

- Dramé, KN, Passaquet, C, Repellin, A, Zuily-Fodil, Y. Isolation and characterization of a novel protease inhibitor overexpressed by water deficit in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.
- Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Matos, A, Peito, A, Figueira, M, Matos, MC. Does water stress affect seeds and shells groundnut lipid composition? Livro de resumos do IX Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal, p. 201, Évora, 18-21 de Setembro de 2005.
- Maria do Céu Matos and Paula Scotti Campos integrated the organizing Commission of the IX<sup>th</sup> Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal / XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiologia Vegetal, that was held in Évora (18-21 September, 2005).
- Dramé K.N., Clavel D.C., Passaquet C., Zuily-Fodil Y. Water deficit regulates stress-responsive genes in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. XVII<sup>e</sup> Congrès International de Botanique, Vienne (Autriche) 17-23 Juillet 2005.
- Clavel D., Diouf O., Drame NK., Diedhiou P., and Tossim HT. Indicators of Pre-harvest Aflatoxin Contamination in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Mycoglobe International Conference, Bari,, 2006.

#### IV. Conclusions

Les facteurs environnementaux, physiologiques et variétaux conditionnant l'infestation par *A. flavus* (*Af*) en pré-récolte de l'arachide ont été précisés. L'étude de cvs. possédant un cycle identique et d'adaptation agronomique comparable pour la zone ciblée a permis de montrer clairement que la résistance à la sécheresse n'est pas obligatoirement couplé à une résistance à l'aflatoxine. En effet, la forte relation entre l'adaptation à la sécheresse et la résistance à l'aflatoxine qui est observée sur des séries de génotypes dont les niveaux d'adaptation agronomique sont différents (notamment leur longueur du cycle de culture) n'est plus vérifiée lorsqu'on compare des génotypes de niveau d'adaptation identique. Ce sont les variétés de cycle court possédant de petites graines qui mûrissent vite sont les plus résistantes. Par ailleurs il a été possible de simuler en serre les conditions d'infestation au champ. Sur le plan de la méthodologie de sélection ces résultats sont importants car ils conditionnent la réussite des criblages variétaux qui ont souvent échoués jusqu'à présent faute d'une bonne connaissance du matériel végétal ou de l'absence de standardisation des dispositifs d'étude.

Les effets de la sécheresse et de l'infestation du sol par *Af* sur la composition des membranes cellulaires et la teneur des graines en différents composés notamment lipidiques. Cette composition évolue de manière différente selon le cultivar ce qui laisse supposer une forte implication du métabolisme des acides gras dans les mécanismes de la résistance de l'arachide en pré-récolte. Le stress hydrique de fin de cycle a davantage perturbé le métabolisme des lipides du cv. sensible que celui du cv. résistant, particulièrement au niveau des teneurs en AG majeurs C18:1 et C18:2 des graines immatures.

La réponse moléculaire des deux cvs de référence à un déficit hydrique croissant a contribué à élucider les mécanismes de résistance à la sécheresse. Les résultats suggèrent que l'arachide possède des mécanismes de protection des cellules contre les dommages provoqués par la sécheresse des tissus. La tolérance à la dessiccation a été définie par la capacité de la plante à limiter les dommages pendant la déshydratation, à maintenir l'intégrité physiologique en période sèche et à mobiliser ensuite les mécanismes de réparation cellulaire lors de la réhydratation. Cette analyse moléculaire complète la description des cultivars utilisés et a permis de rendre possible l'intégration de gènes d'intérêt identifiés dans les variétés à améliorer.

Des mesures préventives (variétés, itinéraires techniques, etc...) ont été définies afin de contrôler la contamination en champ (pre harvest) et après récolte (post harvest). La détermination des phases critiques de contamination de l'arachide par *Af* et l'aflatoxine tout au long de la filière de production de l'arachide a été précisée. L'application des « BPA » (Bonnes Pratiques Agricoles) pour obtenir une production de qualité est actuellement mise en œuvre au niveau d'un projet pilote de production d'arachide de qualité au Sénégal.

Enfin ce contrat a permis la formation d'étudiants en thèse, DEA ou master et une vingtaine publications sous forme d'articles scientifiques dans des revues de rang A, de communications lors de colloques et de posters présentés lors de congrès internationaux.

## 2. Publications

### Revue internationale

- Lauriano, J.A., Ramalho J.C., Lidon F.C. and Matos M.C., 2004. Peanut photosynthesis under drought and re-watering. *Photosynthetica* 42: 37-41.
- Clavel, D., Drame, NK, Macauley, HR, Braconnier, S, Laffray, D., 2005. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ. Exp. Bot.* 54: 219-130.
- Clavel, D., Drame, NK, Diop ND, Zuily-Fodil, Y. 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. Première partie : revue bibliographique OCL, Vol 13(3)
- Clavel, D., Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. 2006. Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs. *Field Crops Research* 96: 296-306.
- Lauriano, J.A., Ramalho, J. C., Lidon, F.C., and Matos, MC., 2006. Mechanisms of energy dissipation in peanut under water stress. *Photosynthetica* 44 (3): 404-410.
- Mayeux A. and Fabre P. 2006. Developing a high quality groundnut industry: A challenge for producer organisations in developing countries to meet market demand. France and the CGIAR: Delivering Scientific Results for Agricultural Development, pp. 52-53.
- Clavel D. 2006. Network for groundnut aflatoxin control in Sahelian Africa. France and the CGIAR : Delivering Scientific Results for Agricultural Development, pp. 54
- Dramé, KN, Clavel, D, Cruz de Carvalho, MH, Passaquet, C, Zuily-Fodil, Y. Water deficit induces variation in expression of stress responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars differing in their tolerance to drought. Accepted à Plant Science sous réserve de modifications
- Clavel, D, Khalfaoui, JLK Drame, NK, Diop ND, Diouf, O, Zuily-Fodil, Y. 2006. Adaptation à la sécheresse et création variétale. Deuxième partie : une approche pluridisciplinaire pour la création variétale (in press) OCL.

### Actes de congrès et conférences

- Clavel, D., 2002. Molecular strategy for groundnut preharvest Aflatoxin elimination: recent advances and future prospects. In: Seventh ICRISAT Regional Groundnut Meeting for Western and Central Africa, ICRISAT (Ed.), Cotonou, 6-8 December 2000, 57-59 pp.
- Clavel, D., Drame, N.K., Diop, N.N., et Zuily-Fodil, Y., 2003. Outils moléculaires pour l'étude de l'adaptation à la sécheresse chez l'arachide. In: Biotechnologies végétales: de la structure des génomes à l'amélioration des plantes, VII<sup>èmes</sup> journées scientifiques du réseau "Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire", El Hadrami, I. et Daayf, F. (Ed.), Marrakech, 7-9 oct. 2002, pp.290-307
- Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Vales, L, Matos, A, Peito, A, Figueira, M, Matos, MC. Estudo do efeito da seca no desenvolvimento das vagens de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e sua implicação na infecção por *Aspergillus flavus*. V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas/ VI Congresso Iberoamericano de Ciências Hortícolas. Vol. 1: Olericultura; Plantas Ornamentais, Associação Portuguesa de Horticultura (Ed.). Actas Portuguesas de Horticultura, n° 5, pp. 278-282.
- Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Matos, A, Figueira, ME, Vales, C, Matos, MC. Grain lipid composition as a tool for understanding drought stress tolerance XIV Congresso Nacional de Bioquímica, December 2004, Vilamoura, Portugal. Livro de Actas pp 60.

### Posters présentés lors de congrès internationaux

- Clavel, D. Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. Variation in drought adaptation among closely related early groundnut lines. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.
- Diouf, O, Clavel, D, Diedhiou, PM, Sarr, B, Braconnier, S. Agrophysiological traits of preharvest contamination in groundnut. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Le dispositif a impliqué 50 producteurs volontaires auxquels des semences et autres intrants ont été fournis afin de cultiver 1 ha d'arachide chacun. Outre la maîtrise des pratiques culturales, le tri post récolte des gousses (maintien de la qualité à la récolte, techniques d'égoussage, séchage, battage) est une phase clé pour l'obtention d'arachide saines. Cette analyse post récolte a été complétée par la détermination des défauts majeurs gousses (moisies, attaquées scarifiées, cassées) entraînant un risque important de contamination par l'aflatoxine et des défauts mineurs (bouts noirs, immatures, tâchées).

Les principales conclusions ont été les suivantes:

- la filière petites graines de Spanish (variétés hâtives) est la mieux adaptée aux pratiques mises en œuvre,
- la mise en œuvre de BPA en milieu rural encadré a permis la valorisation en graines HPS (qualité export) avec des rendements moyens supérieurs à 40% comparés aux 20% maxis qu'obtiennent actuellement les industriels,
- la production de semence doit faire partie intégrante de la filière de production,
- les opérations de tri post-récolte constituent point très sensible pour l'obtention d'une bonne qualité de graines.

Sur la base des résultats acquis et des semences produites dans cette phase de test l'opération a été élargie en à une centaine d'hectares.

### III. Formation & principales publications

#### 1. Formation

Drame K.N. Outils moléculaires pour l'étude écophysiological de la relation sol/plante en conditions de contraintes environnementales, DEA de Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris 12 Val de Marne, 2002, 40p.

Badiane M. Mise au Point d'un Dispositif Expérimental pour l'Etude en Serre de la Contamination en Pré-récolte de l'Arachide par l'Aflatoxine. DEA de Production Végétale, Université Cheikh Anta Diop. Faculté des Sciences et Techniques. Département de Biologie Végétale, Dakar, 2002, 52 p.

Tossim A.-H. Etude en Conditions de Contamination par l'Aflatoxine des Mécanismes Physiologiques Impliqués dans la Résistance chez deux Variétés d'Arachide en Conditions de Déficit de Pré-récolte. Mémoire d'Ingénieur des Travaux Agricoles, ENCR, Bambey, 2002, 58p.

Joaquim Augusto Lauriano, PhD of University of Évora for, "Bases morfo-fisiológicas da resistência à seca do amendoim. Um contributo" discussed in February 2002.

Traore, A., Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop (Dakar), intitulé «Relations entre variétés, conditions environnementales et résistance à l'aflatoxine chez l'arachide (*Arachis hypogaea L.*), soutenu par 01 Août 2005.

Diallo, O. Mémoire présenté pour l'obtention d'un Master en Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux 2 intitulé «Contamination de l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) par l'aflatoxine : mise au point d'un dispositif expérimental pour l'étude de l'infestation en pré-récolte » soutenu le 13 juillet 2005.

Mémoires de fin d'étude de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture du Sénégal), pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome en 2005/2006 pour trois étudiants Bassirou Sarr, Lamine Ba et Djibi Sow, dans le cadre l'opération de Paoskoto (WP4)

Nani K. Dramé, Doctorat de l'Université Paris 12-Val de Marne pour une étudiante sénégalaise, intitulée « Réponses adaptatives de l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) aux contraintes environnementales : Caractérisation d'un nouvel inhibiteur de sérine protéase sous la direction de Zuily-Fodil, soutenue le 16 décembre 2005.

Cláudia Lima Neves , PhD of Pharmacy College Lisbon University for (planned in 2007).

## **Workpackage 4: Integrated crop management**

**Objectifs:** définir des mesures préventives (variétés, itinéraires techniques, etc...) pour contrôler la contamination en champ (pre harvest) et après récolte (post harvest). Les études ont été conduites par l'**Ier/Icrisat** au Mali et le **Cirad** au Sénégal.

Quatre études ont été réalisées par l'équipe **IER/ICRISAT**, la première concerne un essai multilocal participatif en parcelles paysannes, la deuxième la détermination de l'activité anti-fongique *in vitro* de souches locales d'actinomycète, la troisième un test en milieu réel de greniers améliorés pour limiter la contamination durant le stockage et la quatrième l'étude de l'effet de différents amendements sur le niveau d'infestation par *A. flavus*.

### 1. Essai participatif de variétés en milieu paysan

Huit variétés ont été testées dans la zone de Kolokani (Mali) en collaboration avec des paysans. La résistance à la contamination des graines par *A. flavus* et à la production de l'aflatoxine dans les conditions naturelles. Les conditions de culture ont suivi les pratiques paysannes. Aucune différence variétale significative n'a été observée pour les rendements moyens des gousses. Les producteurs ont choisi les variétés IGC7 (résistante) et Fleur 11 (sensible) pour 40% d'entre eux. Les raisons de leur choix sont relatives à leur productivité, la grosseur de leurs graines et à leur goût.

### 2. Recherche et caractérisation de souches d'actinomycètes inhibiteurs d'*A. flavus*

Dix-huit nouvelles souches d'actinomycètes inhibiteurs de la croissance de *A. flavus* ont été isolées et décrites. Cependant les informations obtenues doivent être complétées par l'utilisation des méthodes de taxonomie microbienne permettant d'identifier exactement l'actinomycète et la détermination des propriétés chimiques, physiques et antimicrobiennes, toxiques des molécules responsables de l'inhibition. Des partenariats sont recherchés pour réaliser ces études.

### 3. Suivi/évaluation sanitaire des stocks en milieu paysan

La très forte augmentation de l'infestation par *A. flavus* a été confirmée pour les stocks logés dans le grenier amélioré 00 non traité. Celle-ci s'explique par l'existence de conditions optimales, notamment d'humidité, pour la prolifération des spores. Les quantités de parasites détectés dans les stocks ont été plus faibles pour les stocks logés dans les greniers améliorés traités. Cette baisse est très prononcée pour le grenier 01. Les résultats indiquent également des taux d'aflatoxine B1 plus faibles dans le grenier 01.

### 4. Contrôle intégré de l'infestation par *A. flavus* en station

Un essai de gestion intégrée de la contamination par l'aflatoxine a été installé à durant la campagne 2004 dans la station de Samé (Kayes, Nord Mali). L'objectif de cet essai est de développer une gestion intégrée pour réduire la contamination de l'aflatoxine dans l'arachide au champ. Les effets de quatre facteurs ont été analysés. Le premier facteur est constitué par la variété (55-437, variété résistante, et JL 24, variété sensible), le deuxième par un amendement de chaux au semis (avec et sans), le troisième par un apport de fumier au semis (avec et sans) et le dernier facteur par l'utilisation des résidus de cultures de céréales (avec ou sans).

Les corrections proposées toutes ont été efficaces pour limiter la contamination à part l'apport de résidus de récolte de céréales. La variété sensible, JL 24, répond mieux que la variété résistante, 55-437, aux amendements proposés mais les taux d'infestation et de contamination observés sur 55-437 sont toujours inférieurs à ceux de JL24 même après application des corrections.

### 5. Contrôle intégré de l'infestation par *A. flavus* en champ paysan

L'objectif de l'opération conduite par le **CIRAD au Sénégal** est le développement d'une filière arachide de qualité en communautés rurales et la valorisation des produits sur les marchés locaux et internationaux. Cette opération est commanditée par la Banque Mondiale et l'Union Européenne. L'hypothèse émise sur la base des essais précédents était donc qu'une taille de graines limitée et une forte capacité d'évitement sont favorables à la résistance à l'aflatoxine. Ces essais ont conduit à sélectionner sept variétés à cycle court pour les essais ultérieurs de vulgarisation. L'opération test de production d'arachide de qualité par les producteurs de Paoskoto a été conduite sur la base de ces résultats dans l'objectif de mettre au point des techniques et des outils d'aide à la décision ainsi des pratiques culturales (BPA « bonnes pratiques agricoles ») en conditions pluviales pour la production d'arachide de qualité en milieu paysan.

Au cours de ce travail, 5 gènes d'intérêt (ADNc) ont été identifiés, clonés et étudiés :

- 3 ADNc partiels de gènes codant une phospholipase D<sub>a</sub>, une cystéine protéinase de la famille des papaines, une sérine protéinase de la famille des subtilisines,
- 2 ADNc complets de gènes codant une protéine LEA de groupe 1 et un inhibiteur protéase.

Pour la plupart d'entre eux ces gènes sont les premiers à avoir été séquencés et étudiés chez l'arachide. Ce sont des transgènes potentiels car l'étude de l'expression de ces gènes en conditions de déficit hydrique croissants a montré qu'ils sont tous régulés par le déficit hydrique. En réponse au déficit hydrique, les gènes de phospholipase D, de protéase à cystéine et d'un inhibiteur de protéase sont surexprimés, le gène de protéase à sérine est régulé négativement et le gène de LEA est induit dans les feuilles d'arachide. La comparaison de cultivars présentant différents degrés de tolérance à la sécheresse a permis d'observer une réponse différentielle des gènes en fonction de l'intensité du déficit hydrique et du degré de tolérance à la sécheresse du cultivar. Comparé au cultivar sensible (cv. 73-30), le cv. Fleur 11 semble mieux équilibrer l'expression des gènes codant des protéines hydrolytiques et accumule abondamment les transcrits correspondants à la protéine LEA et à l'inhibiteur. Cette stratégie pourrait correspondre à des caractères de tolérance moléculaire au déficit hydrique. Ceux ci pourraient expliquer la forte tolérance à la sécheresse de ce cultivar, définie sur la base de caractères agronomiques et physiologiques (Dramé *et al.*, soumis).

Les différentes réponses physiologiques, agronomiques, morphologiques et moléculaires précédemment décrites ont permis de compléter le profil général des cultivars permettant ainsi d'avoir une vue globale des différents mécanismes d'adaptation mis en place par l'arachide pour surmonter la contrainte hydrique. Dans une même classe de précocité, certains cultivars sont plus tolérants à la sécheresse que d'autres. Dans le cas de cette étude, les cvs. Fleur 11 et 73-30 ont, tous deux, un cycle de développement court (90 jours) et le cv. Fleur 11 semble plus tolérant à la sécheresse que le cv. 73-30. La stratégie d'adaptation du cv. 73-30 est essentiellement basée sur l'évitement, par la fermeture précoce des stomates qui lui permet de maintenir un CRE élevé dans les tissus. Par conséquent, ce cultivar présente des rendements plus faibles que le cv. Fleur 11 en conditions de déficit hydrique. Par ailleurs, les réponses moléculaires ont montré une accumulation précoce des transcrits codant une phospholipase D, enzyme majeur de la dégradation des phospholipides membranaires, ce qui est corrélée à la faible résistance protoplasmique de ce cultivar (cv. 73-30). De plus, il accumule moins bien que le cv. Fleur 11, les transcrits codant des protéines protectrices (LEA et inhibiteurs de protéinases).

Le travail réalisé constitue un premier pas dans la recherche de gènes candidats pour la tolérance à la sécheresse chez l'arachide et indirectement pour la résistance à *Aspergillus flavus*. Par ailleurs, l'utilisation d'outils moléculaires a permis de confirmer les caractéristiques physiologiques et agronomiques des cultivars étudiés. Ceci permet d'envisager l'évaluation des capacités de tolérance à la sécheresse de nouvelles variétés d'arachide par des tests moléculaires qui ont l'avantage d'être rapides et précoces.

En résumé, nous pouvons émettre l'hypothèse que pour surmonter le déficit hydrique, l'arachide accumule les transcrits de la PLD<sub>a</sub>, (une phospholipase majeure) de la cystéine protéinase et de la protéine LEA afin de réduire les pertes en eau, de mobiliser les précurseurs d'acides aminés pour la synthèse de nouvelles protéines et de protéger les molécules et les membranes des dommages causés par les faibles potentiels hydriques, respectivement. La baisse d'expression de la subtilisine pourrait contribuer à retarder la sénescence induite par la sécheresse. Le rôle *in vivo* de ces gènes pourrait être précisé par transgénèse *in planta*, au moyen de stratégies sens (sur-expression du gène) et antisens (répression du gène) chez *Arabidopsis thaliana*.

Afin d'approfondir les connaissances, d'autres travaux devront être effectués comme l'étude des processus de reprise après une période de sécheresse. De même, la confirmation du rôle adaptatif des protéines codées par les différents ADNc identifiés dans la réponse de l'arachide à la sécheresse devra être entreprise. Dans cette optique, la transgénèse *in planta* d'*Arabidopsis thaliana* initiée, avec comme transgène l'ADNc *AHB* codant un inhibiteur de protéinase, sera poursuivie dans le but de déterminer le rôle de ce gène dans la tolérance à la sécheresse des plantes.

standardisation devrait permettre de limiter les fortes variations habituellement observées et d'améliorer la répétabilité des réponses variétales en matière de résistance/sensibilité à l'aflatoxine en pré récolte. Ce type de dispositif permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires de la résistance variétale à la contamination de l'arachide par l'aflatoxine en pré récolte. Afin de limiter les sources de variabilité des résultats en fonction des environnements il faudrait donc standardiser la mesure de la maturité des fruits notamment en complétant l'observation de la coloration interne de la coque (plus ou moins sombre) qui ne donne qu'un classement qualitatif, avec des mesures d'humidités relatives.

## **Work package 2: Biochemical and physiological studies**

**Objectifs:** étudier les effets de la sécheresse et de l'infestation du sol par *A. flavus* sur la composition des membranes cellulaires et la teneur des graines en différents composés notamment lipidiques. Les activités correspondantes ont été conduites par l'EAN au Portugal.

Le stress hydrique a affecté la teneur en lipides des graines et des coques ainsi que sa composition de manière différente selon le cultivar ce qui laisse supposer une forte implication du métabolisme des acides gras (AG) dans les mécanismes de la résistance de l'arachide en pré-récolte

Le stress hydrique de fin de cycle a davantage perturbé le métabolisme des lipides du cv. sensible que celui du cv. résistant, particulièrement au niveau des teneurs en AG majeurs C18:1 et C18:2 des graines immatures. Au niveau des graines les moins mûres, en effet, la contribution des AG majeurs au total est de 54% chez Fleur 11 et de 41% pour 55-437 alors qu'au niveau des graines très mûres ils ne contribuent que pour 29% pour Fleur 11 et de 42% chez 55-437.

On a remarqué également une forte teneur en AG C18:1 (principalement acide oléique) et C18:2 (principalement acide linoléique) au niveau des coques mûres du cv. résistant. Il en résulte des valeurs faiblement affectées par le stress au niveau des ratios O/L (acide oléique sur acide linoléique) dans les coques et les graines. On peut donc confirmer l'hypothèse d'une relation entre la bonne stabilité du métabolisme des lipides dans les graines en conditions de déficit hydrique notamment dans les graines immatures et la résistance à l'aflatoxine.

En perspective, il serait utile (1) de clarifier les différences de métabolisme des lipides dans les graines des deux cultivars en relation avec l'infestation par *A. flavus* (2) de rechercher une éventuelle liaison entre les taux de phytoalexine resveratrol et la résistance à l'aflatoxine chez les plantes stressées des deux cultivars.

## **Work package 3 : Molecular studies**

**Rappel des objectifs:** caractériser la réponse moléculaire des deux cvs de référence, sensible et résistant, à un déficit hydrique croissant pour contribuer à élucider les mécanismes de résistance en pré-récolte. Compte tenu du faible niveau de connaissance sur la réponse moléculaire de l'arachide à la sécheresse, la démarche a consisté à étudier des gènes de fonctions connues de façon à relier les réponses moléculaires aux réponses agro physiologiques à la sécheresse. Ces activités ont été conduites par le laboratoire d'Eco-Physiologie Moléculaire de l'Université Paris 12, et au CERAAS (Sénégal).

L'arachide possède la capacité de poursuivre son développement métabolique et phénologique (par exemple la floraison) lorsqu'un déficit hydrique allant jusqu'à -3,5 MPa s'opère dans les tissus. Ceci suggère qu'elle possède des mécanismes de protection des cellules contre les dommages provoqués par des potentiels hydriques bas. La capacité à limiter les dommages pendant la déshydratation, à maintenir l'intégrité physiologique en période sèche et à mobiliser ensuite les mécanismes de réparation au cours de la réhydratation, s'appliquent donc tout à fait à l'arachide. De plus, cette compréhension du potentiel génétique de l'arachide en terme de tolérance à la sécheresse constitue une étape clé pour une sélection variétale efficace. La disponibilité des techniques de transgénèse chez l'arachide rend possible l'intégration de gènes d'intérêt identifiés dans les variétés à améliorer.

## II. Activités de recherche & principaux résultats

Quatre workpackages ont été définis, les activités de recherche et les résultats sont présentés selon ces workpackages.

### Work package 1: Physiological processes of pre-harvest contamination

**Objectifs:** ces travaux doivent permettre de préciser les facteurs environnementaux physiologiques et variétaux qui conditionnent la résistance-sensibilité de l'arachide à l'aflatoxine. Au Sénégal, ces travaux ont été conduits par le **CERAAS** en collaboration avec le **CIRAD**.

Trois études ont été conduites :

- Essai 1: Mise au point d'un système expérimental standardisé en conditions contrôlées pour l'étude de la contamination en pré récolte de l'arachide
- Essai 2: Essai multilocal au Sénégal
- Essai 3: Essai régional (Mali, Niger, Sénégal)

Cette série d'expérimentations a permis de préciser les relations entre résistance à la sécheresse et résistance à l'aflatoxine au champ et dans un environnement standardisé reproduisant correctement les conditions de champs, à savoir :

- une meilleure adaptation à la sécheresse de certaines variétés Fleur 11 et JL 24 pour les caractères de production au champ mais une faible capacité d'évitement de la sécheresse (forte chute du potentiel hydrique foliaire en condition de sécheresse),
- un effet du déficit hydrique de fin de cycle sur la qualité technologique des graines plus fort sur les variétés sensibles que sur les variétés résistantes,
- une meilleure maturité et qualité technologique des gousses pour 55-437 et les nouvelles variétés dérivées de 55-128 et 55-33,
- un effet net du bon niveau de maturation des graines sur l'infestation spécialement sur les variétés les plus sensibles,
- une corrélation plus forte du degré de maturation des graines avec leur humidité relative qu'avec leur activité de l'eau laquelle devient peu précise lorsque le nombre de graines est insuffisant,
- une contamination par le champignon et l'aflatoxine plus sévère en conditions de déficit hydrique de fin de cycle pour les variétés Fleur 11 et JL24 qui ont une faible capacité d'évitement de la déshydratation de leurs tissus foliaires.

La forte relation entre l'adaptation à la sécheresse et la résistance à l'aflatoxine qui est observée sur des séries de génotypes dont les niveaux d'adaptation agronomique sont différents (notamment leur longueur du cycle de culture) n'est plus vérifiée lorsqu'on compare des génotypes de niveau d'adaptation identique. Dans ce cas on observe que la stratégie d'évitement associée à une taille de graines réduite, celle de 55-437, est plus efficace que celle de Fleur 11 qui est généralement plus productive que 55-437 en conditions de sécheresse. Un des facteurs majeurs de la résistance en pré-récolte à l'aflatoxine réside dans la capacité de maturation des graines sous forte contrainte hydrique. Par ailleurs 55-437 présente une résistance intrinsèque qui limite l'infestation par *Af* et la contamination par l'aflatoxine quelles que soient les conditions environnementales car ses graines mûres sont plus résistantes que les graines mûres de Fleur 11. Ce résultat confirme des études antérieures indiquant qu'une bonne maturité des graines favoriserait une bonne production de phytoalexines permettant ainsi de minimiser la contamination par les aflatoxines.

Du point de vue méthodologique, des référentiels pour la mise au point d'un outils d'évaluation des risques de contamination par *A. flavus* ont été obtenus, notamment en conditions semi contrôlées en serre grâce la maîtrise de l'infestation artificielle et des conditions de culture et de l'application du déficit hydrique en pots. Cette

# Présentation résumée des principaux résultats obtenus lors du Projet

*Ce rapport résume les principaux résultats des activités scientifiques conduites dans le cadre du projet INCO-DEV Groundnut-Aflatoxin durant la période 01/11/2001–31/05/2006 et détaillés dans le rapport scientifique final (Consolidated Scientific Report). Les résultats saillants des quatre workpackages sont présentés ainsi que les activités de formation et la liste des principales publications.*

## I. Introduction

L'aflatoxine est la plus dangereuse des mycotoxines et son substrat de prédilection est l'arachide qu'elle contamine au champ (pre-harvest contamination) et lors du séchage et du stockage si les conditions sont trop humides (post harvest-contamination). Le vecteur est un champignon du sol parasite faible, le plus souvent saprophyte et très ubiquiste, *Aspergillus flavus* (ou *parasiticus*). La forme *flavus* domine dans les régions africaines sèches. Parmi les aflatoxines, l'aflatoxine B1 est la plus toxique et largement dominante en Afrique. Les sécheresses récurrente en de fin de saison de culture de l'arachide (fin de cycle) représentent le facteur majeur de contamination des arachides. Dans les zones sub sahéliennes, le déficit hydrique de fin de cycle est fréquent et, de plus, il accentue la pression des insectes parasites, facteur biotique déterminant dans le processus de contamination au champ. En outre, la primo contamination ou re-contamination des gousses pendant le séchage au champ à la faveur d'une pluie tardive n'est pas rare. Par conséquent, les taux élevés de contaminations relevés en Afrique font de la contamination de l'arachide une question majeure de santé publique doublée d'une perte financière importante due à la privation des marchés extérieurs notamment européens.

La sélection variétale pour la résistance à l'aflatoxine est limitée par le manque de connaissances sur l'interaction entre la plante et l'organisme vecteur en situation de contrainte environnementale plus ou moins forte. La majeure partie des évaluations de variétés par rapport à l'aflatoxine ont fait état de résultats conflictuels entre les tests en laboratoire sous infestation artificielle et les tests au champ et d'une forte variabilité entre les localités. Les études permettant de comprendre les mécanismes en jeu sont donc indispensables pour prévenir l'infestation de pré récolte au champ. Les études antérieures ont montré que la station expérimentale de Bambey est un site très contaminé donc favorable aux études au champ. Par ailleurs, la disponibilité d'un matériel végétal potentiellement résistant, et des connaissances acquises, notamment lors de projets européens précédents, sur la physiologie de la résistance à la sécheresse de l'arachide ont permis de conduire les études présentées dans ce rapport. Ces travaux visaient principalement à :

- préciser les facteurs environnementaux, physiologiques et variétaux conditionnant l'infestation en pré-récolte de l'arachide
- étudier les effets de la sécheresse et de l'infestation du sol par *A. flavus* sur la composition des membranes cellulaires et la teneur des graines en différents composés notamment lipidiques.
- caractériser la réponse moléculaire des deux cvs de référence, un sensible et un résistant, à un déficit hydrique croissant pour contribuer à élucider les mécanismes de résistance en pré-récolte
- définir des mesures préventives (variétés, itinéraires techniques, etc...) pour contrôler la contamination en champ (pre harvest) et après récolte (post harvest).

La démarche adoptée a consisté à étudier deux à trois variétés de référence dans différentes conditions environnementales partiellement ou totalement contrôlées (champ, serre et phytotron) et à différentes échelles (agronomique, physiologique, biochimique et biologie moléculaire). Le système expérimental de base était constituée par les cultivars 55-437 (productivité moyenne et bonne résistant à l'aflatoxine) et Fleur 11 (bonne productivité et sensible à l'aflatoxine) largement diffusés au Sénégal et dans une partie du Bassin arachidier sub-sahélienne.

## Résumé du Projet

L'aflatoxine, produit par le champignon *Aspergillus flavus* (Af), est la mycotoxine la plus courante en Afrique et c'est aussi la plus dangereuse pour la santé humaine. Il en résulte, d'une part, des menaces sur la santé publique du fait d'une forte consommation de l'arachide en Afrique et d'autre part des risques économiques liés aux exigences du commerce international des produits agricoles destinés à la consommation directe. Les deux types de risques sont en synergie car la faiblesse des ressources entraîne une autoconsommation des produits les plus contaminés. Le projet Groundnut-Aflatoxin avait pour objectif d'augmenter les connaissances sur les mécanismes de l'infestation au champ en conditions de sécheresse et de mettre au point une stratégie intégrée de prévention contre l'infestation de l'arachide en pre et en post récolte.

La démarche adoptée, étudier deux à trois cultivars (cvs), variétés de référence dans différentes conditions environnementales partiellement ou totalement contrôlées (champ, serre et phytotron) a permis d'obtenir des résultats et à différentes échelles (agronomie, physiologie, biochimie et biologie moléculaire).

Les facteurs environnementaux, principalement la sécheresse à la fin du cycle de culture, physiologiques et variétaux conditionnant l'infestation en pré-récolte de l'arachide ont été précisés. La forte relation entre l'adaptation à la sécheresse et la résistance à l'aflatoxine qui est observée sur des séries de géotypes dont les niveaux d'adaptation agronomique sont différents (notamment leur longueur du cycle de culture) n'est plus vérifiée lorsqu'on compare des géotypes de niveau d'adaptation identique. Dans ce cas on observe que la stratégie d'évitement associée à une taille de graines réduite, celle de 55-437, est plus efficace que celle de Fleur 11 qui est généralement plus productive que 55-437 en conditions de sécheresse. Les variétés plus résistantes sont celles qui possèdent un cycle court et de petites graines qui mûrissent vite. Par ailleurs, un protocole permettant de simuler en serre les conditions d'infestation au champ a été mis au point afin d'améliorer les criblages variétaux.

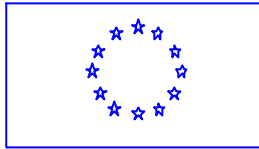
Les effets de la sécheresse et de l'infestation du sol par Af sur la composition des membranes cellulaires et la teneur des graines en différents composés notamment lipidiques ont été étudiés. Cette composition évolue de manière différente selon le cv. ce qui laisse supposer une forte implication du métabolisme des acides gras dans les mécanismes de la résistance de l'arachide en pré-récolte. Le stress hydrique de fin de cycle a davantage perturbé le métabolisme des lipides du cv. sensible que celui du cv. résistant, particulièrement au niveau des teneurs en AG majeurs C18:1 et C18:2 des graines immatures.

La réponse moléculaire des deux cvs de référence à un déficit hydrique croissant a contribué à élucider les mécanismes de résistance en pré-récolte. Les résultats suggèrent que l'arachide possède des mécanismes de protection des cellules contre les dommages provoqués par la sécheresse des tissus. La tolérance à la dessiccation a été définie par la capacité de la plante à limiter les dommages pendant la déshydratation, à maintenir l'intégrité physiologique en période sèche et à mobiliser ensuite les mécanismes de réparation cellulaire lors de la réhydratation. La disponibilité des techniques de transgénèse chez l'arachide rend possible l'intégration de gènes d'intérêt identifiés dans les variétés à améliorer.

Des mesures préventives (variétés, itinéraires techniques, etc...) ont été définies pour contrôler la contamination en pré récolte en champ (pre harvest) et après récolte (post harvest). La détermination des phases critiques de contamination de l'arachide par Af et l'aflatoxine au cours de la filière de production de l'arachide a été précisée. L'application des « BPA » (Bonnes Pratiques Agricoles) afin d'obtenir une production d'arachide de qualité est actuellement testé en vrai grandeur (100 ha) au Sénégal.

L'atelier final du Projet a réuni 25 spécialistes venus du Sénégal, Mali, Bénin, France, Portugal. Il a restitué les principaux résultats obtenus y compris sur la formation du personnel et des étudiants des institutions partenaires. Il a mis l'accent sur l'exploitation et la valorisation de ces résultats tant sur le plan cognitif que sur le plan pratique en identifiant les besoins de recherche d'accompagnement des projets de développement basés sur la production d'une arachide de bonne qualité technologique et sanitaire.

**Mots-clés :** aflatoxine, arachide, facteurs variétaux, facteurs physiologiques, contamination en pré récolte, méthode intégrée de production



**European Commission Fifth Framework Programme  
CONTRAT ICA4-CT-2001–10007 / Groundnut-aflatoxin**

**PROJECT : NEW TOOLS FOR GROUNDNUT AFLATOXIN CONTROL  
IN THE SAHEL REGIONS OF AFRICA**

**Summary of Scientific Final report of the project for the period  
01/11/2001 au 31/05/2006**

CIRAD-CA (France), Partenaire 1(Corrdinator)  
CERAAS-ISRA-ENSA (Sénégal), Partenaire 2  
EPM-Université de Paris 12, Partenaire 3  
IER-ICRISAT (Mali), Partenaire 4  
DPP-EAN (Portugal), Partenaire 5

