

## CHAPITRE XIX

### VARIATIONS SOUS CONTRAINTE HYDRIQUE DE LA TENEUR EN ACIDES AMINÉS LIBRES FOLIAIRES DU MIL

C. MOULINEAU

DPVE, Centre d'Études de Cadarache  
13108 Saint Paul Lez Durance, Cedex

L'analyse des acides aminés libres foliaires a permis d'établir une relation entre la résistance à la contrainte hydrique et les modifications du métabolisme azoté chez deux populations de mil (HKP et IC 30). L'acide aminé majoritaire dans les plantes témoins est l'alanine. La contrainte hydrique s'accompagne d'une diminution de la teneur en alanine et d'une augmentation de la teneur en proline. Ces phénomènes sont exacerbés dans le cas de plantes cultivées en conditions contrôlées par rapport aux plantes cultivées sur le terrain. Les deux populations possèdent des réponses à la contrainte hydrique assez semblables. La compensation entre l'accumulation et la disparition d'acides aminés en relation avec la diminution du contenu relatif en eau des plantes explique, en partie, le faible ajustement osmotique observé chez le mil.

#### I - INTRODUCTION

Lors d'une contrainte hydrique, des modifications de la morphologie, de la physiologie et du métabolisme d'une plante sont observées. Les phénomènes réactionnels (Chevone *et al.*, 1990 ; Chapin, 1991) apparaissent suivant un ordre chronologique précis (Hsiao, 1973). Ils ont été classés (Turner, 1986) dans trois grands groupes : (i) évitement de la sécheresse, (ii) évitement ou retardement de la déshydratation et (iii) tolérance à la déshydratation.

Lorsque le potentiel hydrique d'une plante diminue, l'accumulation de solutés provoque la baisse du potentiel osmotique et permet le maintien de la pression de turgescence des cellules. Cette accumulation rend compte de modifications importantes du métabolisme. Les solutés accumulés sont de natures diverses : des ions (potassium), des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), des acides organiques (malate, pyruvate), des polyols (sorbitol, glycérol) et des composés du métabolisme azoté (amines, acides aminés libres). Leur contribution à l'osmolarité cellulaire dépend de leur nature et du taxon étudié (Morgan, 1992 ; Premachandra et Joly, 1992).

L'étude du métabolisme azoté d'une plante soumise à une contrainte hydrique montre une accumulation globale d'acides aminés, mais la teneur de chaque acide aminé pris séparément n'augmente pas systématiquement. Leur variation (accumulation de proline, glutamine, asparagine et glycine-bétaïne souvent décrite) dépend de la nature du stress appliqué et du taxon étudié (Jones *et al.*, 1980 ; Belanger *et al.*, 1990 ; Ranieri *et al.*, 1989). La proline est considérée comme un indicateur métabolique de contrainte. Il est non spécifique (contrainte hydrique ou thermique, salinité du sol). Lors d'une contrainte

hydrique, la proline interviendrait comme régulateur osmotique et permettrait la protection des structures membranaires contre la déshydratation. Elle constitue aussi un moyen de stockage de carbone réduit et d'azote pendant le stress (Stewart *et al.*, 1966). Cependant son rôle paraît mal défini car l'accumulation de proline ne pourrait être qu'un simple symptôme de souffrance de la plante (Hanson *et al.*, 1977), comme c'est le cas pour l'orge.

Le mil, *Pennisetum glaucum*, occupe des biotopes très contraignants où se pose le problème de la sécurité alimentaire des populations. Cette céréale peut croître entre les isohyètes 125 et 900 mm (Ferraris, 1974). En culture traditionnelle le rendement en grain est faible (inférieur à 500 kg/ha). L'amélioration de la résistance du mil aux contraintes environnementales devient une priorité. Elle passe par la connaissance de ses processus adaptatifs à la sécheresse, qui est la contrainte majeure. Le mil est allogame et son importante variabilité intracultivar peut parfois dépasser les écarts entre cultivars. Il en résulte une grande difficulté dans la fixation des génotypes. Les travaux déjà entrepris sur cette plante ne montrent pas de différences significatives du point de vue physiologique. La connaissance au niveau métabolique de la résistance à la sécheresse du mil reste peu explorée.

Afin d'étudier la liaison entre la résistance du mil à la sécheresse et les modifications du métabolisme azoté, l'analyse des acides aminés libres foliaires est réalisée en relation avec les paramètres hydriques.

## II - MATERIEL ET METHODE

◦ L'étude porte sur la population HKP, cultivée traditionnellement dans la région de NIAMEY (Niger), et la population ICMV IS 86330, notée IC 30. Ces deux populations sont choisies en fonction de leur éloignement génétique et pour leur différence de production relative en condition de contrainte hydrique de fin de cycle, observée au cours des années précédentes.

◦ Au laboratoire, les plantes se développent dans une chambre de culture (photopériode : 12h ; éclairage de  $500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à 28°C, humidité relative 60 % ; obscurité, à 22°C, humidité relative 80 %). Les plantes sont cultivées sur du sable et arrosées plusieurs fois par jour avec une solution nutritive (Siband, 1981). La contrainte hydrique est obtenue par un arrêt de l'irrigation pendant deux jours.

De plus, un essai agronomique en contre-saison chaude, à Niamey, Niger, a permis l'étude de matériel végétal cultivé sur le terrain. Les plantes, cultivées sur des parcelles irriguées jusqu'au stade post-épiaison, ont été soit soumises à une contrainte hydrique à partir du 63<sup>ème</sup> jour, soit maintenues sous irrigation (témoins).

◦ Au laboratoire, le matériel végétal est prélevé 70 jours après semis, au stade post-épiaison. Les prélèvements sont réalisés sur la partie médiane de la feuille (10 cm<sup>2</sup> excepté la nervure centrale), située sur l'étage 4 à partir de l'apex. Après fixation dans l'azote liquide, ils sont traités immédiatement. Chacun d'entre eux correspond à une plante.

Sur le terrain, les prélèvements sont réalisés dans des conditions comparables, 63, 70 et 75 jours après émergence. Le matériel végétal est alors fixé dans l'azote liquide. Cependant, lors du premier prélèvement (63 jours après émergence) les morceaux de feuille n'ont pas été fixés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été lyophilisés avant expédition. Chacun d'entre eux correspond à la moyenne de 8 brins épiés.

Dans les deux cas, le contenu relatif en eau, noté RWC (Relative Water Content), est systématiquement déterminé lors d'un prélèvement.

• Au laboratoire, chaque échantillon (frais ou lyophilisé) est broyé en présence d'azote liquide, de 2,5 ml d'eau additionnée d'acide chlorhydrique (pH 3,4), puis de 2,5 ml de chloroforme. Le broyat, conservé à 4°C pendant 18 heures, est centrifugé à 4000 tours/min pendant 9 minutes. Le surnageant est filtré et congelé à -18°C.

La teneur de chaque acide aminé est déterminée après dérivation, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La dérivation des acides aminés par l'accrochage du groupe phénylisocarbamyl permet leur détection lors de l'analyse en lumière UV à 254 nm. Cette dérivation est effectuée sur 20 et 40 µl de filtrat après ajout d'une quantité connue de norleucine (étalon interne, acide aminé naturellement absent dans les plantes) et après séchage, en milieu basique. Les échantillons dérivés sont lyophilisés et conservés à sec, à -18°C, jusqu'à leur analyse.

La séparation et l'analyse des phénylthiocarbamyl (pct) amino-acides nécessite un équipement d'HPLC (PHILIPS) qui comprend : un passeur d'échantillons réfrigéré à 4°C, une boucle d'injection (20 µl), un injecteur automatique, deux pompes à haute pression, une précolonne (MERCK : référence 50962.0001) et une colonne de 12,5 cm de type C18 phase inverse (MERCK : référence 16855.0001) placées dans un four à 38°C, et un détecteur UV-visible. L'intégration de la surface des pics est réalisée par un programme informatique sur un micro-ordinateur compatible.

### III - RESULTATS

#### A - Etude des plantes cultivées en conditions contrôlées

##### 1) Comparaison pour HKP et IC 30 des teneurs en acides aminés des plantes témoins

La composition en acides aminés libres foliaires de plantes témoins, cultivées en conditions contrôlées, est comparée pour les populations HKP et IC 30 (figure 1). Chaque valeur correspond à la moyenne des mesures réalisées sur trois plantes. Pour chaque acide aminé, les teneurs mesurées pour la population IC 30 sont légèrement supérieures (acide glutamique en particulier). Les résultats montrent que l'alanine est l'acide aminé majoritaire (teneur supérieure à 20 µmol/g MS). La teneur en acide glutamique est voisine de 15 µmol/g MS et celle de l'acide aspartique proche de 10 µmol/g MS. Les autres acides aminés sont plus faiblement représentés (teneur égale ou inférieure à 5 µmol/g MS).

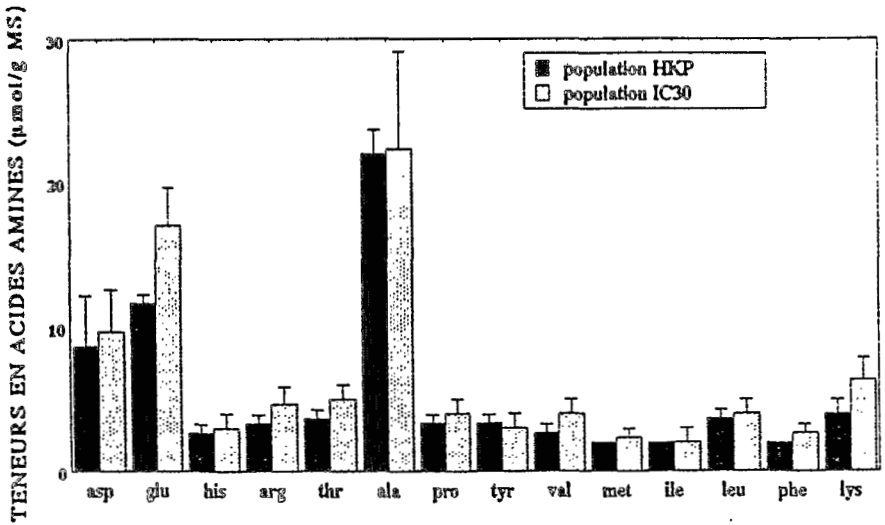


Figure 1

Comparaison des teneurs en acides aminés pour les plantes témoins des populations *HKP* et *IC 30*. Les plantes sont cultivées en conditions contrôlées. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne des valeurs obtenues après l'analyse de trois plantes. Les prélèvements ont été réalisés 70 jours après semis.

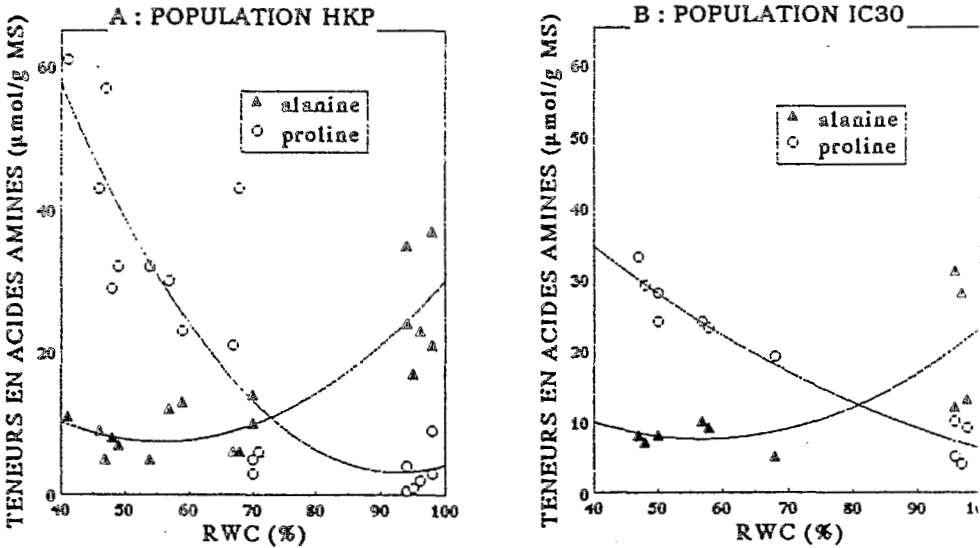


Figure 2

Comparaison de l'évolution des teneurs en proline et en alanine en fonction du contenu relatif en eau. Figure 2A : Population *HKP*. Figure 2B : population *IC 30*. Chaque point correspond à la mesure de la teneur en alanine ou en proline d'une plante. Les prélèvements ont été réalisés 70 jours après semis.

## 2) Evolution des teneurs en alanine et en proline en fonction du contenu relatif en eau

L'alanine et la proline sont étudiées préférentiellement, en raison de leur évolution significative lors d'un stress, par rapport aux variations des teneurs des autres acides aminés (résultats non présentés). La figure 2 montre l'évolution des teneurs en alanine et en proline, de plantes cultivées en chambre de culture, en fonction de leur contenu relatif en eau. La figure 2A correspond à la population HKP, la figure 2B à la population IC 30. Chaque point des diagrammes rend compte d'un dosage réalisé sur une plante. Pour les deux populations, lorsque le contenu relatif en eau diminue, une accumulation de proline et une disparition d'alanine sont observées. Au cours de la contrainte hydrique, la proline devient l'acide aminé majoritaire pour des contenus relatifs en eau inférieur à 70%. Pour un même contenu relatif en eau de 50%, l'accumulation de proline est plus marquée pour la population HKP (la teneur est multipliée par 4 environ) que pour la population IC 30 (par 3 environ) ; la diminution de la teneur en alanine est analogue pour les deux populations (elle varie de 25 à 10  $\mu\text{mol/g MS}$ ).

## B - Etude des plantes cultivées sur le terrain

### 1) Comparaison entre HKP et IC 30 des teneurs en acides aminés des plantes témoins

Les résultats présentés figure 3A et 3B permettent de comparer pour HKP et IC 30, la teneur en acides aminés libres foliaires de plantes cultivées sur le terrain à NIAMEY. Cette teneur est semblable pour les deux populations tant du point de vue qualitatif que quantitatif. L'alanine est l'acide aminé majoritaire (teneurs comprises entre 10 et 20  $\mu\text{mol/g MS}$ ) pour les deux populations ; la teneur en alanine varie en fonction de la date de prélèvement. Les teneurs en acide aspartique et tyrosine (supérieures ou égales à 4  $\mu\text{mol/g MS}$ ), dominent celles des autres acides aminés étudiés (teneurs voisines de 2  $\mu\text{mol/g MS}$ ). Le contenu relatif en eau a diminué de 10 % entre le premier et le dernier prélèvement. Les prélèvements successifs permettent d'observer l'effet de la sénescence sur les teneurs en chaque acide aminé.

### 2) Evolution des teneurs en acides aminés lors d'une contrainte hydrique

Dans les feuilles, l'évolution du contenu relatif en eau est plus rapide pour les plantes HKP que pour IC 30 (figure 4A et 4B). Cependant la cinétique du stress appliqué est lente car l'évolution du contenu relatif en eau est faible entre le premier et le deuxième prélèvement. L'alanine reste l'acide aminé majoritaire lors de la contrainte hydrique. De même l'acide aspartique et la tyrosine ont des teneurs proches de 6  $\mu\text{mol/g MS}$ . La plupart des autres acides aminés ont des teneurs proches de 4  $\mu\text{mol/g MS}$  pour la population HKP et voisines de 2  $\mu\text{mol/g MS}$  pour IC 30. Lorsque la contrainte devient sévère (dernier prélèvement), la teneur en alanine diminue uniquement pour IC 30, tandis que la teneur en proline augmente très faiblement, seulement pour HKP.

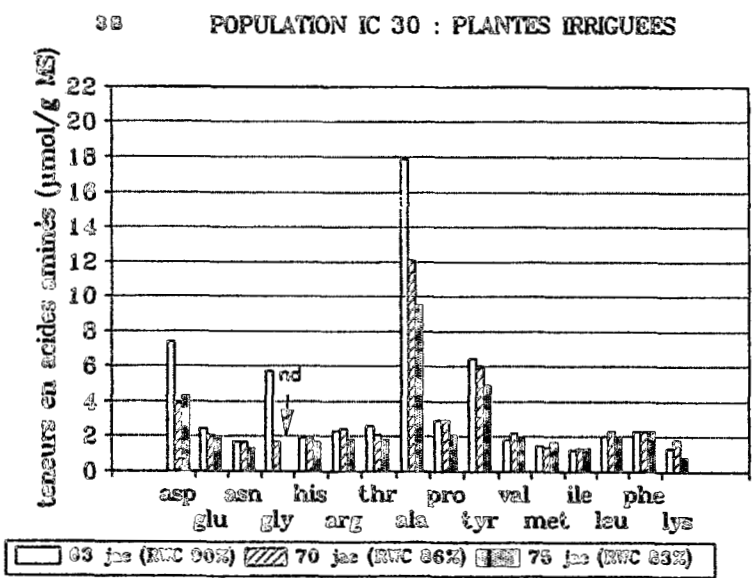
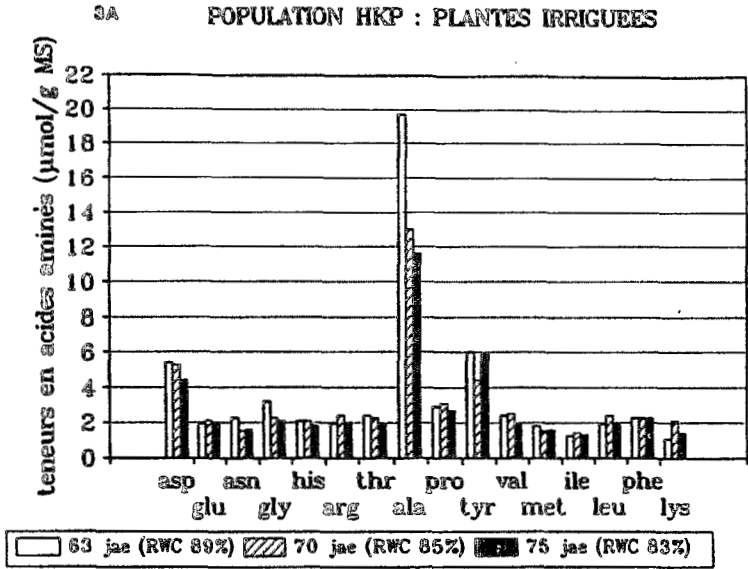


Figure 3

Comparaison des teneurs en acides aminés pour les plantes témoins cultivées sur le terrain. Chaque barre de l'histogramme correspond à la mesure de la teneur en acide aminé réalisée sur huit brins épiés. "jae" : jours après émergence. Figure 3A : population HKP. Figure 3B : population IC 30.

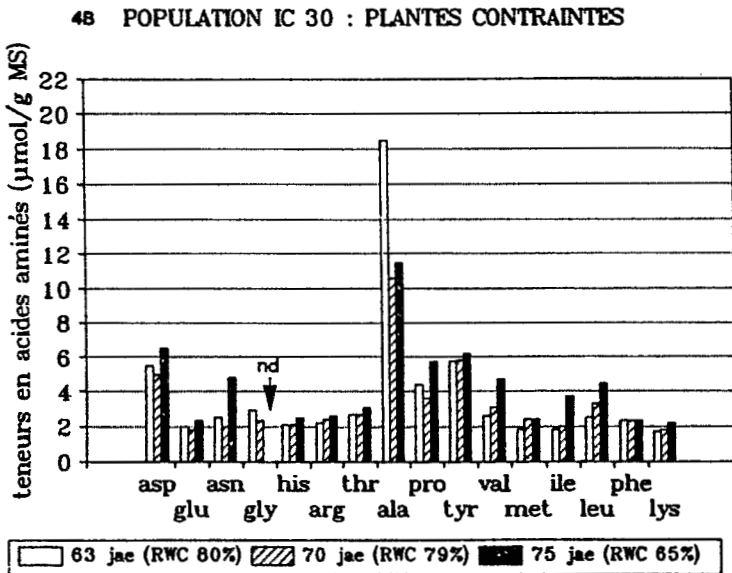
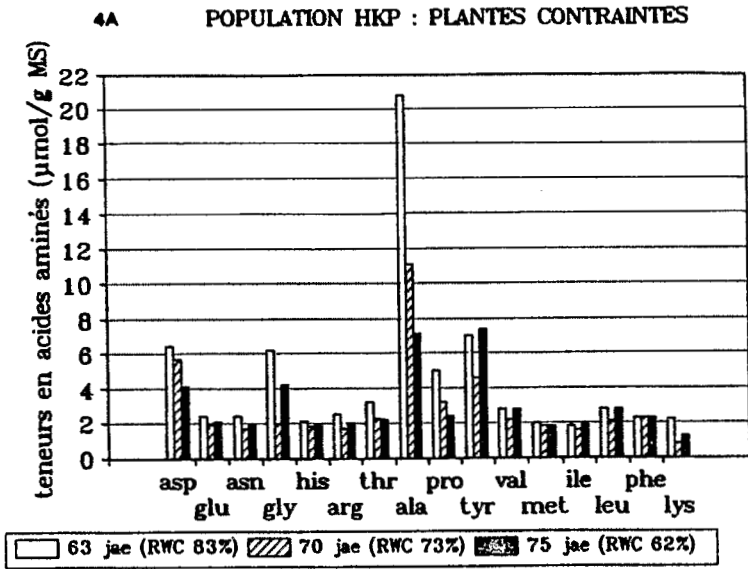


Figure 4

Comparaison des teneurs en acides aminés pour des plantes cultivées sur le terrain et soumises à une contrainte hydrique 63 jours après émergence (jae). Chaque barre de l'histogramme correspond à la mesure des teneurs en acides aminés de 8 brins épiés. "nd" : non déterminé.

Figure 4A : population HKP. Figure 4B : population IC 30.

#### IV - DISCUSSION

La composition en acides aminés est similaire pour les plantes témoins des deux populations, HKP et IC 30, cultivées en chambre de culture. L'analyse des teneurs en acides aminés de plantes cultivées au champ, sur des parcelles irriguées, révèle encore l'analogie de composition pour ces deux populations. La comparaison de la figure 1 et de la figure 3 met en évidence l'influence du mode culture des plantes témoins, au champ à Niamey, ou en chambre de culture sur les paramètres étudiés. Les plantes du terrain possèdent des teneurs en acides aminés en général deux fois plus faibles que les plantes cultivées en chambre de culture, si on considère les deux derniers prélèvements réalisés sur le terrain. Cette différence peut être expliquée par une nutrition minérale azotée plus faible sur le terrain. La teneur en acide glutamique est au moins cinq fois plus faible dans les échantillons nigériens alors que leur teneur en acide aspartique est environ deux fois plus forte. Dans les deux cas, l'alanine est l'acide aminé majoritaire (teneur toujours supérieure à  $9 \mu\text{mol/g MS}$ ) et la proline est minoritaire (teneur comprise entre 2 et  $5 \mu\text{mol/g MS}$ ). La teneur en alanine est cependant toujours inférieure dans les plantes en provenance de Niamey.

Les prélèvements successifs réalisés à Niamey permettent une évaluation de l'effet de la sénescence sur la teneur en acides aminés, pour les plantes témoins. Cependant, il se peut que l'excès de la valeur correspondant au premier prélèvement (63 jours après émergence) soit dû à l'absence de fixation du matériel végétal dans l'azote liquide. Une surévaluation de la teneur en acides aminés par protéolyse est possible : la fixation a pour but de bloquer ce type de réaction enzymatique. Entre le 63<sup>ème</sup> et le 70<sup>ème</sup> jour, les diminutions de la teneur en alanine (HKP et IC 30), glycine et acide aspartique (IC 30), ne sont pas seulement imputables à la sénescence des plantes. En conséquence, l'effet de la sénescence n'est observable qu'entre le deuxième et le troisième prélèvement. Les teneurs en acides aminés ne varient pas significativement entre ces deux prélèvements.

La diminution du contenu relatif en eau des plantes cultivées en chambre de culture, s'accompagne d'une accumulation de proline. Pour des RWC compris entre 75 % et 100 %, la teneur en proline varie peu par rapport à la valeur initiale. L'accumulation de proline devient importante lorsque le contenu relatif en eau est inférieur à 70%. Cette accumulation est plus marquée pour la population HKP, c'est à dire pour la population possédant la teneur en proline la plus faible chez les plantes témoins.

L'observation de l'accumulation de proline lors d'un stress suffisamment sévère et lorsque sa teneur initiale est très basse a déjà été mise en évidence (Stewart *et al.*, 1966). En outre l'alanine, qui est en quantité très importante chez les témoins des deux populations, disparaît lors d'un stress hydrique. La diminution de la teneur en alanine pour un plant de mil contraint est importante. Ces phénomènes impliquent un changement de la proportion de l'alanine par rapport à la proline, qui devient alors l'acide aminé majoritaire. L'équilibre est obtenu pour des contenus relatifs en eau compris entre 70 % et 80 %.



L'analyse des échantillons de Niamey montre que la réponse à la contrainte hydrique des deux populations (HKP et IC 30) est peu importante et analogue. Les effets de la contrainte hydrique (augmentation de la teneur en proline et diminution de la teneur en alanine) sont parallèles à ceux observés dans le cas de plantes cultivées en chambre de culture, mais la réponse est plus faible. La faible différence des teneurs en alanine et en proline, entre les plantes témoins et contraintes, peut être expliquée par le fait que la valeur minimale de RWC atteinte sur le terrain est de 62 %, alors qu'en chambre de culture, elle est proche de 40 %. La contrainte obtenue sur le terrain est toutefois importante pour le mil, car elle engendre une perte de production de 50 %. Les très faibles évolutions des teneurs en alanine et en proline décrites sur le terrain pour les contenus relatifs en eau les plus faibles, ne sont pas contradictoires avec les réponses des plantes du laboratoire. Pour le niveau minimal de RWC, 62 %, les variations observées sur les plantes cultivées en conditions contrôlées ne sont pas maximales (figure 2).

L'évolution des teneurs en acides aminés au cours d'un stress est rapidement mise en évidence au laboratoire après seulement deux jours de contrainte hydrique. Le modèle de culture et le mode de contrainte appliqués ne sont pas le reflet du stress que peut subir une plante sur le terrain. L'amplification des phénomènes réactionnels obtenue par une contrainte plus prononcée (vitesse et amplitude), facilite leur mise en évidence. De plus, ce modèle permet de neutraliser les autres contraintes qui peuvent intervenir sur le terrain comme la chaleur, ou une mauvaise nutrition minérale (en particulier la nutrition azotée).

Les variations principales de teneurs en acides aminés chez le mil, provoquées par une contrainte hydrique, concernent la proline et l'alanine. Elles sont liées aux propriétés chimiques des acides aminés et aux modifications de leurs voies métaboliques de synthèse et de dégradation.

La proline est un marqueur de stress : la relation entre le stress hydrique et l'accumulation de cet acide aminé est établie depuis longtemps. La connaissance de la cinétique d'accumulation de la proline permet la caractérisation de la résistance des plantes à la sécheresse chez le cotonnier (Hubac et Viera Da Silva, 1980) et pour des plantes désertiques (Pourrat et Hubac, 1974). L'accumulation de proline, lors d'une contrainte sévère en conditions contrôlées, pourrait constituer un outil de sélection de différentes populations de mil. Cependant, l'application de cette relation n'est pas systématique et le rôle de la proline est controversé dans l'ajustement osmotique. Si la proline joue ce rôle, il serait donc nécessaire de connaître les processus métaboliques de cette accumulation qui peut être due en partie à l'augmentation de l'hydrolyse des protéines (Hubac et Viera Da Silva, 1980). L'inhibition de son oxydation en hydroxyproline décrite chez l'orge (Stewart *et al.*, 1977) ou bien une diminution de son incorporation dans les protéines peuvent être, aussi, partiellement responsables de cette accumulation. L'augmentation de la synthèse *de novo* à partir du glutamate par stimulation de la glutamate déshydrogénase a été mise en évidence chez le haricot (Jager et Meyer, 1977). Pour le mil, l'analyse de l'activité enzymatique dans les réactions biochimiques décrites sera nécessaire. Ces modifications interviennent pour des intensités de stress données, directement liées au temps d'exposition de la plante à ce stress et elle dépendent du taxon étudié.

L'alanine est un des acides aminés les plus simples parmi les acides aminés aliphatiques à chaîne carbonée. L'un de ses précurseurs, dans les voies métaboliques de synthèse *de novo* est l'acide aspartique. L'alanine est l'un des produits de la photosynthèse qui incorpore le plus rapidement de carbone marqué (Kennedy et Laetsch, 1973). Elle constitue une molécule "navette" des cellules périvasculaires vers celles du mésophylle, pour deux classes de plantes en C<sub>4</sub> ; cependant, le mil fait partie de la troisième classe, NADP-enzyme malique dépendante, où le pyruvate est la molécule intermédiaire (Lavergne *et al.*, 1985). Cet acide aminé moins étudié pourrait être aussi considéré comme un révélateur métabolique de l'état hydrique d'une plante. L'explication de la disparition de l'alanine devra alors être entreprise.

En conclusion, une accumulation de proline et une disparition d'alanine sont observables lorsque le mil est soumis à une contrainte hydrique quand il est cultivé en chambre de culture. Ces deux phénomènes sont liés à des valeurs de contenu relatif en eau correspondant à des contraintes sévères, obtenues essentiellement en conditions contrôlées. La proline et l'alanine peuvent être considérées comme marqueurs de stress chez le mil. En vue de la sélection de cultivars résistants à la contrainte hydrique, une autre perspective est d'augmenter les connaissances sur le contrôle des modifications du métabolisme azoté en choisissant des cultivars possédant des réponses suffisamment éloignées vis à vis de la contrainte hydrique.

### Remerciements

Je voudrais remercier Monsieur J.F. Bois pour l'appui scientifique et les conseils qu'il a pu me donner lors de la réalisation de ce travail, mais aussi Monsieur J. Chanut, Madame S. Doulbeau, Monsieur B. Marin, et Mademoiselle M.C. Thibaud pour leurs aides techniques dans les expérimentations en chromatographie liquide à haute performance. Mes remerciements vont aussi à F. Do et T. Winkel qui ont réalisé les prélèvements sur le terrain.

### BIBLIOGRAPHIE

- BELANGER (R.R.), MANION (P.D.) and GRIFFIN (D.H.), 1990. Amino acid content of water-stressed plantlets of *Populus tremuloides* clones in relation to clonal susceptibility to *Hypoxyton mammatum* *in vitro*. Can. J. Bot. 68 : 26-29.
- CHAPIN (F.) S., 1991. Integrated responses of plants to stress. Biosciences 41 : 29-36.
- CHEVONE (B.D.), SEILER (J.R.), MELKONIAN (J.), and AMUNDSON (R.G.), 1990. Ozone-water stress interactions. In Stress responses in plants : adaptation and acclimatation mechanisms. WILEY-LISS, Inc., publication, ALSCHER R.G. and CUMMING J.R. Editors. Plant Biology 12 : pp. 395.

- FERRARIS (R.), 1973. Pearl millet (*Pennisetum typhoides*). Commonwealth Agricultural Bureau of pastures and field crops, reviews series 1/73.
- HANSON (A.D.), NELSON (C.E.), PEDERSON (A.R.) and EVERSON (E.H.), 1977. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Science* 17 : 489-493
- HSIAO (T.C.), 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24 : 519-570
- HUBAC (C.) et VIERA DA SILVA (J.), 1980. Indicateurs métaboliques de contrainte mésologiques. *Physiol. Vég.* 18 : 45-53.
- JAGER (H.J.) et MEYER (H.R.), 1977. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris*. *Oecologia* 30 ; 81-96.
- JONES (M.M.), OSMOND (C.B.) and TURNER (N.C.), 1980. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit. *Aust. J. Plant Physiol.* 7 : 193-205.
- KENNEDY (R.A.) and LAETSCH (W.M.), 1973. Relationship between leaf development and primary photosynthetic products in the C4 plant *Portulaca oleacea* L. *Planta* 115 : 113-124.
- LAVERGNE (D.), DROUX (M.), JACQUOT (J.P.), MIGINIAC-MASLOW (M.), CHAMPIGNY (M.L.) and GADAL (P.), 1985. Bundle-sheath thylakoids from NADP-malic enzyme-type C4 plants require an exogenous electron donor for enzyme light activation. *Planta* 166 : 187-193.
- MORGAN (J.M.), 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 19 : 67-76.
- POURRAT (Y.) et HUBAC (C.), 1974. Comparaison des mécanismes de la résistance à la sécheresse chez deux plantes désertiques : *Artemisia herba alba* et *Carex pachystylis*. *Physiol. Vég.* 12 : 135-147.
- PREMACHANDRA (G.S.) and JOLY (R.J.), 1992. Solutes contributing to osmotic potential in young versus mature leaves of cocoa seedlings. *J. Plant Physiol.* 139 : 355-360.
- RANIERI (A.), BERNARDI (R.), LANESE (P.) and SOLDATINI (G.F.), 1989. Changes in free amino acid content and protein pattern of maize seedlings under water stress. *Env. Exp. Bot.* 29 : 351-357.

- SIBAND (P.), 1981. Croissance, nutrition et production du mil (*Pennisetum typhoides* Hubbard et Stapf) essai d'analyse du fonctionnement du mil en zone sahélienne. Thèse de doctorat de 3ème cycle à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- STEWART (C.S.), MORRIS (C.J.), and THOMPSON (J.F.), 1966. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation ; II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. *Plant Physiol.* 41 : 1585-1590.
- STEWART (C.R.), BOGESS (S.F.), ASPINALL (D.) et PALEG (L.G.), 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59 : 930-932.
- TURNER (N.C.), 1986. Crop water deficits : a decade of progress. *Adv. Agron.* 39 : 1-51.