

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

Gourlin L.<sup>1</sup>

Avec la collaboration de Belenot D.<sup>2</sup>, 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 industrielle (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@cnpmmai.net](mailto:experimentation@cnpmmai.net)

## **Résumé :**

L'arnica des montagnes est une espèce médicinale importante dont la production est principalement issue de 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 a donc consisté à mettre en culture 24 populations d'origines sauvages (prospectées en France métropolitaine) comparée 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 nouvelles méthodologie d'évaluation développée. Les résultats mettent en exergue la forte variabilité de l'expression phénotypique et chimique de ces différentes accessions 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 parait 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

## **Introduction**

### **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 cueillette, du fait des difficultés rencontrées à la mise en culture et des possibilités d'exploitation de la ressource naturelle (plus gros 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 et de déprise agricole) (Jager, 2016).

De ce fait, l'Arnica est considéré dans de nombreux pays européens comme une plante menacée voire protégée. En France, l'Arnica est protégé dans les régions de plaine où il est présent et protégeable 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 UICN, actuellement considérée comme en « préoccupation mineure » (least concern), les effectifs des populations diminuent (*The IUCN Red List of Threatened Species*).

La France dispose encore de ressources naturelles qui autorisent une cueillette relativement volumineuse. Ainsi, 10 à 20 tonnes de plante entière fleurie fraîche et plusieurs tonnes de capitules secs sont récoltées 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 plante entière fleurie non 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'affaire 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 & Douglas, 2009), pourrait développer les cultures d'arnica. Elle dispose en effet de conditions propices à cette mise en culture : filière professionnelle, vastes et nombreuses zones de production compatibles, ressources génétiques. 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.

Cette production de sols pauvres peut également se présenter comme une opportunité pour le maintien d'une activité agricole en zone rurale défavorisée.

## **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 l'apport de nouvelles données culturales permettant d'affiner et d'adapter les itinéraires techniques de production existants. La réalisation de ces objectifs permettra de préserver les ressources naturelles d'Arnica des montagnes en diminuant fortement la pression de cueillette et 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 PPAM.

## 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 permis la fourniture du matériel végétal utilisé pendant l'essai (issus 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 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 ...).

L'ensemble des **organismes techniques** a permis l'apport de connaissances et compétences en matière de mise en œuvre et suivi sur le terrain d'expérimentation agronomique appliqué. En outre, l'**iteipmai** a 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 plants mis en culture, et permis l'apport de connaissances et compétences techniques de terrain sur la culture de l'Arnica des montagnes. Ils ont également facilité une meilleure perception par les organismes techniques des attentes et contraintes techniques rencontrées sur le terrain.

## Matériels et méthodes

### 1.1 Matériel végétal :

Le principal facteur étudié dans le cadre de cet essai est donc 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 (témoin) : '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 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   |
| 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              |              | 1260 m   | 90%                           | 2014-2015        |
| 12-arn-003     | Cantal - 15                  |              | 1380 m   | 59%                           | 2014-2015-2016   |
| 13-arn-031     | Corrèze - 19                 |              | 780 m    | 55%                           | 2014-2015-2016   |
| 90-arn-036     | Plaine                       |              | 130 m    | 74%                           | 2014-2015-2016   |

## 1.2 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 satisfaisant, corrélation entre zone géographique de prospection de la population testées et

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

résultats observés...). Le tableau 2 présente les caractéristiques géographique et pédologique des sites d'essai.

**Tableau 2 : caractéristiques géographique et pédologique des sites d'essai**

| Appellation<br>Carac. |                       | SARL<br>Jourd'hui<br>Anjou | EARL du Patuet<br>Morvan  | SICARAPPAM<br>Massif central | Ferme du Clot<br>Alpes                 |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|--|
| <b>Géographie</b>     | Région/département    | Pays de la Loire (49)      | Bourgogne (21)            | Auvergne (63)                | Provence Alpes<br>Côtes d'Azur<br>(05) |
|                       | Altitude (m)          | 60                         | 500                       | 900                          | 1600                                   |
| <b>Pédologie</b>      | Texture du sol        | Sableuse                   | Sable argilo-<br>limoneux | Limon-<br>sableux            | Limono-argilo-<br>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<br>éléments | N <sub>total</sub>         | 688                       | 2114                         | 3703                                   |
| Ca<br>(CaO)           |                       | 1083                       | 1412                      | 511                          | 3659                                   |

### 1.3 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 en 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.

### 1.4 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).

### 1.4.1 Evaluation 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 décrit + localisation. NB : pas d'inoculation ni de traitement réalisés   | 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        |      |

### 1.4.2 Evaluation quantitative des rendements en capitules et plante entière fleurie

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

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

Les analyses phytochimiques ont porté sur l'étude des SQL dans les capitules ainsi que 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 fleuries, 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.

#### **Etude 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. Par contre, il ne doit pas y avoir de rutine (ou rutoside).

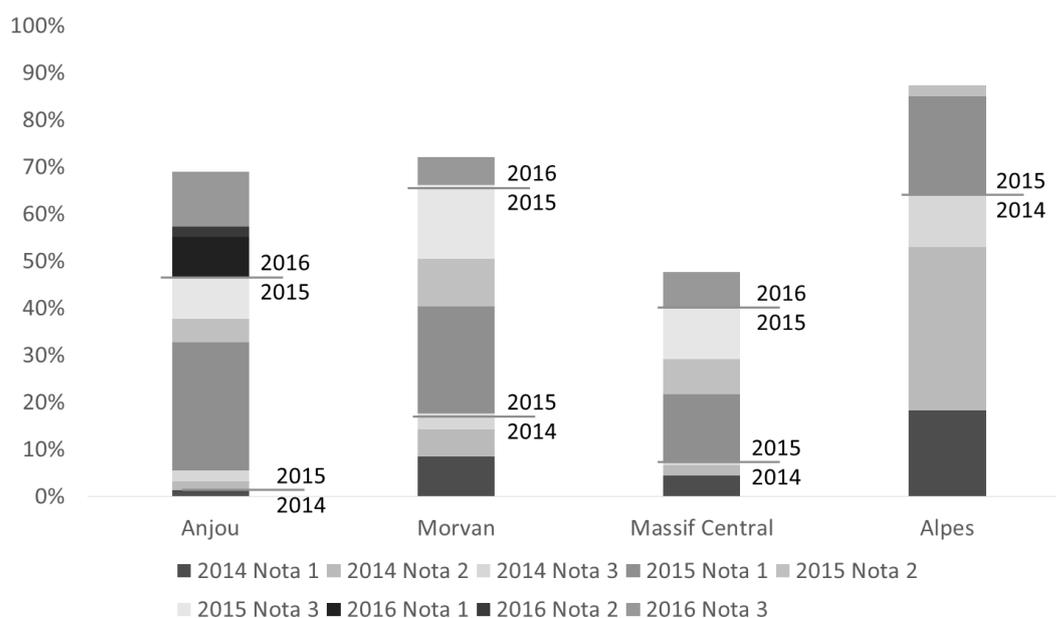
Les profils ont été réalisés sur les teintures d'arnica. Les pics pris en compte sont ceux qui absorbent à 365 nm (ce qui élimine les lactones sesquiterpéniques et ne met en évidence que les flavonoïdes). Les pics de santonine et de BHT sont des étalons et ne sont pas pris en compte.

## Résultats

### 1.1 Evaluation morphologique et comportement agronomique

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

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**

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.

A 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%, 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, celle-ci n'excède pas 40%. 'Arnimed' est de loin la population testée avec le taux de mortalité le plus faible, inférieur à 25%.

A 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 faible en 2014. Ces pertes, inattendues dans un contexte favorable à l'espèce (le producteur cultive de l'arnica depuis de nombreuses années), peuvent très bien être imputées à des agents infectieux, à la nature du sol de l'essai, ou tout autre paramètre non identifié. Entre fin 2015 et fin 2016, l'augmentation des taux de mortalité est très faible, ceci peut laisser 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 < 20%. Fin 2016, les populations sauvages aux taux de mortalités les plus faibles sont la 32 et la 23 (< 50%), deux populations originaires du Massif central (basses altitudes : < 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. A l'image des résultats mesurés en Anjou et dans le Morvan, il y a également une forte mortalité entre fin 2014 et fin 2015 dans le Massif central ; les populations originaires de basses altitudes (Vosges et Massif central) présentent des résultats intéressants à l'échelle de cette variable, les taux de mortalité en fin 2016 sont compris entre 10 et 50%. Fin juin 2016, c'est sur ce site que la mortalité est la plus faible par rapport aux 2 autres sites d'étude restants. Elle est inférieure de moitié des 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.

Dans les Alpes, site de haute altitude (1600m), les suivis se sont arrêtés prématurément fin 2015 en raison de la forte mortalité mesurée sur le site (>85%). Ce site ayant la totalité des prérequis attendus pour un bon développement de l'arnica, la part de 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.

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 symptôme observé et mortalité.

L'étude couplée des symptômes/taux de mortalité avec **les caractéristiques pédoclimatiques** des sites d'essais nous permet en lien avec la bibliographique (Bomme & Daniel, 1994) sur le sujet, de déduire qu'en termes de pH et de granulométrie, le site de Gelles s'impose comme le plus adapté des quatre : en effet c'est celui où les pourcentages de mortalité observés sont 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 argileuse du sol (concentration en argile plus importante que sur le site de Gelles restant tout de même assez faible (18%), qui favorise 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**) met en exergue que la rosette simple se développe en premier puis se transforme presque toujours en multiples avec le développement du pied. En outre, plus on monte en altitude de mise en culture (comparaison entre site), plus le nombre de rosettes multiples est élevé et apparaissent vite. Toutefois, sur un même site, les résultats peuvent être très variables en fonction des populations. Les résultats obtenus supposent que la rapidité d'apparition de rosette multiple caractérise les populations les plus vigoureuse et donc productive. Le lien entre type

de rosette et productivité en capitule n'a pas été directement mesuré. Le bon sens voudrait que le nombre de hampes fleuries soit directement lié au type de rosette toutefois ceci mériterait d'être confirmé. 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 ?

### *1.1.2 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. A noter qu'à basse altitude en Anjou, seule 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, les populations d'origines alpines et pyrénéennes étaient les 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 preuves 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.

## **1.2 Evaluation quantitative des rendements en capitules et plante entière fleurie**

La figure 2 présente les rendements en capitule obtenus en première année de floraison de la culture. C'est dans le Massif central à Gelles que la culture d'Arnica des montagnes semble la plus favorable. Les variétés commerciales 'Arbo' et 'Arnimed' sont les plus productives. Les populations sauvages 6 et 32, bien qu'ayant des rendements inférieurs aux deux témoins testés dans le Morvan, restent plus productives 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 nuit à la culture.

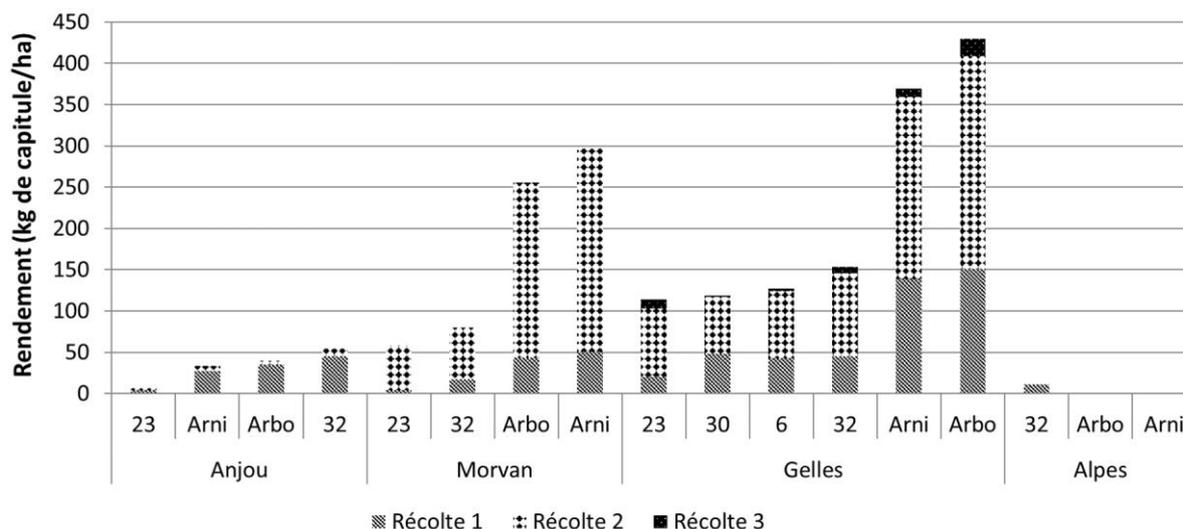


Figure 2 : présentation des rendements en capitules sec des populations aux meilleurs résultats en 1ere année de récolte (2015). Ce graphique permet une comparaison relative des populations, mais ne permet pas de tirer des enseignements absolus sur les rendements à l'hectare en sec.

### 1.3 Phytochimie

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

La méthode utilisée provoque une surestimation de la valeur des SQL, il n'est donc pas possible de comparer les résultats expérimentaux avec la norme. La figure 3 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.

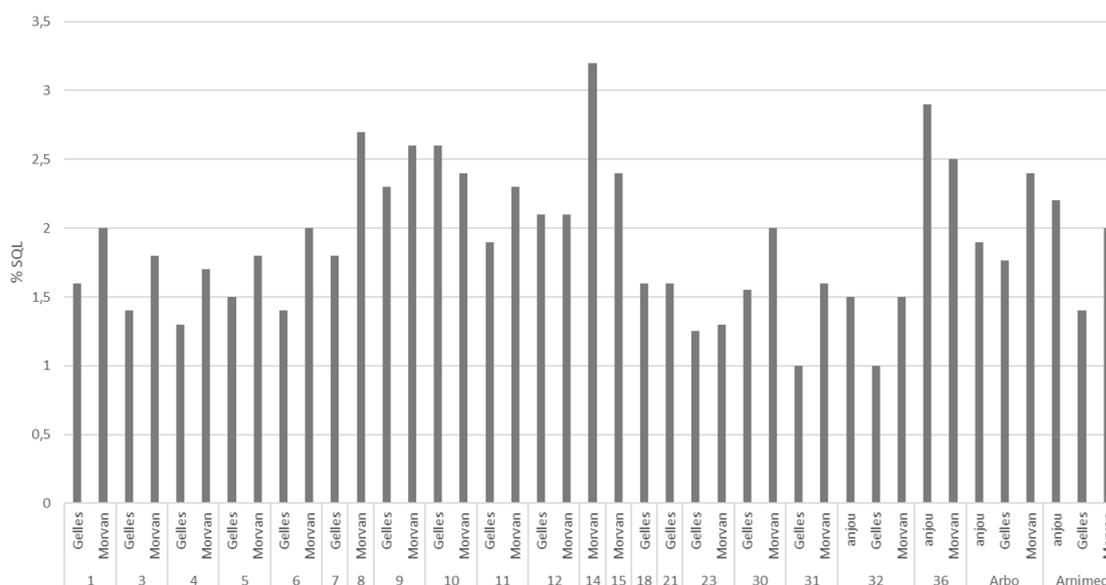


Figure 3 : Teneur en lactones sesquiterpéniques (SQL) dans les capitules d'*Arnica montana*

### 1.3.2 Dosage des lactones sesquiterpéniques (SQL) sur plante entière fleurie

Les résultats (figure 4) illustrent la forte diversité de teneur en SQL en fonction des populations mais également en fonction des sites de mise en culture. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour la population 21 varient du simple au double entre les sites du Morvan et d'Auvergne. Ceci laisse supposer une possible variation dans la concentration des composés chimiques d'intérêts en fonction du terroir de mise en culture. Une étude plus complète serait pertinente à mener pour corroborer ces informations.

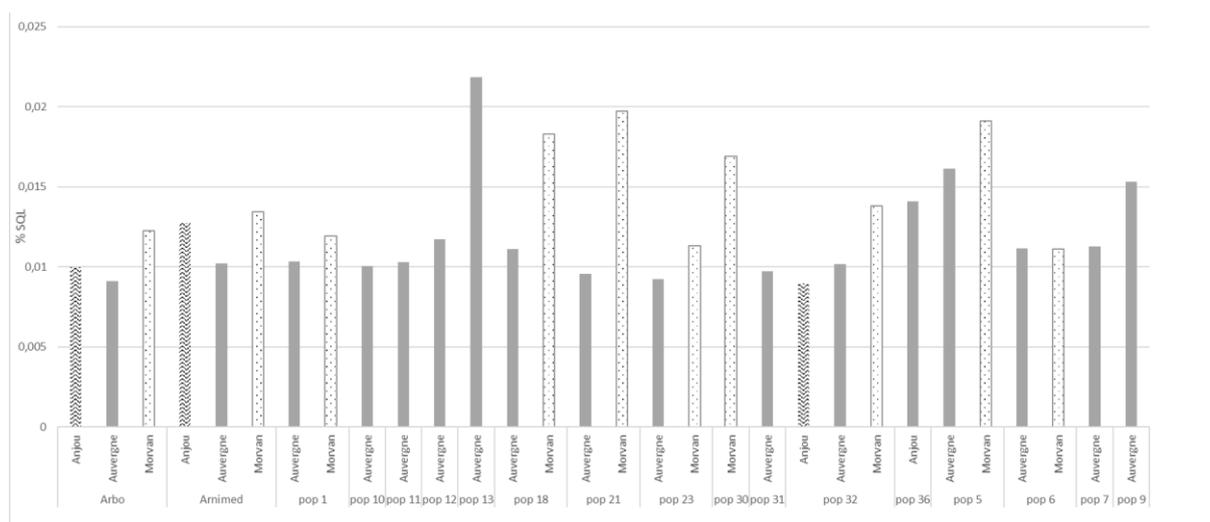


Figure 4 : Teneur en lactones sesquiterpéniques (SQL) sur teintures d'*Arnica montana*

### 1.3.3 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 38 est un peu plus riche en dérivés de la dihydrohélénaline que les autres.

### 1.3.4 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 sol, 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 génétique françaises**, ainsi qu'une démonstration de la bonne adaptation des populations aux sites de mise en culture en fonction des origines géographiques (notable sur 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, présenté 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 de des professionnel 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 prochainement. 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

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), p67-71.

Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 4ème édition. ed. Technique & Documentation 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. Planta Med. 76(8):837-42

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).