





Agence Universitaire Francophone
Réseau BIOVEG
Biotechnologies Végétales et Sécurité Alimentaire
Actions de Recherche en Réseau 2009-2010
Projet SUDBIOTECH Bénin - AUF 2092RR907

### Rapport Scientifique Annuel 2009

[ 2010]

Alain RIVAL

Cirad Département Systèmes Biologiques UMR DIAPC

> CIRAD-DIST Unité bibliothèque Lavalette



#### Sommaire

Executive Summary	3
Suivi de la convention AUF 2092RR907	. 5
Programme d'enseignement	7
Programme de formation par la recherche	26
Annexes 1 à 5	-48

-3 FEV. 2010

#### **Executive summary**

Dans le cadre des projets "Actions de Recherche en Réseau" financés par l'Agence Universitaire de la Francophonie, l'initiative SUDBIOTECH-Bénin a permis comme prévu; l'organisation en 2009 :

- 1. d'une mission annuelle d'enseignement vers l'Université d'Abomey-Calavi à Cotonou
- 2. d'un séjour de formation à DIAPC-Montpellier d'un Doctorant béninois

Du 6 au 11 juillet dernier, s'est tenu le "Ilème Atelier sur la Biologie Moléculaire et les Biotechnologies Végétales" à l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) de la Faculté des Sciences et Techniques. L'Atelier a rassemblé **28 étudiants issus de huit nationalités différentes** (Bénin, Togo, Centrafrique, Gabon, Congo, Cote d'Ivoire, Tchad et Nigeria) de niveau M2 et PhD en Sciences de la Plante ou Analyses Biomédicales.

L'équipe pédagogique, composée de trois enseignants issus d'institutions françaises diverses offre des compétences scientifiques complémentaires: Alain RIVAL (DR Cirad Montpellier: Biologie Moléculaire, Epigénétique), Yves HENRY (DR CNRS- IBP Orsay: Génétique, Amélioration des Plantes) et Aimé NATO (MCCE Université Paris-XI: Biochimie, Biologie cellulaire). Elle a été renforcée par un apport considérable des Enseignants-chercheurs béninois de l'UAC: Ambaliou SANNI, Nicodème CHABI, Kifouli ADEOTI. En outre, les chercheurs de l'ADRAO-WARDA (M-Noëlle NDJIONDJOP et Nani DRAME) ont accueilli l'Atelier durant une demi-journée, proposant une visite détaillée et deux séminaires spécialisés, ouvrant ainsi les étudiants aux applications concrètes des notions évoquées lors de la formation.

Au total, **50 heures de cours, TP et TD ont été dispensées**. L'accent a été mis sur les expérimentations pratiques directement issues de travaux de recherche en cours, avec la réalisation de 4 séances de TP: TP1/Flexibilité Métabolique et Morphogénétique (Effet des effecteurs lumière et phytohormones sur la croissance et le développement, dosage de protéines, électrophorèses natives et dénaturantes, Western Blot), TP2/ Extraction des nucléotides végétaux (protocole simplifié à l'aide d'ingrédients simples: sel de cuisine et détergent domestique, visualisation de pelotes de nucléotides au BEt sous UV); TP3/Détection d'OGMs par PCR (formation a la PCR, électrophorèse, effet des conditions d'amplification); TP4/Production de protéines recombinantes par cultures *in vitro* (Détection par Western Blots, révélation par IgG secondaires marqués).

Du 1<sup>er</sup> Octobre au 31 Décembre 2009, **Mr Kifouli ADEOTI, Doctorant de l'Université d'Abomey Calavi a** été accueilli au sein de la Plateforme GeneTrop de l'UMR DIAPC à Montpellier, France.

Ce séjour vient compléter le travail de Thèse de Doctorat engagé sur le thème « Biosystématique et conservation de quatre légumes feuilles traditionnels consommés au Bénin : Ceratotheca sesamoides, Sesamum radiatum, Acmella uliginosa et Justicia tenella.

Les récents travaux conduits sur l'écogéographie de ces quatre espèces a permis de constater qu'elle présente chacune des distributions assez variables à travers les différentes zones agro écologiques du Bénin.

Dans le but de contribuer à la domestication de ces espèces de légumes, il est important que des paramètres agro-morphologiques et génétiques soient connus. A notre connaissance, il n'existait aucune étude sur la diversité génétique de ces espèces utilisant les marqueurs moléculaires et/ou la cytométrie en flux.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce stage de formation, organisé dans le but de transférer à l'Universté d'Abomey-Calavi de nouvelles techniques d'étude en Biologie moléculaire et leur application sur les différentes espèces d'étude concernées par le travail de Thèse.

Les objectifs poursuivis étaient : i) de déterminer le taux de ploïdie et la taille du génome des différents écotypes de chaque espèce, ii) La mise au point et l'optimisation de protocoles spécifiques d'extraction d'ADN iii) étudier la diversité génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires AFLP.

L'obtention d'une bourse de la Wood-Whelan Foundation (International Union for Biochemistry and Molecular Biology) a permis d'organiser cette formation sur 3 mois en 2009, au lieu des deux semaines initialement prévues. Elle se poursuivra en 2010 sur deux mois.

La prochaine mission d'enseignement financée par le projet SUDBIOTECH Bénin aura lieu en **Décembre 2010**. Elle donnera lieu a l'organisation d'un **3ème Atelier** et permettra également l'organisation de la **soutenance de Thèse** de Mr ADEOTI Kifouli, Doctorant béninois soutenu par le projet.

#### **Mots clefs**

Enseignement, Formation, Biotechnologies végétale, Génie Génétique, Sciences du Végétal, OGMs.

#### Remerciements

L'organisation de l'Atelier de Cotonou a bénéficié du soutien financier de l'Agence Universitaire de la Francophonie (Convention 2062RR907), du Cirad (Departement BioS) et de l'Ambassade de France à Cotonou (Projet ARHES).

Le séjour de formation doctorale à Montpellier de Mr Kifouili ADEOTI a pu être prolongé grâce au soutien de la Fondation Wood-Whelan. Nous tenons à remercier le Professeur J.H. Weil pour son soutien actif.

Un soutien du CIRAD a été demandé pour 2010, dans le cadre de l'Appel d'Offres « Soutien aux Doctorants » de la Directions aux Echanges Scientifiques Internationaux (DESI)

Le montant de l'avenant 2009 de la Convention été versé par l'AUF au Cirad, organisme gestionnaire du budget. En date de l'organisation de la présente mission, le montant de l'avenant 2009 (8.500€) n'avait pas encore été affecté sur le code affaire réservé à cette convention. La présente mission d'enseignement a donc été réalisée sur avances de caisse consenties par le Cirad.

Les deux équipes s'accordent sur le fait qu'il n'est pas réaliste d'organiser, de Septembre à Décembre 2009, les deux missions Bénin -> France originalement prévues dans la Convention, dans des conditions satisfaisantes de préparation et d'accueil scientifique.

D'un commun accord, les équipes décident de concentrer les efforts et les moyens sur les travaux de thèse de Mr ADEOTI Kifouli, en ajournant la deuxième mission destinée initialement à un autre doctorant/jeune chercheur de l'équipe du Prof. Sanni. En outre, les Maitre de conférences et Doctorants concernés par cette formation en France ne seront pas disponibles en fin d'année. E

Ainsi, en conservant la somme globale allouée pour 2009 (8500€), nous avons procédé à une reventilation des crédits (1570 €) originalement prévus pour cette deuxième mission en France, en prolongeant de 7 à 10 jours la présente mission d'enseignement réalisée à Cotonou (+990 € en frais de séjour).

Ce rallongement du temps de formation a permis d'intégrer un TP et un Cours supplémentaires, assurés par l'équipe béninoise, ainsi que la visite des Laboratoires de l'ADRAO-WARDA à Abomey Calavi. Le reliquat (1570-990 = 580€) a été affecté à la production des documents pédagogiques supports de la formation dispensée et destinés aux étudiants.

La redistribution à la marge des crédits alloués n'affecte en rien les objectifs du Projet, ni son impact sur l'Équipe de recherche et les étudiants béninois.

Le montant de l'enveloppe globale pour 2009 sera respecté. Un courrier précisant ces modifications dans la programmation et la gestion de la Convention est envoyé à Serge Hamon, coordinateur du Réseau BioVeg AUF.

Le stage de Formation de Mr ADEOTI Kifouli, Doctorant de l'Université Abomey-Calavi s'est déroulé comme prévu en France à partir du 1<sup>er</sup> Octobre 2009. Ce séjour scientifique est hautement prioritaire pour le Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire. Il est destiné à finaliser un travail de thèse sur l'étude moléculaire de la diversité génétique de quatre espèces de légumes-feuilles béninois. Un financement de la Fondation Wood-Whelan permettra de prolonger ce séjour au delà des deux semaines prévues.

La prochaine mission d'enseignement au Bénin financée par le projet AUF aura lieu en Décembre 2010. Elle donnera lieu à la tenue d'un 3eme Atelier et permettra également l'organisation de la soutenance de Thèse de Mr ADEOTI Kifouli.



Département Systèmes Biologiques

Service Administratif et Financier TA A-SAF/PSS Boulevard de la Lironde RARRA Montoelliei

Rapport financier

Contrat:

BIOTECHNOLOGIES VEGETALES : amélioration des plantes et sécurité alimentaire initier un réseau de formation à la recherche intégrée en biotechnologies végétales

Montant du crédit alloué :

8 500 €

Acitivités :	Nom	Date	Montant Contrat signé	Montant dépensé	Balance
	Alain RIVAL, Aime NATO. Yves HENRI	juil-09			
Missions à la Faculté des sciences et techniques	Frais de voyage		2 470,00 €	3 159,98 €	-689,98 €
d'Abomey-Calavi (Cotonou Bénin)	Frais de séjour		2 310,00 €	8132,81	-5 822,81 6
			4 780,00 €	11 292,79 €	-6 512,79 6
	KIYOUR ADEOTI+ doctorant	oct-09			
	Frais de voyage		1 800,00 €	806,26	993,74
Satges de formation	Frais de séjour, d'accueil :		1 920,00 €	_	
	Bourse			2500	
	Frais de dossier + assurance			660,48	
			3 720,00 €	3966,74	-246,74
	TOTAL		8 500,00 €	15 259,53 €	6 759,53€

### PROGRAMME D'ENSEIGNEMENT

# Ilème ATELIER SUR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE ET LES BIOTECHNOLOGIES VEGETALES

Cotonou, Université Abomey-Calavi Institut des Sciences Biomédicales Appliquées

3 au 13 juillet 2009

Vendredi 3 Juillet.

Arrivée à Cotonou de l'équipe enseignante française (Drs Nato, Henry, Rival) sur AF0814 (19.30 pm)

Accueil par le Prof. Ambaliou Sani.

Samedi 4 Juillet.

Université Abomey-Calavi, ISBA. Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire

- Réunion des équipes enseignantes
- Révision du programme d'enseignement de l'Atelier
- Préparation des réactifs et petits matériel de TP
- Suivi de la Convention AUF 2092RR907
- Réunion budgétaire

Lundi 6 au Samedi 11Juillet. Université Abomey-Calavi, ISBA. Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire Ilème Atelier sur la Biologie Moléculaire et les Biotechnologies Végétales

- Cours, TP et TD (50 heures au total)
- Séminaire de Recherche et Visite des Laboratoires à l'ADRAO-WARDA.

Lundi 13 Juillet.

Université Abomey-Calavi, ISBA. Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire

- Debriefing de la mission
- Visite du Laboratoire d'immunologie IRD-UR10 / UAC sur le campus ISBA
- Visite des installations Air Liquide Bénin (cryogénie)
- Préparation des réactifs et matériel de TP pour la prochaine mission.

Départ pour Paris de l'équipe enseignante française (Drs Nato, Henry, Rival) sur AF0813 (23.05 pm)

### SudBiotech Bénin - Ilème Atelier sur la Biologie Moléculaire et les Biotechnologies Végétales Programme d'enseignement

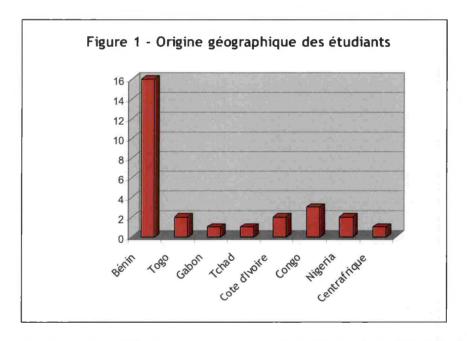
Lundi 6 juillet	09.00 - 10.30	Ouverture officielle - Accueil	15:00 - 16:30	TD1 : Morphogenèse Végétale in vitro
	11:00 - 13:00	Tour de table     Programme de la semaine	17:00 - 19:00	Cours 1 : Organisation des génomes Angiospermes
Mardi 7 juillet	09.00 - 09:30	<ul> <li>Debriefing</li> <li>Présentation des Travaux Pratiques (TP1)</li> </ul>	15:00 - 16:30	TP1 : Calculs et Interprétation
	09:30 - 13:00	TP1 : Recherche de marqueurs Biochimiques des processus de Prolifération et de Différenciation	17:00 - 19 :00	TP1 : Mise en commun des résultats et Conclusions
Mercredi 8 juillet	09:00 - 10:00	Debriefing / Plasticité morphologique et métabolique	15:00 - 16:30	Cours 2 : Epigénétique et Génétique
	10:30 - 13:00	TP2 - Protocole simplifié d'extraction de nucléotides	17:00 - 18:30	TD2 : La Polymerase Chain Reaction (PCR) : Principe et applications en Biologie Moléculaire
Jeudi 9 juillet	09:00 - 11:00	Cours 3: Biotechnologies Modernes et OGMs dans l'Agriculture Africaine	15:00 - 18:00	Table Ronde sur les OGMs végétaux Projections vidéo et débats
	11:30 - 13:00	Cours 4 : Les composés naturels végétaux à propriétés antiparasitaires et antimicrobiennes		
Vendredi 10 juillet	09:00 - 11:00	TP4 : Bioproduction de protéines recombinantes chez une plante modèle	15:00 - 19:00	Visite et Conférences au Centre ADRAO - WARDA
	11:30 - 13:00	Cours 5 : Les plantes « Bioréacteurs pour la biopharmacie »		
Samedi 11 juillet	09:00 - 11:00	TP3 - Détection des transgènes par PCR	15:00 - 16:30	TD3 - Conseils pour la rédaction de Projets de recherche et CV
	11:30 - 13:00	Cours 6 - Innovation et transfert d'échelle en Biotechnologies	17:00 - 18:30	Questionnaire de satisfaction     Bilan et perspectives

#### JOURNEE du 06/07/09 - Ouverture officielle de l'Atelier

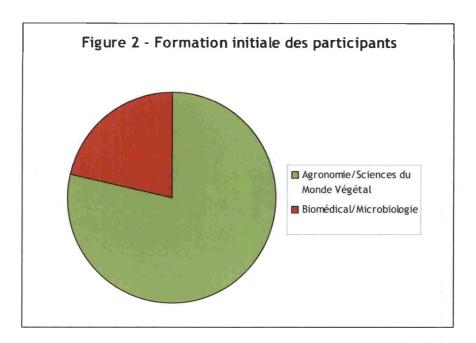
La première journée a débuté à 9h par l'ouverture de l'atelier sous le patronage scientifique du Professeur P LALEYE, Directeur du Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique. Le Prof. LALEYE a souligné l'importance du projet SudBiotech-Bénin pour le renforcement des acquis et le développement des capacités des Doctorants. Le mot d'ouverture a été suivi des interventions des formateurs : le Professeur Ambaliou SANNI (Directeur du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université Abomey Calavi), les Docteurs Alain RIVAL (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD), Aimé NATO (Université Paris Sud) et Yves HENRY (Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS Orsay).

Les interventions des formateurs ont rappelé les objectifs fondamentaux de l'Atelier. Le programme a été présenté en insistant sur l'importance accordée aux expérimentations et à la démarche scientifique. L'Atelier présente un parcours pédagogique intégré, allant des concepts fondamentaux de Totipotence et Plasticité des végétaux jusqu'au Génie génétique et à l'acceptation sociale des OGMs. Il importe que chaque participant puisse s'approprier les diverses technologies présentées au cours de l'Atelier. Les enseignants ont invité les participants a visiter le site web récemment créé par eux, et consultable a l'adresse suivante : http://www.cetice.u-psud.fr/cetice/2007/ogm/

Cette présentation détaillée a pris fin à 10h 30 avec un tour de table permettant d'échanger sur las attentes respectives de chaque participant. L'Atelier accueille 28 participants issus de 8 nationalités différentes: Bénin, Togo, Congo-Brazzaville, Tchad, Côte d'Ivoire, Gabon et Nigéria (figure1).



Les participants présentent différents profils : étudiants en Master ou en DEA, Doctorants ou Assistants de recherche. Certains sont issus de formation agronomique et végétaliste, d'autres ont un background plutôt microbiologie et biomédical (Figure 2).



Les enseignants insistent sur le temps de formation dédié au dialogue informel et à la bonne compréhension des concepts fondamentaux et des démarches déductives qui articulent le parcours pédagogique proposé.

De 11h à 13 h une table ronde a offert à chaque participant l'opportunité de soulever les difficultés auxquelles il est confronté dans son propre travail de Laboratoire, et de se prononcer sur ses attentes vis-àvis de l'Atelier.

Ainsi, l'acquisition et le perfectionnement de nouvelles techniques de biologie moléculaire et de biotechnologie végétale, la caractérisation des marqueurs moléculaires, la sélection assistée par marqueurs, les risques des OGMs, la biosécurité dans les laboratoires, et la rédaction de projets de recherche font partie des préoccupations exprimées. Les formateurs ont apporté des réponses détaillées à chaque intervenant, en les reliant aux objectifs et au programme de l'Atelier.

Un groupe de rédacteurs volontaires s'est désigné, afin de réaliser au jour le jour un rapport abrégé et illustré de photographies des activités de l'Atelier. C'est le travail de ce groupe, corrigé et amendé qui sert de base au présent rapport.

Les formateurs ont distribué à chaque participant un dossier complet comprenant l'ensemble des documents complémentaires aux Cours et TD, ainsi que les protocoles complets de Travaux Pratiques.

Le TD n<sup>0</sup>1, intitulé "Morphogenèse végétale *in vitro*" a été présenté par le Dr Nato entre 15 et 17h. Ce TD consistait à observer le développement de cultures *in vitro* de tabac en boites de Pétri, afin de déterminer d'une part l'importance de l'équilibre hormonal (auxine/cytokinine) dans la programmation morphogénétique, et d'autre part le rôle de la lumière dans l'expression de ces phénomènes. L'auxine est connue pour favoriser la prolifération et les cytokinines pour stimuler la différenciation cellulaire. Le rôle de la lumière est également pris en compte dans l'interprétation des observations.

L'hypothèse de travail est que les végétaux présentent une double flexibilité : morphogénétique et métabolique. Cette flexibilité (résilience) leur permet une adaptation étonnante aux stress et la réponse aux conditions environnementales.

De 17h 15 à 19h, un cours sur *L'organisation du génome des Angiospermes* a été présenté par Yves Henry. De grandes étapes évolutives sont liées à des changements importants du taux de ploïdie. La disponibilité récente de génomes végétaux entièrement séquencés (*Arabidopsis*, peuplier, vigne,...) permet de proposer des hypothèses novatrices sur l'évolution et l'organisation actuelle des génomes chez les Eudicotylédones et les Monocotylédones.



Figure 3 - Participants et enseignants de l'Atelier, réunis à l'ISBA, Université Abomey Calavi

### JOURNEE du 07/07/09 -Marqueurs biochimiques de la prolifération et de la différenciation

La journée a commencé à 9h avec un résumé partagé entre enseignants et étudiants, des notions évoquées le jour précédent, en TD comme en cours. Il est décidé que ce débriefing quotidien soit systématique, afin d'éviter les zones d'ombre dans la compréhension et l'appropriation efficace de la formation.

Une présentation des premiers Travaux Pratiques a ensuite été effectuée par le Dr Nato; ils portent sur *La recherche de marqueurs biochimiques des processus de prolifération et de différenciation cellulaires*, en concentrant l'analyse sur deux carboxylases, la PhosphoEnolPyruvate Carboxylase ou PEPC et la Ribulose *bis*phosphate carboxylase ou RuBisCo.

L'objectif principal de ce TP est la caractérisation (activité, quantité) de marqueurs biochimiques permettant de caractériser la flexibilité métabolique et la flexibilité morphologique des plantes. Plus spécifiquement, les objectifs fixés sont les suivants :

- 1- L'analyse de l'expression des programmes morphogénétiques sous le contrôle d'un signal lumineux et par le biais d'un équilibre hormonal auxine/cytokinine.
- 2- L'analyse des marqueurs biologiques susceptibles de caractériser les processus de prolifération et de différentiation.

Le matériel végétal utilisé pour atteindre ces différents objectifs est un ensemble de cultures *in vitr*o de tabac cultivées sur milieu gélosé enrichi de saccharose et de vitamines, sous les conditions de culture suivantes :

- Cal sur milieu minimum sans auxine ni cytokinine (T)
- Cal sur milieu minimum enrichi en auxine (2mg/l), avec 0,2 mg/l de cytokinine (A)
- Cal sur milieu minimum enrichi en cytokinines (2mg/l), avec 0,2 mg/l d'auxine (B) (Figure 4)
- Vitroplant de tabac sauvage sur milieu minimum (Fwt) (Figure 5)
- Vitroplant de tabac mutant albinos sur milieu minimum (Fa) (Figure 5)

Ces différents échantillons ont été cultivés à la lumière et à l'obscurité.

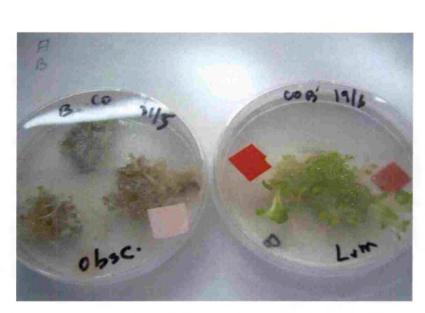


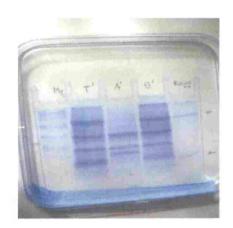
Figure 4 - Cals embryogènes de tabac en culture *in vitro* sur milieu B, à l'obscurité (boite de gauche) ou à la lumière (boite de droite).



Figure 5 - Vitroplants de tabac : à gauche mutant albinos cultivé à la lumière, et à droite témoin sauvage cultivé à l'obscurité.

Les étudiants ont effectué une observation morphologique détaillée du matériel végétal en boites de pétri et en bocaux, cultivé sur *in vitro* sur différents milieux, en conditions de lumière ou d'obscurité. Dans un deuxième temps, les protéines solubles totales de chaque population de cals ont été extraites. Elles sont quantifiées au spectrophotomètre à 595 nm (Méthode Bradford au Bleu de Coomassie). Les polypeptides des extraits bruts sont ensuite analysés par électrophorèse (Figure 5A) sur gel de polyacrylamide (gel natif). Pour la RuBisco, afin de visualiser les deux sous-unités constitutives, les protéines sont dénaturées en présence du détergent ionique SDS, puis séparées par SDS PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

La révélation des sous-unités s'effectue par technique de Western Blot (immunoempreintes) : les polypeptides sont reconnus par des anticorps polyclonaux spécifiques après leur électro-transfert sur membrane de nitrocellulose (Figure 5B).



A

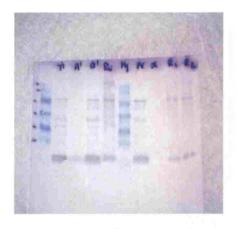


Figure 5A - Gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie, dont les pistes (de gauche à droite) montrent les marqueurs de poids moléculaire, les protéines extraites du témoin (T), les protéines extraites du matériel cultivé sur milieu enrichi en auxine (A), les protéines extraites du matériel cultivé sur milieu enrichi en cytokinine (B) et la RuBisCo pure (petite sous-unité et grande sous-unité). Figure 5B - Révélation de la membrane (Western blot) est réalisée grâce à un anticorps secondaire marqué à la péroxydase venant se fixer sur l'anticorps primaire anti-RuBisCo. Les pistes montrent de gauche à droite : les marqueurs de poids moléculaire, puis les protéines reconnues dans les extraits T, A et B, la RuBisCo pure, les marqueurs de poids moléculaire, les protéines reconnues dans les extraits Fwt, Fa, et deux pistes de RuBisCo pure (petite sous-unité et grande sous-unité).

La révélation de l'activité enzymatique in situ a été effectuée spécifiquement pour la PEPC est révélée grâce à la coloration de l'Oxaloacétate (OAA) produite par la carboxylation du PEP (Figure 6).



Figure 6 - Révélation de l'activité PEPC. De gauche à droite, protéines extraites du témoin (T`), protéines extraites du matériel cultivé sur milieu enrichi en auxine à la lumière (A`), protéines extraites du matériel cultivé sur milieu enrichi en cytokinine (B°), protéines extraites de la plante témoin chlorophyllienne à la lumière (Fv) et protéines extraites du matériel cultivé sur milieu enrichi en auxine à l'obscurité (A).

Les résultats et les interprétations issus de ces travaux sont résumés dans le Tableau 1 présenté à la page suivante.

A l'examen des résultats obtenus, quelques conclusions simples peuvent être tirées;

- La lumière et l'équilibre hormonal (auxine/cytokinine) contrôlent l'expression des programmes morphogénétiques des vitroplants.
- Les marqueurs enzymatiques que sont les deux carboxylases végétales PEPC et RuBisCo permettent de caractériser les processus de prolifération et de différenciation morphogénétique.
- La grande sous-unité de la RuBisCo est absente (ou très faiblement représentée) dans les cellules en prolifération active, suggérant un défaut de maturation des chloroplastes.
- Chez le mutant nucléaire albinos, nous ne retrouvons aucune trace de RuBisCo. Sachant que les ARN messagers de ces deux sous-unités sont présents dans ce matériel, l'absence des deux sous-un ités de l'enzyme suggère une régulation complexe.

NB: Notons qu`au cours de la quantification des protéines solubles, une erreur au niveau de l'étalonnage nous a amené à reprendre une deuxième fois les manipulations au spectromètre.

Milieux de culture	Protéines Solubles Totales (µg/g MF)	Activité PEPC In situ	Interprétation
Milieu T à la lumière (T`)	560	Faible	Absence d'hormone, organogenèse normale.
Milieu A à la lumière (A`)	260	Très forte	Division cellulaire active due à l'auxine d'ou une faible accumulation protéique, et une faible production de RuBisCo avec l'absence de la grande sous-unité (codée par le chloroplaste). Pas de maturation du chloroplaste.
Milieu Bà la lumière (B`)	280	Faible	Différenciation active due à la cytokinine, d'ou la formation de bourgeons et de feuilles vertes. La maturation chloroplastique est complète avec une forte teneur en RuBisCo
Milieu A à l'obscurité	230	Intense	Prolifération, faible taux de RuBisCo
Milieu B à l'obscurité	230	Faible	Différenciation, faible taux de RuBisCo
Plante verte (Fvl) à la lumière	2700	Faible	Différenciation, taux élevé de RuBisCo
Plante mutante (Fα) à la lumière	1170	Intense	Absence totale des deux sous-unités de la RuBisCo
Plante mutante (Fa) à l'obscurité	350	Faible	Non analysé

#### JOURNEE du 08/07/09 - Extraction de Nucléotides - Génétique et Epigénétique

Cette troisième journée a été marquée par la réalisation de la deuxième série de travaux pratiques intitulés « Protocole simplifié pour l'extraction d`ADN végétal ». Ces TP ont été effectués sous la supervision du Dr Nicodème CHABI et du Dr Alain RIVAL. L'objectif de cette séance est d'extraire et de visualiser l'ADN et les autres nucléotides (ARNs) végétaux en utilisant une méthode simple et rapide.

Le principe de cette manipulation est basé sur la lyse cellulaire par des réactifs simples tels que le sel de table et le détergent liquide. Il s'agit de montrer le rôle des nucléotides en tant que constituants normaux du vivant et de « démystifier » l'ADN, souvent considéré comme élément exogène du vivant.

L'utilisation du Bromure d'Ethidium (substance fluorescente) qui s'intercale entre les constituants des nucléotides et le rend visible à l'UV, a permis de confirmer que cette technique permet l'obtention d'importantes « pelotes d'ADN ».

Le protocole suivi pour l'extraction de l'ADN à partir de bulbes d'oignon, de cals organogènes de tabac et de plantes mutantes albinos est résumé comme suit :

- 1. Préparation de la solution de lyse en faisant dissoudre 0, 5 g de sel de table dans 25 ml de détergent liquide de cuisine à 10%
- 2. Broyer au mortier 10 g de matériel végétal et ajouter 25 ml de la solution de lyse.
- 3. Faire passer le mélange à travers le papier filtre et récupérer le filtrat dans un tube Falcon de 50 ml
- 4. Précipiter les acides nucléiques par ajout de 15 ml d'éthanol froid à la solution filtrée
- 5. Laisser reposer. Une pelote blanche apparait : ce sont des acides nucléiques
- 6. Récupérer les acides nucléiques à l'aide d'une micro pipette et les déposer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
- 7. Sécher à l'étuve à 56 ° C durant 15 mn
- 8. Resuspendre l'ADN dans 200 µl d'eau distillée stérile
- 9. Ajouter du BET et observer sous UV.

Ce protocole extrêmement simple fournit des résultats spectaculaires (Figure 7):







В

Figure 7 - Mise en évidence sous UV des nucléotides végétaux extraits par méthode simplifiée. A : Pelote de nucléotides colorée au BET dans la solution éthanolique (Etape 5 du protocole) - B : le témoin est un tube Eppendorf contenant BET + eau (à gauche) et BET + ADN (0,2 ml dans 1,3 ml d'eau) (à droite).

Les nucléotides issus de ce protocole d'extraction doivent être purifié (incubation en présence de protéases et de RNAses, déprotéinisation), afin d'isoler l'ADN avant tout autre usage tel qu'une amplification PCR.

Après le déjeuner, les travaux ont repris à 15h avec un exposé sur *Génétique et Epigénétique* animé par Dr Alain Rival. Au cours de son exposé, l'orateur a rappelé, à partir de la description de sa structure moléculaire, que l'ADN est le support de l'information génétique. L'analyse brute du code génétique (gènes) fait appel à la génomique structurale grâce à des techniques de séquençage, tandis que la fonction du gène (son expression sous forme d'ARN messagers puis de protéines) est étudiée par la génomique fonctionnelle ou post - génomique. L'épigénétique se définit comme l'ensemble des processus d'hérédité nucléaire qui ne sont pas fondés sur des différences dans la séquence d'ADN. Les différents mécanismes épigénétiques et leurs interactions, valables pour l'ensemble des Eucaryotes, ont été présentés : remodelage de la chromatine, méthylation de l'ADN, action des petits ARNs non codants. Il faut noter que l'épigénétique est une voie naturelle d'inactivation des gènes, employée par tous les êtres vivants au cours du développement et en réaction aux modifications de l'environnement. Elle permet par conséquent d'effectuer un blocage d'une fonction spécifique sans altérer la séquence de l'ADN.

Cette notion est à mettre en relation avec la flexibilité métabolique et morphogénétique des plantes abordée en première partie de l'Atelier.

Ce cours a été suivi d'une séance de Travaux Dirigés portant sur La Réaction de Polymérisation en Chaine ou PCR par Alain RIVAL. Apres avoir rappelé le principe de la PCR, qui est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser à partir d'une paire d'amorces un brin complémentaire à un fragment d'ADN, il a montré que la PCR est une technique très puissante de la biologie moléculaire. Cette technique assure l'amplification d'une séquence d'intérêt à partir de très faibles quantités (une seule molécule suffit !) : elle permet d'obtenir 2<sup>n</sup> copies (n étant le nombre de cycles d'amplification). Malgré sa puissance, cette technique n'est pas exempte de faiblesses : elle amplifie aussi très efficacement les ADNs polluants, elle est conditionnée par la qualité de la Taq polymérase employée, enfin la précision des différentes étapes de chaque cycle reste très dépendante de la technologie offerte par les thermocycleurs. Ces faiblesses la rendent donc difficilement transférable d'un Laboratoire à l'autre.

### JOURNEE du 09/07/09 - Biotechnologies et OGMs

Cette journée à commencé par un exposé animé par le Dr Alain Rival, portant sur *Biotechnologies modernes et OGMs dans l'agriculture africaine*.

Après une présentation de l'usine cellulaire, l'orateur à défini ce que sont le génie génétique et les OGM. Il a montré que, contrairement à la sélection classique, pour laquelle les gènes d'intérêt sont introgressés à partir de génomes de la même espèce ou d'espèces très proches, le génie génétique s'affranchit de ces limitations et utilise des gènes pouvant provenir de n'importe quel organisme. Les OGMs se retrouvant d'ores et déjà sur le marché et dans les assiettes des consommateurs (soja, colza, mais), le conférencier a donc abordé les risques liés aux OGMs, les questions d'éthique, mais également les avantages qu'ils peuvent apporter aux populations et aux producteurs africains.

Pour l'orateur, l'agriculture africaine doit faire face à des difficultés croissantes, telles que l'insécurité alimentaire due à la croissance démographique, le manque de moyens, l'absence de technologies, l'appauvrissement de la diversité biologique et la dégradation de l'environnement. Les biotechnologies peuvent aider à la résolution de certaines de ces difficultés.

Les risques liés aux OGMs chez les plantes ont été évoqués: la production de super mauvaises herbes (multi résistantes aux herbicides), la dissémination de gènes, la perte de diversité génétique, les difficultés d'une séparation des filières OGM/non OGM (coûts énormes), le droit de propriété intellectuelle et industrielle (brevetage de gènes ou d'organismes vivants), l'éventuel transfert horizontal d'ADN de plantes/animaux vers l'homme via les aliments, et les risques inconnus et imprévus de la consommation d'OGM.

Il est donc urgent que puisse émerger une population de jeunes scientifiques formés a ces méthodes, capables de jouer un rôle déterminant dans les prises de décision de états africains concernant la bioéthhique et les biotechnologies.

Le second exposé de cette journée a été celui du Dr LAGNIKA sur « Les composés naturels végétaux à propriétés antiparasitaires et antimicrobiennes ». Au cours de sa présentation l'orateur a montré comment il a pu isoler et identifier des molécules extraites de Croton labatus et de Thalia genuculata (deux espèces endémiques de la flore régionale) leur pouvoir antimalarial ou antimicrobien, grâce à diverses techniques chimiques (RMN, SM, CCM, HPLC....) et biochimiques.

Après le déjeuner, les activités de l'Atelier ont repris avec une projection DVD sur les OGMs végétaux, leur acceptation sociale et le rôle des multinationales agroalimentaires, suivie d'un débat public en présence de représentants de la presse locale (voir Annexe 3).

### JOURNEE du 10/07/09 - Biopharmacie - Visite de l'ADRAO

Les travaux de la matinée ont commencé avec des Travaux Pratiques (TP4) sur la production de molécules biopharmaceutiques par des cultures racinaires de tabac.

Il s'agit ici de démontrer qu'il est possible non seulement de produire, mais également de faire excréter, par les cultures de racines des vitroplants transgéniques de tabac, des fragments d'anticorps sous forme d'un polypeptide comprenant les parties variables des chaînes lourdes et légères, liées entre elles par un lien peptidique (scFv), dirigés contre les interleukines IL-4 et Il-6 humaines. Différents organes de tabac transformés sont capables d'exprimer ces ScFv et les racines accumulent ces protéines recombinantes.

Les extraits bruts de racines transformées ont été au préalable séparés par électrophorèse et transférées par Wertern Blot sur membrane de nitrocellulose. Cette expérimentation requiert l'utilisation de deux anticorps, primaire, puis secondaire porteur d'une activité péroxydasique. Après la fixation de l'anticorps spécifique pendant 24h à 4°C, lavage au PBS et fixation de l'anticorps secondaire, l'observation du gel est la suivante :

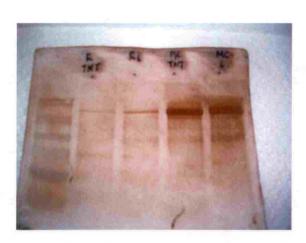


Figure 8 - Révélation par Western Blot de la production in vitro d'anticorps d'interleukines (de gauche à droite) : racine du tabac non transformé (TNT), racine de tabac transformé (RT), milieu de culture du TNT, milieu de culture du (RT).

Ces observations confirment bien que les racines rejettent des protéines dans le milieu de culture ; on note la présence de la protéine recombinante dans les racines transformées.

A la suite du TP4, l'exposé du Dr Aimé Nato a porté sur Les plantes transgéniques dans les bioréacteurs pour la production de protéines recombinantes à usage thérapeutiques et biopharmaceutiques. A travers cet exposé, il a défini le concept d'agriculture moléculaire végétale.

Parmi les avantages des végétaux transformés par rapport aux procédés microbiologiques, nous pouvons citer :

Rapport Scientifique Annuel 2009 – Projet SudBiotech - Convention AUF Actions de Recherche en Réseau 2009-2010

Page 20 sur 48

- La capacité de cibler de façon spécifique les tissus dans lesquels s'exprime la protéine d'intérêt.
- La possibilité de passage à des cultures à large échelle, en bioréacteur
- La facilite de manipulation par rapport aux cultures en champ.
- Les coûts d`exploitation réduits.

En laboratoire cette technique a permis de produire des vaccins, de l'insuline, les interférons, la lipase gastrique... De plus ces cultures sont exemptes de cellules pathogènes et ne présentent pas non plus de molécules allergènes pour l'homme.

Jusqu'à nos jours la production commerciale des protéines recombinantes n'a pas encore été atteinte. L'orateur a conclu qu'il serait intéressant d'encourager le développement de cette technologie, afin d'aider à résoudre certains problèmes de santé.

L'Atelier s'est poursuivi avec la visite de l'ADRAO (Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest) à Abomey Calavi.



Figure 9 - Participants et formateurs de l'Atelier, dans les locaux de l'ADRAO

La visite a commencé par une présentation générale de la structure ADRAO par le Dr Marie Noëlle Ndjiondjop, responsable du programme concernant la diversité génétique et l'amélioration du riz. L'ADRAO regroupe 22 pays; son siège installé à Bouaké (Cote d'Ivoire), a été momentanément délocalisé pour des raisons de sécurité à Cotonou (Bénin). Cette structure dont l'objectif principal est de contribuer à la sécurité alimentaire est divisée en 4 programmes dont le premier est la diversité génétique et l'amélioration du riz. Ce programme développe plusieurs techniques de biologie moléculaire et de biotechnologies pour atteindre à ses objectifs.

Le Dr Kadhy Nani (Post-Doc) a ensuite présenté un exposé sur les *Techniques de biologie moléculaire utilisées pour l'amélioration du riz*. A l'ADRAO, ces techniques sont appliquées aux espèces *Oryza sativa* et *Oryza glaberima*. Parmi ces techniques nous pouvons citer la PCR, la RT-PCR, les DNA chips (micro et macroarrays), le clonage de gènes, l'utilisation de différents marqueurs (RFLP, AFLP, microsatellites, SNPs, etc....). Pour terminer la présentatrice a donné quelques exemples d'application pour l'amélioration chez le riz de la tolérance aux herbicides, ou de la résistance aux stress biologiques comme par exemple certains pathogènes. Elle a conclu que les biotechnologies sont très importantes pour l'amélioration du riz.

Un dernier exposé a été donné par le Dr Marie Noëlle Ndjiondjop qui a montré les résultats obtenus par son équipe et les instituts associés (IRD) dans La lutte contre le Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) grâce à la sélection assisté par marqueur. Le RYMV est un virus très nocif pour O. sativa, trouvé de manière très importante en Afrique de l'Ouest, de l'Est et a Madagascar. L'Unité a pu développer des lignées isogéniques, identifier et caractériser les sources naturelles de résistance au RYNV, transférer la résistance au RYNV. Ces riz résistants au RYNV sont actuellement en expérimentation au champ en Guinée, au Burkina Faso, en Gambie et au Mali.

Cette visite à l'ADRAO a pris fin avec la visite des laboratoires de Ressources génétiques, biologie, de physiologie et de phytopathologie.

#### JOURNEE du 11/07/09 - Détection des OGMs par PCR - Rédaction de projets

La dernière journée de l'atelier a permis d'aborder la détection d'OGM par PCR (Polymerase Chain Reaction) présentée le Dr RIVAL dans le cadre d'une application en laboratoire.

Une présentation rapide du protocole a permis de clarifier le rôle de chaque partenaire de la réaction (ADN, Taq, dNTPs, Tampon Taq, Amorces spécifiques...). La préparation des MasterMix et les contraintes expérimentales liées aux risques importants de contamination des ADNs ont fait l'objet d'une attention particulière. L'application au laboratoire a pour objectif l'identification chez le riz de lignées OGM porteuses d'un gène de sensibilité au RYMV par analyse de leur ADN. Nous allons vérifier si l'OGM a effectivement incorporé le matériel génétique qui lui a été transféré, grâce à la PCR.

Les participants ont travaillé sur 6 échantillons d'ADN de riz transformés et 4 témoins, à deux températures d'annealing différentes (55 et 60° C). Après migration sur gel d'agarose des échantillons correspondant a la Ta 55°C, les résultats obtenus sont les suivants :

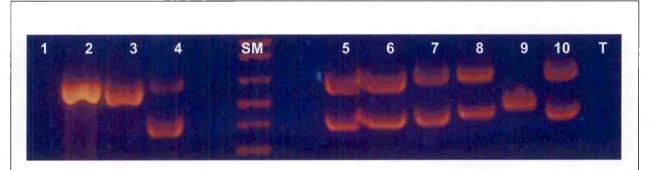


Figure 10 : Révélation des produits PCR sur gel d'agarose à 2%

Puits 1 à 4: Lignées de riz témoins non-transgéniques. La lignée 4 porte le gène de sensibilité recherché

SM: Size Marker: 1kb ladder de 500 pb à 1 kb

Puits 5 à 10: Lignées de riz transformées. La PCR révèle bien le transgene de taille attendue pour (550bp) 5 des 6 lignées testées. Le puits n°9 montre un profil d'amplicons inattendu, qu'il faudra analyser (le séquencage du produit PCR pourrait donner une indication)

Puits T : Témoin négatif (PCR sans ADN)

Avec les mêmes amorces, l'amplification PCR conduite à Ta=60°C a donné des résultats sensiblement identiques.

La session suivante a été consacrée à un TD portant sur Conseils pour la rédaction de projets et de Curriculum VItae.

Sur la base de deux exemples concrets, un formulaire de projet a rédaction libre (Fondations provées) et un projet à rédaction très encadrée (Commission Européenne), le Dr Alain RIVAL a montré les éléments (titre, mots clés, demandeur, Institution recevant le demandeur, personnes référents, budget demandé, durée, problématique, objectifs, matériel et méthodes, originalité du projet, bibliographie) indispensables pour convaincre les évaluateurs de l'intérêt du projet.

Ces éléments doivent être, le plus souvent, être complétés par un curriculum vitae actualisé et une lettre de motivation.

Le Dr Alain Rival a présenté deux outils de montage et de gestion de projets particulièrement utiles:

- 1. L'organigramme du projet (flow chart) sur lequel les étapes logiques sont mentionnées avec leurs articulations et les conditions du GO/noGO de chaque étape,
- 2. Le chronogramme du projet, qui doit, sur une échelle de temps, permettre de visualiser la succession des différentes étapes du projet (Tasks/ Work packages) avec leurs balises (Milestones), leurs résultats attendus (Expected Outputs) et la production afférente (Deliverables).

Le Dr Rival a ensuite présenté un exposé portant sur «Innovations et transferts d'échelle en micropropagation » décrivant l'exemple concret de la micro propagation clonale du palmier à huile.

Il a montré les différentes étapes de la production in vitro des clones à travers la callogenèse, l'embryogenèse somatique, la production des pousses feuillées et la rhizogenèse. Ces pousses feuillées sont acclimatées sur sable stérile sous tunnels pour passer à la pépinière et enfin aux essais en champ destinés à évaluer leur comportement et la production d'huile végétale (première huile au monde après celle du soja).

Le passage du laboratoire a l'Unité de Production industrielle nécessite plusieurs changements d'échelle sur une échelle de temps étendue (prés de 40 ans dans ce cas précis). Elle et nécessite des transitions entre un petit groupe de recherche et des équipes de plus en plus larges. Chaque étape s'accompagne de mises de fonds importantes, croissant le plus souvent d'un facteur 10!

Chacune des difficultés rencontrées requiert la mise en place de nouveaux intervenants et le recrutement de nouvelles compétences.

Ces cycles d'innovation et de transfert ne suivent pas un modèle linéaire mais constituent plutôt un ensemble de boucles itératives imbriquées.

#### **BILAN FINAL - PERSPECTIVES**

Une enquête de satisfaction (voir Annexe 2) a été menée en fin de formation; elle a montré une adéquation très satisfaisante entre les attentes des étudiants et les thèmes proposés.

Les réponses au questionnaire se répartissent comme suit :

# QUESTION 1. Que pensez-vous du contenu proposé? Différenciez vos réponses pour les approches moléculaire, physiologique et cellulaire?

Le contenu de l'Atelier a été jugé satisfaisant pour 100 % des réponses

Suggestion: Plus de manipulations pour les TPs de Physiologie, pour lesquels certaines séquences sont pré-effectuées par les enseignants (Gels de Polyacrylamide, Electrotransfert,...)

## QUESTION 2. Le contenu des enseignements proposés (TP, TD, Cours, visite) correspondait-il à vos attentes ?

L'Atelier a répondu aux attentes de 100% des participants, le groupe étant de niveau assez homogène (DEA, PhD)

L'organisation de Travaux Pratiques a été fortement appréciée, mais plusieurs participants demandent plus de temps pour l'interprétation, les calculs et la mise en commun des résultats. Le niveau de technicité demandé pour la réalisation des TPS est adéquat au niveau de formation

#### QUESTION 3. L'ensemble vous a-t-il donné satisfaction?

La réponse est oui pour 100% des participants, même si l'équilibre acquisitions/approfondissements n'a pas été le même pour tous.

Pour plusieurs participants, l'Atelier était une première expérience de formation incluant des séances pratiques.

# QUESTION 4. Les enseignants ont-ils été assez disponibles pour répondre à vos questionnements individuels ?

La réponse est oui pour 100% des participants.

La question d'une session destinée à l'examen des projets personnels a été évoquée par l'Equipe enseignante. Ce besoin n'est pas apparu au travers du présent questionnaire, mais une session pourrait être envisagée dans le cadre d'un Atelier de deux semaines.

# QUESTION 5. La formation reçue vous sera-t-elle utile pour la poursuite de votre carrière professionnelle ?

La réponse est oui pour 100% des participants, plusieurs d'entre eux insistant encore sur l'utilité de la formation pratique.

#### QUESTION 6. Que suggérez-vous pour améliorer l'ensemble du parcours pédagogique ?

C'est, pour l'Équipe pédagogique, la partie la plus intéressante du questionnaire ! Ainsi, il ressort de l'enquête divers points importants à améliorer pour les missions futures:

- Prolonger la formation sur deux semaines, pour
  - o alléger les horaires quotidiens (8h),
  - o augmenter la partie dévolue à la formation pratique,
  - o prendre le temps de faire tous les rappels nécessaires avant de passer à la notion suivante
  - o instaurer une session sur la recherche bibliographique assistée sur Internet
  - o élargir la formation a d'autres champs des biotechnologies : pathologie, virologie, génie génétique, applications biomédicales
  - o organiser une session sur les aspects légaux : brevets, droit du vivant, cadres juridiques locaux pour les biotechnologies ...

- La partie Pratique de l'Atelier a recu bon nombre de suggestions d'amélioration :
  - o installer des salles de TPs plus grandes et mieux équipées.
  - o réduire la taille des groupes 4 personnes, afin de permettre à chaque participant de participer à la totalité des expérimentations

#### QUESTION 7. Quelle est votre critique principale?

Pour de nombreux participants, les séances de Travaux Pratiques auraient beaucoup gagné à être organisées dans des espaces plus grands.

L'équipe pédagogique va tenter d'exploiter au mieux les infrastructures locales afin d'organiser les TPs dans des salles plus grandes et mieux équipées à l'avenir. Au cours du présent Atelier, la partie pratique a été réalisée dans les locaux propres du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire.

#### QUESTION 8. Quel a été le module d'enseignement le plus utile à votre cursus ?

Évidemment, les réponses varient en fonction de la spécialisation des participants. Majoritairement les TPs et TDs consacré à l'extraction d'ADN et a la PCR ont été considérés comme utiles.

#### QUESTION 9. Autres remarques et suggestions.

- Bien que les organisateurs aient mis en place, grâce à la participation financière du Cirad, un service de restauration gratuite sur place pour tous les participants certains étudiants ont évoqué les couts de transports, qu'il faudra prendre en compte lors de prochaines sessions.
- De même, la lourdeur des horaires journaliers, avec certaines journées finissant a plus de 19.30 a posé des problèmes de transport a plusieurs participants
- Certains participants auraient souhaité recevoir l'ensemble des Documents Pédagogiques avant l'Atelier, afin de pouvoir mieux préparer leurs questions.
- La rédaction d'un rapport personnel par l'étudiant a été également suggérée; elle pourrait faire l'objet d'une séance de TD supplémentaire.
- L'organisation d'une formation conjointe avec l'ADRAO, avec la délocalisation d'une partie des enseignements est évoquée par plusieurs participants
- La densité de la formation a souvent été évoquée, avec une suggestion originale et utile: l'organisation d'une soirée festive en milieu de semaine, destinée à faciliter les contacts et relancer le rythme de l'Atelier.

La communauté des participants et des enseignants (Annexe1) a décidé de créer un espace commun virtuel sur Yahoo afin de garder le contact et mettre en commun l'ensemble des informations utiles découlant de la Formation.

Pour mener à bien cet Atelier, l'équipe pédagogique a été renforcée par l'apport considérable des Enseignants-chercheurs béninois de l'UAC : Ambaliou SANNI, Nicodème CHABI, Kifouli ADEOTI.

En outre, les chercheurs de l'ADRAO-WARDA (M-Noëlle NDJIONDJOP et Nani DRAME) ont accueilli l'Atelier durant une demi-journée, proposant une visite détaillée et deux séminaires spécialisés, ouvrant ainsi les étudiants aux applications concrètes des notions évoquées lors de la formation.

Cette ouverture devra être renforcée à l'avenir, en intégrant la participation d'autres enseignants chercheurs de l'UAC, de l'ADRAO et de leurs institutions partenaires (IRD, Cirad).

La prochaine mission d'enseignement financée par le projet SUDBIOTECH Bénin aura lieu en Décembre 2010. Elle donnera lieu à l'organisation d'un 3eme Atelier et permettra également l'organisation de la soutenance de Thèse de Mr ADEOTI Kifouli, Doctorant béninois soutenu par le projet.

PROGRAMME DE	FORMATION I	PAR LA RECH	ERCHE





## Rapport de stage

CIRAD Département Systèmes Biologiques UMR DIAPC 1097 Centre IRD, BP 64501 F-34394 Montpellier Cedex 5, France.

INITIATION AUX TECHNIQUES DE CYTOMETRIE EN FLUX ET MARQUEURS MOLECULAIRES AFLP : APPLICATION A QUATRE ESPECES DE LEGUMES FEUILLES (CERATOTHECA SESAMOIDES, SESAMUM RADIATUM, ACMELLA ULIGINOSA ET JUSTICIA TENELLA) CONSOMMES AU BENIN



Kifouli ADEOTI

Superviseur: Dr. Alain RIVAL

Les légumes-feuilles traditionnels (indigènes) désignent des espèces végétales cultivées ou sauvages qui ont évolué de façon naturelle dans un milieu et dont les feuilles sont utilisées dans l'alimentation (FAO, 2002; Ogoye-Ndegwa *et al.*, 2003; CTA, 2004). Ils sont généralement riches en fibres, vitamines et en substances de grande valeur nutritionnelles telles que le carotène (provitamine A), l'acide ascorbique, le fer, le calcium (Burkitt 1973; Shiundu ,2002). Ils constituent d'importante source alimentaire et contribue à l'amélioration de l'état nutritionnel des populations. Dans certains cas, ils sont également utilisés en médecine traditionnelle pour leur vertu thérapeutique. Un nombre important de LFTs est connu dans le monde et particulièrement en Afrique Sub saharienne pour leurs propriétés médicinales (Westphal and *al.*, 1985; FAO, 1988; Chweyas and Eyzaguirre, 1999s; Shippers, 2002; Abukutsa, 2004, CTA 2004, Francisca and Eyzaguirre, 2007, Dansi et al., 2008a; 2009).

Un récent inventaire sur la biodiversité des LFTs consommés au Bénin a permis de recenser un certain nombre d'espèces d'importance régionale et/ou nationale (Dansi et al., 2008a) dont les plus importantes sont *Ceratotheca sesamoides* Endl., *Sesamum radiatum* L., *Acmella uliginosa* (L.) Jansen et *Justicia tenella* (Nees) T. Anderson. Ces espèces appartiennent au groupe des espèces appelées "négligées" ou "orphelines" car intéressant peu les recherches scientifiques. Elles appartiennent respectivement aux familles des Pedaliaceae, Asteraceae et Acanthaceae et se retrouvent soit à l'état cultivé et semi-cultivé ou sauvage.

Les récents travaux conduits sur l'écogéographie de ces quatre espèces a permis de constater qu'elle présente chacune des distributions assez variables à travers les différentes zones agro écologiques du Bénin.

Dans le but de contribuer à la domestication de ces espèces de légumes, il est important que des paramètres agro-morphologiques et génétiques soient connus. A notre connaissance, il n'existe aucune étude sur la diversité génétique de ces espèces utilisant les marqueurs moléculaires et/ou la cytométrie en flux.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre stage de formation dans le but d'apprendre les nouvelles techniques d'étude en Biologie moléculaire et leur application sur nos différentes espèces. Les objectifs poursuivis étaient :

- De déterminer le taux de ploïdie et la taille du génome des différents écotypes de chaque espèce
- La mise au point et l'optimisation du protocole d'extraction de l'ADN pour les 4 espèces
- D'étudier la diversité génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires AFLP

#### Cytométrie en flux

Les travaux de cytométrie en flux ont été réalisés sur la plateforme INSERM de l'Institut Régional de Biothérapie de l'hôpital Saint-Eloi de Montpellier sous la supervision de Dr Alain RIVAL, Thierry BEULE et Christophe DUPERRAY. Ils se sont déroulés en deux étapes : la première concernant les espèces *A.uliginosa* et *J.tenella* et la seconde constituée par *S.radiatum* et *C.sesamoides*.

Les feuilles fraiches sont utilisées pour les analyses de cytométrie en flux. Elles sont collectées directement en milieu paysan ou sur des plantes obtenues à partir des semences mises à germer. Seize et quatorze échantillons respectivement de *A.uliginosa* et *J.tenella* ont été analysés. Les espèces *Petunia hybrida* et *Coffea arabica* ont été utilisés comme standards internes respectivement pour *A.uliginosa* et *J.tenella* pour la détermination du taux de ploïdie et de la taille du génome. De plus quatre différents tampons d'extraction ont été testés. Il s'agit des tampons Dolezel (Dolezel and Bartos, 2005), PBS (pH 7,4; Triton 2%), Tris-MgCl2 (Pfosser et *al.*, 1995) et du tampon Galbraith (Galbraith *et al.*, 1983). Le tampon Dolezel s'est révélé plus approprié pour les espèces *A.uliginosa* et *J.tenella*. Le cytomètre utilisé est de type FACScan Becton DickinSon utilisant le logiciel Cell Quest Pro pour l'analyse des données recueillies.

Les espèces S. radiatum et C. sesamoides se sont révélées récalcitrantes pour les analyses de cytométrie en flux. En effet, leur forte teneur en polysaccharides rend très visqueux le filtrat obtenu après que les feuilles soient hachées à la lame de rasoir. Ce filtrat ne peut passer dans les colonnes du cytomètre. Cependant, diverses méthodes sont en train d'être testées (telle que l'extraction en amont des noyaux avant leur passage au cytomètre) pour lever cette difficulté. Les contacts ont été noués avec l'équipe du Dr Spencer Brown au CNRS (ISV, Gif s/ Yvette) afin de bénéficier de son expérience en cytométrie.

#### Résultats

Les résultats de l'analyse en cytométrie en flux sur *A.uliginosa* et de *J.tenella* sont présentés respectivement sur les figures 1 et 2. Des mesures effectuées, il en ressort que la teneur en ADN pour *A.uliginosa* varie selon les écotypes. Des résultats importants statistiquement exploitables ont pu être obtenir pour les deux espèces. En effet le coefficient de variation varie de 1,17% à 8,5%. Des résultats similaires ont également observés pour *J.tenella*. On note l'absence de polyploïdie au niveau des deux espèces.

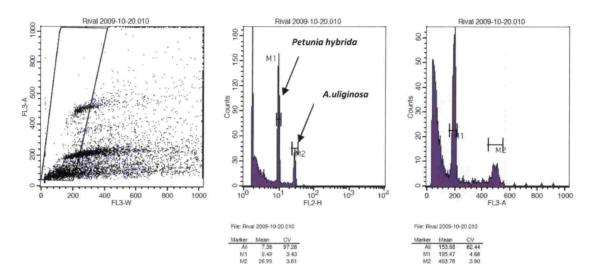


Figure 1 : Histogrammes montrant la teneur relative en ADN de *Petunia hybrida* et *Acmella uliginosa*.

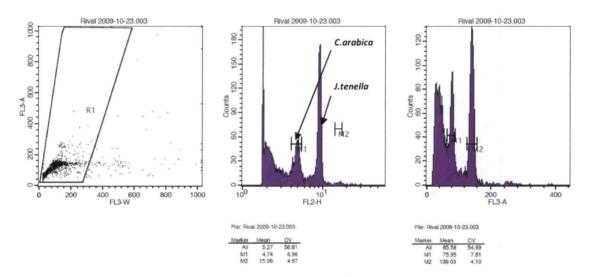


Figure 2 : Histogrammes montrant la teneur relative en ADN de *Coffea arabica* et *Justicia tenella*.

Quelques mesures ont été également effectuées sur les deux espèces récalcitrantes *S. radiatum* et *C. sesamoides* en réalisant une extraction/purification des noyaux à partir des feuilles. Cependant les résultats obtenus ne peuvent être généralisés car il est important que des mesures soient effectuées avec tous les écotypes des deux espèces. Les figures 3 et 4 présentent respectivement les résultats préliminaires obtenus pour *S. radiatum* et *C. sesamoides*.

Rapport Scientifique Annuel 2009 – Projet SudBiotech - Convention AUF Actions de Recherche en Réseau 2009-2010

Page 30 sur 48

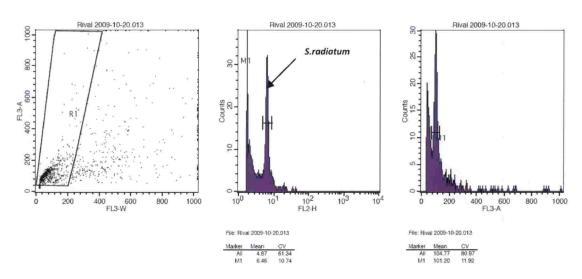


Figure 3: Histogrammes montrant la teneur relative en ADN de Sesamum radiatum

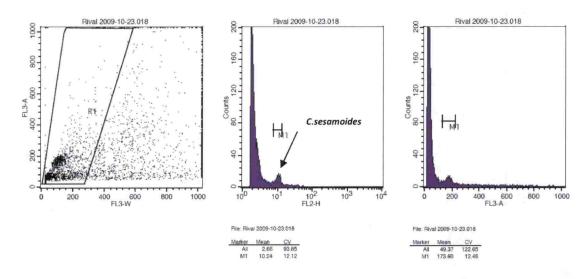


Figure 4: Histogrammes montrant la teneur relative en ADN de Ceratotheca sesamoides

# Mise au point et optimisation du protocole d'extraction de l'AND des quatre espèces.

Deux protocoles d'extraction ont été testés et optimisés pour l'extraction de l'ADN. Il s'agit du protocole au MATAB appliquées pour les espèces *A.uliginosa* et *J.tenella*, et du protocole

au CTAB appliqué aux espèces S. radiatum et C. sesamoides. Ces deux protocoles ont été appliqués avec succès donnant des rendements moyens de l'ordre de 236 µg DNA/g PMF et 66 µg DNA/g PMF respectivement pour les deux premières et les deux dernières espèces.

#### Analyse de la biodiversité par marqueurs AFLP

Les analyses moléculaires par marqueurs AFLP sont en cours de réalisation en collaboration avec la plateforme génomique Sup'Agro Montpellier.

#### Acquis du stage de formation

Ce stage de formation nous a permis durant notre séjour de rencontrer différents chercheurs, et de pouvoir discuter avec ces derniers. Il nous a surtout permis pour nous jeune chercheur du Sud, de découvrir et de nous familiariser avec les nouveaux équipements, d'apprendre de nouvelles techniques d'analyse (cytométrie en flux, marqueurs moléculaires) dans notre domaine de recherche et de pouvoir les appliquer en même temps sur notre matériel de travail (légumes feuilles). Durant notre séjour, nous avons pu également participer pendant 4 jours à une Ecole thématique sur « La génomique fonctionnelle des plantes tropicales et méditerranéennes d'intérêt agronomique » ; une thématique qui nous a permis de découvrir et d'acquérir d'autres outils de recherche et leur domaine d'application surtout en ce qui concerne les espèces tropicales (voir programme détaillé en Annexe 5) .

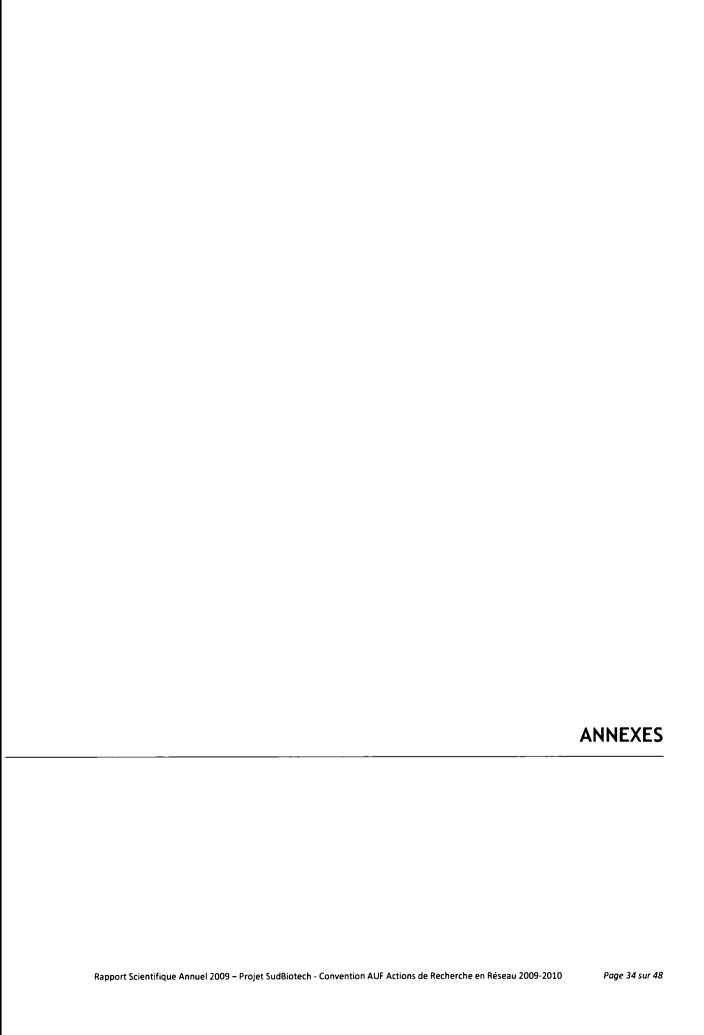
#### Remerciements

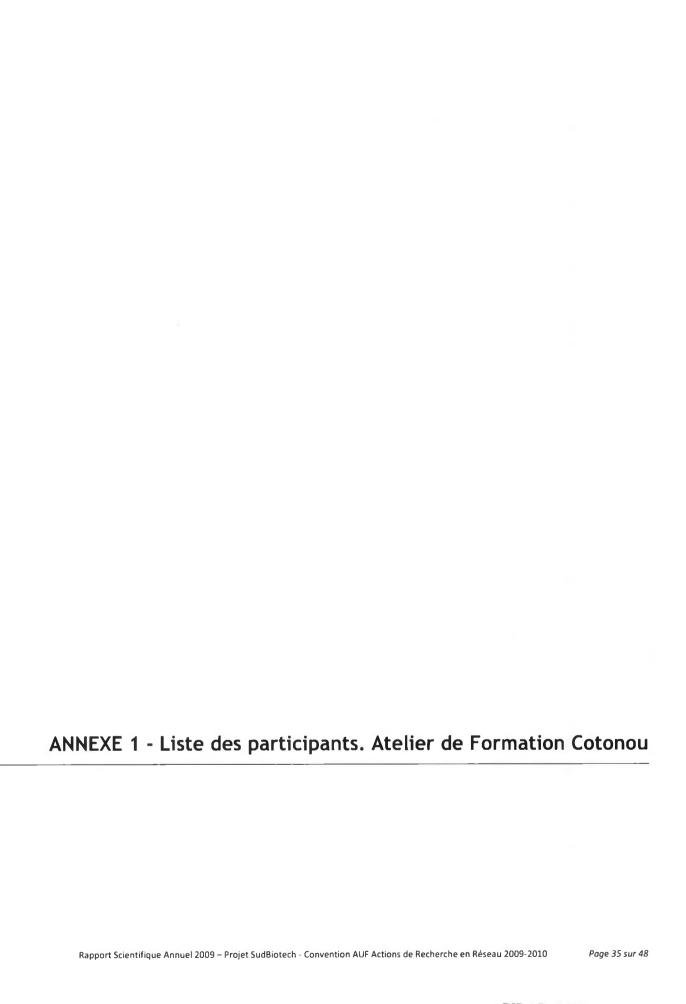
Nous remercions l'AUF pour son soutien financier à travers son projet Action de recherche en Réseau qui a financé le projet SudBiotech-Bénin à travers lequel notre stage de formation a pu être réalisé. Nos remerciements également à l'endroit du CIRAD à travers l'équipe du Dr RIVAL qui assuré notre encadrement.

#### Références

- Abukutsa, 2004. Abukutsa-Onyango MO Crotalaria brevidens Benth. In: GJH Grubben, & Denton, OA (Eds). Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands/Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands 2004:229-231.among the Luo of western Kenya a nutritional anthropology project. In J. Ecolo. Food andbNutri., 69-89
- Burkitt D.P., 1973. Epidemiology of Large Bowel Disease: The Role of Fibre. In: J.M.L Stephen (Ed). Fibre in Human Nutrition. Nutrition Soc. Symposia *Report Series* No. 5, 1973; 145 149.
- Chweya J. A. and Eyzaguirre P., editors. 1999. The biodiversity of traditional leafy vegetables. IPGRI Rome (Italy), 182 p.
- CTA, 2004. Légumes Africains Indigènes. Présentation des espèces cultivées. Pays-Bas
- Dansi A., A. Adjatin, H. Adoukonou-Sagbadja, A. Adomou, V. Faladé, H. Yedomonhan, K. Akpagana & B. de Foucault. 2009. Traditional leafy vegetables in Benin: Folk nomenclature, species under threat and domestication Acta Botanica Gallica, 156 (2), 183-199.
- Dansi A., A. Adjatin, H. Adoukonou-Sagbadja, V. Faladé, H. Yedomonhan, D.Odou and B. Dossou. 2008a. Traditional leafy vegetables and their use in the Benin Republic. Genetic Resources and Crop Evolution, 55: 1239-1256.
- Dolozel J, Binarova P, Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum 31:113-120.
- F.A.O., 2002. Elargir la base des ressources alimentaires grâce aux plantes indigènes.
- FAO, 1988. United Nations Food and Agricultural Organization: Traditional food plants.

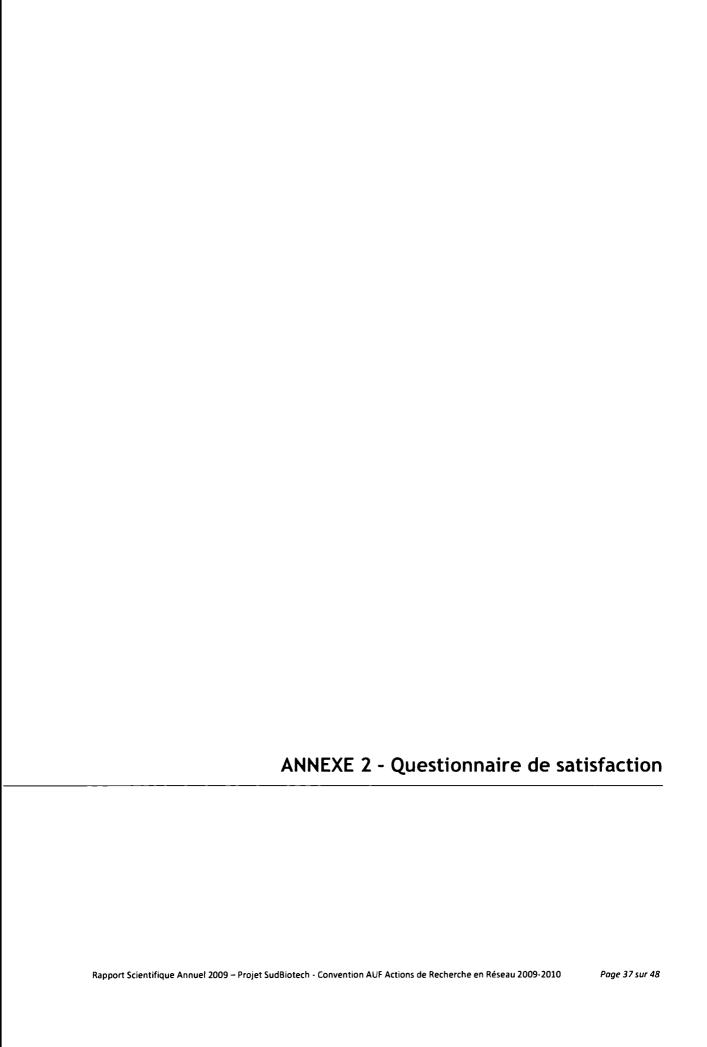
  Food and Agricultural Organization (FAO) Food Nutrition. Paper 42. FAO, Rome, 593p.
- Francisca I.S. and Eyzaguirre P., 2007. African leafy vegetables: Their role in the world heal organization's global fruit and vegetables initiative. AJFAND, Vol.7, N°3, 1-17.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant-tissues. Science 220: 1049-1051.
- Ogoye-Ndegwa C. and Aagaard-Hansen J. 2003. Traditional gathering of wild vegetables Rome (Italy).
- Pfosser M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. Cytometry 21:387-393.
- Schippers, R.R. 2002. African Indigenous Vegetables: an Overview of the Cultivated Species 2002-Revised version on CD-ROM. Natural Resources International Limited, Aylesford, UK.
- Shiundu KM. 2002. Role of African leafy vegetables (ALVs) in alleviating food and nutrition insecurity in Africa. Afr. J. Food Nutr. Science. 2 (2): 97-99.
- Westphal E., Embrechts J., Ferweerda J. D., van Gils-Meeus H. A. E., Mustsaers H. J. W. & Westphal-Stevels J. M. C., 1985. Cultures vivrières tropicales avec références spéciales au Cameroun. PUDOC, Wageningen, the Netherlands.





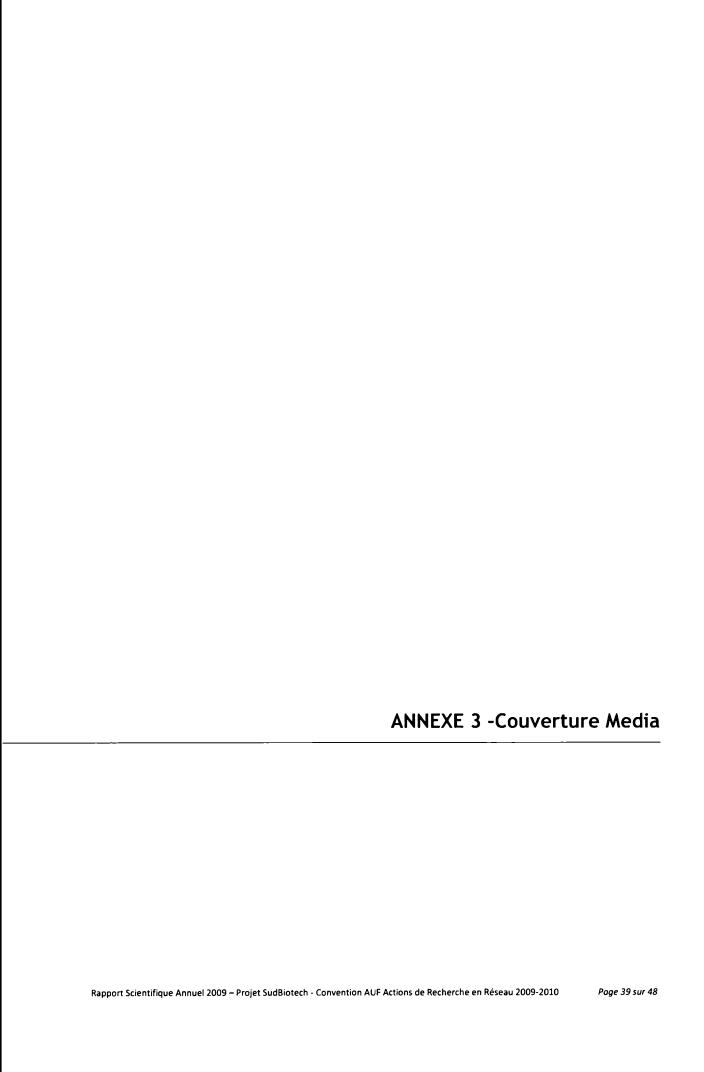
Annexe1 : Liste des participants

Noms et Prénoms	Nationalité	Email	Téléphone	
ASSOGBA Prisca	Bénin	assogbaprisca@yahoo.con	95394895	
ADJOVI Yann	Bénin	Bigyann2013@yahoo.fr	95626484	
ADJOU Euloge	Bénin	eulogesenan@yahoo.fr	95924907	
KOUAKANOU Léonce	Bénin	Leokoul2002@yahoo.fr	97126943	
MBAMBALI MBAYE Corneil	Centrafrique	Warda.etude.cornel@gmail.com	97126943	
HOUNHOUIGAN S. Alain	Bénin	hounhouigans@yahoo.fr	97696494	
ANIHOU Dona Gildas	Bénin	anilyte@yahoo.fr	97270190	
YEBAS Marie Francoise	Congo-Brazza	Yebas.lydie@yahoo.fr	97082193	
NZOBADILA Budeh	Congo- Brazza	Budeh-nzobadila@yahoo.fr	96042831	
KOMBO Guy Romain Aimé	Congo- Brazza	Kombo_guyro@yahoo.fr	96324514	
BOCCO Roland	Bénin	Robocco2000@yahoo.fr	93012627	
AHOUA Nelly Muriel	Côte d`Ivoire	Championne2007@yahoo.fr	97885334	
DJIMARABEYE Pacifique	Tchad	Kodjo2014@yahoo.fr	97279314	
SINA Latifatou	Bénin	latifasina@yahoo.fr	97478690	
ADJATIN Arlette	Bénin	Aarlette2000@yahoo.fr	97440798	
TCHEZOUN Olga	Togo	Olga9088@gmail.com	(228) 2362062	
FOLLY Adade	Bénin	sideson@yahoo.fr	97577258	
FATONDJI Blandine	Bénin	Yemalin2002@yahoo.fr	95061846	
BOTHON Diane	Bénin	botheo2001@yahoo.fr	97892133	
BOGNINOU Sophie	Bénin	sophiebogninou@yahoo.fr	95506767	
AHAMA Kplolali	Togo	ahamalali@yahoo.fr	9232423	
UZOMA Okechukwu	Nigeria	U.okechukwu @cgiar.org		
MOUKOUMBI Yonnelle Déa	Gabon	moukoumbiango@yahoo.fr y.moukoumbi@cgiar.org	95226034	
YAO Naser	Cote d'Ivoire	nyao@cgiar.org	93123628	
OGUNBAYO S. Ayoni	Nigeria	a.ogunbayo@cgiar.org	93414309	
IBITOKOU Samad	Bénin	lbitokouj_samad@yahoo.fr	97474061	



## Atelier de Biologie Moléculaire et de Biotechnologie Végétale Colonou 6-11 juillet 2009 – QUESTIONNAIRE D'EVALUATION

	QUESTION 1. Que pensez-vous du contenu proposé ? Différenciez vos réponses pour les approches moléculaire, physiologique et cellulaire ?
	moléculaire, physiologique et cellulaire? Le programme d'averagement prepase est tre interressant me qu'il a tente compte du mocale d'oticle de la interressant des partie pants (Bac+5) de mo connecisarences acques
	playant des partie pants (Bac + 5) de mos connaissemes acquisses for les aniels mucliques, la fly viologie régétale et la sy Alge QUESTION 2. Le contenu des enseignements proposés (TP, TD, Cours, visite) correspondait-il à
	QUESTION 2. Le contenu des enseignements proposés (TP, TD, Cours, visite) correspondait-il à vos attentes? Les TP of extractions d'ADN de mogration des
	freternes sur mondrane de vitro celluloso, la PCR, de
	QUESTION 3. L'ensemble vous a-t-il donné satisfaction ?
	oue tis louve Empression de formation
	QUESTION 4. Les enseignants ont-ils été assez dispanibles pour répondre à ves questionnements
	7. 45.47.47.3
	les enselgnants ont été tes disposibles et out
	reporde à toutes nos inque tudes. Acreme que tion
	QUESTION 5. La formation reçue vous sera-t-elle utile pour la poursuite de votre carrière
	professionnelle 2
	Only .
	QUESTION 6. Que suggérez-vous pour améliorer l'ensemble du parcours pédagogique ?
	J'ai commi jusque la acceptable
	QUESTION 7. Quelle est votre critique principale ?
	Pour une mostlaire connaissance, les ma impulates doivent être individuelles Mila niveau de juitients
	QUESTION 8. Quel a été la module d'enseignement le plus utile à votre cursus ?
	191 TP bu Extraction of ADN et PCR.
6	Rocherche de marqueurs Brochimi que des procomis de l'est
(	ette formation at benefique tis necessaire
Č	us nemattre la viveaux de divers étudiants à
-	m. 40
1	autos estudianto.
6	and the contraction of the contr



# FRATERNITE

10° année - PRIX : 300 FCFA

N°2379 du vendredi 10 juillet 2009

www.fraternite-info.cum / fraternews@yahoo.com

#### FORMATION SUR LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET LES BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES

# Des doctorants, décideurs et jeunes chercheurs renforcent leurs capacités

Wendy J. KEDOTE

Initier la constitution d'un réseau pérenne capable de former des étudiants, chercheurs. décideurs et professionnels aux fondamentaux régissant les biotechnologies végétales. Tel est l'objectif d'un atelier sur la biologie moléculaire et les biotechnologies végétales qui se tient depuis le lundi dernier à l'Institut des sciences biomédicales appliquées (Isba) de Cotonou. Organise par le projet Sudbiotech Bénin avec la collaboration de l'Agence universitaire de la Francophome, l'Université de Paris XI, le Cirad, l'Ambassade de France à Cotonou et le Centre béninois de la recherche scientifique et technique (Cbrst), cet atelier va permettre de mettre en place un partenariat Nord-Sud durable entre le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, l'Université d'Abomey Calavi au Benin et le projet français Sudbiotech. L'enjeu pour les pays du Nord est de diffuser et partager les connaissances accumulées par les chercheurs en les adaptant aux thématiques et filié-

res spécifiques des sociétés du sud, Hier, les 30 étudiants sélectionnés dont le niveau intel lectuel varie entre le doctorat et le Master 2 et qui viennent des pays de la sous région tels que le Togo, la Côte d'Ivoire, le Congo, le Tchad et le Bénin, ont eu droit à une table ronde publique sur les Organismes génétiquement modifiés (Ogm) végétaux, accompagnée de la projection de films scientifiques. Dans son exposele conférencier Alam Rival a abordé, les thèmes comme "Qu'est-ce que les Ogm". Les risques lies aux Ogm. Les Ogm et la faim dans le monde. Faut-il jeter le bébé Ogm avec l'eau de bain génétique. Par ailleurs. Alain Rival a souligne que le projet intègre une composante pratique utile à la demystification et à l'appropriation des biotech-nologies sur le format des " Ecoles de l'Adn " extraction et manipulation d'Adn végétal, de cultures cellulaires, d'embryons somatiques clonaux. Notons que cet atelier qui constitue la rénovation de l'enseignement en biologie moléculaire pour l'Université d'Abomey Calavi prend fin le 13 juillet prochain.



Photo de famille des doctorants, décideurs et jeunes chercheurs participant à la formation



## Atelier sur les biotechnologies végétales

# Pour une réelle maîtrise des OGMS

atier la constitution d'un réseau pérenne capable de former les étudiants, les chercheurs, les décideurs et les professionnels scientifiques aux notions regissant es bio rechnologies locales. C'est le sens de l'ate el sur la biolo gie moleculaire et les plotechnologies vegetales ou se tient du 06 au 13 juliet 2009 a l'Institut des sciences blomédicales appliquées sha ne 'Universite d'Abo mey Calavi, a cotonou. Organise conjointement par le la poratoire de pioch me et de la piologie moiéculaire de la raduite des sciences et techniques de l'uac et agence universita e de la l'ancophonie, cet atelier, aux oires du conferencier. Alain

Rival, permettra a terme, d'approfondir les connais sances des participants ne cessares au niveau du 3e cycle et lacquisition d'infor mations solices moispensaples a la prise de décisions dans un domaine souvent soum's aux pressions politques, sociales et mediati ques in cair its agit seion ul, de mettre en place un partenar at sud nord dura ple, entre de laboratoire pennois et le projet français. Supplotech lagence universitaire de la l'alicophonie, le Cirad le Cors et l'université oe Parls XII l'atelier pro pose aire un programme integratife multipropinare sous a forme diamparcours pedagogique qui englobe

les différentes facettes des biotechnologies végétales Revenant sur le déroulement oe l'atelier, Alain Rival a prédise qu'il sera question d'une table ronde publique sur les Organismes génériquement modifiés (Ogm), vegétaux, accompagnée de projecfions de films scientifiques. Soul grons que cette année. l'ateller s'auresse à un groupe de 30 étudiants sé lectionnés dans de plusieurs pays de la sous région. Aussi, Il intègre une composante pratique extremement utile à a démystification et a l'appropriation plotechniques sur le format des écoles de l'Aon.

 $\Lambda.F$ 

# FRATERNITE

10° année - PRIX 300 FCFA

N°2375 du lundi 6 juillet 2009

www.fratamita-info.com / fraternews@vahop.com

# OMMUNIQUE DE PRESSE

## ATELIER SUR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE ET LES **BIOTECHNOLOGIES VEGETALES**

SudBiotech Bénin

ISBA Université Abomey Calavi, Cotonou

6 Juillet- 13 Juillet 2009

Laboratoire de Blochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences a Techni-

ques, Université d'Abomey-Calavi
En collaboration avec : L'Agence Universitaire de la Francophonie, le Cirad, l'Université de Paris XI, le Cnrs, l'Ambassade de France à Cotonou et le Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique.

L'objectif principal de l'initiative Bénin-SudBlotech est d'initier la constitution d'un réseau pérenne, capable de former étudiants, chercheurs, décideurs et professionnels

aux fondamentaux régissant les Biotechnologies Végétales

L'Atelier doit permettre, via un transfert de connaissances et de savoir-faire vers le Sud, à la fois l'approfondissement des connaissances nécessaires au niveau du 3eme cycle et l'acquisition d'informations solldes indispensables à la prise de décisions dans un domaine sou-

vent soumis aux pressions politiques, sociales et médiatiques.

Pour le partenaire béninois du projet, l'Université d'Abomey-Calavi, l'enjeu est la rénovation de l'enseignement en Biologie Moléculaire Végétale, le renforcement des capacités des doctorants et jeunes chercheurs, l'acquisition et la maîtrise de nouvelles méthodes d'analy-

ses moléculaires

Il s'agit de mettre en place un partenariat Sud-Nord durable, entre le Laboratoire de Biochimle et de Biologie Moléculaire de l'Université d'Abomey-Calavi au Bénin et le projet français Sudbiotech (Agence Universitaire de la Francophonie, Cirad, CNRS, Université de Paris XI).

Au Nord, pour les Etablissements de Recherche et d'Enseignement concernés (Univer sité, CNRS, Cirad), l'enjeu est de diffuser et partager les connaissances accumulées par les

chercheurs, en les adaptant aux thématiques et filières spécifiques des sociétés du Sud.

L'Atelior propose un programme intégratif et multidisciplinaire, sous la forme d'un parcours pédagogique qui englobe les différentes facettes des Biotechnologies Végétales, sous la forme de cours théonques, Travaux Dingés, Travaux Pratiques, visites de terrain et de laboratoires locaux (ADRAO) pour un cursus global de 56 heures.

Une Table Ronde publique sur les OGMs Végétaux, accompagnée de la projection de

films scientifiques, sera organisée le Jeudi 9 Juillet.

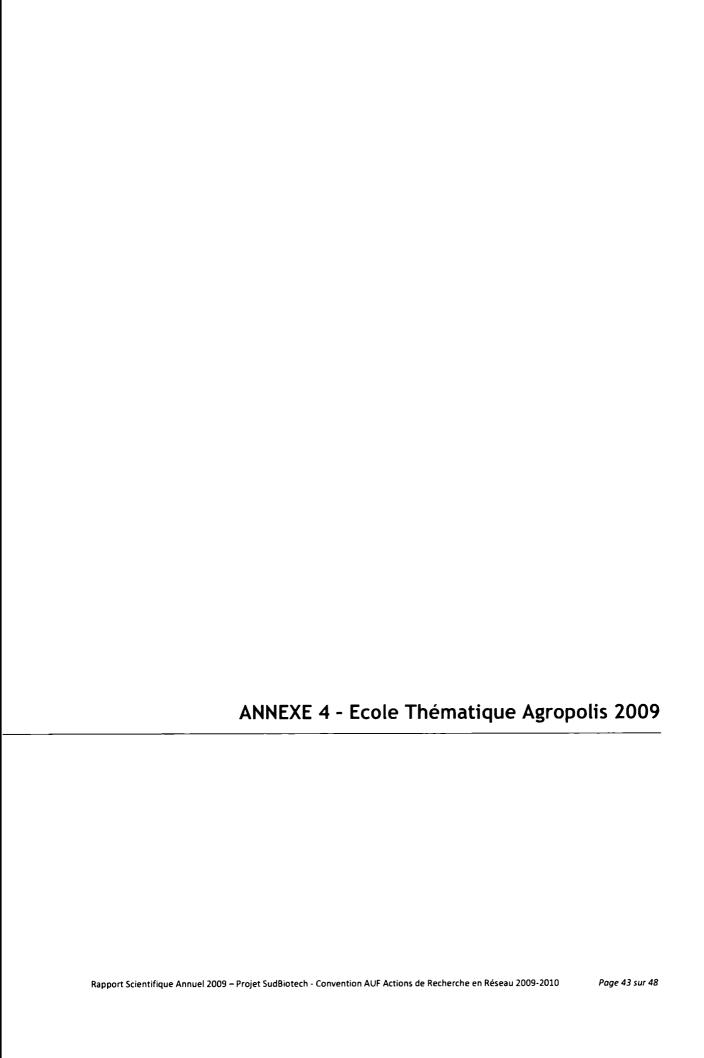
Cette année, l'Atelier s'adresse à un groupe de 30 étudiants sélectionnés (doctorants et Master MI) originaires de plusieurs pays de la sous-région: Togo, Cote d'Ivoire, Congo, Tchad et bien sur, Bénin

Le projet intègre une composante pratique extrêmement utile à la demystification et à l'appropriation des biotechnologies, sur le format des «Ecoles de l'ADN»: Extraction et manipulation d'ADN végétal, de cultures cellulaires, d'embryons somatiques clonaux...

SudBiotech fait appel à des enseignants-chercheurs issus de contextes scientifiques com-

plémentaires afin d'intégrer divers domaines des sciences du végétal: diversité morphologiquo, morphogenèse et construction de la plante, mécanismes régissant la division cellulaire, signaux de développement.

Les intervenants seront cette année, outre l'équipe pédagogique du Professeur Ambaliou SANNI, Mme la Dr Marie Noëlle NJONDJOP (ADRAO-WARDA), les Professeurs Aimé NATO (Université Paris XI, Yves HENRY (CNRS Orsay) et Alain RIVAL (Cirad Montpellier).



Rapport Scientifique Annuel 2009 – Projet SudBiotech - Convention AUF Actions de Recherche en Réseau 2009-2010

#### **Inscriptions**

#### Correspondants

Eric Lacombe UMR BPMP Tél: 04 99 61 31 56 Adresse courriel : eric.lacombe@univmontp2.fr

Valérie Hocher UMR DIAPC Tél: 04 67 41 61 96 Adresses cournel : Valene Hocher@ird.fr

Date limite d'inscription 10 novembre 2009 (nombre de places limité)

Confirmation de votre inscription La confirmation de votre inscription vous sera envoyée avant le 13 novembre 2009

#### Organisation matérielle

Lieu Agropolis International Avenue Agropolis Salle de cours B06

Frais d'inscription Pas de frais d'inscription Les transports sont à la charge des participants Possibilité de restauration à l'IRD



Ecole thématique organisée dans le cadre du Master Biologie Fonctionnelle des Plantes de l'Université Montpellier II

> Informations www.plant.univ-montp2.fr

#### **ECOLE THEMATIQUE**

## Génomique fonctionnelle appliquée aux plantes tropicales et méditerranéennes d'intérêt agronomique

Master Biologie Fonctionnelle des Plantes

16 au 19 novembre 2009



### **Organisation**

Eric Lacombe (UMII) eric\_lacombe@univ-montp2.fr Claudine Franche (IRD) - Valérie Hocher (IRD) Claudine Franche@ird fr - Valérie Hocher@ird fr







# Génomique fonctionnelle appliquée aux plantes tropicales et méditerranéennes d'intérêt agronomique

## Année 2009/2010

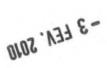
Date	Intervenant	Titre
Lundi 16/11	Accueil	Présentation du module
9 h 45	Valérie Hocher/Eric Lacombe	Procédures d'évaluation
10 h-12 h	Hassen Gherbi	Biologie moléculaire et génomique : des
	Hassen.gherbi@ ird.fr	plantes modèles aux plantes tropicales
13 h 45-15 h 45	Stéphane Jouannic	Le palmier à huile: aspects développementaux
	jouannic@mpl.ird.fr	et biotechnologies associées
16 h - 17 h 30	Christopher Viot	Approche génétique et moléculaire de la
	Christopher.viot@cirad.fr	qualité de la fibre de coton
Mardi 17/11	Anne-Céline Thuillet	"Vous voyez Arabidopsis? Le mil c'est pareil
9 h- 10 h 30	anne-celine.thuillet@ird.fr	ça fleurit"
10 h 45- 12 h 15	Laurent Laplaze	Racines protéoïdes: une adaptation à la
	Laurent.Laplaze@ird.fr	carence en phosphate
Mercredi 18/11	Claudine Campa	Biocarburants et Jatropha curcas
8 h 45-10 h 15	Claudine.Campa@ird.fr	
10 h 15- 12 h 30	Valérie Hocher	Fixation de l'azote chez l'arbre tropical filao :
	hocher@mpl.ird.fr	approches moléculaire et génomique pour la compréhension de la symbiose actinorhizienne
14 h- 15 h 30 h	Denis Fargette- Oumar Traoré	Adaptation d'un virus à ARN de plante, le virus
	denis.fargette@ird.fr	de la panachure jaune du riz : contournement des résistances mais compréhension des

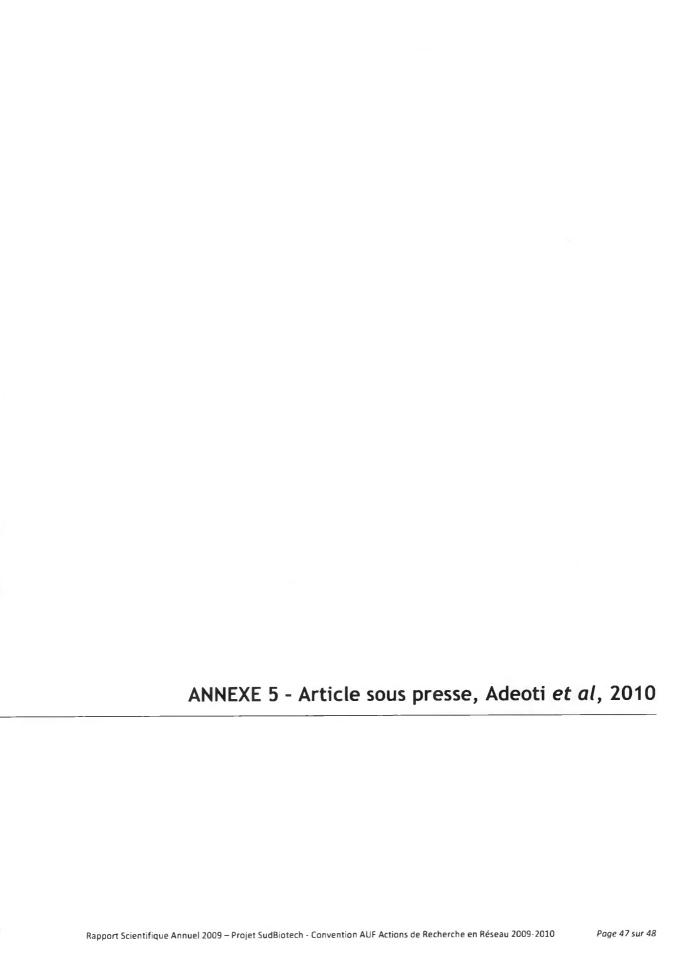
Page 45 sur 48

die.		mécanismes moléculaires
15 h 45 – 17 h 45	Patrice This this@supagro.inra.fr	L'apport du séquençage du génome de la vigne pour la dissection de caractères quantitatifs liés à la qualité finale du vin
<b>Jeudi 19/11</b> 8 h 45 – 10 h 45	Laurence Albar laurence.albar@ird.fr	De l'identification de gènes majeurs à la dissection de caractères quantitatifs chez le riz
11 h – 12 h 30	Fabienne Cartieaux Fabienne.Cartieaux@ird.fr	Aeschynomene-Bradyrhizobium sp.: un couple original dans le champ des symbioses fixatrices d'azote
14 h – 17 h	Jean-Marc Gion jean-marc.gion@cirad.fr	Les biotechnologies et l'amélioration génétique des arbres forestiers

### Lieu:

Salle de cours B06, Agropolis international, avenue Agropolis (en face du musée Agropolis).







#### Available online at http://ajol.info/index.php/ijbcs

Int. J. Biol. Chem. Sci. x(x): xx-xx, xxxx

International Journa of Biological and Chemical Sciences

ISSN 1991-8631

Original Paper

http://indexmedicus.afro.who.int

# Selection of sites for the *in situ* conservation of four traditional leafy vegetables consumed in Benin

K. ADÉOTI <sup>1</sup>, A. DANSI <sup>2,3</sup>°, L. AHOTON <sup>4</sup>, B. **KPÈKI** <sup>4</sup>, **B. C.** AHOHUENDO <sup>4</sup>, A. AHANCHÉDÉ <sup>4</sup>, R. VODOUHÈ <sup>5</sup>, J. D. HOUNHOUIGAN <sup>6</sup> and A. SANNI <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences and Technology (FAST), University of Abomey-Calavi (UAC).

Genetic Resources Unit (GRU), Laboratory of Genetic and Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology (FAST), University of Abomey-Calavi (UAC), BP 526 Cotonou, Benin.

<sup>3</sup>Crop, Aromatic and Medicinal Plant Biodiversity Research and Development Institute (IRDCAM),071 BP 28, Cotonou, Benin.

<sup>4</sup>Department of Plant Production, Faculty of Agriculture (FSA), University of Abomey-Calavi (UAC), BP 526 Cotonou, Benin.

<sup>5</sup>Bioversity International, Office for West and Central Africa, 08 BP 0932, Cotonou, Benin.
<sup>6</sup>Department of Nutrition and Food Sciences, Faculty of Agriculture (FSA), University of Abomey-Calavi (UAC), BP 526 Cotonou, Benin.

\* Corresponding author: E-mail: adansi2001@gmail.com.

#### **ABSTRACT**

Acmella uliginosa, Ceratotheca sesamoides, Justicia tenella and Sesamum radiatum are four traditional leafy vegetables which are widely consumed in Benin. In order to document their origin, folk nomenclature, geographical distribution and ecology and to select adequate zones for in situ conservation of their genetic resources, 118 villages were randomly selected and surveyed throughout the country using a participatory research approach. All the species apart from Ceratotheca sesamoides were reported by farmers as introduced in Benin at different periods. The folk nomenclature comprising 90 different names is based on nine key criteria of variable frequencies according to the species. The geographical distribution maps revealed that the species under study are unequally distributed. Indeed, A. uliginosa is found exclusively in the northwest, J. tenella in the northeast and partially in the centre while S. radiatum and Ceratotheca sesamoides were found almost everywhere in Benin. Results from multivariate analysis combined with geographical distribution maps of the species and the soil and climate maps of Benin, leaded to the selection of the Northwest and of the Northeast regions as the appropriate conservation zones for the four species. Molecular analysis was recommended as it can help in describing genetic diversity and consequently in identifying additional sites for the widely spread species Sesamum radiatum and Ceratotheca sesamoides.

© 2009 International Formulae Group. All rights reserved.

Key words: Folk nomenclature, biodiversity, geographical distribution, site selection, in situ conservation, Benin.

#### INTRODUCTION

Traditional Leafy Vegetables (TLVs) are plants whose leaves (including immature green pod and flowers) are socially accepted,

used and consumed by the local populations (Dansi et al., 2008a). They are rich in fibres, vitamins and minerals such as carotene (provitamin A), ascorbic acid, riboflavin, iron,

© 2009 International Formulae Group. All rights reserved.

etc... (Chweya iodine, calcium, Eyzaguirre, 1999; Odhav et al., 2007; Mensah et al., 2008). In addition to their high concentration in micronutrients, vegetables provide little dietary energy, making them valuable in energy limited diets. The fibre they content has been reported to have beneficial effects on blood cholesterol and aids in the prevention of large bowel diseases, while in diabetic subjects, they improve glucose tolerance (Odhav et al., 2007; Mensah et al., 2008). Throughout the world and in West Africa in particular, quite a large number of TLVs have long been known and reported to have health protecting properties and uses (Odhav et al., 2007; Mensah et al., 2008; Chweya and Eyzaguirre, 1999; Shippers, 2002; Abukutsa-Onyango, 2004, Francisca and Eyzaguirre, 2007; Dansi et al., 2008a, 2009a).

In Benin, TLVs occur as cultivated and semi-cultivated crops or weedy and wild plants, with ecological, social and cultural values, playing a significant role in the daily food and nutritional requirements of local people not only in rural areas, but also and increasingly in urban areas. A biodiversity inventory and documentation survey recently conducted on traditional leafy vegetables throughout the country revealed a total of 187 plant species belonging to 141 genera and 52 families (Dansi et al., 2008 a, 2008b; 2009a). Out of the species inventoried, 18 having local and/or national importance were identified, among which Acmella uliginosa (L.) Jansen, Ceratotheca sesamoides Endl., Justicia tenella (Nees) T. Anderson and Sesamum radiatum L. were found to be of paramount interest. Indeed, Acmella uliginosa is used as a nutraceutical and believed, apart from its nutritional value, to bear special medicinal properties. It is an antibiotic, facilitates the elimination of blood clots in women after delivery and stimulates milk production with breast-feeding mothers (Dansi et al., 2008a). Contrary to the seasonally used leafy Sesamum radiatum vegetables, Ceratotheca sesamoides are available all year round. The first one is cultivated and the

second one is harvested from the wild but both of these species can be collected at the time of plenty, sun dried, stored in traditional containers such as gourds and further used when needed. Moreover, these two TLVs are known, to give stoutness and facilitate good growth, dentition and bones' solidification in the children when regularly consumed (Dansi et al., 2008a). Justicia tenella although with no reported medicinal value is widely cultivated in home gardens and consumed mainly in the Bariba cultural area which spreads over one third of the country.

In order to promote the production, domestication, conservation, marketing and utilization of these four species of high nutritional 1 medicinal importance for the local communities, a multidisciplinary and multi-institutional research project has been recently launched by the University of Ahomey-Calavi (UAC). The present article is aimed at describing a study undertaken within the framework of this project in order to:

- Document their origin and understand their folk nomenclature
- Draw their geographical distribution maps and clearly describe their ecology
- Select appropriate zones for the *in situ* conservation of the genetic resources of these species

## MATERIAL AND METHODS Presentation of the study zone

The present study was implemented in the Republic of Benin, situated in West Africa between latitudes 6°10' and 12°25' and longitudes 0°45' and 3°55'. The profile of the country is an undulating plateau except for a few scattered hills in the centre and the north. The altitude varies from sea level to 400-650 m in the northwest, where the Atacora chain is the outstanding feature. Four major groups of soils can be distinguished, according to Adam and Boko (1993): (1) ferrallitic soils covered by semi-deciduous forest, (2) ferruginous soils covered by dry forest, woodland, and savannah, (3) vertisols in the depression of Lama covered by a particular type of semi-

deciduous forest, and (4) hydromorphic soils covered by swamp and riparian forest.

The average annual rainfall varies from 900 to 1300 m. Its lowest values (900-950 mm) are recorded in the southwest and in the far north. The highest rainfalls (1200-1300 mm) are confined to southeast Benin along the Bassila-Djougou tract. The average annual temperature ranges from 26 to 28°C and can exceptionally reach 35-40°C in some northern localities such as Kandi and Malanville. As in most West-Africa countries, the climate is primarily determined by the annual cycle of the "Inner Tropical convergence Zone" (ITCZ). Three climates zones can broadly be distinguished (Akoègninou et al., 2006): (1) From the coast up to 7°-7°30'N, the climate is with two rainy seasons subequatorial alternating with a long dry season (December-February), and a short dry season (July-August), which rarely exceeds two months. (2) Between the latitudes 7°-7°30' and 9°, the climate becomes subhumid or subsudanian with a tendency to a pattern made of one rainy season and one dry season, (3) The northern section is characterised by a Sudanian climate with a unimodal rainfall regime. The type of this Sudanian climate encountered in the Atacorian climate northwest is called (Akoègninou et al., 2006).

Benin's southern part belongs to the Dahomey gap, which is the dry wedge that separates the West African rain forest belt into the upper Guinea and Lower Guinea /Congolian Forest Blocks (White 1993). As a result, this part of the country (from the coast up to c. 7°30'N) consists of savannah, grassland, farmland, and fallow intermingled with small islands of closed forest (semi-deciduous and swamp forests). From ca. 7°30'N to 12°25'N, the natural vegetation is essentially made of a patchwork of a woodlands and savannahs with belts of riparian forest along rivers.

#### Sites selection and survey

In order to draw a concise geographical distribution of a plant species at the country level, a great number of villages locating in different agroecological zones and spread out all over the country should be considered. For these reasons, 118 villages (table 1) belonging to diverse ethnical and agro-ecological (humid, semi arid, arid) zones (Dansi et al. 2008a; 2009a) were randomly selected and surveyed (Figure 1). Data were collected during expeditions to different sites, through the application of Participatory Research Appraisal tools and techniques such as direct observation, group discussions, individual interviews and field visits using a questionnaire, according to Kamara et al. (1996); Defoer et al. (1997); Chweya and Eyzaguirre (1999); Adoukonou-Sagbadja et al. (2006) and Dansi et al., (2008a,b; 2009a). Interviews were conducted with the help of interpreters from each area. As TLVs is mainly a women's affair, women local organisations were involved in the study in each site, in order to facilitate precise data collection. Prior to group meeting, farmers were requested in advance to bring samples of the species under study and, if any, samples of known diverse forms. Specific information about the area (agro-ecological zone, name of location, name of sub-location, name of village, ethnic group) were first collected after detailed presentation of the research objectives to the farmers. Then, farmers were asked to display the different types of the species and their variability as known in their village if any. Through discussion, key information was recorded on each one of the species under study. These are: vernacular name and meaning, origin, preferred habitat, intraspecific diversity and specific uses (known medicinal properties). Field (home gardens, cultivated fields, bushes, shallows) visits were organised in order to observe the plant species under cultivation or in their natural habitat.

#### Data analysis

Data were analysed through descriptive statistics (frequencies, percentages, means, etc.) in order to generate summaries and tables at different levels. To analyse the relationship between villages in

Table 1: List of the selected sites surveyed and their geographical localisation

N°	N° Village names Village Geographical localisat		calisation		
		code	Region	District	
1	Agbodjèdo	S10	Sud	Allada	
2	Aglamidjodji	C15	Centre	Savalou	
3	Agonli-houègbo	C19	Centre	Zangnanado	
4	Akaradè	W22	Northwest	Bassila	
5	Akongbéré	C5	Centre	Savè	
6	Alédjo	W36	Northwest	Bassila	
7	Aplahoué	S20	Sud	Aplahoué	
8	Atawignan	S15	Sud	Adja-ouèrè	
9	Azowlissè	S11	Sud	Adjohoun	
10	Badékparou	E25	Northeast	Parakou	
11	Badjoudè	W18	Northwest	Ouaké	
12	Banon	C3	Centre	Bantè	
13	Bassila	W21	Northwest	Bassila	
14	Béké	W32	Northwest	Pehounko	
15	Belléfoungou	W12	Northwest	Djougou	
16	Bensékou	E30	Northeast	Kandi	
17	Bétérou	E18	Northeast	Tchaourou	
18	Birni	W33	Northwest	Copargo	
19	Bodi	W20	Northwest	Bassila	
20	Bodjékali	E5	Northeast	Malanville	
21	Boké	E12	Northeast	Sinendé	
22	Bonou	S14	Sud	Bonou	
23	Borodarou	E10	Northeast	Gogounou	
24	Borondy	WII	Northwest	Djougou	
25	Copargo	W35	Northwest	Copargo	
26	Cotiakou	W6	Northwest	Tanguiéta	
27	Dassari	W25	Northwest	Materi	
28	Déwa	W15	Northwest	Djougou	
29	Djaloukou	C7	Centre	Savalou	
30	Djougou	W14	Northwest	Djougou	
31	Doutou	S26	Sud	Houéyogbé	
32	Dré	<b>S</b> 7	Sud	Houéyogbé	
33	Ewè	S19	Sud	Kétou	
34	Fita	C8	Centre	Dassa	
35	Foli	C20	Centre	Zakpota	
36	Foumbéa	W13	Northwest	Djougou	
37	Galata	C14	Centre	Bantè	
38	Gbassa	E3	Northeast	Banikoara	
39	Gbêlito	S4	Sud	Aplahoué	
40	Gbéssaka	E8	Northeast	Ségbana	

41	Gokanna	E20	Northeast	Tchaourou
42	Gomé-ifada	C13	Centre	Glazoué
43	Goro	E21	Northeast	Tchaourou
44	Gounarou	Ell	Northeast	Gogounou
45	Goungoun	E7	Northeast	Kandi
46	Gouroubéri	E27	Northeast	Karimama
47	Guéné	E6	Northeast	Malanville
48	Houébossou	S13	Sud	Lokossa
49	Hounti	S12	Sud	Lokossa
50	Idadjo	C2	Centre	Ouèssè
51	Ifangni	S25	Sud	Ifangni
52	Illara	S21	Sud	Kétou
53	Illikimou	S22	Sud	Kétou
54	Ita akadi	S17	Sud	Sakété
55	Kalalé	E17	Northeast	Kalalé
56	Kassakpéré	E26	Northeast	Nikki
57	Kawado	W17	Northwest	Ouaké
58	Konkondji	C16	Centre	Savalou
59	Korontière	W3	Northwest	Houkoumbé
60	Kossou-Ouinra	W39	Northwest	Pehounko
61	Kouandé	W29	Northwest	Kouandé
62	Koundokpoé	S3	Sud	Comè
63	Koupagou	WI	Northwest	Natitingou
64	Koussoukoingou	W30	Northwest	Natitingou
65	Koutagou	W23	Northwest	Natitingou
66	Koutakourkou	B29	Northeast	Kandi
67	Kpankou	C18	Centre	Kétou
68	Kpanroun	SI	Sud	Abomey-calavi
69	Kparou	E13	Northeast	Tchaourou
70	Kpassabéga	W34	Northwest	Kopargo
71	Lahotan	C17	Centre	Savalou
72	Lou	E15	Northeast	Kalalé
73	Louho	S24	Sud	Porto-Novo
74	Madémahoué	S8	Sud	Come
75	Magoumi	C12	Centre	Glazoué
76	Malanville	E4	Northeast	Malanville
77	Manigri	W38	Northwest	Bassila
78	Minifi	C10	Centre	Dassa-Zoumè
79	Monkassa	E28	Northeast	Malanville
80	Montèwo	C4	Centre	Savè
81	Nafayaoti	W27	Northwest	Tanguiéta
82	Naogon	S23	Sud	covè
83	Naougou	W2	Northwest	Cobly
84	Niaro	W31	Northwest	Kouandé
		_		

K. ADÉOTI et al. / Int. J. Biol. Chem. Sci. x(x): xx-xx, xxxx

85	Odo mèta	S18	Sud	Kétou
86	Okounfo	C11	Centre	Save
87	Okoutaossé	C1	Centre	Bantè
88	Ouari Maro	E19	Northeast	N'Dali
89	Ouèdèmè adja	<b>S</b> 6	Sud	Lokossa
90	Pam-Pam	W10	Northwest	Perma
91	Paouignan	C9	Centre	Dassa-Zoumè
92	Parakou	E23	Northeast	Parakou
93	Pédarou	E14	Northeast	Parakou
94	Pénéssoulou	W37	Northwest	Djougou
95	Péporiyakou	W9	Northwest	Natitingou
96	Pèrèrè	E16	Northeast	Pèrèrè
97	Satiandiga	W24	Northwest	Tanguiéta
98	Sébou	E22	Northeast	Parakou
99	Sèdjè-Dénou	S2	Sud	Abomey-Calavi
100	Ségbana	E9	Northeast	Ségbana
101	Sègbohoué	S9	Sud	Allada
102	Sèmèrè	W19	Northwest	Ouaké
103	Sinawongourou	E31	Northeast	Kandi
104	Sokouhoué	<b>S</b> 5	Sud	Lokossa
105	Sokponta	C6	Centre	Glazoué
106	Sonoumon	El	Northeast	N'Dali
107	Sooum	W4	Northwest	tanguiéta
108	Tansé	W28	Northwest	Kouandé
109	Tayakou	W7	Northwest	Tanguiéta
110	Tchakalakou	W8	Northwest	Natitingou
111	Tchaourou	E24	Northeast	Tchaourou
112	Tiélé	W5	Northwest	Tanguiéta
113	Toubougnidi	W26	Northwest	Matéri
114	Toumè	E32	Northeast	N'dali
115	Wassa	W16	Northwest	Djougou
116	Wiya	S27	Sud	Grand-Popo
117	Yakassou	E2	Northeast	N'dali
118	Zoungbomè	S16	Sud	Akpro-Missérété
R W	West: C: centre: E: Fast: S: Sout	h		

NB: W: West; C: centre; E: East; S: South

term of species distribution, surveyed villages (table 1) were considered as individuals and the vegetable species (Acmella uliginosa, Ceratotheca sesamoides, Justicia tenella and Sesamum radiatum) as variables and scored as 1 when present or 0 when absent. Using this methodology a binary matrix was compiled and used to perform a Principal Coordinate Analysis (PCA) with SAS statistical package (SAS

Institute, 1996). Similarity between species in term of geographical localisation was assessed using Jaccard coefficient of similarity (Jaccard, 1908) computed by NTSYS-pc 2.2 (Rohlf 2000) and a dendrogram drawn using UPGMA cluster analysis of the same program (Sneath and Sokal 1973; Swofford and Olsen 1990). In this analysis, vegetable species were considered as individuals and the villages as

variables and scored as described above. For better understanding of the species' ecology, their geographical distribution maps constructed using MapInfo Professional 8.0 were superimposed on the Benin soils and climate maps following Adam and Boko (1993) and the frequency of the species in the diverse ecological zones (number of villages in which the species is found out of the total number of the villages surveyed) were determined.

## **RESULTS**Origins of the species

Out of the four leafy vegetables studied, only the uncultivated species Ceratotheca sesamoides is recognised by the farmers as indigenous to the country. According to them, Justicia tenella, Acmella uliginosa and Sesamum radiatum were all introduced to Benin at different periods. Justicia tenella was introduced to the northeast of Benin about 60 years ago by the catholic European missionaries while Acmella uliginosa and Sesamum radiatum were introduced from Togo to the Northwest by Kabiè immigrants, about respectively 10 years and 50 years ago.

#### Folk nomenclature

Across the various villages and ethnic groups surveyed TLVs are identified by specific vernacular names. For the four species investigated, a total of 93 vernacular names were recorded (table 2). While C. sesamoides and S. radiatum have the greatest recorded number of vernacular names (29 and 30 respectively), only 15 vernacular names were recorded for J. tenella and 19 for A. uliginosa (table 2). The meanings of the vernacular names recorded are compiled in table 2.

Our analysis revealed the use, across regions, of nine key criteria in naming the four species under study. These are: origin, status of the plant (wild, cultivated), specific habitat, growth habit (creeping or erected), shape of the leaf, taste, easiness of the cooking, type and colour of the sauce (Table 1). While five

criteria were used to name S. radiatum and C. sesamoides, only two (origin and taste) were applied to A. uliginosa and all apart from the growth habit go with J. tenella. vernacular names in relation with origin have been used to designate C. sesamoides. Taste is only applied to A. uliginosa and J. tenella and it appeared, for these species, as the most used criteria. The slimy aspect of the sauce is the most important criterion used to designate C. sesamoides and S. radiatum. These two morphologically very close species are separated in their naming by two additional key criteria which are the growth habit (C. sesamoides is creeping while S. radiatum is erected) and the status (C. sesamoides is wild while S. radiatum is cultivated) of the plant (table 3).

# Geographical distribution and ecology of the species

The geographical distribution maps of the species (Figures 1) revealed that they are unequally distributed throughout the country. Indeed, A. alignosa (Figure 1) is found almost exclusively in the northwest region (Departments of Donga and Atakora). J. tenella occupies the north and the Nago cultural area of the centre of Benin (Figure 1). S. radiatum was found almost everywhere in Benin (Figure 1). Apart from the far south where it is absent (Figure 1) Ceratotheca sesamoides follows the same geographical distribution as S. radiatum.

The superimposition of the geographical distribution maps of the species with both Benin soil and climate maps combined with the frequency of occurrence of the species on each type of soil (Figure 2) or climate (Figure 3) helped to understand their respective ecology. C. Sesamoides, although present everywhere, mostly occurs on ferralitic and ferruginous soils (Figure 2) and in Sudanian and Atacorian climates (Figure 2). In almost all the villages surveyed this species was reported to be closely linked to lateritic soils and some of its vernacular names (table 3) even refer to this particular habitat. S. radiatum is found on all the types

Table 2: List of the vernacular names recorded per species and their meaning

Species	Vernacular names	Ethnic groups	Meaning of vernacular names
Ceratotheca	Abiwèrè	Tchabè	-
sesamoides	Agbô	Idatcha, Mahi,	Slimy vegetable
		Goun, Fon	
	Assôworou	lamba	Slimy vegetable of hare
	Dowoungbaana	Boko	Vegetable of rocky zones
	Féïyôtô	Dendi	Slimy vegetable
	Gandafoï	Dendi	Creeping vegetable
	Gnankassounwari	Bariba	Wild vegetable
	Goufounin	Ani	Slimy vegetable
	Idjabô	Tchabè	Slimy vegetable
	Issé	Mokolé	Slimy vegetable
	Kasankpokpo	Foodo	Slimy creeping vegetable
	Koufoihangou	Gangamba	Wild slimy and creeping vegetable
	Koumonkou ilè	Fè	Slimy creeping vegetable
	Kpééwari	Bariba	Slimy creeping vegetable
	Kpééwori	Bariba	Slimy creeping vegetable
	N'zoti adènin	Kotokoli	Creeping and slimy vegetable
	Nonman	Wama	Slimy vegetable
	Nonpoéa	Wama	White slimy regetable
	Nôr	Pila pila	1 111111111
	Siwadouanwé	Ditamari	- (AM IHWY
	Taalè hounnoum	Lokpa	Wild Slimy vegetable
	Tanonman	Wama	Creeping and slimy vegetable
	Toohoun	Berba	Slimy vegetable
	Toopouôguè	Berba	White and slimy vegetable
	Toossibouhoun	Berba	Black and slimy vegetable
	Wôri	Bariba	Slimy vegetable
	Wôrigbéégui	Bariba	Wild vegetable
	Woriyô	Peul	-
	Yoodo	Dendi	Slimy vegetable
Sesamum	Agbôè	Aïzô	Slimy vegetable
radiatum	Agbon	Adja	Slimy vegetable
	Agbôté	Idatcha	Erect slimy vegetable
	Anansara foïto	Dendi	Slimy sauce of white people
	Dossé	Tchabè	-
	Dossi / Dossiguia	Bariba	-
	Dossiyô	Peulh	-
	Dossila	Boko	Black vegetable
	Féïyôtô	Dendi	Slimy vegetable
	Gooloo	Tchabè	-
	Gousséninfounin	Ani	Slimy vegetable prepared with potash
	Koumalo odoussè	Foodo	Slimy cultivated vegetable
	Koumalo oyélissè	Foodo	Erect Slimy vegetable
	Koumankoun akô	Fè	Male Slimy vegetable

	Kounanhangou	Gangamba	Slimy vegetable of the people Kabiè
	Koussèlomsôgou /	Gnindé	Black slimy vegetable
	Koussèlomsô		
	Lakouta	Dendi	-
	N'zoti koudouté	Kotokoli	Cultivated slimy vegetable
	Ningbo	Mahi	-
	Nonbotaman	Wama	Slimy and cultivated vegetable
	Nonmanwon	Yom	-
	Okoukou	Holi	Slimy vegetable
	Sôka wourou	Lamba	Slimy vegetable like sesame
	Tankantohoun	Berba	Slimy vegetable of wama ethnic
			group
	Tébonon	Bariba	•
	Titamanwadouanti	Ditamari	Slimy vegetable of Ditamari people
	Touhounnoum	Lokpa	Slimy vegetable of elephant
	Touwadouanti	Ditamari	Slimy vegetable of elephant
Acmella	Anansaara kalowao	Lokpa	Zanthoxylum xanthoxyloides of
uliginosa			white people
	Boubouô	Ditamari	Vegetable of pepper taste
	Boupèbouô	Ditamari	White people's pepper
	Bourdierikè	Berba	A/H1
	Didakomfroubiali	Gangamba	Zanthoxylum xanthoxyloides of
			Ditamari's ethnic group
	Djidja koumalo	Foodo	Slimy vegetable of elephant
	Gaatam migaate	Peulh	- LAN III W
	Kablè koulmawô	Foodo	Spice of Kabie's ethnic group
	Kalwôou	Lamba	- YMINN h.
	Kpékpéraboubou	Berba	3/AP 1 G W 1
	Kpéssèbohaa	Yom	UKUI INW I
	Lôwôlôkpè	Holi	It's un the hands it takes a long time
	Otomkalouwè	Ani	Vegetable of Zanthoxylum
			ranthoxyloides' taste
	Oulakombouonou	Yindé	F
	Sãanakpawogo	Pila pila	White people's Zanthoxylum
		P I MILA	xanthoxyloides
	Tanwou-	Bariba	-
	wouroussouguia	W	T 171
	Yèyèca	Kotokoli	Taste like pepper
	Yoritampobou	Wama	Yoruba vegetable of pepper taste
	Yowaboukpé	Bariba	Vegetable of Ditamari ethnic people
	Agbadoudou	Kotokoli ; Foodo	Delicious vegetable
	Atchélikéma	Ani	Atchélé tree's vegetable
	Bôwénou	Bariba Wama	Woman act and forget to some her
	Dimouniountchoro	vv ailia	Woman eat and forget to serve her husband
	Djagudjagu	Fè, Tchabè	Eat fufu (pounded yam)
	Djagudjagu Djègoudjègou	Idatcha	Eat fufu (pounded yam)
	Gnonwonko	Bariba	-
	Kourôkountônu	Bariba	The woman is not the man
	Koulokoullollu	Dativa	The woman is not the man

Parbatoukpékpéya	Wama	Hard leaves
Saligaman	Saxwè	Haoussa ethnic group 's vegetable
Tchakou tchakou	Lamba	-
Tikounsooti	Ditamari	Black vegetable
Tilétoussi	Lokpa	Vegetable of termites
Tipèwadouanti	Ditamari	Slimy vegetable of white people
Tokpélé	Saxwè	-

of Benin soils and climates (figure 5). A. uliginosa and J. tenella are all associated with the ferralitic and ferruginous soils and with the Sudanian and Atacorien climates of the northern Benin.

#### Selection of zones for in situ conservation

The Principal Coordinate Analysis (PCA) carried out to analyse the relationships between surveyed villages in term of species distribution led to four groups, namely G1, G2, G3 and G4 (Figure 4). G1 gathers villages (almost all of the northwest) in which, A. uliginosa was found. G2 is the group of J. This particular group assembles villages in which J. tenella is associated with C. cesamoides and S. radiatum. Groups 3 and 4 identify S. radiatum and C. Cesamoides respectively. At 75% of similarity on the dendrogram (Figure 5) which was designed to assess the resemblance between species in term of geographical distribution, cesamoides and S. radiatum were found to cluster together. Moreover, they appeared as isolated from J. tenella and A. uliginosa. Geographical distribution of the species combined with multivariate analysis led to the selection of two regions for the in situ conservation of the genetic resources of the species. These are the Northwest for A. uliginosa in association with the couple C. cesamoides and S. radiatum and the Northeast for J. tenella together with the same couple.

#### DISCUSSION

All the species under study, apart from Ceratotheca sesamoides, were reported as introduced in Benin. Although farmers uphold the thesis of the introduction of Justicia tenella in Benin, its area of origin remains unclear. The species is still not

described yet in the PROTA database (www.prota.org) and it is therefore difficult to hypothesise on its origin and history. Acmella uliginosa and Sesamum radiatum effectively exist in Togo and their local geographical localisations, as reported by Batawila et al. (2007), is in agreement with reports from Beninese farmers. The introduction of species or crop varieties from one country to another via the cross border communities is frequent. In Benin, it has been already reported for many crops including fonio (Adoukonou-Sagbadja et al., 2006, Dansi et al., 2009b), yam (Dansi et al., 1999; Dumont and Vernier, 2000; Mignouna and Dansi, 2003) and leafy vegetables (Dansi et al. 2008a).

Various vernacular names are used to designate the species. Among the vernacular names recorded (table 2), 24 were already reported by Dansi et al. (2009a). The analysis of the meanings of vernacular names compiled in table 2 confirms the existence of various scenario which are specific to folk nomenclature (unexplained names, synonymy, homonymy, semantic, same name across ethnic area, singular and plural) as reported by Mekbib (2007) on sorghum and Dansi et al., (2009a) on TLVs. The fact that no vernacular names in relation with origin have been used to designate C. sesamoides was expected as C. sesamoides is indigenous and growth in the wild (Akoègninou et al. 2006; Dansi et al. 2009). Taste is the most used criteria in naming A. uliginosa and J. tenella. According to the farmers, A. uliginosa has a particular spicy taste similar to the one of the root's bark Zanthoxylum xanthoxyloides. understands why almost all the vernacular names of this species refer to the taste of Zanthoxylum root's bark (Pepper taste) and to foreign origin as described above

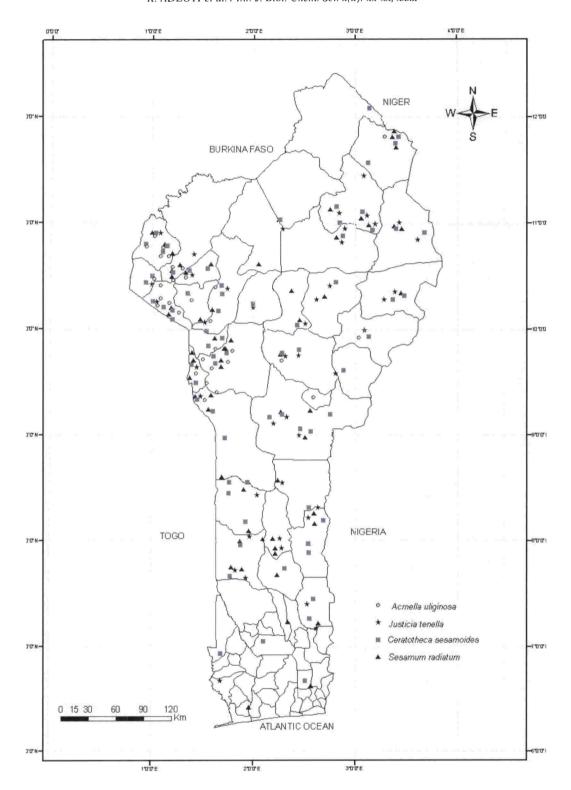


Figure 1: Geographical distribution map of Acmella uliginosa, Ceratotheca sesamoides, Justicia tenella and Sesamum radiatum in Benin

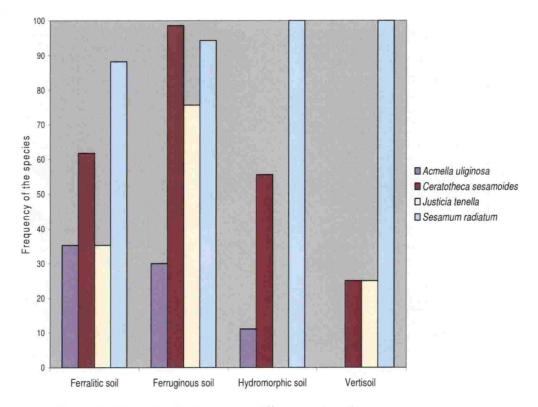


Figure 2: Frequency of the species on different Benin soils

Table 3: Naming criteria and their importance per species.

Criteria	C. sesamoides (%)	S. radiatum (%)	J. tenella (%)	A. uliginosa (%)
Origin	-	10.52	12.5	46.66
Taste	-	-	50	53.34
Aspect of the sauce	60.86	55.26	6.25	-
Status of the plant	10.86	18.42	6.25	-
Specific habitat of the plant	02.17	-	6.25	-
Growth habit	19.56	7.89	-	-
Colour of the sauce	6.52	7.89	6.25	-
Shape of the leaf	-	-	6.25	-
Easiness of the cooking	-		6.25	-

N.B.: For a given species and criterion, value in the table represents percentage of vernacular names based on the criteria.

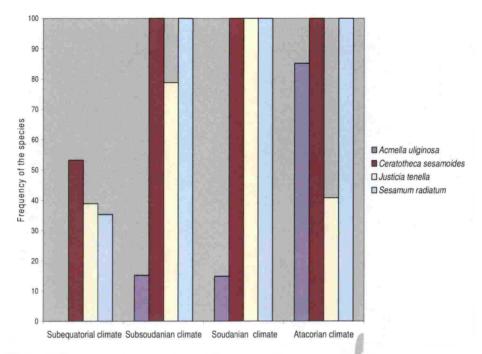


Figure 3: Frequency of the species on different Benin climates

(table 2). In the northern regions, both species are rather used as nutraceuticals for the same purposes (Akoègninou et al. 2006; Dansi et al. 2008a). In the case of J. tenella the taste really refers to the deliciousness of its sauce which most frequently bring women (as reported by interviewed men) to eat all and therefore forget to reserve a part for their husbands. Its vernacular names Dimouni-n'tchoro and Kourôkountonnou which literally mean "woman has forgotten to give to her bushand" and "Woman is not a man" in Wama and Bariba languages respectively are in agreement with the men's statement. As reported by many authors (Brush 1980; Brush et al. 1981; Alcorn 1984; Hernandez 1985; Maxted et al., 1997; Brush, 2000; Tuan et al., 2003) the understanding of folk nomenclature of these species helps in identifying their importance and distribution and consequently in developing appropriate in situ conservation strategies.

As revealed by the geographical distribution map, the four species under study are unequally distributed throughout the

country. According to farmers, the presence of Acmella iluvinosa in some places in the northeast (Parakou, Malanville, Sonoumon and Kassakpere) is linked to the migration of some Ditamari farmers from the northwest in the search of labour opportunities. The fact that this species is sold exclusively by the Ditaman women in the local markets of these localities confirms this hypothesis. J. tenella which was firstly known and used by the Bariba people of the northeast has rapidly diffused toward the northwest and the centre. The historic mixture and the remarkable integration of the Nago and Bariba communities in the transition zone of Tchaourou have surely contributed to its quick adoption as a leafy vegetable by Nago people. The absence of the species in the Mahi cultural area though surrounded by Nago was surprising and needs further investigation. The results obtained in this study with regard to the ecology (soil and climate) of C. sesamoides and Sesamum radiatum are in agreement with those reported by Bedigian (2004) and Batawila et al. (2007). A. uliginosa

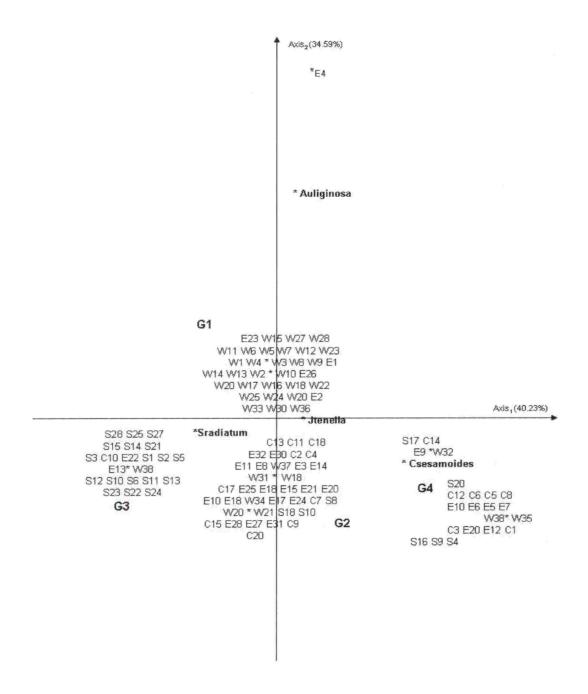


Figure 4: Principal Coordinate Analysis showing the dispersion of the surveyed villages with regard to the presence of the species under study. Villages grouped together are similar by the species they contain.

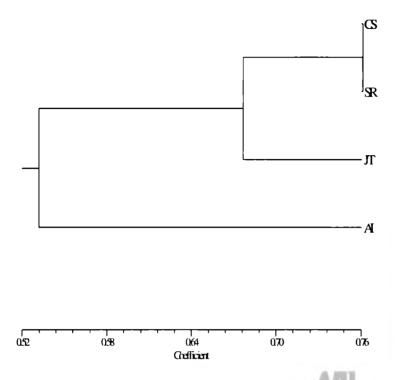


Figure 5: UPGMA dendrogram based on Jaccard coefficient of similarity showing the grouping of the species. CS (Ceratotheca sesamoides), SR (Sesamum radiatum), JT (Justicia tenella), AI (Acmella uliginosa)

is actually in progression toward the centre, the south and the northeast. It is also the case of *J. tenella* which is in progression toward the south. For these two cultivated species it is too early to conclude on their final distribution and ecology mainly because of their continuous spread.

The results of the multivariate analysis combined with the geographical distribution of the species have led to the selection of the northwest and of the northeast for the *in situ* conservation of the genetic resources. However, as *C. cesamoides* and *S. radiatum* are not distributed only in the north, their adaptability to various agroecological zones could also reflect some fractionation of their respective total genetic diversity. Therefore, a further genetic diversity assessment using molecular markers is required for the

estimation of genetic diversity and the selection of adequate conservation sites for these two species as it was the case for Dioscorea abyssinica (Agbangla et al. 2007), Digitalis obscura (Nebauer et al., 1999) and Asimina triloba (Huang et al., 2000). Following Maxted et al., (1997), two to three sites should be chosen within selected regions as conserving diversity in many sites is not only more reassuring but highly recommended.

#### Conclusion

The present study revealed that the four species under study are unequally distributed throughout the country and are preferentially linked to diverse soils and climates. Therefore more than one zone will be required to preserve genetic resources in

situ. Based on both distribution maps and multivariate analysis, Northwest Northeast regions were selected as appropriate conservation zones for A. uliginosa and J. tenella respectively. At the same time, these two zones will also help to conserve S. radiatum and C. sesamoides which are present almost everywhere in Benin. Because of the wide adaptability of these two closely related species to various agro-ecological zones, the existence of a well structured but hidden intraspecies genetic diversity has hypothesized. Estimating this genetic diversity using molecular markers such as AFLP will be useful in decision making with regard to the selection of additional in situ conservation sites.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

This research was sponsored by the scientific council of the University Abomey-Calavi (UAC) through collaborative project "6 AVG" on traditional vegetables. We thank Dr Yédomonhan (Department of Botany, FAST) for his technical assistance during the entire study and Mr A. Onansanya (WARDA, Cotonou, Benin) for help with both SAS and NTSYS computer programs. We are also grateful to all the communities or inflividual farmers we met for fruitful discussions during the surveys.

#### **REFERENCES**

- Abukutsa-Onyango MO. 2003. Crotalaria brevidens Benth. In Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables, Grubben GJH, Denton OA (Eds). Backhuys Publichers: Leiden, Wageningen/CTA Netherlands, 229-231.
- Adam S, Boko M. 1993. *Le Bénin*. Les éditions du Flamboyant / EDICEF.
- Adoukonou-Sagbadja H, Dansi A, Vodouhè R, Akpagana K. 2006. Indigenous knowledge and traditional conservation of Fonio millet (*Digitaria exilis* Stapf, *Digitaria iburua* Stapf) in Togo.

- Biodiversity and Conservation, 15: 2379-2395.
- Agbangla C, Dansi A, Ahanhanzo C, Alavo TBC, Daïnou O, Tostain S, Scarcelli N, Pham J-L. (2007). Assessment of genetic diversity within and between populations of *Dioscorea abyssinica* Hochst. ex Kunth of northern Benin using AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) markers. *Annales des Sciences Agronomiques du Bénin*, 9(1): 43-55.
- Akoègninou A, Van der Burg WJ, Van der Maesen LJG. 2006. Flore Analytique du Bénin. Backhuys Publishers:

  Netherlands.
- Alcorn JB. 1984. Huastec Mayan Ethnobotany. Austin, Univ. Press: Texas.
- Batawila K, Akpavi S, Wala K, Kanda M, Vodouhè R, Akpagana K., 2007. Diversité et gestion des légumes de queillette au Togo. AJFAND, 7(3): 1-16.
- Bedigian D. 2004. Slimy leaves and oily seeds: Distribution and use of wild relatives of sesame in Africa. Economic Botany, 58: 3-33.
- Brush SB, Carney HJ, Haumam Z. 1981.

  Dynamics of Andean potato agriculture.

  Economic Botany, 35: 70-85.
- Brush SB. 1980. Potato taxonomies in Andean agriculture. In: *Indigenous Knowledge Systems and Development*. Brokensha DW, Warren DM, Werner 0 (eds). University Press of America, New York; 37-47.
- Brush SB. 2000. *Genes in the field*. Lewis Publishers: United Kingdom.
- Chweya JA, Eyzaguirre P. 1999. The biodiversity of traditional leafy vegetables. IPGRI Publication: Italy.
- Dansi A, Adjatin A, Adoukonou-Sagbadja H, Adomou A, Faladé V, Yedomonhan H, Akpagana K, de Foucault B. 2009a. Traditional leafy vegetables in Benin: Folk nomenclature, species under threat and domestication. Acta Botanica Gallica, 156(2), 183-1999.

- Dansi A, Adjatin A, Adoukonou-Sagbadja H, Faladé V, Yédomonhan H, Odou D, Dossou B. 2008a. Traditional leafy vegetables and their use in the Benin Republic. Genetic Resources and Crop Evolution, 55: 1239-1256.
- Dansi A, Adoukonou-Sagbadja H, Vodouhè R. 2009b. Diversity, conservation and related wild species of Fonio millet (*Digitaria* spp.) in the northwest of Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution* (submitted).
- Dansi A, Mignouna HD, Zoundjihekpon J, Sangare A, Asiedu R, Quin FM. 1999. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-Dioscorea rotundata* complex) of Benin Republic. Genetic Resources and Crop Evolution, 46: 371-388.
- Dansi, A, Adjatin A, Adoukonou-Sagbadja H, Akpagana K. 2008b. Production and traditional seeds conservation of leafy vegetables in Benin rural areas. Bulletin de la Recherche Agronomique du Benin, 59: 59-70.
- Defoer T, Kamara A, de Groove H. 1997. Gender and variety selection: farmers' assessment of local maize varieties in southern Mali. African Crop Sciences Journal, 5(1): 65-76.
- Dumont R, Vernier Ph. 2000. Domestication of yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) within the Bariba ethnic group in Benin. *Outlook on Agriculture*, **29**(2): 137-142.
- Francisca IS, Eyzaguirre P. 2007. African leafy vegetables: their role in the world health organization's global fruit and vegetables initiative. *AJFAND*, **7**(3), 1-17.
- Hernandez XE. 1985. Maize and man in the greater southwest. *Economic Botany*, **39**(4): 416-430.
- Huang HW, Layne DR, Kubisiak TL. 2000. RAPD inheritance and diversity in

- pawpaw (Asimina triloba). J. Am. Soc. Hort. Sci., 125: 454-459.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44:223–270.
- Kamara A, Defore T, de Groove H. 1996. Selection of new varieties through participatory research: the case of corn in South Mali. *Tropicultura*, **14**(3), 100-105.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG. 1997. Plant Genetic Conservation: the in situ approach. Chapman and Hall: United Kingdom.
- Mekbib F. 2007. Infra-specific folk taxonomy in sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) in Ethiopia: folk nomenclature, classification, and criteria. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 3(38): 645-663
- Mensah J K, Okoli R I, Ghaju-Obodo J O, Eifediyi K. 2008. Phytochemical, nutritional and medical properties of some leafy vegetables consumed by Edo people of Nigeria. African Journal of Riotechnology. 7(14): 2304–2309
- Mignorna HD, Dansi A (2003). Yam (Dioscorea spp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. Genet. Resourc. Crop Evol. 50:519-528.
- Nebauer SG, del Castillo-Agudo L, Segura J. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (Digitalis obscura L.). Theor. Appl. Genet., 98: 985-994.
- Odhav B, Beekrum S, Akula Us, Baijnath. H. 2007. Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. Journal of Food Composition and Analysis, 20(5): 361-448
- Rohlf FJ. 2000. NTSYS-pc version 2.2: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York.
- SAS. 1996. SAS/STAT User's guide. Release 6 12 Cary, N.C SAS Institute.

- Shippers RR. 2002. African indigenous vegetables: an overview of the cultivated species. Chatham, UK. Natural resources Institute/ACP-UE Technical Centre for Agricultural and rural Cooperation.
- Sneath PHA, Sokal RO. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Swofford DL, Olsen GJ. 1990. Phylogeny reconstruction. In *Molecular systematic*. Hillis DM, Moritz C (eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Tuan HD, Hue NN, Sthapit BR, Jarvis DI. 2003. On farm management of agricultural biodiversity in Vietnam. Proceedings of a Symposium 6-12 December 2001, Hanoi, Vietnam. IPGRI Publication: Italy.
- White F. 1993. The AETFAT chorological classification of Africa: history, methods and applications. *Bull. Jard. Bot. Natl. Belg.*, 62: 225-281

-3 FEV. 2010