fixation in mediterranean rice fields. *Microbial Ecology* **34**, 39-48.

-R-

Rahmatullah M., Gill A., Wissemeier A-H., Steffens D. (2006). Phosphate availability from phosphate rock as related to nitrogen form and the nitrification inhibitor DMPP. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169**, 675-678.

Rathke G-W., Behrens T., Diepenbrock W. (2006) Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **117**, 80-108.

Raven J-A., Wollenweber B., Handley L-L. (1992). A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* **121**, 19-32.

Rawat S-R., Silim S-N., Kronzucker H-J., Siddiqi M-Y., Glass A-D. (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.

Reddy D-D., Sharma K-L. (2000). Effect of amending urea fertilizer with chemical additives on ammonia volatilization loss and nitrogen-use efficiency. *Biology and Fertility of Soils* **32**, 24-27.

Rennenberg H., Wildhagen H., Ehling B. (2010). Nitrogen nutrition of poplar trees. *Plant Biology* **12**(2), 275-291.

Rhodes D., Brunk O-G., Magalhaes J-R. (1989). Assimilation of ammonium by glutamate dehydrogenase? In TE Poulten, JT Romeo, EE Conn, Eds, Recent Advances in Phytochemistry. Plenum Press, New York, pp 191-226.

Robinson L-C., Hubbard E-J., Graves P-R., DePaoli-Roach A-A., Roach P-J., Kung C., Haas D-W., Hagedorn C-H., Goebel M., Culbertson M-R. (1992). Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 28-32.

Rosenthal G.A. (2001). 1-canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical, *Amino Acids* **2**, 319-330.

-S-

Sahrawat K-L. (1980b). Control of urea hydrolysis and nitrification in soil by chemicals Prospects and problems. *Plant and Soil* **57** (2-3) 335-352.

Sahrawat K-L., Keeney D-R. (1985). Perspectives for research on development of nitrification inhibitors. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **16**, 517-524.

Salsac L., Chaillou S., Morot-Gaudry J-F., Lesaint C., Jolivet E. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**, 805-812.

San Francisco S., Urrutia O., Martin V., Peristeropoulos A., Garcia-Mina J-M. (2011). Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**(9), 1569-75.

Sarker A-N., Jones R-G-W. (1982). Effect of rhizosphere pH on the availability and uptake of Fe, Mn and Zn. *Plant and Soil* **66**, 361-372.

Schwab G-J., Murdock L-W. (2010). Enhanced-Efficiency Nitrogen Fertilizer for Corn and Wheat Production. IFA International Conference on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Miami, International Fertilizer Industry Association, Paris, France.

Sechley K-A., Yamaya T., Oaks A. (1992). Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *International Review of Cytology* **134**, 85-163.

Shaviv A. (2005). Controlled release fertilizers. In « IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers », Frankfurt, Germany, 2830. June 2005.

Skopelitis D-S., Paranychiankis N-V., Kouvarakis A., Spyros A., Stephanou E-G., Roubelakis-Angelakis K-A. (2007). The isoenzyme 7 of tobacco NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activity. *Plant Physiology* **145**, 1726-1734.

Skopelitis D-S., Paranychiankis N-V., Paschalidis K-A., Plianokis E-D., Delis I-D., Yakoumakis D-I., et al. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenase to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* **18**, 2767-2781.

Slangen J., Kerkhoff P. (1984). Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: A literature review. *Fertility Research* **5**, 1-76.

Slocum R-D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 729-745.

- Smil V.** (2001). Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. The MIT Press, Cambridge, MS, London.
- Smith K-A., McTaggart I-P., and Tsuruta H.** (1997). Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use and Management* **13**, 296-304.
- 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 C-C., RoebG-W., Udvardi M.** (2002). Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology* **130**, 1788-1796.
- Somerville C-R., Ogren W-L.** (1980). Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**, 257-259.
- Soriano A., Colpas G.J., Hausinger R.P.** (2000). UreE stimulation of GTP dependent urease activation in the UreD-UreF-UreG-urease apoprotein complex, *Biochemistry-US* **39**, 12435-12440.
- Soriano A., Hausinger R-P.** (1999). GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11140-11144.
- Soto G., Fox R., Ayub N., et al.** (2010). TIP5;1 is an aquaporin specifically targeted to pollen mitochondria and is likely involved in nitrogen remobilization in *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of Plant*, ahead of print.
- Stebbins N., Holland M-A., Cianzio S-R., Polacco J-C.** (1991). Genetic test of the roles of the embryonic urease of soybean. *Plant Physiology* **97**, 1004-1010.
- Stebbins N., Polacco J-C.** (1995) Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology* **109**, 169-175.
- Stevenson F-J., Cole M-A.** (1999). Cycles of soil. 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc. New York USA, 164-173.
- Subbarao G-V., Sahrawat, K-L., Berry W-L., Nakahara K., Ishikawa T., Watanabe T., Suenaga K., Rondon M., Rao I-M.** (2006). Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems - Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 302-335.
- Subbaraoa G-V., Nakaharaa K., Hurtadob M-P., Onoc H., Moretab D-E., Salcedob A-F., Yoshihashia A-T., Ishikawaa T., Ishitanib M., Ohnishi-Kameyamac M., Yoshidac M., Rondonb M., Raob I-M., Lascanob C-E., Berryf W-L., Itoa O.** (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106.**, 17302-17307.

- Sutton M-A., Lee D-S., Dollard G-J., Fowler D.** (1998). International conference on atmospheric ammonia: emission, deposition and environmental impacts. *Atmospheric Environment* **32**, 1-593.
- Suzuki A., Gadal P.** (1984). Glutamate synthase : physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms. *Physiologie végétale* **22**, 471-486.
- Suzuki I., Dular U., Kwok S-C.** (1974). Ammonia and ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas* cells and extracts. *Journal of Bacteriology* **176**, 6623-6630.

-T-

- Tan X-W., Ikeda H., Oda M.** (2000). The absorption, translocation, and assimilation of urea, nitrate and ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. *Scientia Horticultura* **84**, 275-283.
- Tercé-Laforgue T., Dubois F., Ferrario-Méry S., Pou de Crezenzo M-A., Sangwan R., Hirel B.** (2004). Glutamate dehydrogenase of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) 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.
- Terman G-L.** (1979). Volatilization losses of nitrogen as ammonia from surface applied fertilizers, organic amendments, and crop residues. *Advances in Agronomy* **31**, 189-223.
- Thompson J-F.** (1980). Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. In BJ Miflin, ed, *The Biochemistry of Plants*, Vol5. Academic Press, New York, pp 375-402.
- Tobin A-K., Yamaya T.** (2001). Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal of Experimental Botany* **52**, 591-604.
- Todd C.D., Tipton P.A., Blevins D.G., et al.** (2006). Update on ureide degradation in legumes, *Journal of Experimental Botany* **57**, 5-12.
- Torisky R-S., Griffin J-D., Yenofsky R-L., Polacco J-C.** (1994). A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Molecular and General Genetics* **242**, 404-414.
- Trenkel M-E.** (1997). Improving Fertilizer Use Efficiency-controlled Release and Stabilized Fertilizers in Agriculture. International Fertilizer Industry Association (IFA), Paris, France.
- Trenkel M-E.** (2010). Slow- and controled-release and stabilized fertilizers. An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture; International fertilizer industry association.

- Trenkel M-E., Wichmann W., Kummer K-F.** (1988). New Challenges for the World Fertilizer Industry with Regard to Agriculture. IFA Agro-Economics Committee, Monte Carlo.
- Trueman L-J., Richardson A., Forde B-G.** (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* **175**, 223-231.
- Tsay Y-F., Schroeder J-I., Feldmann K-A., Crawford N-M.** (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.
- Turano F-J., Dashner R., Upadhyaya A., Caldwell C-R.** (1996) Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. *Plant Physiology* **112**, 1357-1364.

-V-

- Vanetten C-H., Kwolek W-F., Peters J-E, et al.** (1967). Plant seeds as protein sources for food or feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **15**, 1077-1089.
- Varel V.H., Nienaber J-A., Freetly H-C.** (1999). Conservation in cattle feedlot waste with urease inhibitors. *Journal of Animal Science* **77**, 1162-1168.
- Veldkamp E., Keller M.** (1997). Fertilizer-induced nitric oxide emissions from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **48**, 69-77.
- Vidmar J-J., Tagmount A., Cathala N., Touraine B., Davidian J-C-E.** (2000). Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **475**, 65-69.
- Vlek P-L-G., Carter M-F.** (1983). The effect of soil environment and fertilizer modifications on the rate of urea hydrolysis. *Soil Science* **136**, 56-63.
- Volk R-J., Chaillou S., Mariotti A., Morot-Gaudry J-F.** (1992). Beneficial effects of concurrent ammonium and nitrate nutrition on the growth of *Phaseolus vulgaris*: a ¹⁵N study. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**, 487-493.
- von Rheinbaben W.** (1990). Nitrogen losses from agricultural soils through denitrification - a critical evaluation. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **153**, 157-166.

-W-

- Walker C-D., Graham R-D., Madison J-T., Cary E-E., Welch R-M.** (1985). Effects of nickel deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Physiology* **79**, 474-479.

- Wang W-H., Kohler B., Cao F-Q., Liu L-H.** (2008) Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* **175**, 467-477.
- Wang Z-P., Cleemput O., van and Baert L.** (1994). Movement of urea and its hydrolysis products as influenced by moisture content and urease inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* **22**, 1-20.
- Watson C-J.** (2005). Urease inhibitors. IFA International Workshop on Enhanced- Efficiency Fertilizers, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.
- Watson C-J., Akhonzada N-A., Hamilton J-T-G., Matthews D-I.** (2008). Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Use and Management*. **12**, 418-443.
- Watson C-J., Miller H.** (1996). Short-term effects of urea amended with the urease inhibitor N-(n-butyl)thiophosphoric triamide on perennial ryegrass. *Plant and Soil* **184**, 33-45.
- Watson C-J., Miller H., Poland P., Kilpatrick D-J., Allen M-D-B., Garrett M-K., Christianson C-B.** (1994). Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 1165-1171.
- Watson C-J., Poland P., Miller H., Allen M-D-B., Garrett M-K. Christianson C-B.** (1994b). Agronomic assessment and ¹⁵N recovery of urea amended with the urease inhibitor nBTPT (N-(n.butyl)thiophosphoric triamide) for temperate grassland. *Plant and Soil*. **161**,167-177.
- Weber A., Gutser R., Michel H-J., Wozniak H., Chen G-X., Xu H. Niclas H-J.** (2004a). Dicyandiamide and 1H-1,2,4-Triazole - a new effective nitrification inhibitor for reducing nitrous oxide emissions from cultivated land. In: A. Weiske: Greenhouse Gas Emissions from Agriculture - Mitigation Options and Strategies, Proceedings, International Conference, February 10-12, 2004, Leipzig, Germany, pp. 273-275.
- Weiske A., Benckiser G., Herbert T., Ottow J-C-G.** (2001). Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 109-117.
- Wiesler F.** (1998). Comparative assessment of the efficacy of various nitrogen fertilizers. *Journal of Crop Production* **1**, 81-114.
- Winkler R-G., Blevins D-G., Polacco J-C., et al.** (1988). Ureide catabolism in nitrogenfixing legumes, *Trends in Biochemical Sciences* **13**, 97-100.
- Witte C-P.** (2001). Modifying nitrogen use efficiency: molecular manipulation of urea metabolism in leaves of *Solanum tuberosum*. PhD thesis. Scottish Crop Research Institute, University of Dundee, Dundee, UK.
- Witte C-P.** (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science* **180**, 431-438.

Witte C-P., Isidore E., Tiller S-A., Davies H-V., Taylor M-A. (2001). Functional characterization of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant Molecular Biology* **45**, 169-179.

Witte CP., Medina-Escobar N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry* **290**, 102-7.

Witte C-P., Tiller S-A., Taylor M-A., Davies H-V. (2002) Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ^{15}N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiology* **128**, 1129-1136.

Witte C-P., Rosso M-G., Romeis T. (2005). Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 1155-1162.

-X-

Xiaobin W., Jingfeng X., Grant C-A., Bailey L-D. (1994). Effects of placement of urea with a urease inhibitor on seedling emergence, N uptake and dry matter yield of wheat. *Canadian Journal of Soil Science*, short communication, 449-452.

Xu X., Zhou L., Van Cleemput O., Wang Z. (2000). Fate of urea- ^{15}N in a soil-wheat system as influenced by urease inhibitor hydroquinone and nitrification inhibitor dicyandiamide. *Plant and Soil* **220**, 261-270.

-Y-

Yamaya T., Oaks A., Rhodes D., Matsumoto H. (1986). Synthesis of [^{15}N] glutamate from [2- ^{15}N] glutamate and [^{15}N] glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots. *Plant Physiology* **81**, 754-757.

Yuan L., Loqué D., Ye F., Frommer W-B., Von Wirén N. (2007) Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology* **143**, 732-744.

-Z-

Zacheri B., Amberger A. (1990). Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertilizer Research* **22**, 37-44.

Zakir H-A-K-M, Subbarao G-V, Pearse S-J., Gopalakrishnan S., Ito O., Ishikawa T., Kawano N., Nakahara K., Yoshihashi T., Ono H., Yoshida M. (2008). Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *New Phytologist* **180**, 442-451.

- Zaman M., Nguyen M-L., Blennerhassett J-D., Quin B-F.** (2008) Reducing NH₃, N₂O and NO₃⁻-N losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental S-amended nitrogenous fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* **44**, 693-705.
- Zerulla W., Barth Th., Dressel J., Erhardt K., Horchler von Locquenghien K., Pasda G., Rädle M., Wissemeier A-H.** (2001a). 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 79-84.
- Zerulla W., Pasda G., Hähndel R., Wissemeier A-H.** (2001b). The new nitrification inhibitor DMPP (Entec®) for use in agricultural and horticultural crops - an overview. In: *Plant Nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. W.J. Horst *et al.* (eds.) pp 754-755.
- Zhengping W., Cleemput O., Baert L.** (1991). Movement of urea and its hydrolysis products as influenced by moisture content and urease inhibitors. *Biology and fertility of soils* **22**, 101-108.
- Zhengping W., Van Cleemput O., Liantie L., Baert L.** (1991). Effect urease inhibitors on urea hydrolysis and ammonia volatilization. *Biology and Fertility of Soils* **11**, 43-47.
- Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J-J., Glass A-D.** (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (AtNrt2;1) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Plant* **17**, 563-568.
- Zilliox L., Schenck C., Kobus H., Huwe B.** (1990). Pollution par les nitrates: quels remèdes? *Supplément la Recherche*, **227**, 18-21.
- Zonia L-E., Stebbins N-E., Polacco J-C.** (1995). Essential role of urease in germination of nitrogen limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiology* **107**, 1097-1103.