



# Arnica montana : évaluation des ressources génétiques françaises en vue du développement de la culture en plaine et en montagne

L. Gourlin, Denis Bellenot, Benoit Pasquier, Simon Flahaut, P. Gallotte, P. Allec, P. Danelon, C. Baconnier, B. Leduc, H. Jourd'hui, et al.

## ► To cite this version:

L. Gourlin, Denis Bellenot, Benoit Pasquier, Simon Flahaut, P. Gallotte, et al.. Arnica montana : évaluation des ressources génétiques françaises en vue du développement de la culture en plaine et en montagne. Innovations Agronomiques, INRA, 2019, 71, pp.67-80. 10.15454/w0yij2 . hal-02172495

HAL Id: hal-02172495

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02172495>

Submitted on 3 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## ***Arnica montana* : évaluation des ressources génétiques françaises en vue du développement de la culture en plaine et en montagne**

Gourlin L.<sup>1</sup>, Bellenot D.<sup>2</sup>

Avec la collaboration de Pasquier B.<sup>1</sup>, Flahaut S.<sup>3</sup>, Gallotte P.<sup>2</sup>, Allec P.<sup>4</sup>, Danelon P.<sup>5</sup>, Baconnier C.<sup>5</sup>, Leduc B.<sup>6</sup>, Jourd'hui H.<sup>7</sup>, Chaud I.<sup>8</sup>, Darmas L.<sup>9</sup>.

<sup>1</sup> Conservatoire National des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles (CNPMAI)

<sup>2</sup> Iteipmai – Laboratoire phytochimie

<sup>3</sup> Comité des plantes aromatiques et médicinales (CPPARM)

<sup>4</sup> Chambre d'Agriculture des Hautes-Alpes

<sup>5</sup> Lycée Horticole Terre d'horizon (EPLEFPA)

<sup>6</sup> EARL du Patuet

<sup>7</sup> SARL Jourd'hui

<sup>8</sup> Société d'Intérêt Collectif Agricole de la Région Auvergne des Producteurs de Plantes Aromatiques et Médicinales (SICARAPPAM)

<sup>9</sup> La ferme du clôt

**Correspondance** : experimentation@cnpmai.net

### **Résumé**

L'*arnica* des montagnes est une espèce médicinale importante dont la production est principalement issue de la cueillette à l'état sauvage, notamment sur le territoire métropolitain. La ressource étant en régression, le maintien, voire le développement de la production française passe donc par la mise en culture, actuellement anecdotique car difficile. Certains freins pourraient être levés par la mise en évidence de matériel végétal adapté à la production. L'objectif de ce projet était de mettre en culture 24 populations d'origines sauvages (prospectées en France métropolitaine) et de les comparer à deux variétés commerciales témoins 'Arbo' et 'Arnimed', sur 4 sites d'expérimentation aux contextes pédoclimatiques variés mais a priori adaptés à la culture de l'espèce. Durant les 3 années d'essai, un suivi morphologique et agronomique des populations a été réalisé. Des analyses des sesquiterpènes lactones et flavonoïdes ont été effectuées, et une nouvelle méthodologie de dosage de ces composés a été développée. Les résultats mettent en exergue la forte variabilité de l'expression phénotypique et chimique des différentes souches testées. Une forte mortalité globale a pu être constatée sur l'ensemble des populations sauvages étudiées sans que les causes aient pu en être identifiées. Sur l'ensemble des variables suivies, les variétés commerciales 'Arbo' et 'Arnimed' sont particulièrement performantes, et deux populations sauvages se démarquent par leurs résultats intéressants : l'une paraît pertinente pour démarrer des travaux de sélection d'une variété adaptée à la basse altitude, tandis que l'autre, originaire du Massif central, pourrait se proposer comme une alternative d'origine locale (française) à la culture de variétés commerciales sélectionnées (suisse et allemande).

**Mots-clés** : sesquiterpène lactone, populations sauvages, Arbo, Arnimed, capitule, plante entière fleurie

**Abstract** : *Arnica montana*: Testing of original french genetic resources for the development of lowland and mountain cultivation

*Arnica montana* is a major medicinal specie, which is now mainly produced from wild harvesting, especially in mainland France. As the wild resource is decreasing, and in order to maintain or even

develop the French production, cultivation is a good option, that is still very limited, because of its difficulty. Finding the right plant material could help to enhance cultivation programs. This project aimed at growing 24 wild populations, which were collected in mainland France, and to compare them with 2 commercial varieties, 'Arbo' and 'Arnimed'. This was set on 4 experimentation spots, chosen for their potential match for Arnica cultivation. The experiment lasted 3 years, and morphological and agronomical subjects were studied on the populations. Sesquiterpene lactones and flavonoids analyzed, and a new methodology of evaluation was developed. The results showed extreme variability of phenotypic and chemical expression of the different populations. An important death rate has been noticed on wild populations, but the causes are still unknown. On the set of variables chosen, commercial varieties 'Arbo' and 'Arnimed' were particularly competitive, and two wild populations stand out with promising results. One seems appropriate for starting selection works on a variety that would be suitable for low altitude, and the other one could be a local (French) alternative to the cultivation of selected varieties ('Arbo' and 'Arnimed' are from Swiss and German selection work).

**Keywords:** sesquiterpene lactone, wild populations, Arbo, Arnimed, flower heads, whole flowering plant

## 1. Introduction

### 1.1 Contexte et enjeux

*Arnica montana*, espèce emblématique des prairies d'altitude d'Europe, est utilisée en homéopathie et dans l'industrie pharmaceutique en usage externe pour les suites de blessures et accidents (hématomes, rhumatismes, inflammations, etc.) et dans l'industrie cosmétique pour ses vertus adoucissantes et cicatrisantes (Bruneton, 2009).

La France est l'un des derniers pays où la production est presque exclusivement issue de la cueillette, du fait des difficultés rencontrées à la mise en culture et des possibilités d'exploitation de la ressource naturelle (premier territoire de cueillette en Europe), qui pourtant commence à s'épuiser, en raison d'une surexploitation par cueillette, des phénomènes d'intensification de l'agriculture (intrants), et de déprise agricole (Jager, 2016).

De ce fait, l'Arnica est une espèce considérée dans de nombreux pays européens comme une plante menacée voire protégée réglementairement. En France, elle est protégée dans les régions de plaine où elle est présente, et susceptible de l'être partout ailleurs par d'éventuels arrêtés préfectoraux ("INPN - Inventaire National du Patrimoine Naturel") (Burfield, 2010). Sa vulnérabilité a par ailleurs été évaluée à différentes échelles territoriales selon la méthodologie officielle de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) : si elle est actuellement considérée comme étant en « préoccupation mineure » (least concern) aux échelles européenne et mondiale, ses effectifs sont réputés diminuer depuis plusieurs dizaines d'années en France.

La France dispose néanmoins encore de ressources naturelles qui autorisent une cueillette relativement volumineuse. Ainsi, 10 à 20 tonnes de plantes entières fleuries fraîches et plusieurs tonnes de capitules secs sont récoltés annuellement en France, essentiellement pour les besoins du marché national. Cependant ces dernières années, l'offre a du mal à couvrir la demande. Plusieurs tonnes de plantes entières fleuries ne sont pas fournies chaque année pour les besoins du marché français, et le marché mondial ne cesse de se développer. Pour l'Europe par exemple, il est estimé à 50 t de capitules secs par an (Burfield, 2010) pour un chiffre d'affaires à la production de 3 à 4 M€. Ainsi, les sites de cueillette sont surexploités. L'espèce s'en trouve menacée dans ses habitats naturels et risque d'être à terme totalement interdite de cueillette, voire de disparaître.

Pour maintenir la compétitivité de la production française, voire accroître ses marchés à l'exportation, la France, à l'instar de certains pays producteurs (Smallfield et Douglas, 2009), pourrait développer les

cultures d'arnica. Elle dispose en effet de conditions propices à cette mise en culture : filière professionnelle existante, vastes et nombreuses zones de production compatibles, ressources génétiques diversifiées. Actuellement, cette alternative est freinée par :

- L'activité de cueillette, permettant d'obtenir une ressource à un coût relativement bas par rapport à la plante cultivée, même si cette activité est menacée à terme pour cette espèce sans la mise en place de solutions de substitution,
- Le manque de connaissance sur la mise en culture en France,
- Une faible disponibilité du matériel végétal potentiellement exploitable.

La culture de cette espèce adaptée aux sols pauvres peut également se présenter comme une opportunité pour le maintien d'une activité agricole en zone rurale défavorisée.

## 1.2 Objectifs

Devant cet état de fait, les objectifs généraux poursuivis lors de ces trois années d'études sont de contribuer au développement des cultures de l'Arnica des montagnes en France par un choix judicieux de matériel végétal issu de ressources génétiques françaises et par l'apport de nouvelles données culturales permettant d'affiner et d'adapter les itinéraires techniques de production existants. L'atteinte de ces objectifs permettra de préserver les ressources naturelles d'Arnica des montagnes en diminuant fortement la pression de cueillette, et en favorisant ainsi le maintien et la bonne gestion de la ressource naturelle.

Pour ce faire, 24 populations d'origines sauvages, prospectées en France métropolitaine, ont été mises en culture et comparées à deux variétés commerciales témoins, sur 4 sites d'essai, d'altitude variant de +60 à +1600m, directement chez des producteurs de Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (PPAM).

## 1.3 Partenaires

Ce projet était construit autour de 6 actions et regroupait 9 partenaires techniques.

Le CNPMAI et le Lycée horticole de Romans ont assuré la multiplication des ressources génétiques. L'EARL du Patuet, la SICARAPPAM, la Ferme du Clot et la SARL Jour'd'hui (dénommés ci-après « les producteurs ») ont accueilli sur leurs exploitations agricoles les essais et ont pris en charge leurs entretiens. Accompagnés du CNPMAI, du CPPARM, de la Chambre d'Agriculture des Hautes-Alpes et de l'Iteipmai (dénommés ci-après « les organismes techniques »), les producteurs ont participé aux travaux d'implantation des essais et à la récolte des lots. Lors de la réalisation des différentes actions sur le terrain, chaque producteur était en lien direct avec un organisme technique, la proximité géographique facilitant les échanges entre partenaires. Les organismes techniques ont assuré sur leur site d'essai respectif la réalisation des notations relatives aux évaluations morphologiques et agronomiques des populations testées. Le CNPMAI, a été en charge du traitement de l'ensemble de données collectées sur les 4 sites d'essai. Le laboratoire de phytochimie de l'iteipmai a pris en charge l'ensemble des travaux d'évaluation qualitative des lots.

Le **CNPMAI**, chef de file du projet a assuré le pilotage et la diffusion de l'état d'avancement des travaux en complément de la coordination technique, administrative et financière du projet. Il a fourni l'essentiel du matériel végétal de base utilisé pendant l'essai (issu de divers travaux de prospections) ainsi que la mise à disposition de ses connaissances et compétences techniques pour la multiplication des lots. De plus, le CNPMAI a apporté son expertise et son savoir-faire en matière de pré-évaluation et évaluation d'un pool diversifié de populations d'origines sauvages (réflexion sur le protocole, traitement des données, etc.).

L'ensemble des **organismes techniques** a apporté connaissances et compétences en matière de mise en œuvre et suivi sur le terrain d'expérimentations agronomiques appliquées. L'**iteipmai** a par ailleurs apporté les connaissances et compétences de son laboratoire pour effectuer les différentes analyses phytochimiques.

Le **lycée horticole de Romans** a pris en charge la production des plants à partir des semences fournies par le CNPMAI.

Les quatre **producteurs** partenaires de l'essai ont accueilli et entretenu les parcelles expérimentales, et mis à disposition leurs connaissances et compétences techniques de terrain sur la culture de l'arnica des montagnes. Ils ont également permis aux organismes techniques d'appréhender au mieux les attentes et contraintes techniques rencontrées sur le terrain.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Matériel végétal

Le principal facteur étudié dans le cadre de cet essai est le matériel végétal : 24 populations d'origine sauvage (23 issues des prospections 2012-2013 menées en France par le CNPMAI et une récoltée en 1990 en plaine et multipliée depuis par le Conservatoire) ont été mises en culture (Tableau 1) en comparaison avec deux variétés commerciales (témoins) : 'Arbo' (provenance : Jelitto - Allemagne) et 'Arnimed' (provenance : Médiplants - Suisse).

Les taux de mortalité des populations testées, supérieurs à 40% sur tous les essais en fin 2015, ont justifié une adaptation des suivis pour l'année 2016. En effet, dans un souci de représentativité des résultats, il a été décidé lors du comité de pilotage de mars 2016, de maintenir un suivi uniquement sur :

- Les populations dont l'effectif de pieds vivants cumulé sur les trois répétitions d'un site était supérieur ou égal à 30 ;
- Les populations aux meilleurs rendements en capitules en 2015 ;
- Les populations qui sur un ou deux sites ne satisfaisaient pas les deux conditions précédemment exposées (dans un souci de comparaison globale des résultats entre les sites).

**Tableau 1:** Synthèse des sites de prospection des populations sauvages d'*Arnica montana* étudiées.

N° pop	Département	Date de récolte	Altitude	% de germination <sup>1</sup>	Années de suivis
12-arn-001 bis	Puy-de-Dôme -63	30/07/2012	1260 m	92%	2014-2015-2016
12-arn-004	Pyrénées-Orientales - 66	17/07/2012	1730 m	64%	2014-2015
12-arn-005	Hautes-Pyrénées - 65	29/07/2012	1680 m	91%	2014-2015-2016
12-arn-006	Puy-de-Dôme - 63	10/08/2012	1260 m	97%	2014-2015-2016
12-arn-007	Haute-Savoie - 74	11/08/2012	1580 m	98%	2014-2015-2016
12-arn-008	Haute-Savoie - 74	11/08/2012	1800 m	95%	2014-2015
12-arn-009	Savoie - 73	11/08/2012	1810 m	96%	2014-2015-2016
12-arn-010	Savoie - 73	12/08/2012	2158 m	94%	2014-2015-2016
12-arn-011	Savoie - 73	12/08/2012	2070 m	89%	2014-2015-2016
12-arn-012	Hautes-Alpes - 05	13/08/2012	2100 m	98%	2014-2015-2016
12-arn-013	Hautes-Alpes - 05	13/08/2012	2270 m	92%	2014-2015-2016

<sup>1</sup> Tests réalisés en 2013, en boîte de Pétri dans 2 conditions : 20°C-nuit et 20°C alternance jour/nuit

N° pop	Département	Date de récolte	Altitude	% de germination <sup>1</sup>	Années de suivis
12-arn-014	Alpes de Haute-Provence - 04	13/08/2012	2000 m	95%	2014-2015
12-arn-015	Alpes-Maritimes - 06	14/08/2012	2200 m	92%	2014-2015
12-arn-016	Alpes-Maritimes - 06	14/08/2012	2110 m	83%	2014-2015
12-arn-017	Alpes de Haute-Provence - 04	14/08/2012	2240 m	96%	2014-2015
12-arn-018	Haut-Rhin - 68	15/08/2012	1200 m	96%	2014-2015-2016
12-arn-021	Territoire de Belfort - 90	15/08/2012	1180 m	92%	2014-2015-2016
13-arn-023	Puy-de-Dôme - 63	25/07/2013	880 m	93%	2014-2015-2016
13-arn-030	Ardèche - 07	27/07/2013	1280 m	66%	2014-2015-2016
13-arn-032	Puy-de-Dôme - 63	25/07/2013	860 m	78%	2014-2015-2016
12-arn-002	Puy-de-Dôme -63	30/07/2012	1260 m	90%	2014-2015
12-arn-003	Cantal - 15	16/07/2012	1380 m	59%	2014-2015-2016
13-arn-031	Corrèze - 19	24/07/2013	780 m	55%	2014-2015-2016
90-arn-036	Plaine	1990	130 m	74%	2014-2015-2016

## 2.2 Caractéristiques des parcelles

La conception du protocole d'expérimentation vise également à mesurer l'impact du site de mise en culture (et des conditions pédoclimatiques associées) sur le développement des populations (mortalité, rendement, corrélation entre zones géographiques de prospection de la population testée et résultats observés...). Le Tableau 2 présente les caractéristiques géographiques et pédologiques des sites d'essai.

**Tableau 2** : Caractéristiques géographiques et pédologiques des sites d'essai.

Appellation Carac.		SARL Jour'd'hui Anjou	EARL du Patuet Morvan	SICARAPPAM Massif central	Ferme du Clot Alpes
<b>Géogr aphy</b>	Région/département	Pays de la Loire (49)	Bourgogne (21)	Auvergne (63)	Provence Alpes Côtes d'Azur (05)
	Altitude (m)	60	500	900	1600
<b>Pédologie</b>	Texture du sol	Sableuse	Sable argilo-limoneux	Limon-sableux	Limono-argilo-sableuse
	CEC (meq/100g)	6.1	10.3	15.2	29.9
	pH Eau	6.1	5.9	5.4	5.6
	pH KCl	5.2	4.5	4.3	5
	% MO totale	1,07	3.81	5.11	18
	C/N	9	10.5	8	6.3
	Teneur en éléments	N <sub>total</sub>	688	2114	3703
Ca (CaO)		1083	1412	511	3659

## 2.3 Multiplication des plants et installation de l'essai

Afin de limiter les risques d'échec, la multiplication des populations a été réalisée par deux structures partenaires en 2014. En effet, ces étapes de semis et repiquage sont particulièrement délicates avec des semences collectées dans la nature. Les structures ont réalisé les travaux en suivant le même protocole opératoire (substrat utilisé, date de semis, stade de développement des plantules au repiquage, etc.) élaboré par le chef de file. Sur chacune des parcelles d'essai, 20 pieds par population sur trois blocs randomisés ont été implantés en mai et juin 2014.

## 2.4 Variables mesurées et méthodes de travail utilisées

Afin de suivre le développement de la culture, trois observations par an durant tout le projet ont été réalisées sur chacun des sites :

- 1 notation pour évaluer la reprise des plants au printemps (entre le 29 avril et 21 mai en fonction des sites, dénommée ci-après notation 1) ;
- 1 notation en pleine floraison (entre le 22 mai et le 22 juin en fonction des sites, dénommée ci-après notation 2) ;
- 1 notation avant l'hiver (entre mi et fin octobre, dénommée ci-après notation 3).

### 2.4.1 Évaluation morphologique et comportement agronomique

Le Tableau 3 synthétise les variables suivies, leurs échelles de mesure ainsi que les périodes d'observation sur le terrain.

**Tableau 3** : Variables suivies pour évaluation morphologique et comportement agronomique.

Définition des variables	Mesure	Période d'observation		
		2014	2015	2016
Propreté de la microparcelle	Echelle de 0 à 5. 0 = aucune adventice, 5 = arnica à peine visible	Notations 1, 2, 3		
Etat sanitaire	Echelle de 0 à 5. 0 = tous les pieds sont morts, 5 = très belle parcelle, pieds vigoureux, homogènes	Notations 1, 2, 3		
Note qualitative	Etat de tous les pieds les uns par rapport aux autres : très beau (TB), beau (B), assez beau (AB), moyen (M), assez laid (AL), laid (L), chétif (c), malade (m)	Non évalué		Notations 1, 2, 3
Nombre de pieds morts	Comptage et localisation des pieds concernés	Notations 1, 2, 3		
Pieds malades	Nombre de pieds atteints par les symptômes décrits + localisation. NB : pas d'inoculation ni de traitement réalisé	Notations 1, 2, 3		
Nombre de pieds chétifs	Nombre de pieds très peu développés mais sains + localisation	Notations 1, 2, 3		
Stade de développement	% de pieds vivants dans chaque catégorie ; végétatif, boutons, fleurs principales épanouies, fleurs axillaires épanouies, fleurs axillaires fanées	Non évalué	Notation 2	
Type de rosette	Echelle de 1 = tous les pieds de la modalité sont à rosette simple à 5 = tous les pieds sont à rosettes multiples. 3 = 50% des pieds à rosette multiplie- 50% rosette simple	Notation 3		
Diamètre de la rosette à l'état végétatif	Mesure en centimètre des rosettes à l'état végétatif	Notation 3		
Hauteur de la plante fleurie	Mesure d'un plant moyen représentatif (cm) et note d'homogénéité de la mesure sur la modalité (1 = homogène, 5 = hétérogène)	Non évalué	Notation 2	

### 2.4.2 Évaluation quantitative des rendements en capitules et plantes entières fleuries

Deux récoltes ont eu lieu en 2015 et 2016. La première a permis l'évaluation du rendement en capitules en première année de floraison (2015), les capitules ont été récoltés et pesés sur l'ensemble des modalités de l'essai ayant fleuri. En seconde année de floraison (2016), la plante entière fleurie a été récoltée et pesée sur l'ensemble des modalités de l'essai ayant fleuri.

### **2.4.3 Phytochimie : dosage des sesquiterpènes lactoniques (SQL) dérivés de l'hélénaline (norme Pharmacopée)**

Les analyses phytochimiques ont porté sur l'étude des SQL, molécules supposées d'intérêt chez l'arnica des montagnes, dans les capitules ainsi que dans la plante entière fleurie.

#### **▪ Capitules**

Le premier volet de travaux a consisté à mettre en place une méthode de dosage pour la rendre plus rapide et plus efficace que celle précisée dans la pharmacopée européenne (« ARNICA (FLEUR D') » n° 01/2012 : 1391). Pour la phase d'extraction, le chloroforme utilisé en 2015 a été remplacé par l'acétate d'éthyle réputé moins toxique et nous avons testé l'intérêt d'une phase de purification par addition d'oxyde d'alumine qui a pour but de précipiter des flavonoïdes qui interfèrent dans la phase d'analyse par HPLC. Sur 10 échantillons, la corrélation entre les deux séries de résultats est bonne ( $r^2 = 0,85$ ), les résultats avec alumine étant à 90% de ceux sans alumine. Suite à ces premiers résultats, la méthode utilisée sur l'ensemble des capitules récoltés en deuxième année de floraison 2016 a été la suivante : extraire 1,00 g de poudre de fleur d'arnica par 40 mL d'acétate d'éthyle aux ultrasons pendant 5 min. Filtrer. Reprendre le filtre et la poudre par 40 mL d'acétate d'éthyle aux ultrasons pendant 5 min. Filtrer. Rassembler les filtrats et ajouter 7,0 g d'oxyde d'aluminium neutre. Filtrer. Evaporer à sec sous pression réduite et reprendre par 3,0 mL de la solution d'étalon interne (santonine + 4-hydroxybenzoate de butyle). Les chromatographies ont été réalisées par une Chaîne HPLC Agilent type 1260, équipée d'une Colonne C18 250X4.6mm, granulométrie 5  $\mu$ m, porosité 100 Angstrom de chez Macherey Nagel, débit : 0,8 ml/min, durée : 90 min + 5 min post time. Tous les pics compris entre le pic de santonine et le pic de 4-hydroxybenzoate de butyle ont été intégrés. Sur ces extraits à l'acétate d'éthyle, l'analyse par GCMS permet d'identifier les différentes lactones sesquiterpéniques présentes.

#### **▪ Plante entière fleurie**

Sur l'ensemble des modalités récoltées en 2016 sous forme de plante entière fleurie, les teintures ont été réalisées selon la monographie « ARNICA (PLANTE ENTIÈRE) POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES » de la Pharmacopée française, en recouvrant une masse connue d'échantillon de plante entière partie aérienne par 10 fois son poids d'un mélange éthanol/eau (50/50 M/M) et en laissant macérer 8 semaines à l'abri de la lumière. Remarque : la teinture d'arnica selon la Pharmacopée Européenne (« ARNICA (TEINTURE DE) » n° 01/2008:1809 CORRIG2 6 .3 ») est plus riche (norme supérieure à 0,04%) car préparée uniquement à partir des capitules. Les solutions pour analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) sont préparées de la façon suivante : dans un ballon à fond rond, introduisez 25,000 g de teinture mère, ajoutez 2,0 mL de la solution d'étalon interne et 15 g d'oxyde d'aluminium neutre R. Agitez pendant 2 min et filtrez. Rincez le ballon et le filtre avec 3 fois 5 mL d'un mélange à volumes égaux de méthanol R et d'eau R. Evaporez le filtrat à siccité, sous pression réduite, à température inférieure à 50 °C. Dissolvez le résidu dans 2,0 mL d'un mélange de 80 volumes de méthanol R et de 20 volumes d'eau R puis filtrez.

#### **▪ Comparaison des profils en dérivés de l'hélénaline et de la dihydrohélénaline**

Sur les extraits à l'acétate d'éthyle, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GCMS) permet d'identifier les différentes lactones sesquiterpéniques présentes. Il y a deux séries : les esters de l'hélénaline et les esters de la dihydrohélénaline.

Appareil utilisé pour les GCMS : MARQUE SHIMADZU TYPE GCMSQP2010 SE HS20. Colonne : type DB5, 30m x 0,25 mm, épaisseur de la phase stationnaire 0,25 $\mu$ m.



- **Étude de la présence ou de l'absence de rutine selon les parties de plantes et les origines en 2016**

Selon la monographie « ARNICA (FLEUR DE) » n° 01/2012 :1391 de la Pharmacopée Européenne, les flavonoïdes normalement présents sont l'astragaline, l'isoquercitroside et le lutéolol-7-glucoside. En revanche, la rutine (ou rutoside) n'étant pas mentionnée dans la monographie, elle ne doit par conséquent pas être présente. La caractérisation et dosage des différents flavonoïdes était donc important à considérer au regard de la portée de l'étude.

Les profils ont été réalisés sur les teintures d'arnica (protocole ci-dessus). Les pics pris en compte sont ceux qui absorbent à 365 nm, ce qui élimine les lactones sesquiterpéniques et ne met en évidence que les flavonoïdes. Les pics de santonine et de BHT sont des étalons et ne sont pas pris en compte.

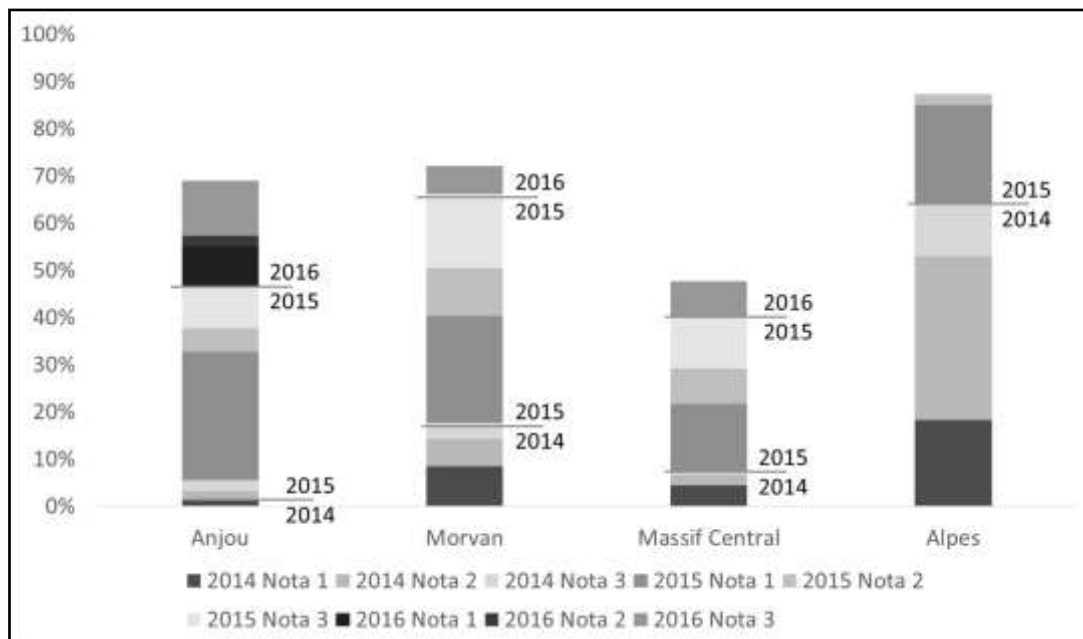
### 3. Résultats

#### 3.1 Évaluation morphologique et comportement agronomique

##### 3.1.1 Bilan de l'état sanitaire des populations : mortalité, maladie, influence des facteurs pédoclimatiques

- **Mortalité**

La mortalité mesurée sur les 4 sites durant l'essai est assez notable, sans être une surprise. Le graphique ci-dessous (Figure 1) illustre la mortalité cumulée des populations sauvages et des témoins sur les 4 sites de 2014 à 2016.



**Figure 1:** Pourcentage cumulé du taux de mortalité par site sur les trois années d'essai (source : données issues du projet).

Sur le site de basse altitude, en **Anjou**, la mortalité est très faible en première année de culture (2014) ; entre 2014 et 2015, la mortalité est croissante pour toutes les populations. À la fin de l'étude en 2016, toutes les populations originaires des Alpes et des Pyrénées ont des taux de mortalité très importants, supérieurs à 80%, tandis que les populations originaires d'altitudes plus basses (Vosges, Massif central et plaine) sont moins touchées avec un pourcentage de pied mort inférieur à 75%. Les populations d'altitudes inférieures à 880 m ont significativement été moins touchées par la mortalité que

les autres populations sauvages de l'essai ; en fin d'année 2016, leur mortalité n'excède pas 40%. Le témoin 'Arnimed' est de loin la population testée avec le taux de mortalité le plus faible, inférieur à 25%.

À 500 mètres d'altitude, dans le **Morvan**, la mortalité est assez faible en première année de culture. Malgré tout, trois populations (21, 18 et 5) ont un taux de mortalité supérieur à 40% et au contraire, de faibles taux de mortalité sont constatés pour les populations des Alpes de « basses altitudes » (< 2200m). En 2015, seconde année de culture, la mortalité augmente nettement pour l'ensemble des populations étudiées. Celle-ci est particulièrement marquée pour les accessions du massif des Alpes où les taux étaient de manière générale plus faibles en 2014. Ces pertes, inattendues dans un contexte favorable à l'espèce (le producteur cultive de l'arnica depuis de nombreuses années), peuvent être imputées à divers facteurs potentiels tels que la présence d'agents infectieux, la nature du sol de l'essai, la variabilité climatique, etc. Entre fin 2015 et fin 2016, l'augmentation des taux de mortalité est très faible, laissant supposer l'atteinte d'un état stationnaire. Concernant les témoins 'Arbo' et 'Arnimed', la mortalité est très faible en fin 2016 (< 40%). Ce résultat est particulièrement marqué pour 'Arnimed' où le taux de mortalité est inférieur à 20%. Fin 2016, les populations sauvages aux taux de mortalités les plus faibles sont la 32 et la 23 (< 50%), deux populations originaires des basses altitudes du Massif central (< 880m).

Dans le **Massif central**, à 900 m d'altitude, le taux de mortalité est faible à très faible pour toutes les populations testées à l'exception de la 14 qui atteint déjà 50% de mortalité. À l'image des résultats mesurés en Anjou et dans le Morvan, il y a également une forte mortalité entre fin 2014 et fin 2015. Les populations originaires de basses altitudes (Vosges et Massif central) présentent des résultats intéressants avec des taux de mortalité en fin 2016 étant inférieurs voire largement inférieurs à 50%. Fin juin 2016, c'est sur ce site que la mortalité est la plus faible par rapport aux sites d'étude situés en Anjou et dans le Morvan. Elle est inférieure de moitié à ces deux autres en médiane, et de 40% environ en moyenne. En revanche, son écart-type n'est pas significativement différent des deux autres sites (test de Bartlett, p-value = 0.402), l'hétérogénéité des taux de mortalité entre populations n'en est donc pas modifiée : ils ont des écarts relatifs entre eux aussi importants que sur les autres sites.

Enfin dans les **Alpes**, site d'expérimentation situé à plus haute altitude (1600m), les suivis se sont arrêtés prématurément fin 2015 en raison de la forte mortalité générale mesurée sur le site (>85%). Ce site ayant la totalité des prérequis attendus pour un bon développement de l'arnica, la responsabilité du producteur impliqué dans l'entretien du site d'essai ne peut pas être négligée.

De manière générale, la forte mortalité cumulée en fin 2015, et le problème de représentativité des populations testées que cela a engendré, a nécessité une adaptation du protocole de suivi pour la dernière année d'essai. Se reporter au § 1.1 du matériel et méthode pour prendre connaissance de la méthodologie de sélection.

#### ▪ **Maladies**

Sur l'ensemble des trois années d'études, un certain nombre de symptômes ont pu être observés : légère chlorose, nécrose foliaire, cœur rougeâtre, taches brunes. Les suivis réalisés durant les trois années d'essai n'ont pas permis de mettre en relation symptômes observés et mortalité. Le parasitage des individus par la mouche de l'arnica (*Tephritis arnicae*) a également pu être observé sur les sites du Massif central et des Alpes, sans pouvoir être corrélé avec les taux de mortalité constatés.

#### ▪ **Influence des facteurs pédoclimatiques**

L'étude couplée des symptômes/taux de mortalité avec les **caractéristiques pédoclimatiques** des sites d'essais nous permet, en lien avec la bibliographique (Bomme et Daniel, 1994) sur le sujet, de déduire qu'en termes de pH et de granulométrie, le site du Massif central s'impose comme le plus

adapté des quatre : c'est celui où les pourcentages de mortalité observés sont en effet les plus faibles sur la durée de l'essai. Les maladies observées dans le Morvan en deuxième notation de 2016 peuvent être reliées à la nature davantage argileuse du sol, qui favoriserait les attaques fongiques par temps humide. Le printemps très pluvieux de 2016 (247mm sur l'ensemble du mois de mai) est sans doute un facteur d'infection important.

L'étude de la variable « **type de rosette** » (**simple ou multiple**) confirme également l'hypothèse de l'importance des facteurs pédoclimatiques sur la rusticité, et donc l'état sanitaire, des individus. L'essai mené laisse à penser que la rosette simple se transforme presque toujours en multiple à mesure du développement du pied. Par ailleurs, il semblerait que plus l'altitude de mise en culture est élevée, plus le nombre de rosettes multiples est important et augmente vite. Toutefois, sur un même site, les résultats peuvent être très variables en fonction des populations. Néanmoins, les résultats obtenus supposent que la rapidité d'apparition de rosettes multiples caractérise les populations les plus vigoureuses et donc productives. Le lien entre type de rosette et productivité en capitules n'a pas été directement mesuré, mais le bon sens voudrait que le nombre de hampes fleuries soit directement lié au type de rosette. Certaines questions subsistent malgré tout : comment expliquer l'impact de l'altitude sur l'apparition des rosettes multiples ? Les plantes sont-elles plus vigoureuses en altitude ? Quels sont les facteurs environnementaux qui agissent ? Uniquement et spécifiquement le froid ?

### **3.1.2 Précocité et abondance de la floraison**

Sur les deux années étudiées (2015-2016), les populations implantées en Anjou sont celles qui fleurissent le moins en « pourcentage de pieds vivants fleuris ». En deuxième année de culture, la proportion de pieds fleuris sur ce site est de trois à quatre fois plus faible que dans le Morvan et dans le Massif central ; en troisième année de culture cette différence est très marquée : le facteur de multiplication passe en moyenne à 16. À noter qu'à basse altitude en Anjou, seules les trois populations de plus basses altitudes (de plaine et <1000m) ont fleuri ainsi que les deux variétés commerciales 'Arbo' et 'Arnimed'. Ceci suggère que les besoins en vernalisation varient d'une altitude d'origine à une autre, et que l'adaptation des populations originaires de moyenne montagne et de l'étage collinéen se traduit par des besoins en vernalisation réduits par rapport aux populations de montagne.

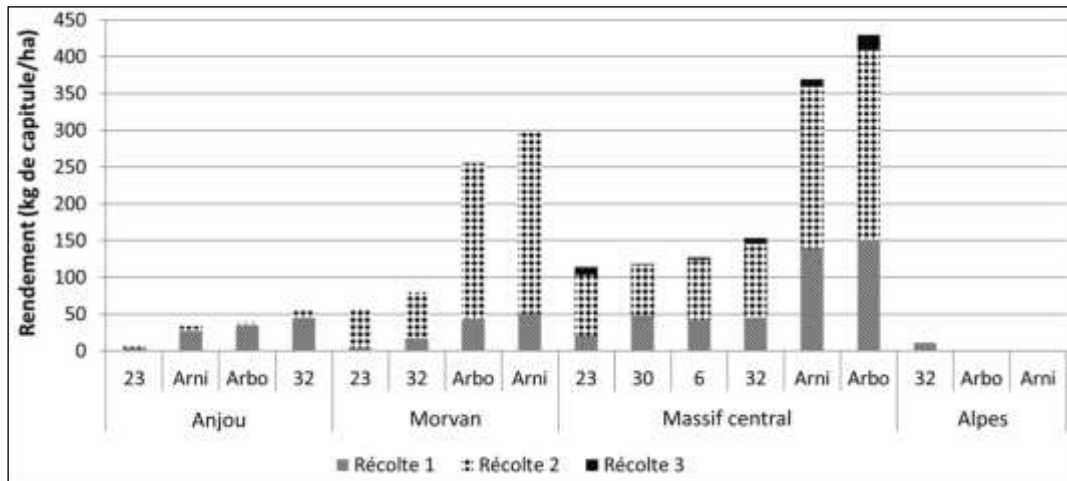
En 2016, les pourcentages de floraison des pieds d'arnica sont plus faibles qu'en 2015, sauf dans le Morvan où ils augmentent de 13%. Cette même année dans le Morvan, les populations d'origines alpines et pyrénéennes étaient plus précoces que les témoins. Dans le Massif central, les populations alpines étaient les plus précoces en 2015 et 2016.

Il est très intéressant de préciser ici que sur les sites du Morvan et du Massif central, là où la floraison a été la plus importante dans le cadre de ce projet, les variétés commerciales témoin, 'Arbo' et 'Arnimed' ont fait preuve de résultats remarquables (plus de 95% des pieds en fleurs) et homogènes sur les deux années de suivi, laissant suggérer la bonne compatibilité de ces variétés aux environnements pédoclimatiques des deux sites d'essai concernés.

### *3.2 Évaluation quantitative des rendements « capitule » et « plante entière fleurie »*

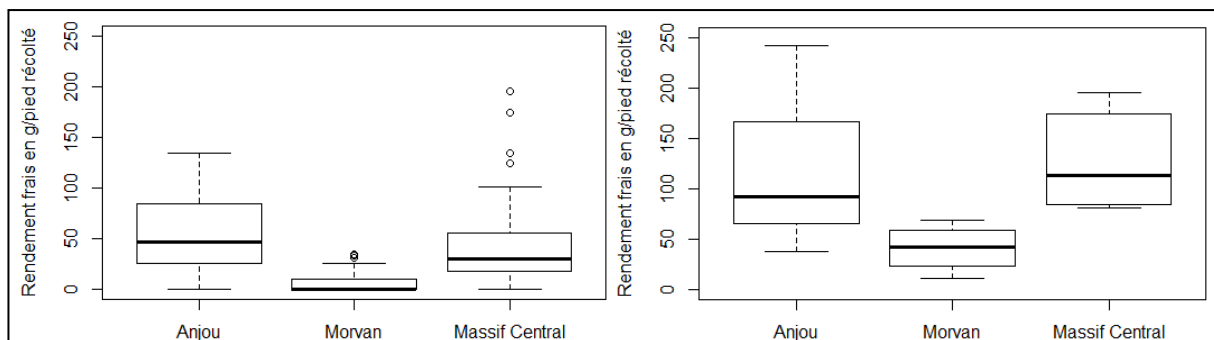
La Figure 2 présente les rendements en capitules obtenus en première année de floraison de la culture sur les témoins et les populations sauvages présentant les meilleurs rendements (toutes originaires du Massif central). C'est dans le Massif central que la culture d'arnica des montagnes semble la plus favorable. Les variétés commerciales 'Arbo' et 'Arnimed' sont les plus productives. La population sauvage 32, bien qu'ayant des rendements inférieurs aux deux témoins testés, reste plus productive que toutes les autres populations sauvages testées tous sites confondus. Les populations 23, 6 et 30,

toutes originaires du Massif central, présentent également des rendements intéressants quoique très inférieurs à ceux des témoins et plus faibles que ceux de la population 32. En Anjou, les rendements sont très faibles. Néanmoins, la population sauvage 32 a des rendements plus élevés que les deux populations commerciales actuellement sur le marché 'Arbo' et 'Arnimed'. Les rendements obtenus dans les Alpes sont exposés à titre informatif et ne seront pas discutés dans le détail, le très mauvais état sanitaire de la parcelle ayant fortement nui à la culture.



**Figure 2** : Présentation des rendements en capitules sec des populations aux meilleurs résultats en 1<sup>ère</sup> année de récolte (2015). Ce graphique permet une comparaison relative des populations, mais ne permet pas de tirer des enseignements absolus sur les rendements à l'hectare en sec (source : données issues du projet).

Comme présenté sur la Figure 3, les rendements en « plante entière fleurie » (PEF) sont également très différents selon les sites : ils sont proches de zéro et très peu dispersés dans le Morvan contrairement aux autres sites où l'étendue de la dispersion est deux à trois fois plus grande. Les témoins sont plus dispersés que les populations avec des valeurs de rendement plus élevées. Les populations originaires des moyennes altitudes du Massif central et des Vosges sont là encore celles qui présentent les meilleurs rendements parmi les populations sauvages. L'essai ayant dû être arrêté en 2016 sur le site des Alpes, l'évaluation des rendements en PEF n'a pas pu être réalisée.



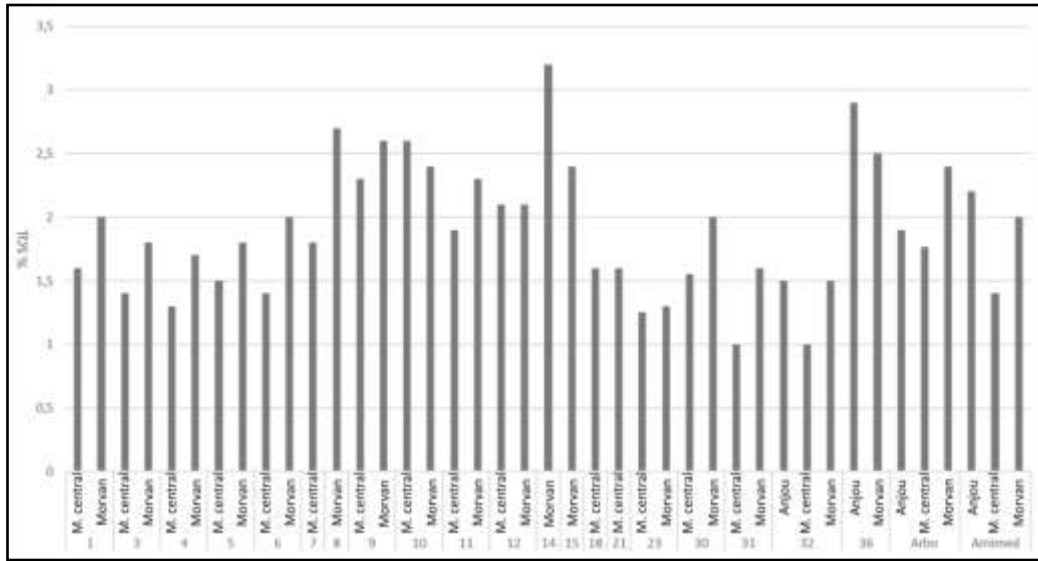
**Figure 3** : Comparaison de la distribution des rendements en plante entière fraîche des populations (à gauche) avec les témoins (à droite) entre les sites à la récolte 2016 (source : données issues du projet).

### 3.3 Phytochimie

#### 3.3.1 Dosage des lactones sesquiterpéniques (SQL) sur capitules

La méthode développée, réfléchi pour être plus rapide et efficace que celle proposée par la norme, s'avère pertinente pour comparer des échantillons entre eux mais surestime la valeur des SQL par rapport au dosage normalisé ; il n'est donc pas possible de comparer les résultats expérimentaux avec

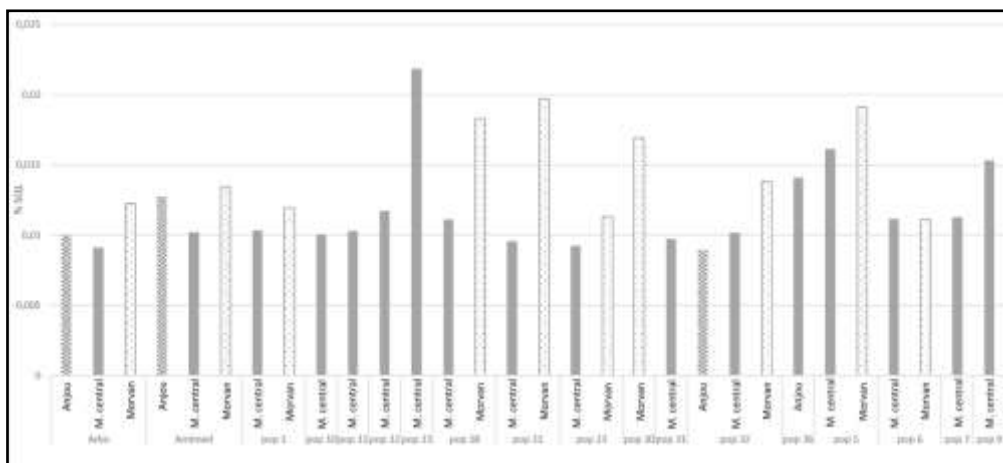
la norme. La Figure 4 présente les résultats obtenus sur les capitules récoltés en 2015. Il est à noter une forte hétérogénéité des résultats entre populations testées mais également entre sites pour une même population, à l'image des résultats obtenus pour les populations 30, 31, ou bien encore 32.



**Figure 4 :** Teneur en lactones sesquiterpéniques (SQL) dans les capitules d'*Arnica montana* (source : données issues du projet).

### 3.3.2 Dosage des lactones sesquiterpéniques (SQL) sur PEF

Les résultats (Figure 5) illustrent la forte diversité de teneur en SQL en fonction des populations mais également en fonction des sites de mise en culture. À titre d'exemple, les résultats obtenus pour la population 21 varient du simple au double entre les sites du Morvan et du Massif central. Ceci laisse supposer une possible variation dans la concentration des composés chimiques d'intérêt en fonction du lieu de mise en culture. Une étude plus complète serait pertinente à mener pour corroborer ces informations.



**Figure 5 :** Teneur en lactones sesquiterpéniques (SQL) sur teintures d'*Arnica montana* (source : données issues du projet).

### 3.3.3 Comparaison des profils en dérivés de l'hélénaline et de la dihydrohélénaline

Tous les échantillons analysés (profils GCMS) montrent que les dérivés de l'hélénaline sont dominants comparés aux dérivés de la dihydrohélénaline. Ceci est en accord avec la publication de Seemann et

al. (2010) qui ont étudié une dizaine de populations sauvages d'arnica en Allemagne aux côtés d'une variété cultivée (sans doute Arbo).

La population 36 est un peu plus riche en dérivés de la dihydrohélénaline que les autres, se rapprochant ainsi des concentrations observées chez un témoin espagnol de la sous-espèce atlantica.

### **3.3.4 Dosage des flavonoïdes**

Les profils ont été réalisés sur les teintures d'arnica. Les pics pris en compte sont ceux qui absorbent à 365 nm (ce qui élimine les lactones sesquiterpéniques et ne met en évidence que les flavonoïdes). Les pics de santonine et de BHT sont des étalons et ne sont pas pris en compte.

Seuls deux flavonoïdes sont identifiés : l'isoquercitroside et l'astragaline. Les autres ne le sont pas (produits de référence non disponibles) ; selon la littérature, il pourrait s'agir de génines de flavonoïdes, par exemple des dérivés méthoxylés de la scutellareine, de la lutéoline ou du kampférol.

Les résultats sont la somme de tous les pics de flavonoïdes, en faisant l'approximation qu'ils ont le même coefficient de réponse. Nous n'avons pas trouvé de rutine. Les résultats sont exprimés en ppm. Les valeurs varient entre 180 et 520 ppm pour les flavonoïdes totaux et entre 4 et 62 ppm pour l'isoquercitroside seule.

## **Conclusion**

Cet essai multipartenarial, multilocal et triennal a permis :

- Des **avancées sur la connaissance de la biologie** de l'arnica des montagnes (caractéristiques morphologiques).
- Des **avancées sur les méthodologies de dosages des sesquiterpènes lactones**. Cette nouvelle méthode a été proposée à la pharmacopée européenne (groupe 13A).
- Des **avancées sur les techniques culturales** (nature des sols, multiplication, aspects sanitaires, récoltes, rendements).
- Sans le solutionner toutefois, de **mettre l'accent sur un point de blocage déterminant** pour un réel développement de la culture : le dépérissement et la mortalité importante des pieds d'arnica en premières années de culture ainsi que la forte influence des facteurs pédoclimatiques (effet du froid sur la floraison).
- **L'évaluation multilocale de ressources génétiques françaises**, ainsi qu'une démonstration de la bonne adaptation des populations aux sites de mise en culture en fonction des origines géographiques (notable sur la mortalité et les rendements, moins sur l'état sanitaire).
- **L'émergence** d'un matériel végétal adapté à la production française (dans certaines zones). Les variétés commerciales testées Arbo et Arnimed ont en effet sur l'ensemble des variables étudiées, présentées des résultats homogènes et supérieurs aux populations sauvages. Ainsi, la mise en culture de l'espèce en France pourrait avoir lieu sur la base de ces variétés, sans qu'il soit indispensable dans un premier temps de développer une ou plusieurs variétés adaptées aux terroirs français.
- La **rencontre et la mise en partenariat** d'acteurs très divers de la filière PPAM (cueilleurs, producteurs, multiplicateurs, chercheurs, gestionnaires d'espaces, transformateurs...) et de différents horizons géographiques.
- La **formation** de plusieurs partenaires de la filière PPAM à ce type de recherche agronomique appliquée.

Durant ce programme, des « pieds élites » au sein des populations testées ont pu être identifiés, prélevé *in situ* et mis en conservation au CNPMAI sous forme de plants. Ce matériel végétal est mis à

disposition des professionnels de la filière pour toute thématique de valorisation future (sélection, renforcement de population sauvage, etc.).

La globalité des résultats obtenus, ne pouvait pas être présentée ici de manière exhaustive. Des articles plus spécifiques seront publiés ultérieurement. Pour tout complément d'information, il est possible de se référer au compte-rendu global du projet (CNPMAI, 2016) ou de contacter directement le CNPMAI.

En parallèle, l'intérêt porté sur cette thématique de mise en culture de l'Arnica n'a cessé de croître ces dernières années. Ainsi, suite aux travaux menés dans le cadre de ce CASDAR Innovations et Partenariats, le CNPMAI a été financé en 2017 par la Région Auvergne Rhône Alpes (AURA) pour développer la mise en culture de l'Arnica en région AURA. Un projet collaboratif d'expérimentation de mise en culture appliquée portant sur la période 2018-2020 a vu le jour fin 2017, dont le CNPMAI est chef de file. Il regroupe 7 producteurs, 4 organismes techniques et de développement, 3 organisations de producteurs et 5 entreprises utilisatrices, sur 5000 m<sup>2</sup> d'essai au total environ. L'objectif est d'aboutir à une fiche technico-économique simplifiée pour la culture de l'arnica en Agriculture Biologique en région AURA.

### Références bibliographiques

ANSM - Pharmacopée française, 2008. Monographie «ARNICA (PLANTE ENTIÈRE) POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES».

Bomme U., Daniel G., 1994. First results from selection breeding of Arnica montana L. Gartenbauwissenschaft, 59(2), 67-71.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 4ème éd. Ed. Tech& Doc Lavoisier, Paris.

Burfield T., 2010. Updated list of threatened aromatic plants used in the aroma & cosmetic industries. v 1.21.

CNPMAI, 2016. « Arnica Montana : évaluation des ressources génétiques françaises en vue du développement de la culture en plaine et en montagne. ». Compte-rendu final du projet, 2014 - AAP IP n°5304 / n°2101178629.

INPN - Inventaire National du Patrimoine Naturel [WWW Document], n.d. URL <https://inpn.mnhn.fr/accueil/index> (accessed 1.29.18).

Jager C., 2016. Suivi pluri-annuel (2009 – 2015) de l'Arnica et de l'état de conservation des hautes chaumes sur la zone conventionnée du Markstein Evaluation de l'impact de la cueillette et des pratiques agricoles. ESOPE Rapport final, octobre 2016, 130.

Pharmacopée européenne, 2008. Monographie «ARNICA (TEINTURE DE)» n° 01/2008:1809 CORRIG2 6.3

Pharmacopée européenne, 2012. Monographie «ARNICA (FLEUR D')» n° 01/2012 : 1391.

Seemann A., Wallner T., Poschlod P., Heilmann J., 2010. Variation of sesquiterpene lactone contents in different Arnica montana populations: influence of ecological parameters. PlantMed. 76(8), 837-842

Smallfield B.M., Douglas M.H., 2009. Arnica montana a grower's guide for commercial production in New Zealand. 19.

The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document], n.d. URL <http://www.iucnredlist.org/> (accessed 1.29.18).

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)