

Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*)

El Houssine TAHRI, Abdelmajid BELABED & Khadija SADKI

Mots-clés : Blé dur, *Triticum durum*, Proline, Chlorophylle, Glutamine synthétase, ARNm

الحسين الطاهري، عبدالمجيد بلعابد و خديجة صادقي

ملخص

أثر الضغط الأسموزي على كمية الحامض الأميني البرولين (Proline) و اليخضور (Chlorophylle) و ARNm- Poly (A+) المشفر لأنزيم GS (Glutamine synthétase) عند بعض أصناف القمح الصلب. ارتفاع الضغط الأسموزي بإضافة مادة PEG 6000 إلى محلول السقي أدى عند ثلاثة أصناف من القمح الصلب إلى ارتفاع في كميات أوراقها من البرولين بالموازاة مع انخفاض في كميتها من اليخضور و نشاط أنزيم GS و ARNm- Poly (A+) المشفرة له. هذه النتائج تظهر أن شبكة الأرنيتين Ornithine تكون هي المفضلة لتكوين حامض البرولين أثناء فترة الضغط الأسموزي.

RESUME

L'addition de polyéthylène glycol (PEG)(150 g.l⁻¹) au milieu nutritif provoque une accumulation de proline par les feuilles de trois variétés de blé dur (*Triticum durum*) : Tassaout, Cocorit et Acsad 65. Elle conduit, en revanche, à une diminution de leurs teneurs en pigments chlorophylliens. L'arrêt du stress permet un retour progressif aux valeurs initiales. L'application du stress est, par ailleurs, marquée chez les trois variétés par une baisse de leurs activités glutamine synthétase (GS), enzyme impliquée dans la biosynthèse du glutamate qui est un précurseur commun aux pigments chlorophylliens et à la proline. La biosynthèse des pigments chlorophylliens serait liée à l'activité GS tandis que la biosynthèse de la proline, et par la suite son accumulation, serait due à une voie différente (voie de l'ornithine par exemple). La diminution de l'activité GS, sous l'effet de la contrainte osmotique, paraît être due à une baisse du niveau des transcrits ARNm poly (A⁺).

ABSTRACT

Osmotic stress effect on levels of proline, chlorophyll and mRNA coding for glutamine synthetase in three hard wheat varieties (*Triticum durum*). The addition of polyethylene glycol (PEG)(150 g.l⁻¹) to the nutritive medium leads to the proline accumulation in leaves of three hard wheat varieties: Tassaout, Cocorit and Acsad 65. In contrast, it leads to the decrease of their chlorophyll pigments content. The stop of stress allows the progressive return to the initial values. The stress is, on the other hand, marked in all varieties by the decrease of their glutamine synthetase (GS) activities. Because this enzyme is involved in the control of glutamate which is the one of the proline and chlorophyll pigments precursor, the chlorophyll pigments biosynthesis may be linked to the activity of this enzyme but the proline biosynthesis may not. Other way may be involved: arginine – ornithine way for exemple. The decrease of the GS activity under osmotic stress conditions may be due to the decrease of the mRNA poly (A⁺) transcripts level.

INTRODUCTION

Face à l'augmentation des forces de rétention de l'eau dans un sol en cours de dessiccation, un ajustement osmotique peut se manifester, mais à des degrés variables, chez la plupart des végétaux. Les métabolites impliqués dans cet ajustement sont assez variés. De fortes accumulations en potassium et en nitrates ont été mises en évidence chez le blé (MUNNS & al., 1979) et chez le tournesol (JONES & al., 1980) respectivement. HUBAC & al. (1986) montrent l'existence d'une corrélation positive entre la capacité du coton à tolérer la dessiccation et sa

teneur en malate. Chez le soja, la teneur foliaire en saccharose contribuerait au maintien d'une pression osmotique élevée limitant les pertes d'eau par transpiration (BENSARI & al., 1990)

Des études menées sur l'osmorégulation indiquent que les acides aminés libres peuvent jouer un rôle significatif dans ce processus. JONES & al. (1980) rapportent que leur teneur augmente de façon très significative chez le sorgho et le tournesol en cas de stress hydrique. Parmi les acides aminés pouvant être accumulés, la proline représente l'une des manifestations les plus remarquables des stress

hydriques et osmotiques. Son rôle d'osmoticum a été rapporté par de nombreux auteurs (STEWART & LEE, 1974 ; KAUSS, 1977). Dès 1973, SINGH & al. proposent de l'utiliser comme critère de tolérance de l'orge à la sécheresse. Plusieurs sélectionneurs et physiologistes ont utilisé la capacité de son accumulation dans le criblage de génotypes résistants au déficit hydrique [BENLARABI & MONNEVEUX (1988) sur le blé dur, BELLINGER & al. (1989) sur le maïs], au froid [DORFLING & ASKMAN, (1989) sur le blé tendre] et à la salinité [HUBAC & VIEIRA DA SILVA (1980) chez *Artemisia herba alba*].

L'accumulation de la proline, induite par les stress, peut être le résultat de trois processus complémentaires : stimulation de sa synthèse (MORRIS & al., 1969 ; BOGGESS & al., 1976), inhibition de son oxydation (STEWART & al., 1977 ; RAYAPATI & STEWART, 1991) et/ou altération de

la biosynthèse des protéines (STEWART & al., 1977).

La proline serait synthétisée à partir de l'acide glutamique via l'acide 5 carboxylique 1 pyrroline (P5C) mais également via l'arginine et l'ornithine (LIGNOWSKI & SLITTSTOESSER, 1971) (Fig. 1).

Dans le présent travail, nous avons cherché à caractériser trois variétés de blé dur par leur capacité à accumuler de la proline sous la contrainte d'un stress osmotique. L'évolution des cinétiques d'accumulation de la proline a été comparée à celle des pigments chlorophylliens vu que les deux métabolites possèdent le glutamate comme précurseur commun (Fig. 1). Nous avons, par ailleurs, tenté de vérifier l'évolution de l'activité de la GS, enzyme impliquée, avec la glutamate synthase (GOGAT), dans le contrôle de la biosynthèse du glutamate (Fig. 1).

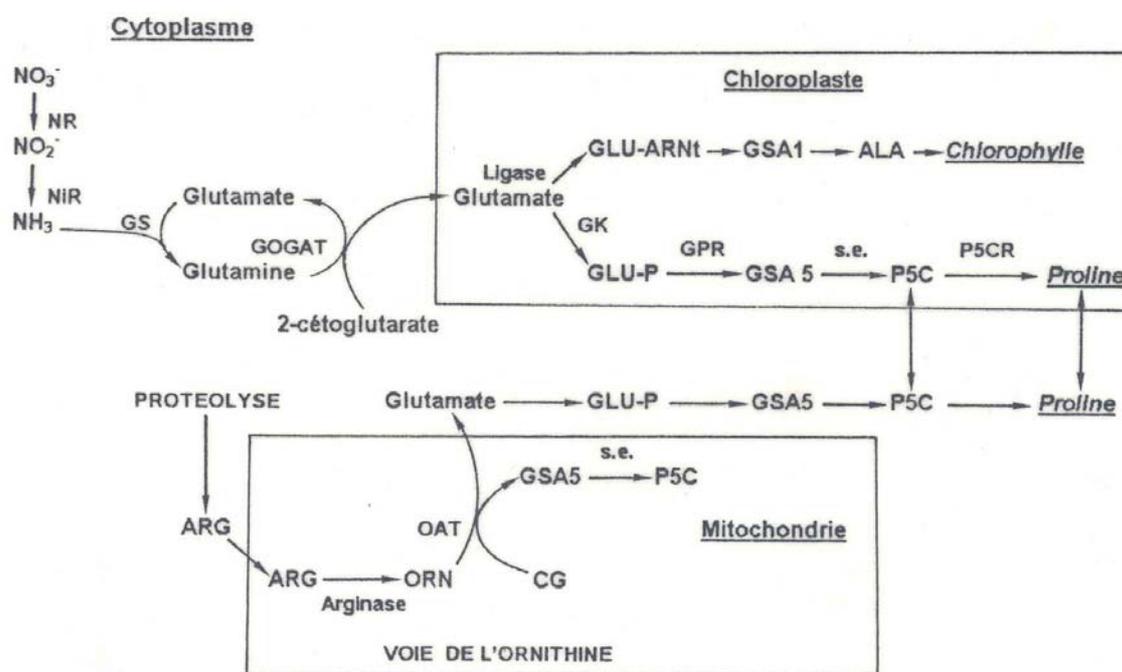


Figure 1 : Interconnexion des voies de biosynthèse de la chlorophylle et de la proline. ALA: Alanine, ARG: Arginine, CG: Cétoglutarate, GLU-P: Glutamyl phosphate, GLU-ARNt: Glutamyl-ARNt, GOGAT: Glutamate synthase, GS: Glutamine synthétase, GSA1: Glutamate 1-semialdéhyde, GSA5: Glutamate 5-semialdéhyde, ORN: Ornithine, P5C: Pyrroline 5-carboxylate, GK: Glutamyle Kinase, GPR: Glutamyle phosphate réductase, OAT: Ornithine-aminotransférase, P5CR: Pyrroline5-carboxylate réductase, NiR: Nitrite réductase, NR: Nitrate réductase, s.e: sans enzyme.

MATERIEL ET METHODES

OBTENTION DES PLANTULES

Les semences de 3 variétés de blé dur (Acsad 65, Tassaout et Cocorit) sont stérilisées, pendant 5 min, à

l'eau de javel (diluée 100 fois) puis rincées 3 fois à l'eau distillée. Après une imbibition de 2 h dans l'eau distillée, la mise en germination des semences a été réalisée pendant 3 jours sur papier filtre humidifié et placé dans des boîtes de pétri (diamètre

90 mm), à 20°C et à l'obscurité.

Les germinations obtenues sont placées, à raison de 6 plantules par pot, dans des pots de 500 ml remplis aux deux tiers par du sable inerte préalablement stérilisé. Le développement des plantules se poursuit dans une chambre de culture sous une photopériode de 15 h d'éclairage à 2100 lux (lampes Philips 40 W distantes de 1 m des plantules) à une température de l'ordre de 24°C. Un arrosage avec une solution nutritive complète (milieu de Heller) a été régulièrement effectué afin de maintenir le sable bien humide (EL HAFID & BELABED, 1994).

APPLICATION DU STRESS OSMOTIQUE

Les plantes, âgées de 3 semaines, sont transférées pendant 22 h sur milieu nutritif aéré et additionné de PEG 6000 (150 g.l⁻¹). Le PEG, utilisé comme osmoticum imperméant, permet d'obtenir des solutions hypertoniques. L'arrêt du stress a été réalisé par retour à la solution nutritive sans PEG.

DOSAGE DE LA PROLINE

La méthode utilisée est celle de MONNEVEUX & NEMMAR (1986). Cent mg (pour chaque essai) prélevés sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont immédiatement pesés puis placés dans un tube à essai. Un volume de 2 ml de méthanol à 40% est ajouté à l'échantillon et le tout est chauffé, pendant 1 h, dans un bain-marie à 85°C. Après refroidissement, 1 ml de la solution d'extraction est ajouté à 1 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 ml du mélange eau distillée-acide acétique-acide orthophosphorique de densité 1,7 (120, 300, 80: v / v / v). L'ensemble est porté à ébullition pendant 30 mn au bain-marie, puis refroidi et additionné de 5 ml de toluène. Après agitation au vortex, une pincée de Na₂SO₄ est ajoutée dans chaque tube.

DOSAGE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS

Cinquante mg (pour chaque essai) prélevés sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont broyés dans de l'acétone à 80%. Le broyage est répété plusieurs fois afin d'extraire la totalité des pigments chlorophylliens. L'extrait obtenu est centrifugé à 2500 g pendant 5 min. La DO de la totalité des surnageants obtenus est mesurée à 646,8 nm et à 663,2 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 5 U.V). Les concentrations en chlorophylles totales (Chlorophylles a et b), exprimées en mg. g⁻¹ MF sont données par la formule $7,15 \times DO_{646,8} + 18,71 \times$

$DO_{646,8} V / M$; où V désigne le volume de l'extrait total en litres et M la masse de la matière fraîche broyée en grammes.

DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE (GS)

Cinq cent mg (pour chaque essai), prélevés sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont broyés à 4°C en présence de 2,5 ml du tampon Tris- HCl 25 mM (pH 7,8) contenant de l'EDTA 1 mM, du MgCl₂ 1 mM et du β-mercaptoéthanol 0,1%. L'extrait est ensuite centrifugé, pendant 20 min, à 30 000 g (centrifugeuse Z 252 MK) et à 4°C.

L'activité de la GS est déterminée sur l'extrait brut. L'hydroxylamine (NH₂OH) est utilisée comme substitut à l'ion ammonium lors de la réaction enzymatique (O'NEAL & JOY, 1973). Le milieu réactionnel est composé de glutamate 80 mM, de MgCl₂ 20 mM, de NH₂OH 6 mM, d'EDTA 4 mM et d'ATP 8 mM. Après 30 min à 35°C, la réaction est arrêtée par addition de FeCl₃ (FeCl₃ 0,37 mM préparé dans un mélange d'acide trichloroacétique 0,2 M et d'acide chlorhydrique 0,6 M) qui, en présence de γ-glutamyl hydroxamate, donne un complexe coloré brun. Après centrifugation (15 000 g pendant 5 min à 4°C), l'absorbance du surnageant obtenu est lue à 540 nm et les quantités du produit de la réaction sont déterminées à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec des concentrations croissantes en γ-glutamyl hydroxamate.

EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN POLY (A⁺)

L'extraction des ARN est réalisée sur les plus jeunes feuilles et selon la méthode de MANIATIS & al. (1989). A partir des ARN totaux, nous avons procédé à l'isolement des ARN poly (A⁺) sur colonne de cellulose en suspension dans du NaOH 0,1 N. La colonne est lavée d'abord deux fois avec 12 ml de NaOH 0,1 N suivis de 12 ml de tampon oligo-dT «binding buffer». L'extrait foliaire est additionné de 8 ml de milieu tampon oligo-dT puis déposé sur la colonne. Quatre ml du tampon d'éluion (contenant les ARN poly (A⁺)) sont récupérés dans des tubes corex de 15 ml. Une précipitation des ARN poly (A⁺), pendant une nuit à -20°C, avec de l'acétate d'ammonium est ensuite provoquée. Le culot obtenu est séché au «speed vec» pendant 30 min puis repris ensuite avec 20 µl d'eau distillée stérilisée en présence de DEPC (inhibiteur des Rnases). Le dosage des ARN poly (A⁺) et ARNs est réalisé par mesure de la DO à 260 nm (1 unité .DO est égale à 40 µg d'ARN dans une cuve de 1 cm de trajet optique).

HYBRIDATION MOLECULAIRE ARN-ADN

Les ARN poly (A^+) sont mis à migrer sur gel d'agarose horizontal pendant 4 h à 100 V. Les ARN poly (A^+) sont ensuite transférés sur membranes de nitrocellulose (MANIATIS & al., 1989). Afin d'éviter toute fixation aspécifique de la sonde pGS 20, une préhybridation des ARN poly (A^+) a été effectuée (BELABED, 1992) Les membranes ont été alors placées dans un tampon de préhybridation constitué de 4 ml du tampon 5 XP, 14 ml d'eau distillée et stérilisée et 1,16 g de NaCl. Le mélange est incubé dans un bain marie à 60°C pendant 10 min. Deux ml de thymus de veau dénaturé au préalable sont ensuite ajoutés au milieu. La préhybridation dure 4 h à 65°C. L'hybridation, proprement dite, a été réalisée par addition de la sonde hétérologue radioactive (ADNc, Soja) au tampon de préhybridation. L'opération dure 15 h, à 45°C (conditions de faible stringence) et sous agitation. Les filtres sont rincés dans les conditions décrites par MANIATIS & al. (1989) puis posés sur un support solide en plastique recouvert de « Saran Warp » et mis en contact avec un film d'autoradiographie (Kodak) L'exposition est effectuée à -80°C en présence d'un écran amplificateur.

RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 2 montre l'évolution des teneurs en proline enregistrées pendant et après l'application du stress osmotique aux plantules des trois variétés de blé dur étudiées : Cocorit, Tassaout et Acsad 65. Les cinétiques obtenues sont relativement différentes. Les teneurs accumulées ne deviennent significatives qu'à partir d'une période de latence de 10 h environ. Après 22 h de stress, c'est la variété Cocorit qui enregistre les plus fortes teneurs. L'arrêt du stress permet un retour progressif aux valeurs initiales chez chacune des variétés étudiées.

L'accumulation de la proline a été démontrée chez de nombreuses espèces et dans différentes situations de stress (osmotiques, hydriques, thermiques) (BLUM & EBERCON, 1976 ; HUANG & CAVALIERI, 1979 ; HUBAC & VIERA DA SILVA, 1980 ; BELLINGER & al., 1989 ; DORFLING & ASKMAN, 1989 ; OBER & SHARP, 1994). Certains auteurs (SINGH & al., 1973) pensent que les quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance aux stress. La proline accumulée pourrait jouer un rôle d'osmoticum (STEWART & LEE, 1974 ; KAUSS, 1977). Elle pourrait, également, intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique (PESCI & BEFFAGNA, 1984) ou constituer une réserve d'azote utilisée par la plante postérieurement à la période du stress (TAL & ROSENTHAL, 1979).

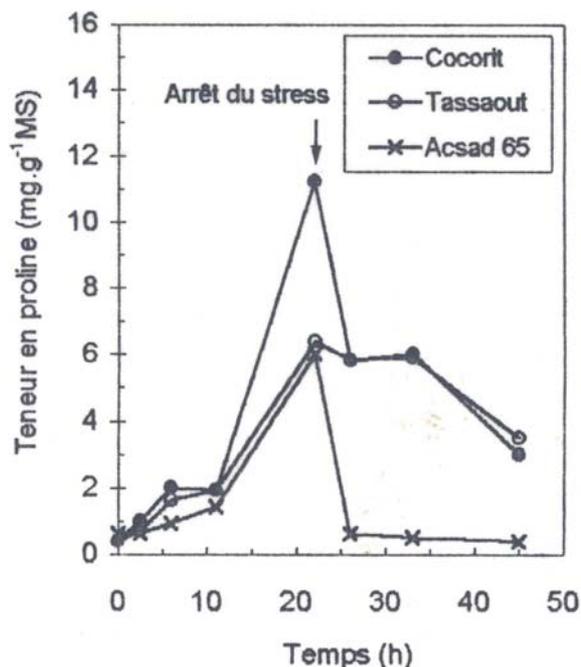


Figure 2 : Effet du stress osmotique sur la teneur en proline des feuilles des variétés Cocorit, Tassaout et Acsad 65. Le stress est provoqué par addition de PEG 6 000 (150 g.l⁻¹) au milieu de culture et son arrêt par retour au milieu de culture sans PEG. La teneur en proline des plantules témoins reste égale à celle enregistrée à t_0 .

Parallèlement à cette augmentation de la teneur en proline foliaire sous l'effet du stress, une baisse dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux (Chlorophylles a et b) a été, en revanche, enregistrée (Fig. 3). Cette diminution est plus marquée chez la variété Cocorit que chez les deux autres variétés. L'arrêt du stress permet un retour progressif aux teneurs initiales.

Les résultats illustrés sur les figures 2 et 3 montrent une certaine proportionnalité, mais inverse, entre les teneurs en proline accumulées et les teneurs en pigments chlorophylliens perdues par chacune des trois variétés. La variété qui accumule plus de proline est aussi celle qui connaît la plus forte diminution de ses teneurs en pigments chlorophylliens et *vice versa*.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une connexion vraisemblable entre les voies de biosynthèse des pigments chlorophylliens et de la proline. Une compétition entre ces deux composés sur leur précurseur commun, le glutamate, peut être à l'origine de cette évolution (BENGSTON & al., 1978 ; REDDY & VEERANJANEYULU, 1991).

L'étude de l'évolution de l'activité de la glutamine synthétase (GS) foliaire, réalisée parallèlement à celle de la proline et des pigments chlorophylliens,

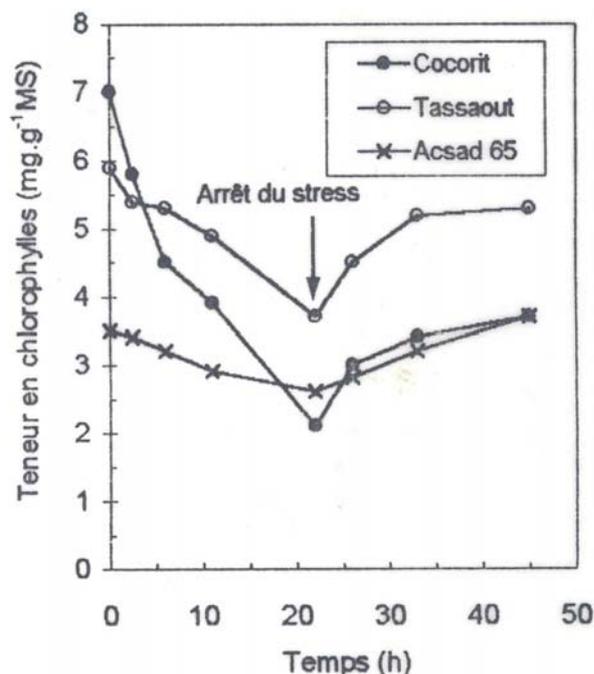


Figure 3 : Effet du stress osmotique sur la teneur en pigments chlorophylliens des variétés Cocorit, Tassaout et Acsad 65. Le stress est provoqué par addition de PEG 6000 (150 g.l⁻¹) au milieu de culture et son arrêt par retour au milieu de culture sans PEG. La teneur en chlorophylle des plantules témoins reste égale à celle enregistrée à t₀.

montre qu'elle est aussi affectée par l'addition du PEG au milieu de culture (Fig. 4) Les pertes en activité, enregistrées après 22 h de stress, sont de l'ordre de 49%, 24% et 14% chez les variétés Cocorit, Tassaout et Acsad respectivement. Un transfert des plantules dans la solution nutritive sans PEG permet un retour progressif aux activités initiales.

TAYLOR & al. (1982) ont rapporté que l'activité de la GS est relativement peu affectée par le stress hydrique. *Phaseolus vulgaris* enregistre une diminution de son activité GS suite à un apport de sel au milieu de culture (BOUCAULD & BILLARD, 1979). Les feuilles de soja mises à l'obscurité voient leur activité GS diminuer (TIRADO & al., 1990).

La baisse de l'activité de la GS semble être relativement proportionnelle à la baisse des teneurs en pigments chlorophylliens chez chacune des trois variétés étudiées (Figs. 2 et 4) et inversement proportionnelle aux teneurs de proline accumulée (Figs. 3 et 4). Ceci montre bien que la biosynthèse des pigments chlorophylliens serait, en toute vraisemblance, liée à l'activité GS. Ces pigments utiliseraient le glutamate produit notamment par cette enzyme. La proline utiliserait, cependant, le glutamate provenant d'autres

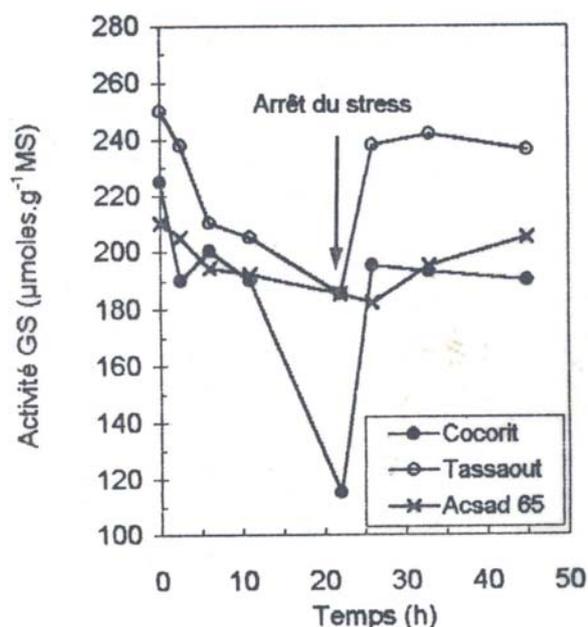


Figure 4 : Effet du stress osmotique sur l'activité de la glutamine synthétase (GS) des variétés Cocorit, Tassaout et Acsad 65. Le stress est provoqué par addition de PEG 6000 (150 g.l⁻¹) au milieu de culture et son arrêt par un retour au milieu de culture sans PEG. L'activité GS des plantules témoins reste égale à celle enregistrée à t₀.

voies, celle de l'ornithine par exemple. Selon STEWART & al. (1977), une altération de la biosynthèse des protéines serait, en partie, à l'origine de la proline accumulée. Le mécanisme impliqué peut faire intervenir la voie de l'ornithine (Fig. 1). STEWART & al. (1977) et RAYAPATI & STEWART (1991) pensent que l'accumulation de la proline, induite par les stress, peut être le résultat de l'inhibition de son oxydation.



Figure 5 : Autoradiographie de l'analyse par « northern blot » des ARNm poly (A⁺)-GS, après hybridation avec la sonde p-GS 20, des extraits de feuilles de plantules de blé dur traitées pendant 22 h par du PEG 6000 (150 g.l⁻¹). 1 μg d'ARN poly (A⁺) a été déposé sur le gel d'électrophorèse. Puits 1 : exemple de bandes obtenues chez les plantules témoins. Les puits 2, 3 et 4 correspondent, respectivement, aux bandes obtenues à partir d'extraits de feuilles des variétés Cocorit, Acsad 65 et Tassaout traitées au PEG.

La baisse de l'activité GS peut être liée à une baisse du niveau des transcrits des ARNm poly (A⁺) - GS sous l'effet du stress. La variété Tassaout semble être la plus affectée (Fig. 5). Selon PLATT & ANTHONY (1981) la diminution de l'activité GS a été attribuée à une diminution du niveau énergétique (ATP) due à une réduction de l'activité photosynthétique par le stress. Elle a été, également, associée

à une augmentation parallèle de l'activité de la glutamate déshydrogénase GDH (TIRADO & al., 1990). Cette enzyme jouant un rôle important dans l'assimilation de l'ammonium, en conditions de stress (LACUESTA & al., 1990), pourrait continuer à assurer la biosynthèse du glutamate et *a priori* celle de la proline.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELABED, A-M (1992). - *Contribution à l'étude de : 1) Electrophysiologie de l'absorption des ions nitrates chez les cellules libres d'Acer pseudoplatanus L.. 2) Régulation des gènes codant pour la glutamine synthétase cytosolique du Soja*. Thèse, Univ. Mohammed Premier, Oujda, Maroc, 258 p.
- BELLINGER, Y.; BENSOUAD, A. & LAHRER, P. (1989). - Physiological accumulation: a trait of use to breeding for stress tolerance. In ACEVEDO, CONESA, MONNEVEUX & SRIVASTAVA (Eds): Physiology-breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments. *Colloque n° 55*, July 3-6, 1989, Montpellier, France, pp. 449-458.
- BENGSTON, C.; KLOCKARE, B.; KLOCKARE, R.; LARSSON, S. & SUNDQUIST, C. (1978). - The after effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the level of abscisic acid and proline in dark grown wheat seedlings. *Plant Physiol.*, 43, pp. 205-212.
- BENLARABI, M. & MONNEVEUX, Ph. (1988). - Etude comparée du comportement en situation de déficit hydrique de deux variétés algériennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) adaptées à la sécheresse. *C.R. Acad. Agric. France.*, 74 (5), pp. 73-83.
- BENSARI, M.; CALMES, J. & VIALA, G. (1990). - Régulation du carbone fixé par photosynthèse entre l'amidon et le saccharose dans le feuillage de soja: Influence d'un déficit hydrique. *Plant. Physiol.. Biochem.*, 28 (1), pp. 113-121.
- BLUM, A. & EBERCON, A. (1976). - Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science*, 16, pp. 428-431.
- BOGGESE, S-F; ASPINALL, D.; & PALEG, L-G. (1976). - Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline synthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3, pp. 513-525.
- BOUCAUD, J.; & BILLARD, P. (1979). - Etude comparée des activités glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase dans les racines et les parties aériennes d'une halophyte obligatoire *Suaeda maritima* Var. *macrocarpa* et d'une glycophyte *Phaseolus vulgaris*, cultivées en présence de différentes concentrations en NaCl. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 289, pp. 599-602.
- DÖRFLING, K. & ASKMAN, A. (1989). - Relationship between frost tolerance and formation of proline, abscisic acid and specific proteins in cold hardened winter wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *XII Eucarpia Congress*.
- EL HAFID, L. & BELABED, A. (1994). - Relation entre la résistance membranaire et la composition en lipides foliaires sous l'effet d'un stress hydrique chez deux variétés de soja. *Actes Inst. Agr. Vét.*, 14 (4), pp. 41-46.
- HUANG, A-H-C. & CAVALIERI A-J. (1979). - Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant. Physiol.*, 63, pp. 531-535.
- HUBAC, C. & VIEIRA DA SILVA, J. (1980). - Indicateurs métaboliques de contraintes mésologiques. *Physiol. Vég.*, 18, pp. 45-53.
- HUBAC, C.; GURRIER, D. & BOUSQUET, U. (1986). - Effect of far-red light on malate and potassium contents in cotton leaves: Relation to drought resistance. *Physiol. Plant.*, 66, pp. 37-40.
- JONES, M.M.; OSMOND, C.B. & TURNER, N.C. (1980). - Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 7, pp. 193-205.
- KAUSS, H. (1977). - Biochemistry of regulation. In NORTHCOPE (Ed): *International Review of Biochemistry*, II, pp. 119-139.
- LACUESTA, M.; GONZALEZ-MORO, B.; GONZALEZ-MURUA, C. & MUNOZ-RUEDA, A. (1990). - Temporal study of the effect of phosphinothricin on the activity of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and nitrate reductase in *Medicago sativa* L.. *Plant Physiol.*, 136, pp. 410-414.
- LIGNOWSKI, E.M. & SPLITTSTOESSER, W.E. (1971). - Arginine synthesis, proline synthesis and related process. In JOHN & THOMPSON (Eds): *The Biochemistry of plants*, 25, pp. 225-229.
- MANIATIS, T.; FRTISCH, E-F & SAMBROOK, J. (1989). - *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MONNEVEUX, Ph. & NEMMAR, M. (1986). - Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, 6 (6), pp. 583-590.
- MORRIS, L.C.; THOMPSON, J.F. & JOHNSON, C.M. (1969). - Metabolism of glutamic and N-acetyl glutamic

- acid in leaf discs and cell-free extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 44, pp. 1023-1026.
- MUNNS, R. ; BRADY, C.J. & BRLOW, E.W.R. (1979). - Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. *Aust. J. Plant Physiol.*, 6, pp. 379-389.
- O'NEAL, D. & JOY, K.W. (1973). - Glutamine synthetase in Pea leaves. I: Purification, stabilization and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159, pp. 113-122.
- OBER, E.S. & SHARP, R.E. (1994). - Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. *Plant. Physiol.*, 105, pp. 981-987.
- PESCI, P. & BEFFAGNA, A. (1984). - Inhibiting effect of fusicoccin on abscisic acid induced proline accumulation in barley leaves. *Plant Sci. Letters*, 37, pp. 7-12.
- PLATT, S.G. & ANTHONY, G. (1981). - Ammonia accumulation and inhibition of photosynthesis in methionine sulfoximine treated spinach. *Plant Physiol.*, 67, pp. 509-513.
- RAYAPATI, P.J. & STEWART, C.R. (1991). - Solubilization of proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.*, 95, pp. 787-791.
- REDDY, P.S. & VEERANJANEYULU, K. (1991). - Proline metabolism in senescing leaves of horsgram (*Macrotyloma uniflorum* Lam.). *J. Plant. Physiol.*, 137, pp. 381-383.
- SINGH, T.N. ; PALEG, L.G. & ASPINALL, D. (1973). - Nitrogen metabolism and growth in barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26, pp. 45-56.
- STEWART, C.R. ; BOGGESS, F. ; ASPINALL, D. & PALEG, I.G. (1977). - Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.*, 59, pp. 930-932.
- STEWART, C.R. & LEE, J.A. (1974). - The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*, 120, pp. 273-289.
- TAL, M. & ROSENTHAL, I. (1979). - Salt tolerance in *Simmondria chenensis* water balance and accumulation of chloride sodium and proline under low and high salinity. *Ann. Bot.*, 34, pp. 701-708.
- TAYLOR, A.A. ; DE-FELICE, J. & HAVILL, D.C. (1982). - Nitrogen metabolism in *Posterium sanguisorba* during water stress. *Ibid*, 90, pp. 19-25.
- TIRADO, J-L. ; CONEJERO, G. & ROBIN, P. (1990). - Comparaison des activités glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase et nitrate réductase chez *Glycine max*. Effet de l'obscurité sur la première feuille trifoliée. *Plant Physiol.*, 28 (2), pp. 251-257.

Manuscrit déposé le 2 janvier 1998

Version modifiée acceptée le 28 mai 1998

Adresse des auteurs :

Laboratoire d'amélioration et de production végétales
Université Mohamed Premier
Faculté des Sciences
Département de Biologie
B.P. 524
60 000 Oujda
Maroc