

Des produits de biocontrôle
à partir de coproduits végétaux

Le potentiel des sommités de **chanvre** et **silphie** en Wallonie

Résultats du projet ExtraWal

Avec le soutien
du Plan de Relance
de la Wallonie

valbiom

 CIRCULAR
WALLONIA


Wallonie
Relance

Au travers de l'Arrêté du Gouvernement wallon du 8 juin 2023 octroyant une subvention à l'asbl Valbiom dans le cadre de la mesure 9 relative à l'économie biosourcée de la stratégie Circular Wallonia, la Région wallonne confie à Valbiom la mission de soutenir le développement d'une filière extractible en Wallonie à travers la valorisation, par l'extraction, des molécules d'intérêt présentes dans les coproduits issus de différents secteurs.

Ce rapport constitue la version courte d'un rapport plus complet décrivant les activités et résultats obtenus durant le projet ExtraWal, dont la subvention couvre la période du 1^{er} juin 2023 au 31 août 2025.

La version complète du rapport peut être obtenue auprès de Valbiom.

Missions et rôles de Valbiom

Asbl fondée en 2002, Valbiom est aujourd'hui reconnue comme le centre de référence en économie biosourcée dont la mission est de faire émerger, promouvoir et pérenniser de nouvelles activités économiques en Wallonie, axées sur la valorisation non-alimentaire de la biomasse.

L'asbl peut compter sur une équipe de 15 employés experts dans les domaines de la bioingénierie, de la communication et du management, ainsi que sur un réseau de près de 200 membres.

Valbiom remplit trois rôles essentiels pour le déploiement de l'économie biosourcée en Wallonie : expert, facilitateur et ambassadeur.

Ses axes stratégiques sont les suivants :

- ➡ Insuffler et déployer de nouvelles filières.
- ➡ Accompagner et concrétiser les projets.
- ➡ Informer et sensibiliser.

Rédaction : William Donck, chef de projet Produits biosourcés, Valbiom

Ce rapport est structuré en 4 parties

Contexte

Partie 1

Résultats obtenus sur
les coproduits du **chanvre**

Partie 2

Résultats obtenus sur la **silphie**

Partie 3

Résultats complémentaires et
identification des **molécules**
porteuses d'activités biologiques

Partie 4

Afin de rendre la lecture de ce rapport fluide et agréable, les protocoles de laboratoire n'y sont pas décrits en détails. Ceux-ci peuvent être obtenus auprès de Valbiom, à la demande.

Ce rapport constitue le livrable principal du projet ExtraWal, qui s'inscrit dans la continuité des projets **ExtraHempWal** et **ExtraForWal**. Ces trois projets ont les objectifs généraux à moyen et à long terme suivants :

- Moyen terme (2024-2026) : **développer l'activité d'extraction**, éventuellement via une unité-pilote. Celle-ci serait adaptée à plusieurs types de coproduits issus de diverses industries telles que forestière et agricole.
- Long terme (2026-2032) : doter la Wallonie d'une **filière de l'extraction végétale** valorisant les produits et sous-produits issus des ressources biomasse wallonnes et de leur transformation, contribuant au maintien de la valeur ajoutée et de la compétitivité des acteurs sur le territoire wallon.

ExtraWal a pour objectif de **valoriser des coproduits à travers l'extraction de leurs molécules d'intérêts**. En effet, s'il s'avère que ces coproduits sont riches en certains types de molécules avec des propriétés exploitables, la valorisation de ces coproduits en serait fortement augmentée.

Si les deux projets précédents se focalisaient respectivement sur les sommités de chanvre et sur les écorces d'arbres, ExtraWal vise à **renforcer et à valider les résultats précédemment obtenus et à intégrer d'autres gisements d'intérêt pour la filière extractible, en l'occurrence les feuilles de chanvre et de la silphie**.

Dans la continuité d'ExtraForWal, Valbiom coordonne aujourd'hui un nouveau projet de plus grande envergure : **ExtraBark**. Ce projet, lancé en mars 2024 dans le cadre du programme Interreg Grand Région, s'étend sur trois ans et vise à évaluer le potentiel des écorces de 10 essences d'arbres dans la Grande Région (provinces de Liège et Luxembourg en Wallonie, Luxembourg, Région Grand-Est en France, et Saarland et Rheinland-Pfalz en Allemagne).

L'objectif d'ExtraBark est d'étudier les applications possibles pour la protection des plantes et du bois, en exploitant les propriétés naturelles de ces essences.

Sept partenaires belges, luxembourgeois et français travaillent conjointement pour élargir les connaissances et multiplier les applications possibles.

Les avancées d'ExtraBark peuvent être suivies régulièrement sur la page LinkedIn du projet, offrant une visibilité accrue aux résultats et encourageant les synergies transfrontalières.

Étant donné l'existence de ce projet ExtraBark, ExtraWal se positionne plus spécifiquement dans la continuité de ExtraHempWal.

Partie 1

Contexte

CONTEXTE

Ce rapport se concentre sur 3 coproduits provenant de filières étudiées par Valbiom :

- **Sommités de chanvre (filière chanvre textile)**
- **Feuilles de chanvre (filière chanvre graine)**
- **Silphie**

Depuis 2019, Valbiom mène des essais du champ au produit fini afin de développer la filière du chanvre textile fibres longues en Wallonie.

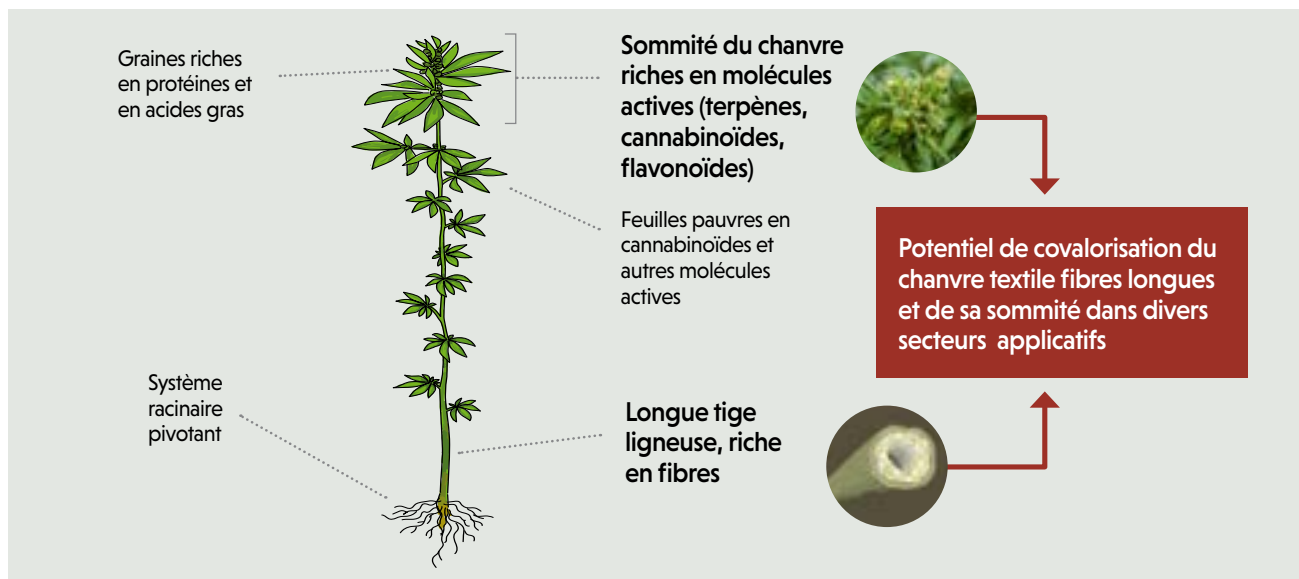
Le chanvre textile fibres longues se récolte aux environs de la période de floraison. Un des coproduits de ce chanvre sont les sommités, qui comprennent des fleurs et des feuilles.

Il est donc pertinent d'**étudier la co-valorisation des sommités du chanvre fibres longues afin de valoriser la plante entière au moment de la récolte.**

Étant donné que le moment de récolte du chanvre textile est encore relativement méconnu, cette étude analyse également **le moment idéal de coupe du chanvre textile fibres longues** en analysant la qualité des fibres avant floraison, à floraison et après floraison, via des coupes transversales des tiges.

Différents moments de récolte de sommités ont été analysés : avant floraison, en fleurs, et après floraison, en parallèle de ces analyses de tiges.

Figure 1: Covalorisation du chanvre textile fibres longues et des sommités (figure provenant de ExtraHempWal)



CONTEXTE

En parallèle de la filière chanvre textile, filière principale étudiée par Valbiom, le chanvre est également cultivé pour la **production de graines**. La récolte se fait plus tard dans la saison, et les machines agricoles actuelles permettent de séparer les graines des feuilles, qui représentent donc le coproduit principal de cette filière. Ce rapport **compare les concentrations en molécules d'intérêt ainsi que les activités biologiques des extraits de sommités de chanvre (filière textile) et des extraits de feuilles de chanvre (filière graine)**.

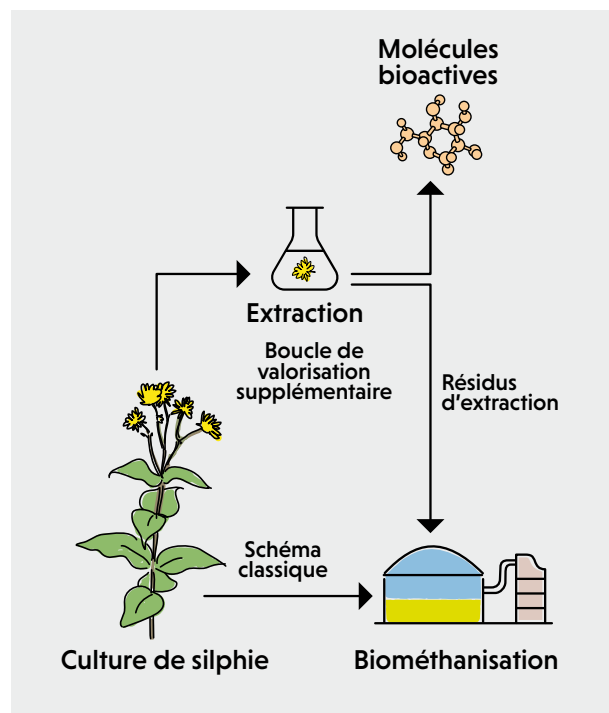
Concernant **la silphie**, Valbiom a commencé à s'intéresser à cette culture en 2020, en lien avec ses multiples usages possibles et ses externalités positives intéressantes.

En 2021, des discussions avec plusieurs partenaires (CIPF, Fourrage Mieux, Natagriwal, UCLouvain et La Roche Madoux) débouchent sur la création de L'Observatoire de la silphie. Ce projet, financé jusqu'en 2025, a pour objectif de suivre et analyser le développement de la silphie en Wallonie. L'accent est mis sur le conseil agronomique, l'évolution de la production de biomasse et de matière sèche à travers le temps, tant annuels que pendant la saison culturale. Différentes formations et points d'attentions sont également apportés aux agriculteurs désireux d'implanter ce type de culture pérenne. De la sensibilisation auprès des pouvoirs publics et des citoyens est également effectuée. En outre, les différentes méthodes de récolte et de mécanisation pour les opérations au champ sont étudiées. Les principales

valorisations considérées dans ce projet sont la biométhanisation et le fourrage.

Dans le cadre d'ExtraWal, la silphie est étudiée pour la **capacité de ses molécules bioactives à être extraites avant d'utiliser les résidus d'extraction en biométhanisation**. L'objectif est donc d'ajouter une boucle de valorisation à la silphie, et non pas de la détourner de son flux initial. C'est pourquoi l'impact de l'extraction sur le potentiel méthanogène sera également étudié dans le cadre de cette étude.

Figure 2 : Schéma de valorisation de la silphie



Partie 2

Résultats obtenus sur les coproduits de chanvre

CHANVRE

Analyse des tiges: fibres primaires et secondaires

La valorisation des coproduits du chanvre textile passe par une bonne compréhension du développement des fibres tout au long de la période de culture. L'objectif prioritaire de la culture du chanvre textile est d'**obtenir des fibres de la meilleure qualité possible**. Il est donc important de comprendre comment ces fibres évoluent au cours du temps afin de pouvoir ajuster le curseur pour obtenir les meilleures fibres, tout en obtenant le plus de molécules d'intérêt dans les sommités.

Ce travail d'analyse et de compréhension du développement des fibres a été réalisé en 2022, 2023 et 2024. Les résultats de 2022 sont présentés dans le rapport **ExtraHempWal**.

D'après la littérature et les centres de recherche spécialisés, les critères d'évaluation de la qualité des fibres sont les suivants:

- Un taux de remplissage important des fibres primaires (> 90%) permet de garantir la qualité des fibres longues.
- Une absence de développement de fibres secondaires serait un signe positif pour s'assurer de la qualité des fibres longues.

Ce postulat reste toutefois à confirmer par la recherche.

Comparaison des résultats de 2023 et 2024

Laboratoires impliqués

- Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W)

Département connaissance et valorisation des produits, Unité qualité et authentification des produits, Laboratoire de microscopie, A. Anselmo & P. Veys (analyses 2023)

- Université de Technologie Tarbes, Occitanie Pyrénées (analyses 2024)

Rappel concernant la terminologie utilisée

Dans le cadre de ce rapport, nous utilisons des termes spécifiques qui décrivent le stade de développement du chanvre.

Le point de référence, **T2**, correspond au stade de pleine floraison. Ce point peut donc être différent pour chaque variété, certaines étant précoces, d'autres plus tardives. À partir de ce moment de pleine floraison, **T-1** et **T1** correspondent à respectivement 20 et 10 jours avant floraison, et **T3** et **T4** à respectivement 10 et 20 jours après floraison.

T-1	T1	T2	T3	T4
20 JOURS AVANT FLORAISON	10 JOURS AVANT FLORAISON	PLEINE FLORAISON	10 JOURS APRÈS FLORAISON	20 JOURS APRÈS FLORAISON

CHANVRE

Méthodologie

L'essai chanvre textile fibres longues de 2023 a été mené sur une surface totale de 7 hectares, sur une parcelle d'un seul tenant, en agriculture biologique, à Awans.

Valbiom a semé 4 variétés différentes : Bialobrzeskie, Santhica 27, Tygra et Uso 31, puis a récolté les différents échantillons à divers moments : 20 jours avant floraison (T-1), 10 jours avant floraison (T1), à floraison (T2), 10 jours après floraison (T3) et 20 jours après la floraison (T4).

En 2024, l'essai a été mené sur une surface totale de 8 hectares, sur une parcelle conduite en agriculture conventionnelle située à Villers-le-Bouillet.

Les 4 mêmes variétés qu'en 2023 ont été semées, et des échantillons ont été collectés à 3 dates (15/07/24, 25/07/24, et 5/08/24) correspondant à des stades de développement allant de T-1 à T3 en fonction des variétés.

Une analyse de la variance a été réalisée en utilisant un modèle linéaire mixte avec comme facteurs fixes l'année, la variété et la date de prélèvement et comme facteur aléatoire la répétition.



La collecte de données (répartition des échantillons) n'étant pas similaires entre les années, l'analyse a dû se faire par variétés et dates de prélèvements.



Les protocoles de préparation des échantillons ne sont pas détaillés dans ce rapport, mais peuvent être obtenus sur demande auprès de Valbiom.

Résultats

Tableau 1.
Données de remplissage en fibres primaires et secondaires pour les différentes variétés
et dates de prélèvement en 2023 et 2024.

				Remplissage fibres primaires		Remplissage fibres secondaires	
				en %	Écart-type	en %	Écart-type
2023	Bialobrzeskie	18-07-23	T-1	69,9	0,8	0	0
	Uso 31		T1	70,0	3,5	0	0
	Tygra		T1	66,6	2,3	0	0
	Bialobrzeskie	27-07-23	T1	72,3	2,8	0	0
	Uso 31		T2	77,6	1,7	0	0
	Tygra		T2	73,3	4,4	0	0
	Bialobrzeskie	03-08-23	T2	77,2	1,7	2,4	3,3
	Uso 31		T3	76,7	2,8	5,8	5,9
	San27		T1	79,0	3,1	0	0
	Tygra		T3	75,8	5,8	8,4	6,6
	Bialobrzeskie	18-08-23	T3	80,2	3,6	6,5	9,2
	Uso 31		T4	79,6	2,6	5,7	8,0
2024	Bialobrzeskie	15-07-24	T-1	62,0	7,3	0	0
	Bialobrzeskie	25-07-24	T1	81,4	2,8	0	0
	Uso 31		T2	72,0	2,1	0	0
	San27		T-1	68,3	4,2	0	0
	Bialobrzeskie	05-08-24	T2	87,0	2,2	0	0
	Uso 31		T3	72,4	7,8	0	0
	San27		T1	84,5	7,6	0	0

CHANVRE

Effet de l'année

Afin d'observer cet effet, les dates du 18/07/23 & 15/07/24, 27/07/23 & 25/07/24 et du 03/08/23 & 05/08/23 ont été conservées car elles étaient les plus proches pour pouvoir comparer 2023 et 2024.

Pour la variété **Bialobrzeskie**, à la fin du mois de juillet et au début du mois d'août, on observe un **plus grand remplissage en fibres primaires des cellules en 2024** (p-value<0.001). Aucun effet significatif n'a été observé sur les autres variétés (Uso 31 et San27).

Concernant les **fibres secondaires**, celles-ci **n'ont pas été observées en 2024**, contrairement à 2023 où elles ont été **observées à partir du début du mois d'août**.

Effet de la date

En 2023, pour les variétés **Bialobrzeskie** et **Uso 31**, on observe un effet de la date (p-value<0.01) sur le remplissage en fibres primaires, **augmentant au cours du temps et passant de 70 à 80 % de la mi-juillet à la mi-août**. Bien qu'une augmentation en fibres secondaires soit observée avec le temps pour ces deux variétés, celle-ci n'est pas significative. Pour la variété **Tygra**, l'effet de la date de prélèvement n'a pas été significatif sur le pourcentage en fibres primaires et secondaires.

En 2024, pour la variété **Bialobrzeskie** l'effet de la date (p-value<0.001) a impacté le remplissage

des cellules en fibres primaires en passant de 62 à 87% de la mi-juillet au début du mois d'août. La variété San27 est passé d'un remplissage de 68 à 84 % en 10 jours mais l'effet n'est pas statistiquement significatif (i.e., ce qui peut être expliqué par des écart-types relativement importants). La variété Uso 31 avait, elle, un remplissage similaire entre ces deux dates. **L'augmentation en fibres primaires avec le temps semble donc plus rapide en 2024 qu'en 2023, tandis qu'aucune fibre secondaire n'a été observée en 2024.**

Effet de la variété

Pour les différentes dates de prélèvement, en 2023 et 2024, **aucune différence entre les variétés n'a été observée sur le remplissage en fibres primaires**, ce qui peut être expliqué par des écart-types importants.

L'effet variétal a également été observé aux différents stades de développement, afin de coller à la physiologie de la plante. En 2023, au temps de floraison T1, l'effet variétal est significatif (p-value<0.001) avec un taux de remplissage en fibres primaires plus faible pour Tygra et plus élevé pour San27, Bialobrzeskie et Uso 31 étant intermédiaires. Aucune différence n'est observée en T2 et T3. En 2024, un effet significatif est observé au temps de floraison T2 (p-value <0.001) avec un remplissage plus important pour Bialobrzeskie qu'Uso 31.

CHANVRE

Conclusions sur les fibres primaires et secondaires

En 2023, un pourcentage plus faible en fibres primaires a été observé pour la variété Bialo, tandis qu'en 2024 aucune fibre secondaire n'était présente dans aucune des variétés.

En 2023, la vitesse de remplissage des fibres primaires dans le temps était moins rapide qu'en 2024. Celles-ci ont augmenté de 10 % en un mois, tandis qu'en 2024 celles-ci ont augmenté de plus de 20 % en 10 jours.

Finalement, il est actuellement compliqué de tirer une conclusion sur l'effet variétal. Une légère tendance, à confirmer, serait que San27 et Bialobrzeskie aient un remplissage en fibres plus élevé que Tygra et Uso 31.

Les résultats obtenus par cette analyse de fibres par microscopie possèdent des **écart-types relativement importants** qui peuvent

être expliqués par un nombre d'échantillons relativement restreint. En effet, cette **méthode** est plutôt **onéreuse** et il n'a pas été possible d'analyser un grand nombre d'échantillons.

En outre, cette analyse peut être influencée par le **positionnement de la coupe dans la hauteur de la tige**, qui doit être similaire entre les prélèvements.

En 2023, les variétés ont seulement atteint une hauteur de 79 à 90cm tandis qu'en 2024, les hauteurs étaient de 87 à 137cm.

Il est possible que la morphologie de la plante, différente entre 2023 et 2024, ait influencé le contenu en fibres des coupes, qui étaient pourtant positionnées aux mêmes hauteurs.

CHANVRE

Extractions et teneurs en molécules d'intérêts

Laboratoire impliqué

Celabor, Centre de services scientifiques et techniques en Agro-alimentaire, Emballage, Environnement et Textile, Etienne Maron

Essais 2023

En 2023, 7 variétés de chanvre ont fait partie de l'essai, réparties sur 4 parcelles différentes.

- Felina et Ferimon à Louvain-la-Neuve
- Uso 31, Bialobrzeskie, Tygra et Santica 27 à Awans
- Felina, Ferimon, Futura 75, Bialobrzeskie, Tygra, Santhica 27 et Uso 31 à Chièvres

Méthodologie

Tous les échantillons de sommités ou de feuilles ont été séchés par Valbiom dans une étuve à 40°C pendant 48 heures, parfois plus si cela s'avérait nécessaire, avant de les fournir au Celabor.

Chaque échantillon est tout d'abord broyé sur un broyeur de laboratoire Retsch SM-300 équipé d'une grille avec des mailles à 1 mm. Ensuite l'extraction hydroalcoolique (éthanol 70 %) se fait selon un ratio solide/liquide de 1 pour 15. L'extraction dure 30 minutes, le solvant est ensuite évaporé et l'eau lyophilisée afin d'obtenir un extrait sec. Ces conditions furent déterminées lors de la campagne d'essais 2022 (voir rapport [ExtraHempWal](#)).

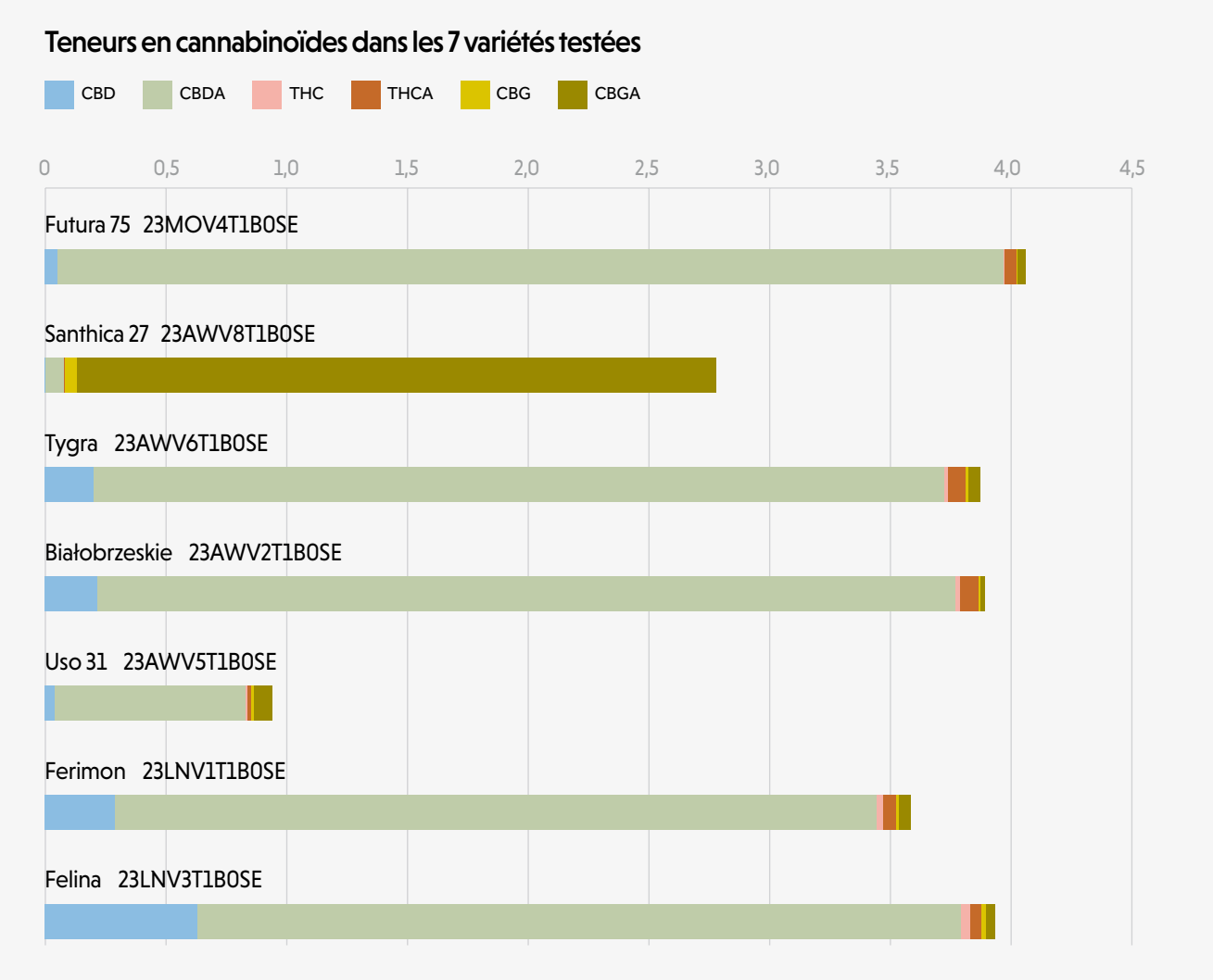
Les cannabinoïdes sont ensuite dosés par UPLC-DAD-MS, les polyphénols totaux sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, et la lutéoline-7-O-Glucuronide par UPLC-DAD-MS.

CHANVRE

Figure 3. Teneurs en cannabinoïdes dans les 7 variétés de chanvre testées en 2023

Résultats

Dosage des cannabinoïdes par UPLC-DAD-MS



CHANVRE

Le graphique de la Figure 3 compare les teneurs en cannabinoïdes des différentes variétés étudiées.

Les échantillons présentant les teneurs les plus élevées ont été sélectionnés pour réaliser ce graphique. Il apparait clairement que la **variété Uso 31 est la moins riche en CBD** puisque le dosage est plus de 3 fois moins important que dans toutes les autres variétés.

Santhica 27 confirme ses spécificités avec **une teneur en CBG très importante** et des concentrations très basses dans tous les autres marqueurs suivis.

Les autres variétés présentent des teneurs globales entre 3,5 et 4 % et des profils similaires. La Bialobrzeskie, pourtant variété à orientation textile, présente des teneurs comparables aux variétés à orientation CBD.

Les teneurs en THC restent sous les seuils légaux et ce sont les variétés Bialobrzeskie et Tygra qui présentent les taux les plus élevés et doivent donc être suivis avec plus d'attention.

Tableau 2.

Résultats des dosages de polyphénols par la méthode Folin (spectrophotométrie)

Dosage des polyphénols par la méthode Folin

ID Celabor	ID Valbiom	Variété	Folin (g EAG/kg MS)
ECH-202308019	23MOV4T2B0SE	Futura 75	28.26
ECH-202308018	23MOV4T1B0SE	Futura 75	27.26
ECH-202308006	23AWV6T2B0SE	Tygra	24.76
ECH-202307992	23LNV1T-1B0SE	Ferimon	24.31
ECH-202307987	23LNV3T-1B0SE	Felina	23.78
ECH-202308002	23AWV2T1B0SE	Białobrzeskie	23.69
ECH-202308005	23AWV6T1B0SE	Tygra	23.25
ECH-202307995	23LNV1T3B0SE	Ferimon	22.61
ECH-202308001	23AWV2T-1B0SE	Białobrzeskie	21.86
ECH-202307988	23LNV3T1B0SE	Felina	21.62
ECH-202307993	23LNV1T1B0SE	Ferimon	20.60
ECH-202307997	23AWV5T1B0SE	Uso 31	20.54
ECH-202307989	23LNV3T2B0SE	Felina	20.25
ECH-202308003	23AWV2T2B0SE	Białobrzeskie	19.84
ECH-202307998	23AWV5T2B0SE	Uso 31	19.59
ECH-202308007	23AWV6T3B0SE	Tygra	19.53
ECH-202307990	23LNV3T3B0SE	Felina	18.86
ECH-202307994	23LNV1T2B0SE	Ferimon	18.49
ECH-202308010	23AWV8T1B0SE	Santhica 27	16.31
ECH-202307999	23AWV5T3B0SE	Uso 31	15.62
ECH-202307991	23LNV3TGDCSG	Felina	7.38
ECH-202307996	23LNV1TGDCSG	Ferimon	6.39

CHANVRE

D'un point de vue variétal, les différences entre les chanvres ayant les meilleurs et les moins bons résultats au test Folin sont limitées.

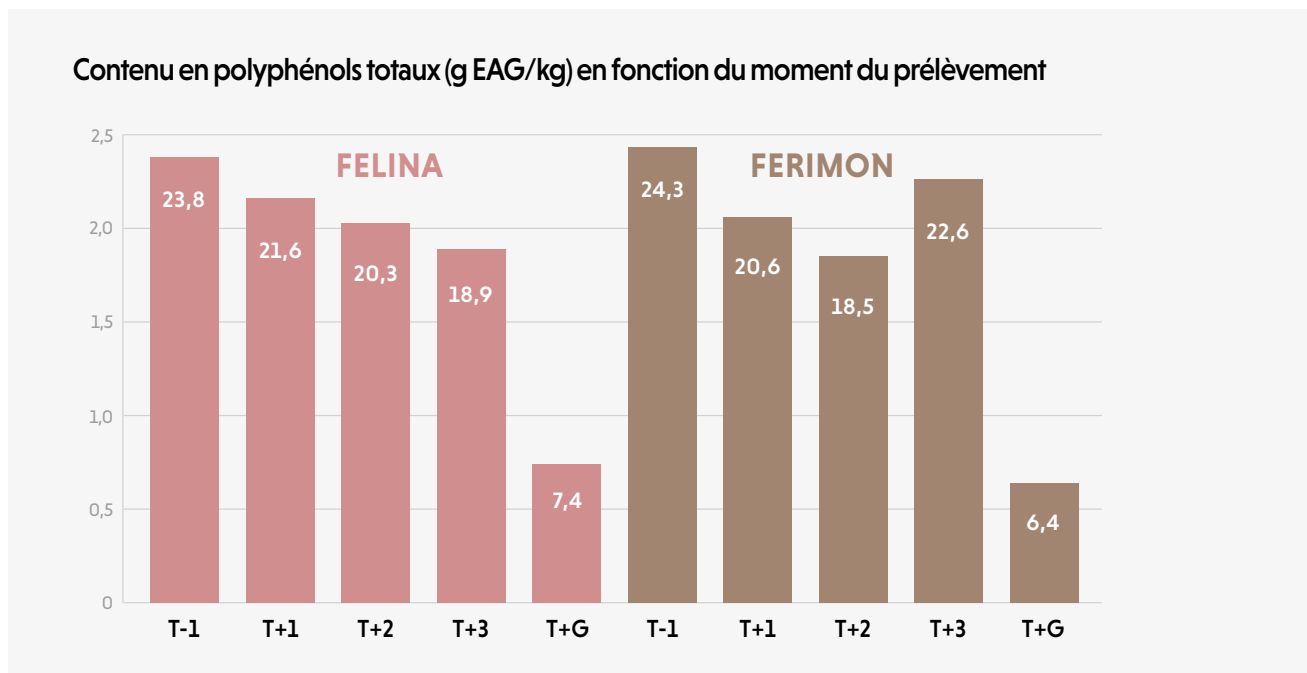
Toutefois, une tendance se dégage : **Futura 75** présente systématiquement les meilleurs résultats, indiquant une richesse élevée en polyphénols.

À l'inverse, **Santhica 27** obtient l'un des plus faibles scores, suggérant un potentiel moindre en polyphénols. Les deux analyses effectuées sur les feuilles de chanvre Felina et Ferimon sont bien inférieures (deux dernières lignes du tableau 2).

Cette différence est attribuée à une récolte tardive (octobre), période où les réserves en polyphénols semblent avoir diminué. Cette diminution souligne l'intérêt d'étudier l'évolution de la valeur Folin au fil du temps, sur des prélèvements d'une même variété cultivée au même endroit.

Les résultats pour **Felina** et **Ferimon** sont présentés dans la figure 4. Ce graphique confirme bien une tendance à la diminution de la quantité de polyphénols dans le chanvre avec le temps.

Figure 4. Évolution des teneurs polyphénols totaux au cours du temps pour Felina & Ferimon.

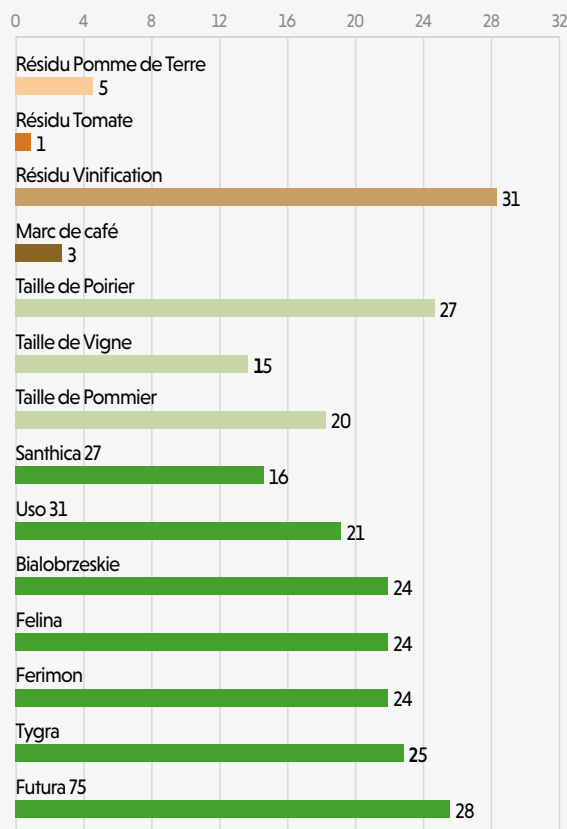


CHANVRE

La figure 5 reprend les teneurs en polyphénols Folin de plusieurs coproduits, dont le chanvre. Pour plusieurs de ces matières, la possibilité d'une voie de valorisation a déjà été étudiée et a débouché sur des résultats intéressants. **Le potentiel polyphénol dans le chanvre semble donc être intéressant.**

Figure 5. Comparaison de résultats Folin entre chanvres et d'autres matières

Comparaison des teneurs en polyphénols (g EAG/kg) dans le chanvre et d'autres coproduits

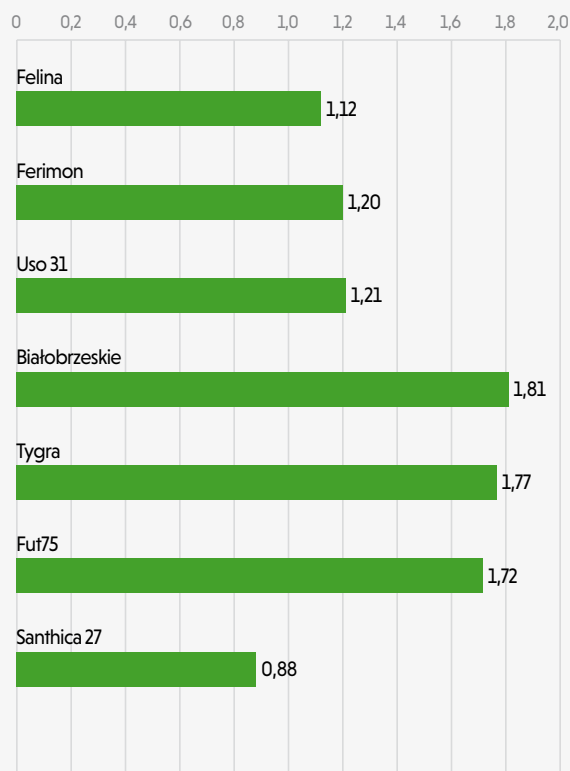


Dosage d'un polyphénol majoritaire par méthode UPLC-MS

Il est intéressant de pousser l'analyse plus loin en quantifiant le polyphénol spécifique du chanvre identifié lors de l'étude précédente : **la lutéoline-7-O-Glucuronide (L7G).**

Figure 6. Comparaison des teneurs en L7G dans les variétés testées.

Teneur en Lutéoline-7-O-Glucuronide (%)



CHANVRE

Les résultats des dosages Folin et L7G ne suivent pas nécessairement la même tendance. En effet, le test Folin est une méthode globale de dosage spectrophotométrique, plus spécifique aux polyphénols polaires tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes glycosylés.

En revanche, le dosage par chromatographie est spécifique aux molécules choisies, ne prenant en compte que les marqueurs suivis. Cependant, étant donné que la lutéoline-7-O-glucuronide est le polyphénol majeur dans le chanvre, une corrélation existe entre les deux résultats.

La figure 6 présente les résultats les plus élevés pour chaque variété de chanvre analysée. Les faibles teneurs en polyphénols de **Santhica 27** sont confirmées, tandis que **Futura 75** affiche de bons résultats, similaires à ceux des variétés **Tygra** et **Bialobrzeskie**.

La diminution des teneurs au cours du temps est moins marquée jusqu'à la mi-août, suggérant que certains polyphénols, comme ceux mesurés, sont plus stables que d'autres acides phénoliques, qui se dégradent probablement plus rapidement.

Outre l'analyse de la L7G, des dosages exploratoires ont révélé la présence de **vitexine** et d'**orientine** dans les extraits de chanvre, avec des teneurs d'environ 0,15 % pour l'orientine et 0,05 %

pour la vitexine. Si la valorisation des polyphénols se confirme, il serait pertinent d'explorer plus en détail les autres composés phénoliques présents dans le chanvre.

Afin de pouvoir réaliser des tests d'activité biologique, des extraits doivent être produits à l'échelle pilote. Les six extraits produits ont été réalisés sur les matières premières (voir tableau 3). Les extraits de Felina et Ferimon sont donc des extraits de feuilles de chanvre graine, tandis que les autres sont des extraits de sommités de chanvre textile.

Les conditions d'extraction avaient été déterminées en 2022. Un mélange éthanol/eau (70:30) a été utilisé avec un rapport de bain 1 pour 15 sur une masse de chanvre sèche comprise entre 600 et 1500 grammes en fonction de la disponibilité de la matière. L'extraction a été réalisée à température ambiante durant 30 minutes. Les résultats de ces extractions sont résumés dans le tableau suivant.

Ces six extraits ont été testés pour leurs **propriétés antifongiques** à l'automne 2024 par le laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de l'Université de Liège. Ces résultats sont présentés à la section « Activités biologiques », page 24. L'extrait de la variété Bialobrzeskie a dû être détruit en raison de sa concentration trop élevée en THC.



Les détails des résultats d'extraction peuvent être consulté à la demande auprès de Valbiom.

Tableau 3. Profil des 6 extraits 2023

Variété	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	Lutéoline-7-O-Glucoronide
Santhica 27	9,92	86	3,85
Uso 31	2,12	109	4,22
Ferimon	19,07	74	1,38
Felina	11,32	74	2,11
Tygra	8,19	116	3,81

Essais 2024

En 2024, les essais Valbiom ont concerné 4 variétés de chanvre, Tygra, Uso 31, Santhica 27 et Bialobrzeskie, sur une seule et même parcelle située à Villers-le-Bouillet.

Trois journées de récolte d'échantillons furent organisées. Le 15/07, le 25/07 et le 05/08.

Le 15 juillet et le 5 août, seules des sommités de la variété Bialobrzeskie furent récoltés. Le 25 juillet, des échantillons des 4 variétés furent prélevés.

Une fois séchés, les échantillons ont été envoyés au Celabor, en charge des caractérisations chimiques et des extractions.

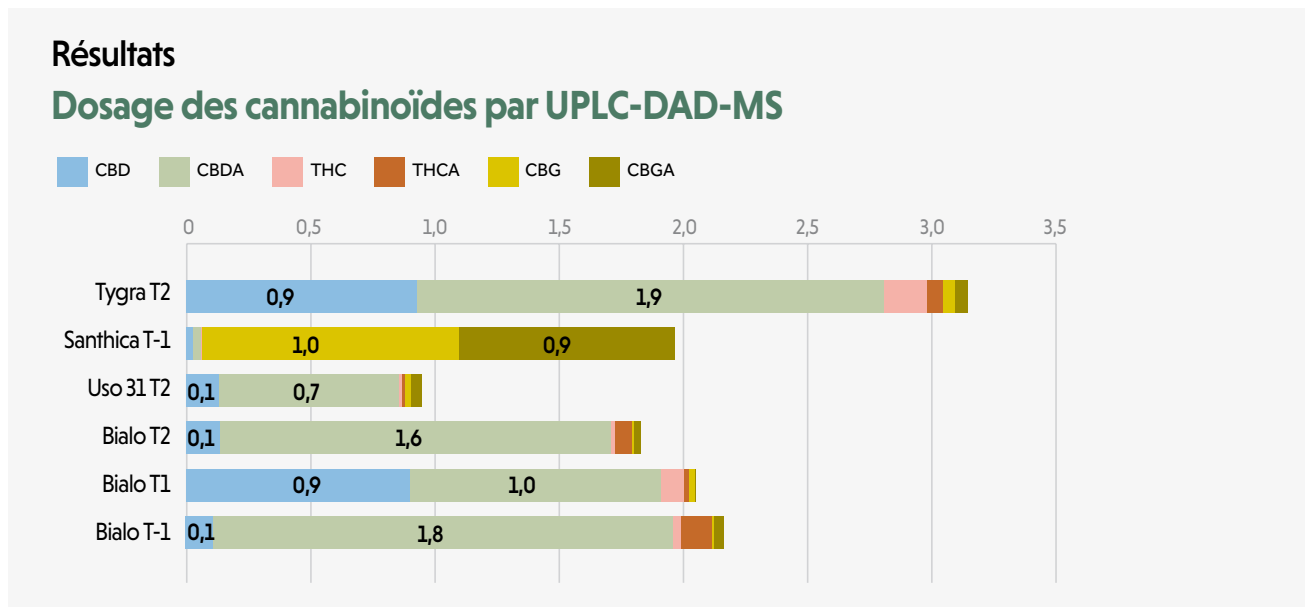
Méthodologie

Les méthodes de dosages ainsi que d'extractions sont similaires à celles utilisées dans la campagne d'essai 2023 (voir ci-dessus).

En ce qui concerne les terpènes (composés non-dosés en 2023), l'analyse est réalisée par injection en GC/MS en quantifiant à partir d'une courbe de standard externe préparée dans le même solvant que l'échantillon.

CHANVRE

Figure 7. Comparaison des teneurs en cannabinoïdes (%) dans les différentes variétés analysées en 2024.



La variété Uso 31 présente les teneurs les moins importantes en cannabinoïdes, aux alentours de 1 %. **Ces résultats sont très proches de ceux enregistrés en 2023, lesquels se situaient entre 0,5 et 1,2 %.** Notons que les concentrations en THC ne dépassent pas 0,03 %, loin de la teneur légale autorisée à 0,3 %.

La Santhica 27 possède elle aussi des teneurs relativement similaires (bien que légèrement inférieures) à celles observées en 2023. Un avantage de cette variété est qu'elle ne contient que des traces de THC, l'empêchant de dépasser les teneurs légales dans des extraits pour lesquels les concentrations en cannabinoïdes sont enrichies.

Les teneurs les plus élevées en cannabinoïdes sont observées pour la variété Tygra avec une concentration en CBD total de l'ordre de 3 %, proche mais légèrement inférieure aux résultats 2023. Le THC est cependant problématique pour cette variété avec une concentration proche de la teneur légale autorisée, ce qui rend compliqué la production d'un extrait de cette variété d'un point de vue légal.

La Bialobrzeskie a été dosée sur trois échantillons, récoltés à trois moments différents afin de contrôler l'évolution des teneurs en cannabinoïdes selon la période de récolte et donc de maturation des fleurs.

CHANVRE

Globalement, nous n’observons pas de différences significatives, hormis une légère diminution de la teneur en CBD dans le troisième point d’analyse. Par rapport à 2023, les concentrations semblent être légèrement plus faibles.

L’évolution du rapport entre les formes neutres et acides est en revanche étonnante avec un **rapport 50-50 entre les deux formes pour le CBD à T1 très différent des observations réalisées à T-1 et T2**. Cette différence est difficilement explicable mais elle est peut-être due à une variation climatique spécifique présente au moment de la récolte à T1. Ce rapport CBD/CBDA d’environ 50-50 n’était pas observé en 2023.

À nouveau, des teneurs en polyphénols totaux sont présentes dans le même ordre de grandeur que ce qui a été observé précédemment, avec des dosages légèrement plus élevés pour les variétés Bialobrzeskie et Tygra.

En revanche, **la comparaison des teneurs à différents moments de récolte montre une augmentation au cours du temps**, contrairement à ce qui a été observé en 2023. Ce paramètre est peut-être toutefois lié à des conditions climatiques ponctuelles comme une augmentation des températures ou de l’humidité plus qu’à un vieillissement de la plante au cours des semaines.

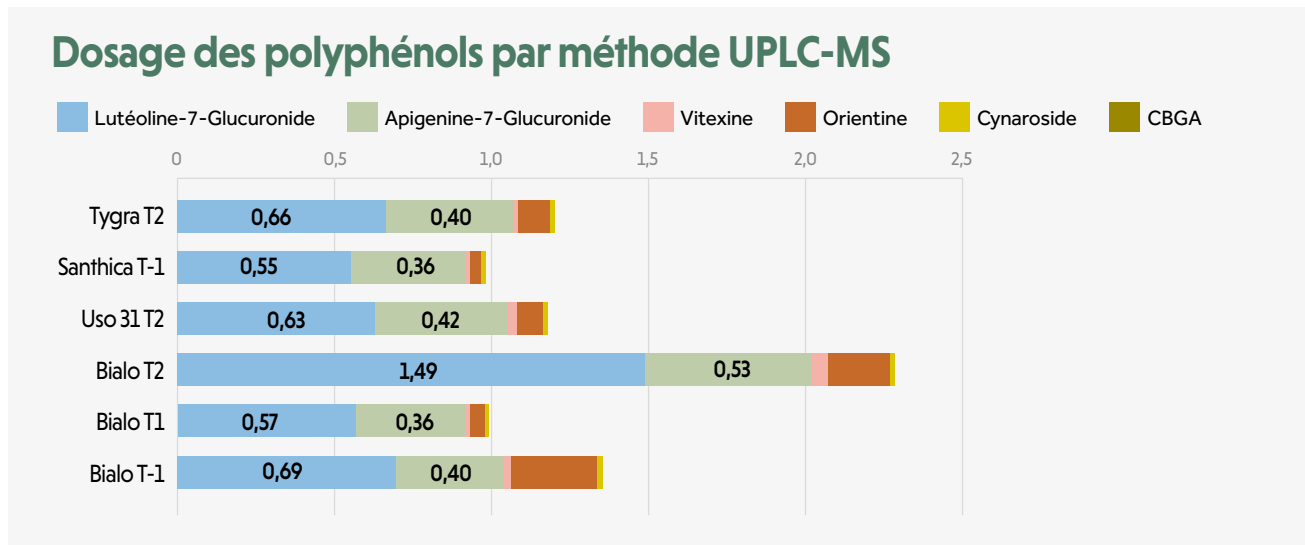
Dosage des polyphénols par la méthode Folin

Tableau 4.
Résultats des dosages de polyphénols par la méthode Folin (spectrophotométrie)

ID Celabor	ID Valbiom	Folin (g EAG/kg MS)
ECH-202405087	Bialobrzeskie T-1	22.32
ECH-202405088	Bialobrzeskie T1	21.16
ECH-202405089	Uso 31 T2	20.32
ECH-202405090	Santhica T-1	20.47
ECH-202405091	Tygra T2	22.58
ECH-202405092	Bialobrzeskie T2	24.85

CHANVRE

Figure 8. Comparaison des teneurs en polyphénols (%) dans les différentes variétés analysées.



Le polyphénol majoritaire pour chacune des variétés reste la **lutéoline-7-glucuronide**. Aucune variation significative n'est observée en fonction des variétés, à l'exception de la Bialobrzeskie à T2, où les teneurs y sont plus que doublées pour la lutéoline-7-glucuronide, par exemple. Ce résultat confirme la tendance dégagée par la mesure Folin.

Cela suggère que **la maturation des plantes pourrait favoriser l'accumulation de certains polyphénols ou indiquer que les conditions climatiques au moment de la récolte influent sur les quantités en polyphénols présents dans les plantes.**

Ces résultats semblent cohérents par rapport à ceux de 2023.

Notons toutefois qu'aucune trace de terpènes n'a pu être dosée dans les extraits. Cela semble logique au vu des étapes post-extraction. L'évaporation de l'éthanol puis surtout la lyophilisation de l'eau restante entraîne l'évaporation des composés volatils qui ne sont donc plus détectés.

L'extrait Tygra, dépassant la limite légale en termes de THC, a dû être détruit au laboratoire.



Les résultats de ces extractions ne seront pas détaillés dans ce rapport mais peuvent être obtenus auprès de Valbiom.

CHANVRE

Le tableau suivant reprend les teneurs en différents composés des 3 extraits qui ont été testés pour leur propriétés antimicrobiennes et insecticides à l'automne 2024.

Tableau 5. Profil des 3 extraits produits à l'échelle semi-pilote en 2024

Variété	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	Lutéoline-7-O-Glucoronide
Bialobrzeskie	4,16	59	2,44
Santhica 27	6,26	95	1,97
Uso 31	2,39	80	2,76

Activités biologiques

Laboratoires impliqués

- Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine l'Université de Liège (essais sur les extraits 2023 et 2024)
- Profilia (extraits 2024)

Une fois que les extraits ont été produits, il convient d'évaluer leur potentiel. Étant donné les résultats obtenus dans le projet ExtraHempWal, ce projet s'est concentré avant tout sur le potentiel en termes d'**activités antifongiques**.

Dans un premier temps, les résultats des essais réalisés par la Haute Ecole Provinciale de Hainaut-Condorcet en septembre 2023 sur des extraits de chanvre de l'été 2022 seront présentés.

Pour la première fois, ces extraits, qui avaient démontré leur potentiel suite aux tests in vitro, ont été testé sur plante entière (phytotrons).

Ensuite, place aux résultats des extraits de chanvre 2023. Ceux-ci ont été testés par le laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine l'Université de Liège selon une approche progressive allant du test in vitro aux essais en conditions contrôlées.

D'autres tests d'activités biologiques ont été réalisés sur les extraits 2024, et les résultats sont présentés dans la partie 4 de ce rapport.

CHANVRE

La start-up française **Profilia** a été en charge de réaliser ces essais, avec une méthodologie innovante. Une première méthode prédictive est appliquée afin d'estimer le potentiel des fonctions antimicrobiennes, antioxydantes et insecticides.

Ensuite, sur base de ces prédictions, les meilleurs extraits sont testés en conditions in vitro.

Pour finir, un fractionnement des extraits est réalisé afin de tenter d'identifier les fractions actives. Ces extraits ont également été utilisés par ULiège pour quelques tests in vitro.

Tableau 6. **Résumé de l'ensemble des tests d'activités biologiques réalisés.**

	Extraits	Essais	Laboratoire
2022	VB26 (Bialobrzeskie)	Phytotrons	Condorcet
	VB32 (Uso 31)	Phytotrons	Condorcet
2023	23LNV3TGDCSG (Felina)	In vitro → phytotrons	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	23LNV1TGDCSG (Ferimon)	In vitro → phytotrons	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	23AWV5T1B0SE (Uso 31)	In vitro → phytotrons	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	23AWV6T2B0SE (Tygra)	In vitro → phytotrons	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	23AWV8T2B0SE (Santhica)	In vitro → phytotrons	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	5 fractions purifiées de 23AWV5T2B0SE	Bioshift	Profilia
2024	Bialobrzeskie T1	In vitro	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	Bialobrzeskie T1	Bioshift + in vivo + fractionnement	Profilia
	Uso 31 T2	In vitro	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	Uso 31 T2	Bioshift + in vivo + fractionnement	Profilia
	Santhica T-1	In vitro	Université Liège (Gembloux AgroBioTech)
	Santhica T-1	Bioshift + in vivo + fractionnement	Profilia

CHANVRE

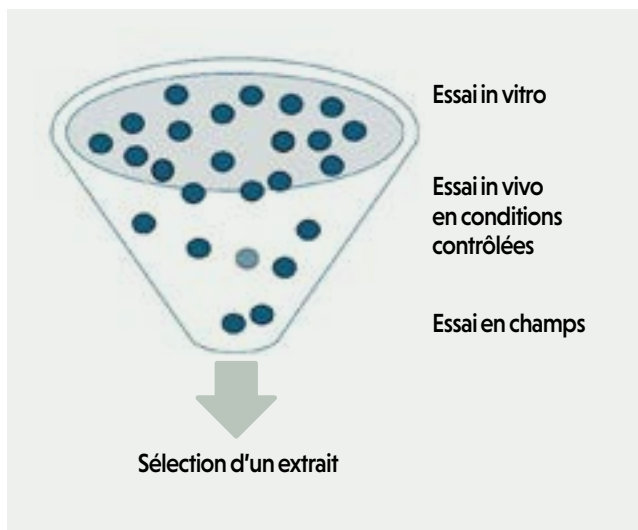
Efficacité des extraits de chanvre 2023 sur l'inhibition du pouvoir pathogène de *P. infestans*: approche en entonnoir

Étant donné les résultats obtenus dans la section précédente, l'objectif de ces essais, menés par le laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de l'Université de Liège, est d'intégrer un premier essai de formulation dans les extraits afin d'étudier l'impact de cette étape supplémentaire sur l'efficacité des extraits sur les plants de tomates.

La méthode choisie se base sur une approche en entonnoir, pour évaluer l'efficacité des extraits végétaux en tant que solutions naturelles pour la protection des cultures (Figure 9). Cette méthode, structurée en plusieurs étapes successives, permet de cribler les extraits les plus prometteurs tout en limitant les risques et en optimisant les ressources.

Figure 9.

Méthodologie de l'entonnoir appliquée pour les tests sur les extraits 2023



CHANVRE

Méthodologie de l'entonnoir

Étape 1 : tests in vitro

Les tests in vitro sont réalisés dans des conditions strictement contrôlées en laboratoire. Cette phase permet d'évaluer rapidement une large gamme d'extraits pour leur activité biologique contre des cibles spécifiques, telles que des pathogènes, des ravageurs ou des mécanismes physiologiques. L'environnement simplifié exclut les interactions environnementales et permet de sélectionner les extraits les plus prometteurs.

Étape 2 : évaluation de la phytotoxicité

Les extraits retenus sont soumis à des tests de phytotoxicité afin de vérifier leur innocuité pour les plantes cibles. Ces tests, également réalisés dans des conditions contrôlées, permettent d'éliminer les composés susceptibles de causer des dommages ou de perturber la croissance des cultures.

Étape 3 : tests in vivo sur feuilles détachées

Les extraits sont appliqués sur des feuilles détachées pour simuler leur efficacité dans des conditions proches de la réalité. Ce système intermédiaire permet d'observer les interactions entre les extraits et les tissus végétaux tout en restant dans un cadre expérimental maîtrisé.

Étape 4 : tests en conditions contrôlées

L'efficacité des extraits les plus prometteurs est validée lors d'essais en chambre de culture, des environnements semi-contrôlés qui reproduisent les conditions naturelles. Ces essais permettent d'évaluer leur efficacité sur des plantes entières, dans des conditions où les facteurs environnementaux tels que la lumière, la température et l'humidité jouent un rôle crucial. Les résultats obtenus fournissent une base solide pour des validations futures en plein champ.

Étape 5 : optimisation de la formulation

Avant les essais en plein champ, il est nécessaire d'optimiser les formulations des extraits pour maximiser leur stabilité et leur efficacité face à des conditions naturelles souvent imprévisibles, comme les variations climatiques ou les interactions avec les micro-organismes du sol.

Cette approche progressive et méthodique garantit une sélection rigoureuse des extraits les plus efficaces tout en limitant les risques économiques et environnementaux. La méthode en entonnoir suit ainsi une démarche scientifique et responsable, soutenant le développement de biopesticides naturels à la fois efficaces et sûrs.

CHANVRE

Matériels et méthodes

Extraits de chanvre

Six extraits de chanvre de 2023, trois de 2024, et le solvant Sovinol (S500 75 % - A800 25 %, Minagro) ont été fournis par Valbiom pour les différents tests.

Le tableau ci-dessous expose les abréviations utilisées. À ces abréviations, des suffixes ont été utilisés pour indiquer la concentration testée.

Les extraits de chanvre sont mis en solution dans de l'eau distillée stérile par agitation en conditions stériles pendant 1 à 3 heures en fonction de la solubilité de l'extrait.

Pour certains tests, un solvant a été ajouté.

Tableau 7. **Tableau synthétique des abréviations utilisées pour le rapport.**

Extraits 2023	Extraits 2024	Suffixes (Concentrations)	Autres abbr.
U = Uso 31	U = Uso 31	1 = 2,5 g/l	SOL = Solvant Sovinol
S = Santhica	S = Santhica	2 = 5 g/l	T- = Témoin/blanco
T = Tygra	B = Bialobrzeskie	3 = 7,5 g/l	
FL = Felina		4 = 10 g/l	
FR = Ferimon		5 = 25 g/l	
UP = Uso purifié			

CHANVRE

Agent pathogène

L'agent pathogène *Phytophthora infestans* souche 22-015 (accession du CRA-W) est cultivé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu RA (Rye Agar). La souche est réactivée par repiquage à partir de la collection, puis incubée à 18°C dans l'obscurité pendant 7 jours.

Un deuxième repiquage est effectué, suivi d'une incubation de 7 à 14 jours, selon l'objectif. Une incubation de 14 jours est nécessaire pour la production de sporanges, qui sont ensuite récoltés dans de l'eau distillée stérile avec 0,025% de Tween 80.

La concentration en sporanges est évaluée et ajustée par comptage sur hémocytomètre.

La plante hôte

Pour les tests de phytotoxicité ou impliquant une plante hôte pour *P. infestans*, des plants de tomate de la variété Money Maker ont été utilisés.

Les graines ont été semées en barquettes, puis repiquées individuellement dans des pots de 10 cm après 12 jours. La culture s'est déroulée sous serre chauffée à 30°C.

Résultats et discussion

Les résultats des tests font l'objet d'une étude statistique. L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour étudier l'effet des traitements sur la variable quantitative, en fonction de la variable qualitative (traitement).

Si l'ANOVA révèle une différence significative entre les traitements, un test de comparaison des moyennes de Tukey est effectué pour identifier les traitements qui diffèrent significativement des autres.

CHANVRE

Étape 1: test in vitro de diffusion sur disques

Ce test vise à évaluer l'efficacité des extraits de chanvre pour inhiber ou ralentir la croissance d'un pathogène fongique via la méthode de diffusion sur disques. Des disques imprégnés de l'extrait sont placés sur un milieu de culture solide, permettant la diffusion des molécules actives. Si le pathogène est sensible, une zone d'inhibition, sans croissance, se forme autour du disque.

La taille de cette zone reflète l'efficacité de la substance active et permet de comparer différentes concentrations ou formulations.

L'effet de cinq extraits de chanvre de 2023 et d'un solvant à 0,5 % sur le développement mycélien de *P. infestans* a été évalué in vitro. Trois concentrations du biocontrôle (2,5 - 5 et 7,5 g/l) ont été testées.

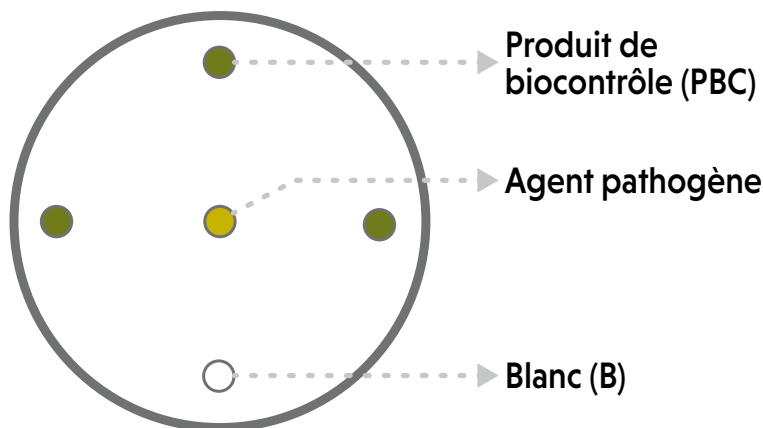
Des pastilles de filtre Whatman stériles sont placées aux quatre coins de chaque boîte de Pétri.

Cinq microlitres de produit sont appliqués sur trois pastilles, et de l'eau distillée stérile sur la quatrième, servant de contrôle. Un écusson de *P. infestans* (4 mm) est placé au centre de chaque boîte. Les boîtes sont incubées à 23°C pendant 5 à 7 jours, avec trois répétitions par concentration.

Après incubation, le rayon de croissance mycélien est mesuré dans les quatre directions correspondant aux pastilles. Le taux d'inhibition (Ti) de la croissance mycélienne est calculé avec l'équation suivante: $Ti = (RB - RPBC) / RB$, où RB est le rayon mycélien vers le témoin, et RPBC vers le produit de biocontrôle. Chaque boîte fournit trois taux d'inhibition relatifs au témoin.

Figure 10.

Schéma expérimental de répartition des modalités dans un test de diffusion sur disques.



CHANVRE

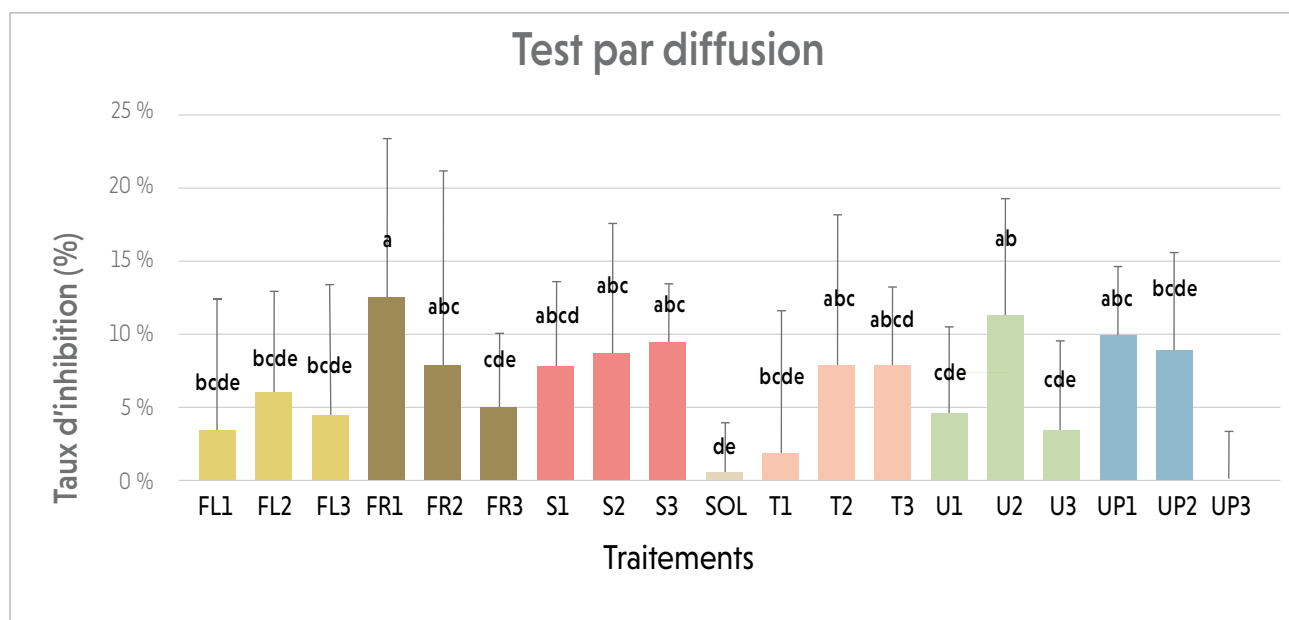
Parmi les extraits et concentrations testés, sept traitements (T2, FR2, S2, S3, UP1, U2, FR1) ont réduit de manière significative la croissance de *P. infestans*, avec des taux d'inhibition variant de 9,5 % à 12,6 % (figure 11).

Il est à noter que les concentrations les plus élevées ne sont pas toujours les plus efficaces.

Les extraits Ferimon possèdent les concentrations les plus élevées au CBD, due à des % de récupération meilleurs. À l'inverse, l'extrait Uso2, qui performe également relativement bien, possède la concentration la plus faible en CBD. Difficile à ce stade d'établir une corrélation entre ces deux paramètres.

Figure 11.

Taux d'inhibition moyen de *P. infestans* en fonction du traitement testé par la méthode de diffusion sur disques.
Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux.
Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne



CHANVRE

Ces résultats, bien que montrant un certain potentiel des extraits de chanvre, ne semblent pas aussi prometteurs que ceux obtenus dans ExtraHempWal. Pour rappel, les 4 extraits avaient alors montré une inhibition proche de 100 % à la concentration de 5g/L.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences :

1. La fraîcheur des extraits (hypothèse difficile à valider car il faudrait pour cela que des mêmes extraits soient testés avec quelques mois d'écart, ce qui n'a pas été possible).
2. La vigueur du pathogène utilisé (hypothèse également difficile à valider à ce stade du projet).
3. La composition chimique des extraits.
4. La méthode utilisée pour les tests antifongiques.

Pour valider l'hypothèse n°3, il faudrait pouvoir comparer deux tests antifongiques réalisés avec la même méthode mais des extraits de composition différentes. Or les extraits 2022 (Condorcet) et 2023 (ULiège), ont été testés avec des méthodes différentes. En effet, l'Université de Liège a utilisé des tests de type « diffusion sur disques », tandis que le Condorcet a utilisé des tests de type « poisoning agar » (méthode de dilution). Dans ce dernier cas, l'extrait est ajouté

à la totalité du milieu, puis autoclavé à 121°C. La méthode par dilution sert notamment à déterminer la concentration minimale inhibitrice. En revanche, dans la méthode « diffusion sur disques », des gouttes sont déposées sur le milieu, et la concentration diminue à mesure que l'on s'éloigne des gouttes, permettant ainsi d'évaluer l'effet antifongique.

Essais complémentaires à l'étape 1

Pour comprendre l'impact de la méthode utilisée et de la composition des extraits, de nouveaux essais in vitro ont été réalisés, cette fois-ci avec les extraits de chanvre 2024, et selon les deux méthodes précédemment utilisées. Les variétés de chanvre testées en 2024 sont Uso 31, Santhica 27 et Bialobrzeskie. Trois concentrations du produit de biocontrôle (2,5 - 5 et 7,5 g/l) ont été testées.

Concernant la méthode par diffusion sur disques, chaque concentration des extraits de chanvre est testée en trois répétitions (3 pastilles/boîte), avec trois boîtes de Pétri par concentration. Un écusson rond de 4 mm de diamètre de *P. infestans* est placé au centre de chaque boîte, qui sont ensuite incubées entre 5 et 7 jours à 23°C dans l'obscurité. Chaque concentration des extraits de chanvre est testée avec trois boîtes de Pétri par concentration. Pour les deux méthodes, une modalité témoin (T-) composée de trois boîtes non traitées a été réalisée.

CHANVRE

Figure 12.
Photographie exemplative du test in vitro
par dilution.



Comparaison des résultats 2022 et 2024 obtenus avec la méthode de dilution (hypothèse 3)

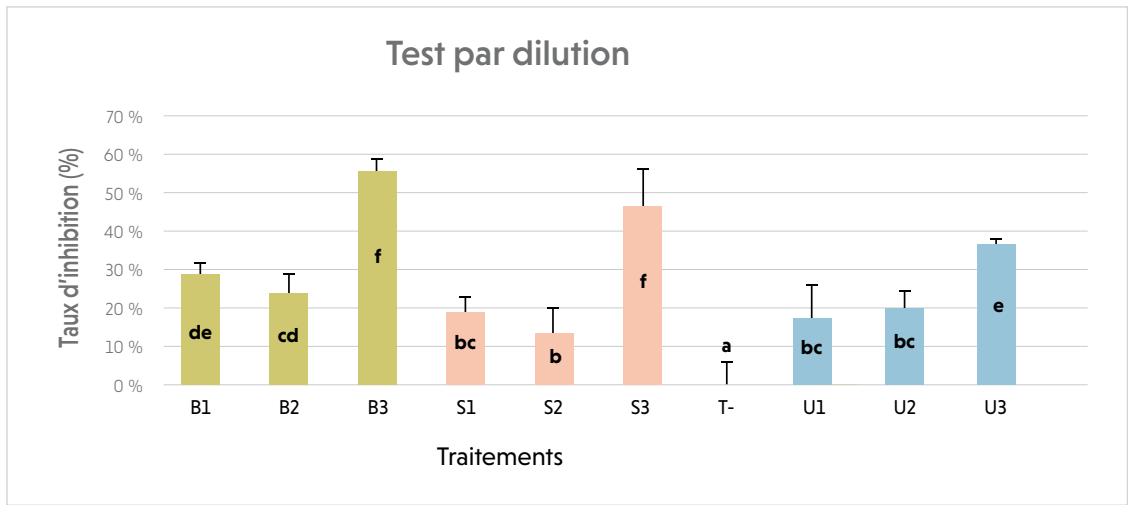
Efficacité obtenue en 2022

- Santhica 27: 98,7% d'inhibition à 5g/L
- Uso 31: 100 % d'inhibition à 5g/L
- Bialobrzeskie: 100 % d'inhibition à 5g/L

Efficacité obtenue en 2024

- Santhica 27: <50 % d'inhibition à 7,5 g/L
- Uso 31: <40 % d'inhibition à 7,5 g/L
- Bialobrzeskie: <60 % d'inhibition à 7,5g/L

Figure 13.
Taux d'inhibition moyen de *P. infestans* en fonction du traitement testé par la méthode par dilution.
Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux.
Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



CHANVRE

Les résultats sont très différents, bien que la méthode utilisée soit identique.

Bien que cela ne soit pas significatif étant donné le nombre d'échantillons très restreint, les extraits 2022 sont plus riches en cannabinoïdes (voir tableau 8), ce qui pourrait laisser suggérer que cette famille de molécules joue un rôle dans l'activité antifongique.

Cependant, cette observation n'est plus valide lorsqu'on compare des extraits de variétés différentes d'une même année.

Tableau 8.
Comparaison de la composition des extraits 2022 et 2024

	2022		2024	
	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)
Bialobrzeskie	12,86	63,94	4,16	59
Santhica 27	9,13	58,56	6,26	95
Uso 31	4,5	72,26	2,39	80
	Activité antifongique forte		Activité antifongique modérée	

Comparaison des résultats 2023 et 2024 obtenus avec la méthode de diffusion sur disques (hypothèse 3).

Efficacité obtenue en 2023

- Santhica 27:
<10 % d'inhibition à 7,5 g/L
- Uso 31:
>10 % d'inhibition à 7,5 g/L

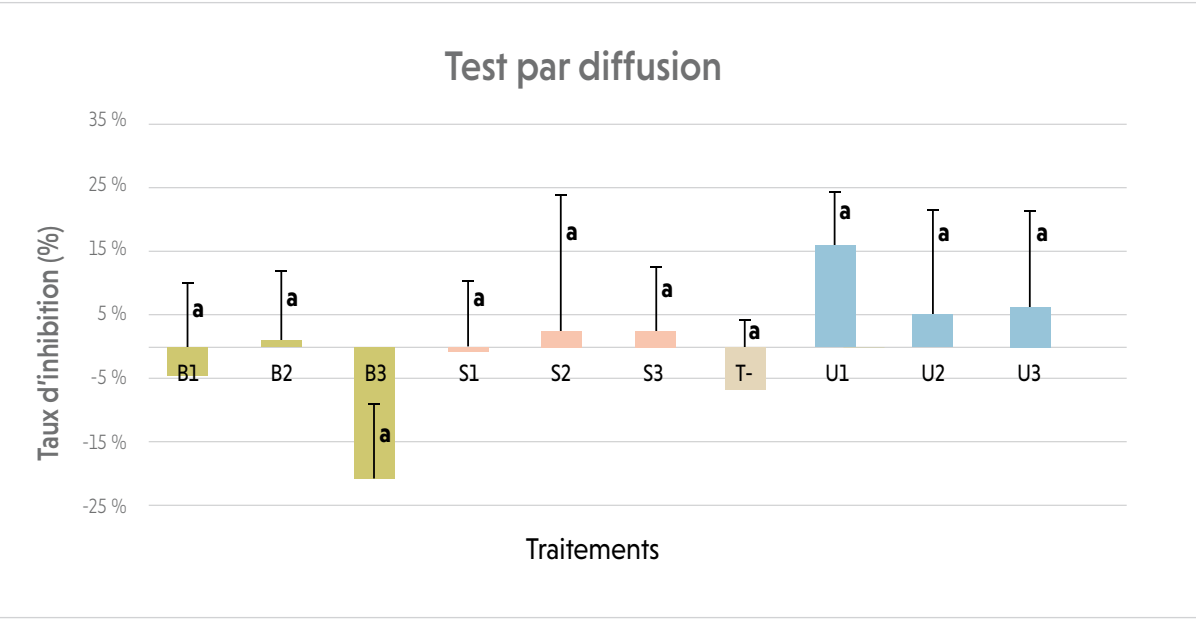
Efficacité obtenue en 2024

- Santhica 27:
<5 % d'inhibition à 7,5 g/L
- Uso 31:
15 % d'inhibition à 7,5 g/L

Les trois extraits de 2024 aux trois concentrations testées n'ont pas eu d'effet significatif sur le développement mycélien de *P. infestans* dans le test de diffusion sur disques.

Figure 14.

Taux d'inhibition moyen de *P. infestans* en fonction du traitement testé par la méthode de diffusion sur disques. Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



Nous observons donc que l'extrait de Santhica 27 de 2023 est légèrement meilleur que celui de 2024, tandis que l'extrait d'Uso 31 de 2023 est légèrement moins bon que celui de 2024.

Cependant, il est important de relativiser ces résultats d'inhibition obtenus par diffusion, en raison des très faibles efficacités mesurées, tant avec les extraits de 2023 qu'avec ceux de 2024.

Tableau 9.
Comparaison de la composition des extraits 2023 et 2024.

	2023		2024	
	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)	CBD totaux (%) ou CBG totaux pour Santhica 27	Polyphénols totaux (mg EAG/g)
Bialobrzeskie*	10,34	101	4,16	59
Santhica 27	9,92	86	6,26	95
Uso 31	2,12	109	2,39	80
	Activité antifongique forte		Activité antifongique modérée	

*Extrait détruit car valeur en THC trop élevée

L'hypothèse selon laquelle les cannabinoïdes jouent un rôle dans l'activité antifongique semble confirmée, étant donné que les extraits les plus efficaces contiennent plus de cannabinoïdes (Santhica 27 de 2023 et Uso 31 de 2024), bien que dans le cas de l'Uso 31, la différence soit minime. Cette hypothèse devra être validée ultérieurement par une nouvelle série de tests.

Comparaison des résultats 2024 obtenus avec les deux méthodes (hypothèse 4)

Pour évaluer l'impact de la méthode, nous pouvons observer les résultats obtenus sur les extraits 2024 et sur lesquels les deux méthodes

ont été appliquées (figures 13 et 14).

Les résultats ne montrent pas d'effet significatif des trois extraits 2024 sur le développement mycélien dans le test de « diffusion sur disques », aux trois concentrations testées (figure 14).

À l'inverse, le test par dilution montre que tous les traitements ont significativement réduit le développement mycélien de l'agent pathogène (figure 13).

Les extraits à 7,5 g/L présentent un taux d'inhibition significativement plus élevé par rapport aux concentrations de 2,5 g/L et 5 g/L, sans pour autant atteindre les taux d'inhibition obtenus dans ExtraHempWal (pour une concentration

CHANVRE

équivalente). En effet, les traitements B3 et S3 offrent les meilleurs taux d'inhibition, atteignant respectivement 56 % et 48 %.

Cependant, il a été observé que le développement mycélien n'est pas complètement inhibé, mais plutôt ralenti, même aux concentrations les plus élevées.

Cette observation explique également l'absence de différences observées dans le test par diffusion, où la taille des zones d'inhibition est proportionnelle à l'efficacité et à la concentration de la substance active.

En conséquence, de nouveaux tests in vitro ont été effectués, avec des concentrations en extraits plus élevées afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice ($T_i = 100\%$).

Tentative d'atteindre la concentration minimale d'inhibition

Une dernière série de tests a donc été effectuée avec des concentrations encore plus élevées.

En effet, les essais précédents, réalisés avec des concentrations plus faibles, ont montré des résultats encourageants, mais n'ont pas permis d'obtenir une inhibition complète.

Ces nouveaux tests visent à identifier la concentration minimale d'inhibition (CMI), c'est-à-dire la plus faible concentration capable de bloquer totalement la croissance de l'agent ciblé. Cette démarche permet d'optimiser l'efficacité des extraits et de mieux définir leur potentiel d'application.

Deux nouvelles concentrations (10 et 25 g/l) de l'extrait Bialobrzeskie (B) ont donc été testées selon les méthodes diffusion sur disques et dilution en gélose, avec une méthodologie identique à celle décrite au point précédent.

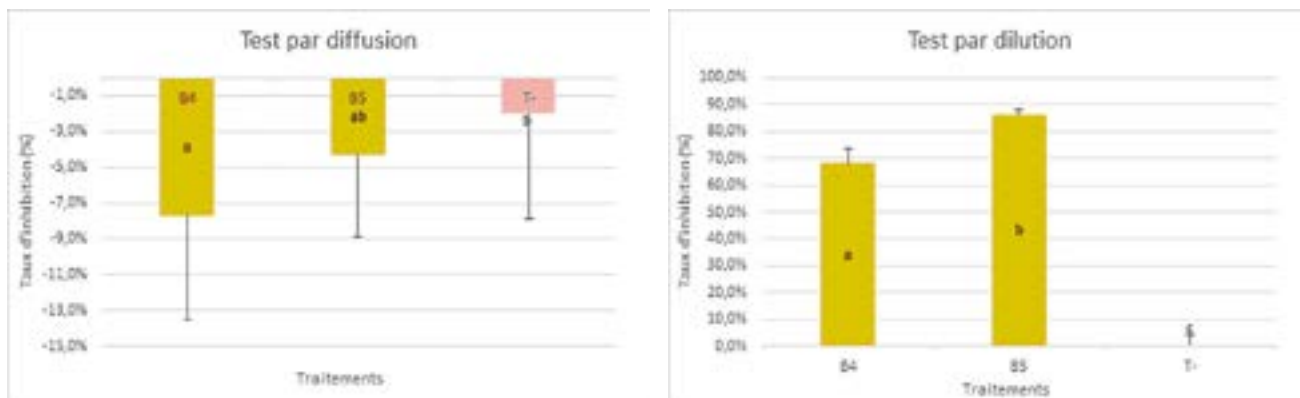
De manière assez inattendue, on constate un effet positif sur la croissance mycélienne des traitements B4 et B5 (taux d'inhibition négatif, figure 15) dans le test par diffusion sur disques. Le taux d'inhibition de B4 (-7,7%) est significativement inférieur au T- (-2,0%). B4 et B5 (-4,3%) ne sont pas différents entre eux.

Ces résultats sont contradictoires avec le test par dilution qui montre un taux d'inhibition de 68,0% et de 86,4%, respectivement pour B4 et B5.

CHANVRE

Figure 15.

Taux d'inhibition moyen de *P. infestans* en fonction du traitement testé par la méthode de diffusion sur disques (à gauche) et par la méthode de dilution (à droite). Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



Bien que l'on n'atteigne pas un Ti de 100% avec le traitement B5 (25 g/l de l'extrait Bialobrzieskie), on peut émettre l'hypothèse que la CMI a été atteinte car le rayon mycélien mesuré pourrait être le rayonnement mycélien résiduel de l'écusson central de *P. infestans* (figure 16).

Figure 16.

Photographie du test in vitro par dilution.



CHANVRE

Étape 2 : évaluation de la phytotoxicité

L'évaluation de la phytotoxicité a été réalisée sur les six extraits 2023, à la suite de la première étape in vitro.

Tester la phytotoxicité d'un biocontrôle est essentiel avant de procéder aux tests d'efficacité in vivo pour plusieurs raisons :

1. **Sécurité pour les plantes** : les tests de phytotoxicité permettent d'évaluer si le biocontrôle cause des dommages aux plantes, tels que des brûlures, un retard de croissance ou la mort des plantes. Il est crucial de garantir que le produit est sans danger pour les plantes hôtes avant de tester son efficacité contre les ravageurs ou les maladies.
2. **Optimisation de la formulation** : ces tests aident à déterminer les concentrations sûres du biocontrôle. Si un produit présente des signes de phytotoxicité, la formulation peut être ajustée pour trouver un équilibre entre efficacité et sécurité.
3. **Efficacité réelle** : un produit phytotoxique peut fausser les résultats des tests d'efficacité en affaiblissant les plantes, les rendant plus vulnérables aux pathogènes ou ravageurs. Assurer l'absence de phytotoxicité garantit des résultats plus fiables.

L'objectif est donc de vérifier l'innocuité des extraits sur les plants de tomate.

En fonction de l'intensité et de l'incidence des symptômes observés, la phytotoxicité a été qualifiée selon trois catégories : négative (-), négligeable ($\pm$), ou positive (+).

En cas de phytotoxicité, des symptômes spécifiques sont apparus à partir de 13 jours après traitement (figure 17).

L'évaluation a été réalisée lorsque les symptômes se sont stabilisés, soit 21 jours après traitement.

Les lésions observées se traduisaient par des taches de nécrose brune sur le limbe foliaire, dont la taille était égale ou inférieure à celle de la goutte de produit appliquée.

Initialement, la lésion était souvent limitée à la face adaxiale du limbe, mais elle s'étendait généralement à la face abaxiale.

Lorsqu'un extrait phytotoxique touchait une nervure, celle-ci montrait des signes de nécrose, pouvant aller jusqu'à la perforation dans les cas graves.



Le protocole précis de cette manipulation ne sera pas décrit dans ce rapport, mais peut être obtenu auprès de Valbiom.

Figure 17.
Photographies des lésions spécifiques provoquées par des extraits de chanvre phytotoxiques.



Un gradient de phytotoxicité a été observé dans la majorité des cas avec l'augmentation de la concentration. Cependant, l'extrait U (Uso 31) s'est révélé phytotoxique quelle que soit la concentration, tandis que l'extrait UP (Uso purifié) s'est toujours montré non phytotoxique (tableau 10).

Pour la suite des tests, seuls les extraits présentant une phytotoxicité négative ou négligeable ont été sélectionnés pour l'étape suivante: FL1, FR1, FR2, S1, T1, UP1, UP2, et UP3. Bien que classé comme positif (+), l'extrait S2 a également été inclus. Le solvant (SOL), quant à lui, n'a montré aucune phytotoxicité à la concentration utilisée.

Tableau 10
Phytotoxicité des extraits qualifiés selon trois catégories: négative (-), négligeable (±), ou positive.

Traitement	FL1	FL2	FL3	FR1	FR2	FR3	S1	S2	S3	SOL	T1	T2	T3	U1	U2	U3	UP1	UP2	UP3
Phytotoxicité	±	+	+	-	±	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

CHANVRE

Étape 3 : tests in vivo sur feuilles détachées

Ce test permet d'évaluer rapidement et à moindre coût l'efficacité du produit sur la plante hôte, tout en minimisant les variables environnementales qui peuvent influencer les résultats in situ.

Les faces abaxiales des folioles ont été traitées séparément par pulvérisation de 200 µl des différents traitements.

De l'eau distillée a été pulvérisée pour le témoin (T-). Ensuite, les folioles ont été inoculées par 10 µl de suspension sporanges de *P. infestans* à une concentration de 1×10^5 sporanges/ml. Les boîtes humides ont alors été refermées et mise à incubées pendant 6 jours à 18°C dans le noir.

Figure 18.

Photographie du test sur feuilles détachées avant inoculation du pathogène



Le protocole précis de cette manipulation ne sera pas décrit dans ce rapport, mais peut être obtenu auprès de Valbiom.

CHANVRE

Les symptômes ont été notés de deux manières distinctes :

- L'indice de sévérité (Is)
- La surface des lésions

Statistiquement, trois modalités réduisent significativement la surface des lésions (bâtonnets) par rapport au témoin négatif (T-), à savoir : S1, FL1, et FR2.

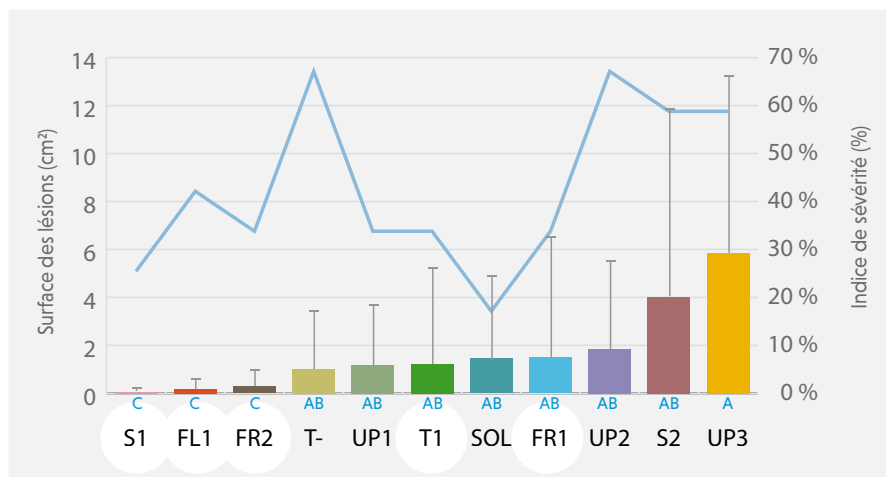
En ce qui concerne l'indice de sévérité (courbe), deux modalités supplémentaires se démarquent également : T1 et FR1. Ces cinq modalités ont donc été sélectionnées pour l'étape suivante sur des plantes entières.

Les résultats obtenus pour la surface des lésions et l'indice de sévérité peuvent révéler des tendances divergentes (figure 19).

En effet, l'indice de sévérité reflète le développement externe de l'agent pathogène sur la surface de la foliole, tandis que la mesure de la surface des lésions met en évidence son développement interne, révélé grâce au procédé de dépigmentation utilisé.

Figure 19

Niveaux d'infection de *P. infestans* exprimés par la surface des lésions (axe vertical gauche - histogramme) et l'indice de sévérité (axe vertical droit - courbe) selon le traitement appliqué dans un test sur feuilles détachées. Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



Ainsi, les traitements T1 et FR1 semblent limiter la prolifération externe du pathogène sans toutefois affecter significativement son processus de pénétration et d'infection des tissus internes.

CHANVRE

Étape 4 : tests en conditions contrôlées

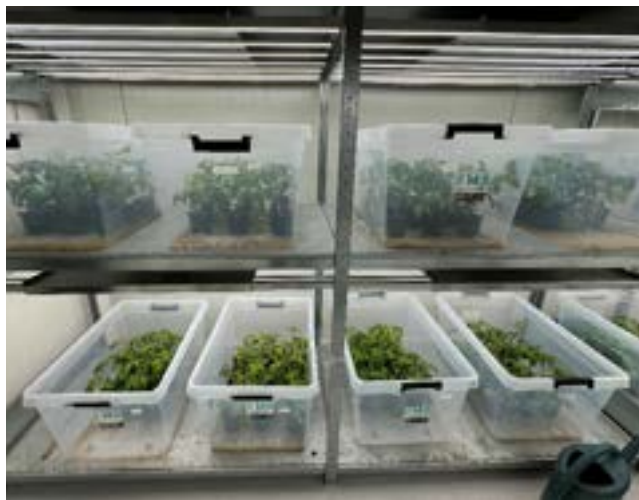
Cinq extraits ont été sélectionnés pour cette étape en conditions contrôlées. Ce type d'essai permet de mesurer l'impact du produit sur la maladie tout en prenant en compte les interactions complexes entre la plante, l'environnement et le produit. Il fournit des informations précieuses sur son efficacité globale et sa persistance. Ces données sont essentielles pour valider l'utilisation du produit en conditions agricoles.

Après le repiquage, les plants ont été placés dans des boîtes en plastique transparent de 170 L et cultivés dans une chambre de culture à 20 °C, avec une photopériode de 18 h de lumière. Au stade 3 vraies feuilles étalées, les plants ont été traités **soit de manière préventive, 24 h avant l'inoculation du pathogène (-24 h), soit de manière curative, 72 h après (+72 h)**. Les traitements ont été réalisés par pulvérisation des extraits S1, FL1, FR1, FR2 et T1, solubilisés dans de **l'eau distillée** (test 1) ou dans **0,5 % de solvant** (Sovinol S500) (test 2). Des témoins (T-) ont été mis en place avec de l'eau distillée (test 1) ou de l'eau contenant 0,5 % de solvant (test 2), ainsi qu'une référence cuivrée (Cu: CUPREX GARDEN d'Edialux, 50 % oxychlorure de cuivre) préparée selon les recommandations du fabricant.

L'agent pathogène a été pulvérisé à une concentration de 1×10^4 sporanges/ml pour le test 1, et de 2×10^4 sporanges/ml pour le test 2. Après inoculation, les boîtes d'incubation ont

Figure 20

Photographie du test sur plantes entières



été fermées pendant 24 h pour maintenir une humidité relative de 100 %. Chaque modalité (extrait × concentration × moment d'application) a été testée dans une boîte contenant 6 plants de tomate pour le test 1 et 9 plants pour le test 2. L'indice de sévérité de la maladie, comme défini dans le test sur feuilles détachées, a été calculé par plante 10 jours après l'inoculation du pathogène. En complément, l'indice de protection (I_p) est également calculé selon la formule suivante :

Avec I_s représentant l'indice de sévérité du témoin non traité (I_{sT-}) et du traitement (I_{sTr}).

$$I_p = \frac{I_{sT-} - I_{sTr}}{I_{sT-}}$$

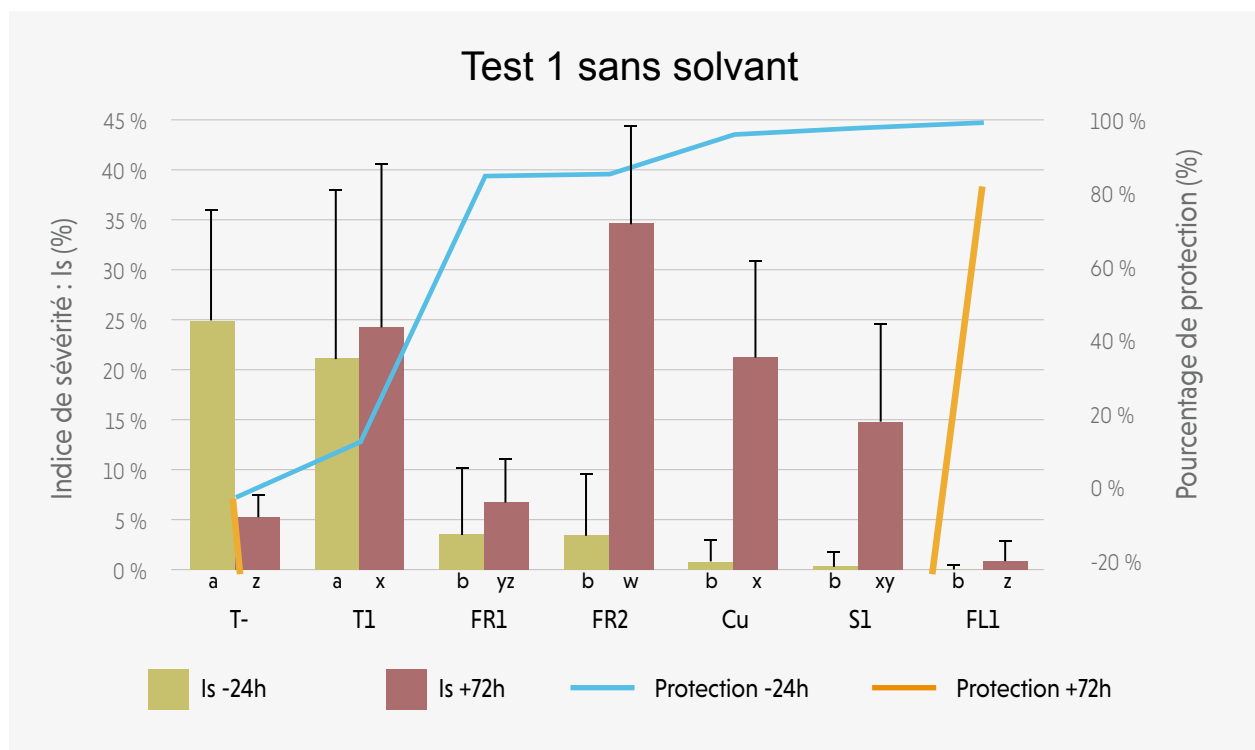
CHANVRE

Le premier test, dans lequel les extraits ont été mis en solution uniquement dans de l'eau, a montré **une réduction significative de la sévérité de la maladie pour les traitements préventifs (-24h) FR1, FR2, S1 et FL1** (Figure 21). Ces extraits ont statistiquement aussi bien contrôlé la maladie que la référence cuivrée (protection de 96 %).

Ce niveau de protection est particulièrement remarquable compte tenu de l'utilisation d'un agent de biocontrôle non formulé. En revanche, en traitement curatif (+72h), aucun des traitements, y compris la référence cuivrée (Cu), n'a permis de réduire les symptômes de la maladie.

Figure 21

Indice de sévérité de *P. infestans* (axe vertical gauche, histogramme) et pourcentage de protection correspondant (axe vertical droit, courbe) en fonction des traitements appliqués de manière préventive (-24 h) ou curative (+72 h) dans le test 1 sur plantes entières. Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux. Les résultats des traitements préventifs et curatifs ont été analysés séparément. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



CHANVRE

Pour le second test, les extraits ont été mis en solution avec 0,5 % de solvant (figure 22).

Lors d'un traitement préventif (-24h), les modalités S1, FL1 ont significativement réduit la sévérité de la maladie de 35 % et 46 %, respectivement.

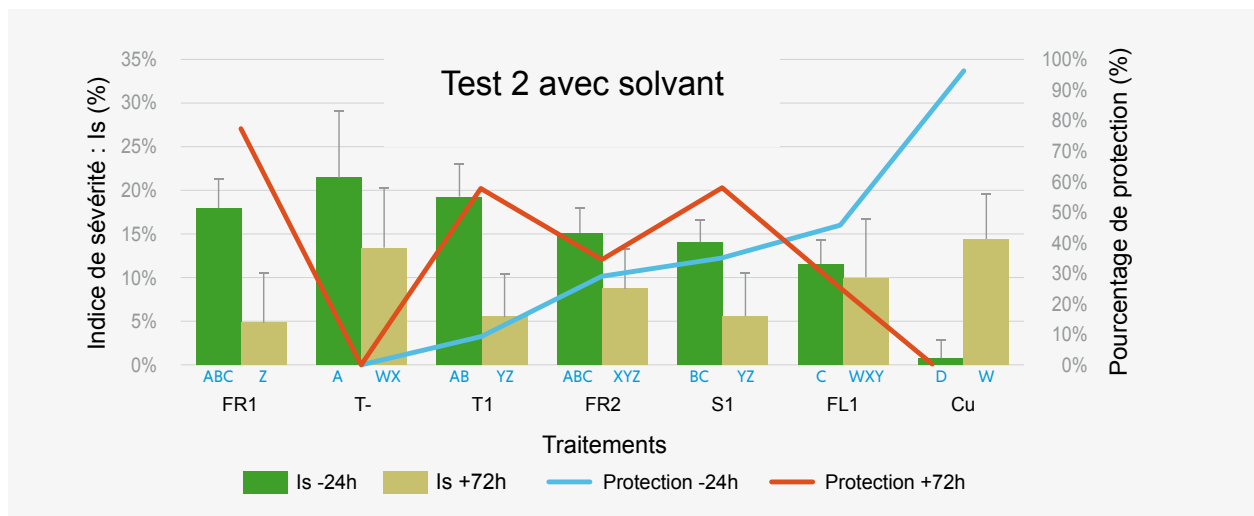
Bien que non significatif, le traitement FR2 montre lui aussi une réduction de 35 %. En comparaison, la référence cuivrée (Cu) appliqué en préventif réduit les symptômes de 96 %.

Par rapport au premier test sans solvant, un profil de protection similaire est observé pour les traitements préventifs, bien que les niveaux de protection soient globalement plus faibles.

En revanche, **l'ajout de solvant semble avoir renforcé l'efficacité des traitements T1, FR1 et S1 appliqués en curatif.** Ces extraits ont significativement réduit les symptômes de 58 %, 64 % et 59 %, respectivement, tandis que la référence cuivrée n'a eu aucun effet sur la maladie (-8 % de protection). Il est à noter que FR1 est également la modalité ayant montré le plus fort taux d'inhibition de *P. infestans* lors des tests in vitro.

Figure 22

Indice de sévérité de *P. infestans* (axe vertical gauche, histogramme) et pourcentage de protection correspondant (axe vertical droit, courbe) en fonction des traitements appliqués de manière préventive (-24 h) ou curative (+72 h) dans le test 2 (solvant) sur plantes entières. Les traitements partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux. Les résultats des traitements préventifs et curatifs ont été analysés séparément. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de la moyenne.



CHANVRE

Essais complémentaires: test de biostimulation

L'objectif de tester l'efficacité d'un produit de biostimulation sur plante entière est d'évaluer son impact sur la croissance, le développement et l'activité physiologique des plantes en environnement représentatif. L'activité biostimulante des extraits de chanvre non phytotoxiques de 2023 (FL1, FR1, FR2, S1, S2, T1, UP1, UP2, UP3) a été évaluée sur des plants de

tomate repiqués et cultivés en serre.

Le test n'a révélé aucun effet de biostimulation, ni des traitements ni du solvant, quel que soit le paramètre mesuré. Cependant, les résultats montrent que les extraits n'ont eu aucun effet néfaste sur les plantes, ni sur leur croissance, ni sur leur activité photosynthétique. Ainsi, aux concentrations testées, ces extraits pourraient être utilisés contre les agents phytopathogènes de la tomate sans effet secondaire significatif.

Conclusions

1. Test in vitro de diffusion sur disques

Parmi les extraits (2023) et concentrations testés, sept traitements ont réduit significativement la croissance de *P. infestans*, avec des taux d'inhibition entre 9,5 % et 12,6 %. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence en raison des faibles taux d'inhibition observés.

Étonnement, les trois extraits de 2024 n'ont montré aucun effet significatif sur le développement mycélien dans le test de diffusion sur disques. En revanche, dans le test par dilution, tous les traitements ont réduit significativement le développement mycélien, les extraits à 7,5 g/L ayant les meilleurs résultats (56 % et 48 % de réduction pour B3 et S3).

Toutefois, le mycélium n'a pas été totalement inhibé, mais seulement ralenti, même aux concentrations les plus élevées.

Les essais réalisés avec les extraits de 2024 confirment que la méthode de diffusion sur disque est moins adaptée pour mettre en évidence la capacité d'inhibition des extraits. Cette limitation pourrait s'expliquer par une concentration beaucoup plus faible des extraits dans la méthode de diffusion, comparée à celle obtenue par dilution dans l'agar. Par ailleurs, la phytotoxicité des extraits de 2024 n'a pas été testée. Il est probable que certains extraits soient phytotoxiques, ces résultats in vitro doivent donc être interprétés avec précaution.

Concernant la concentration minimale d'inhibition (CMI), celle-ci est probablement atteinte avec une concentration de 25 g/L.

CHANVRE

2. Test de phytotoxicité

Des symptômes spécifiques de phytotoxicité sont apparus 13 jours après traitement, principalement sous forme de lésions nécrotiques sur la face adaxiale des feuilles.

La phytotoxicité était souvent liée à la concentration, bien que certains extraits comme l'extrait U aient montré une toxicité systématique. Les extraits non phytotoxiques ou à faible toxicité (FL1, FR1, FR2, S1, T1, UP1, UP2, UP3) ont été retenus pour les tests ultérieurs.

3. Test d'efficacité sur feuilles détachées

Les traitements ont montré des effets divergents. Certains ont limité la prolifération externe du pathogène sans affecter son développement interne. Les extraits S1, FL1, et FR2 ont réduit significativement la surface des lésions, tandis que T1 et FR1 ont limité la prolifération externe sans affecter l'infection interne.

4. Tests d'efficacité sur plantes entières

Les tests ont montré que **les extraits solubilisés dans de l'eau offrent une protection préventive efficace contre la maladie, avec des performances comparables à la référence cuivrée** (96 % de protection) pour les modalités FR1, FR2, S1 et FL1. Cependant, aucun traitement,

y compris la référence cuivrée, n'a été efficace en curatif. L'ajout de 0,5 % de solvant a permis de maintenir un profil de protection préventive similaire, bien que les niveaux de protection soient globalement plus faibles.

En revanche, **cet ajout a considérablement amélioré l'efficacité des traitements curatifs, notamment pour T1, FR1 et S1, avec des réductions significatives des symptômes allant jusqu'à 64 %, alors que la référence cuivrée n'a montré aucun effet.** Le traitement FR1 s'est particulièrement distingué par son efficacité curative et son fort taux d'inhibition de *P. infestans* lors des tests in vitro.

Ces résultats indiquent que l'ajout de solvant optimise l'efficacité des extraits en curatif, tout en maintenant une protection préventive notable.

5. Test de biostimulation

Aucun effet de biostimulation n'a été observé, ni pour les traitements ni pour le solvant, sur la hauteur, le nombre de feuilles, la biomasse ou la fluorescence chlorophyllienne. Toutefois, aucune altération de la croissance ou de l'activité photosynthétique n'a été constatée, indiquant que ces extraits n'ont pas d'effets secondaires significatifs.

Conclusion de cette partie

Les feuilles de chanvre semblent présenter un potentiel, le FR1 étant l'un des meilleurs extraits. Cependant, aucune corrélation directe n'a été observée entre la concentration de l'extrait et son efficacité contre *P. infestans*. Les résultats montrent également une grande variabilité en fonction des méthodes et des extraits utilisés. Bien qu'une activité anti-mildiou semble être présente, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre son efficacité. Il est également crucial de comprendre le mécanisme d'action ainsi que les molécules responsables de cette activité, comme expliqué dans la partie 4.

Partie 3

Résultats obtenus sur la silphie

SILPHIE

Laboratoires impliqués

• Celabor

Centre de services scientifiques et techniques en Agro-alimentaire, Emballage, Environnement et Textile, Job Tchoumtchoua (partie analytique)

• Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine

Université de Liège (activité biologique)

• Innolab

Bernard Willems (pouvoir méthanogène)

Extractions et teneurs en molécules d'intérêts

Cette étude sur la silphie s'est déclinée en plusieurs étapes :

1. Optimisation des conditions d'extraction de la silphie fraîche à l'échelle du laboratoire
2. Sélection des meilleures conditions et production des extraits à l'échelle pilote au départ de la silphie ensilée
3. Comparaison du taux de saponines des trois types de silphie
4. Application du CO₂ supercritique

Optimisation des conditions d'extraction à l'échelle laboratoire

La silphie fraîche, récoltée par Valbiom, a été stockée à -20°C. Un broyage préalable de la matière a été effectué à 2 mm en présence d'azote, afin de faciliter le processus d'extraction en raison de son taux d'humidité élevé.

Cette matière est ensuite utilisée pour le développement et l'optimisation des méthodes d'extraction à l'échelle du laboratoire.

À cet effet, des tests de macération ont été réalisés avec trois solvants différents : l'hexane, l'acétate d'éthyle et l'éthanol à 70 %. De plus, diverses durées de macération (1, 2, 4 heures) et températures (25°C, 40°C) ont été évaluées.

Pour chaque condition d'extraction, le rendement est déterminé, et les triterpénoïdes ainsi que les polyphénols quantifiés afin de sélectionner les conditions d'extraction les plus efficaces.

SILPHIE

Tableau 11
Résumé des résultats de la phase d'optimisation

	Macération hydroalcoolique (solvant polaire)	Macération à l'acétate d'éthyle (polarité intermédiaire)	Observations
Rendements d'extraction (g extrait/100 g matière fraiche)	+ - 4%	<1%	Majorité de composés polaires dans la matière Macération hexane: /
Triterpénoïdes (mg/100g extrait sec)		(2h à 25°C: 200-300) 1h à 40°C: 100-130	Meilleure extraction avec acétate d'éthyle
Polyphénols (mg/100g extrait sec)	1h à 40°C: + - 400	1h à 40°C: + - 400	Résultats similaires
Profil des polyphénols	Acide chlorogénique Isoquercetine kampfèrol-3- rutinoside	Acide coumarique Kaempferol-3-glucoside Isoquercetine Hyperoside Kaempferol-3-rutinosid	Extraction sélective de polyphénols selon leur polarité

Sélection des meilleures conditions et production des extraits à l'échelle pilote

Après la phase d'optimisation des méthodes d'extraction, une montée en échelle a été effectuée afin de produire des extraits en quantité suffisante pour la phase d'étude des activités biologiques.

Les conditions de production à grande échelle étaient les suivantes :

- Solvants: acétate d'éthyle & éthanol 70%
- Température: 40°C
- Durée: 1h
- Volume: 1L à 5L
- Broyage: 4 mm

Les extractions à grande échelle sont effectuées sur les 3 matières analysées:

- Silphie fraîche
- Silphie ensilée
- Silphie ensilée séchée

SILPHIE

Rendements

L'un des défis majeurs lors de la montée en échelle d'une méthode d'extraction est de maintenir le même rendement que celui obtenu à l'échelle du laboratoire.

La figure 23 montre que les rendements massiques obtenus à l'échelle du laboratoire ont bien été atteints après extraction à grande échelle, aussi bien pour l'extraction à l'acétate d'éthyle que pour l'extraction à l'éthanol 70% (en considérant le % de matière sèche).

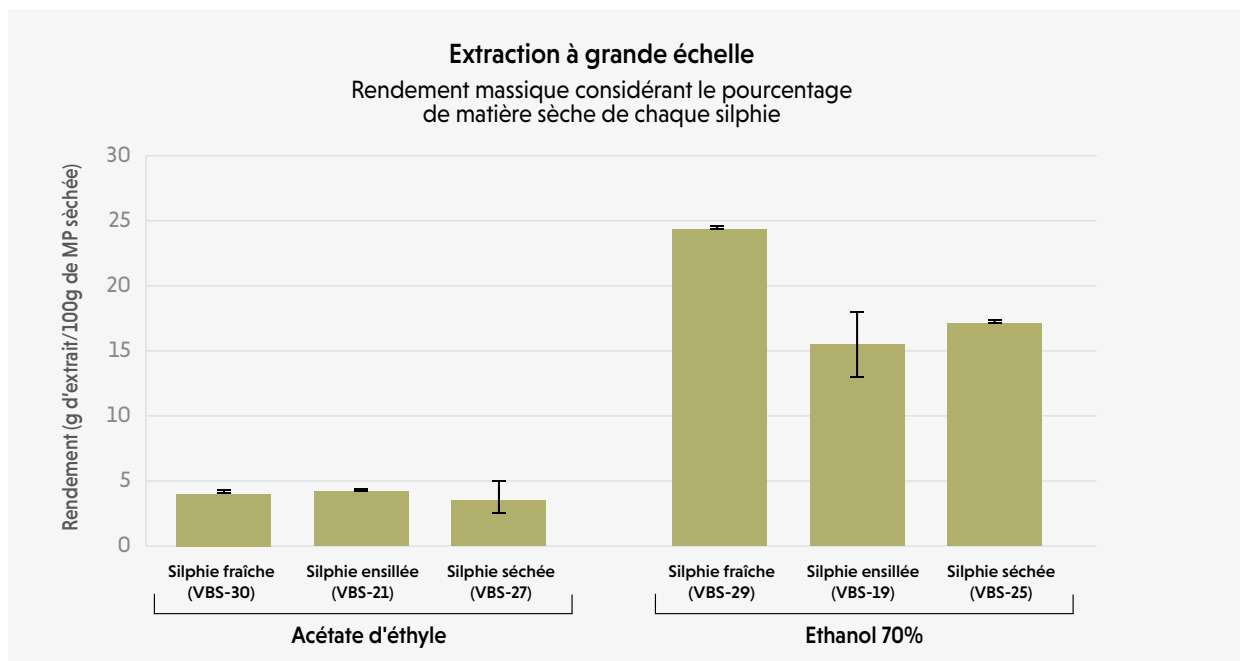
La méthode développée ici serait donc effectivement industrialisable.

La figure 23 montre que les rendements d'extraction à l'acétate d'éthyle sont similaires (+/-4%) pour les trois types de silphie.

Pour l'extraction à l'éthanol 70%, la silphie fraîche a présenté un meilleur rendement d'extraction (>24%) en comparaison avec les deux autres types de silphie, qui ont montré des rendements similaires.

Figure 23

Rendement massique des extraits produits à grande échelle



SILPHIE

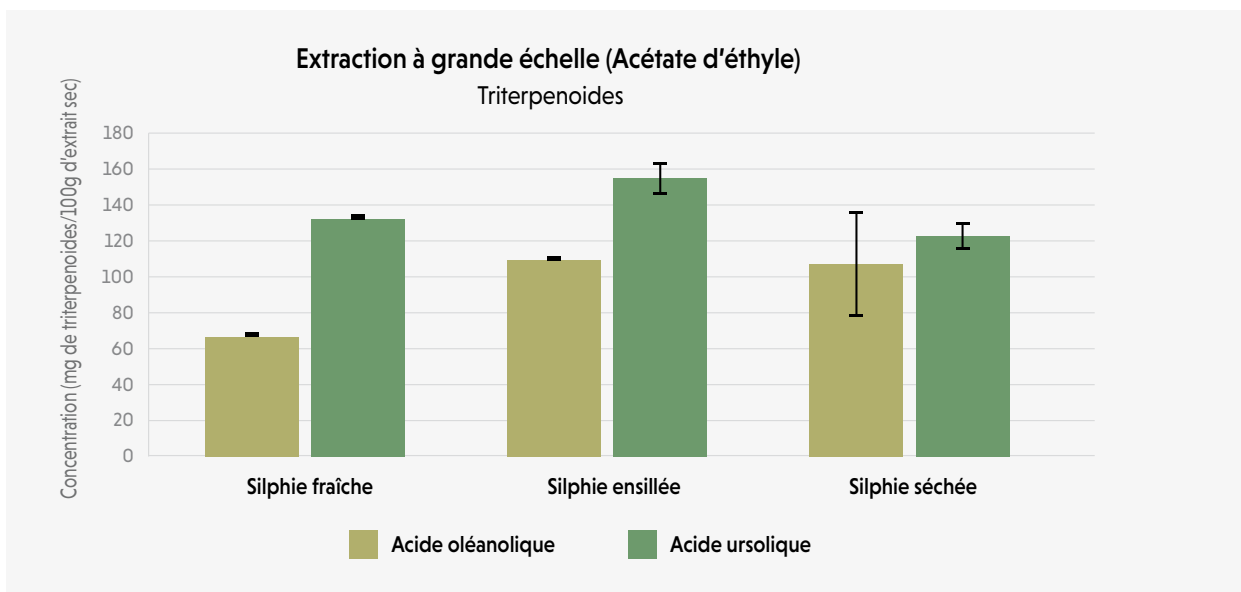
Triterpénoïdes

Pour la silphie fraîche, la concentration d'acide ursolique a atteint le niveau observé à l'échelle du laboratoire (scalabilité de la méthode), mais l'acide oléanolique est resté à une concentration 50 % plus basse (126 vs 67 mg/100g) par rapport à l'essai au laboratoire.

Cela pourrait être attribué à un problème analytique, car les extraits de silphie fraîche à grande échelle (VSB-29 et VSB-30), non prévus au départ et produits quelques jours avant l'envoi des échantillons, n'ont pas permis de reproduire les dosages analytiques des triterpènes (Figure 24).

Figure 24

Concentration en triterpénoïdes des extraits produits à grande échelle



SILPHIE

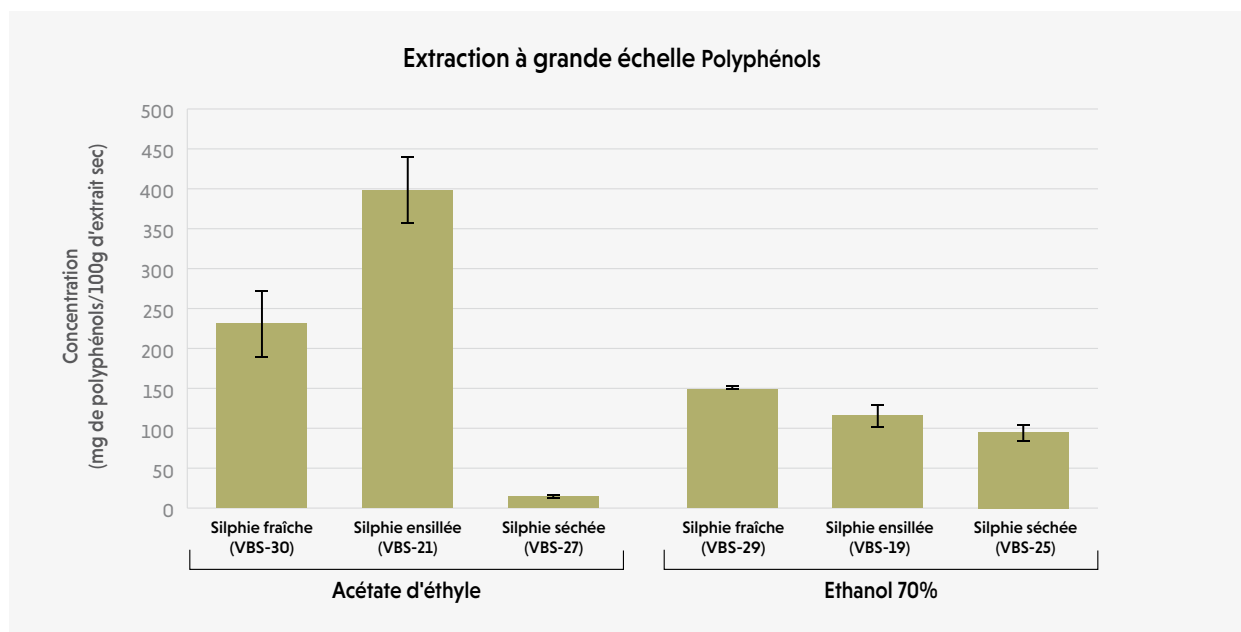
Polyphénols

Les taux de polyphénols sont plus bas dans les extraits de silphie fraîche produits à grande échelle, en comparaison avec ceux obtenus à l'échelle du laboratoire, aussi bien pour l'acétate d'éthyle (231 vs 395 mg/100g) que pour l'éthanol 70% (150 vs 416 mg/100g).

Il convient néanmoins de noter que les dosages effectués sur les extraits produits à grande échelle semblent beaucoup plus fiables (grandes quantités d'extraits disponibles), avec de faibles écarts types (figure 25), contrairement à ce qui avait été observé à l'échelle du laboratoire .

Figure 25

Concentration en polyphénols des extraits produits à grande échelle



SILPHIE

Profil des polyphénols

En ce qui concerne la silphie fraîche, le profil moléculaire des extraits produits à l'échelle pilote semble similaire à celui des extraits produits à l'échelle du laboratoire.

En revanche, le séchage semble avoir été défavorable pour certaines molécules, telles que

l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside, qui ne sont pas présentes dans les extraits des deux autres silphies (fraîche et ensillée).

De plus, l'acide coumarique est retrouvé en plus petite quantité par rapport aux taux observés dans les extraits de silphie fraîche.

Figure 26
Profil des polyphénols quantifiés dans les extraits produits à grande échelle.

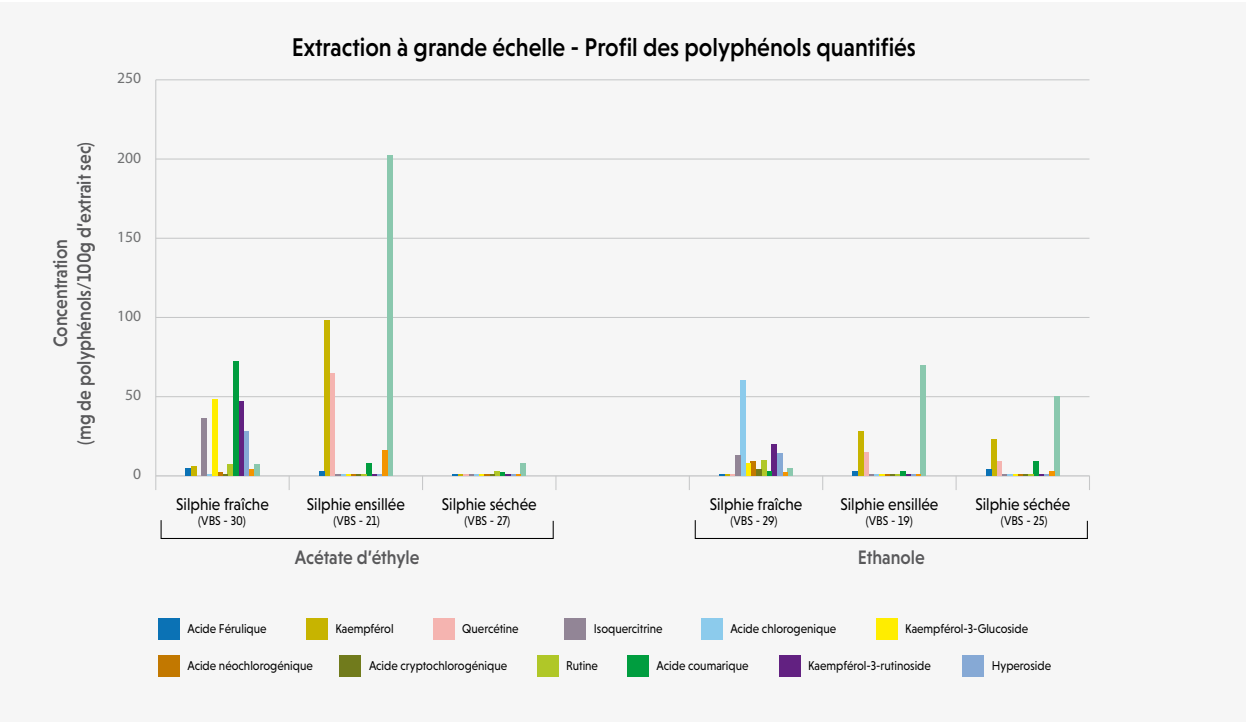


Tableau 12
Résumé des informations principales de ces extractions à l'échelle pilote.

	Macération hydroalcoolique (solvant polaire)			Macération à l'acétate d'éthyle (polarité intermédiaire)			Observations
	Silphie fraîche (VBS-29)	Silphie ensilée (VBS-19)	Silphie séchée (VBS-25)	Silphie fraîche (VBS-30)	Silphie ensilée (VBS-21)	Silphie séchée (VBS-27)	
Rendements d'extraction (g extrait/100g MP séchée)	+ 25%	+15%	+17%	<5%	<5%	<5%	Méthode industrialisable Silphie fraîche meilleur rendement pour hydroalc.
Triterpénoïdes (mg/100g extrait sec) Ac. Oléanolique / ac. ursolique	/	/	/	60-130	110-150	100-120	Méthode industrialisable
Polyphénols (mg/100g extrait sec)	+150	+115	+ 100	+230	+400	<25	Taux plus bas mais plus fiable qu'à l'échelle labo
Profil des polyphénols	Acide chlorogénique	Ac. protocatéchique Kaempferol Quercétine	Ac. protocatéchique Kaempferol Quercétine	Acide cryptochlorog. Rutine Kaempferol-3- glucoside	Ac. protocatéchique Kaempferol Quercétine	Ac. protocatéchique	Kaempferol-3-glucoside, Isoquercétine et ac. coumarique disparus au séchage VBS-19 est l'extrait le plus pauvre

SILPHIE

Comparaison du taux de triterpénoïdes et de saponines des trois types de silphie

Comme le révèle le tableau ci-joint, les triterpénoïdes extraits à l'aide de l'acétate d'éthyle sont clairement détectables et quantifiables dans les matières premières, à l'exception de l'acide ursolique, qui est présent dans la silphie fraîche à des concentrations non quantifiables.

Les deux triterpénoïdes identifiés sont présents en concentrations plus élevées dans la silphie séchée et en quantités plus faibles dans la silphie fraîche (voir tableau 13).

Il convient toutefois de souligner que ces triterpénoïdes sont présents à des concentrations très faibles, de l'ordre du milligramme pour 100 g de silphie.

Ces concentrations diffèrent de celles de la figure 24 qui présentent la concentration dans l'extrait, tandis que les valeurs du tableau correspondent à la concentration dans la matière première.

Tableau 13
Taux de triterpénoïdes déterminés dans les 3 types de silphie (en tenant compte du taux de matière sèche).

mg/100g de MP sèche	Silphie fraîche	Silphie ensilée	Silphie séchée
Acide oléanolique	5,9	8,7	10,9
Acide ursolique	LQ	8,9	14,5

Les saponines sont des hétérosides de triterpènes. Il s'agit d'un sucre polaire accroché à un terpène apolaire pour former des saponines. Le séchage ou l'ensilage sont des processus qui peuvent influencer la conversion d'une forme à l'autre.

Une méthode spectrophotométrique a été mise au point pour quantifier les saponines totales présentes dans les matières premières. La présence de saponines a été confirmée, mais à des taux très faibles (environ 0,6 %) tant pour la silphie fraîche que pour la silphie ensilée.

En revanche, le taux de saponines dans la silphie séchée, relativement plus élevé (environ 2 %), doit être interprété en tenant compte du taux d'humidité.

SILPHIE

En prenant en compte le taux de matière sèche, la figure 27 illustre que les trois types de silphie présentent chacun environ 2 % de saponines, la silphie fraîche affichant une concentration relativement plus élevée.

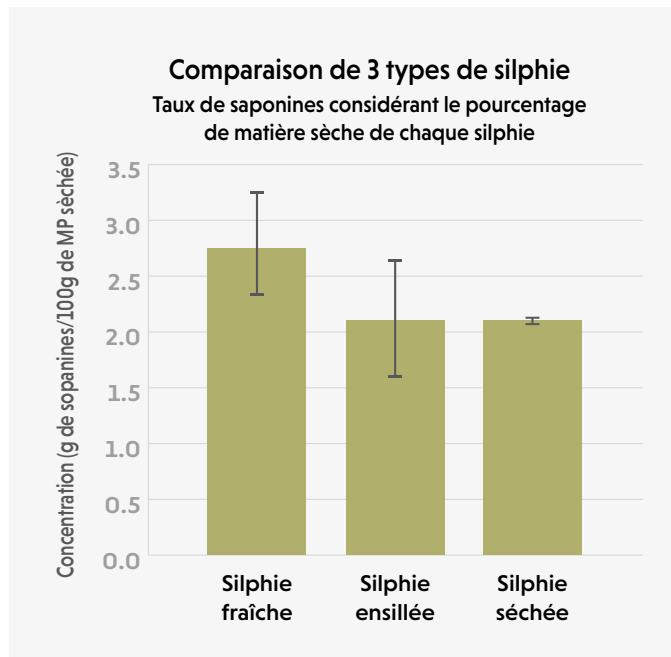
On voit donc que la forme saponine prédomine sur la forme « libre » de triterpénoïdes.

Une hypothèse serait donc que le séchage et l'ensilage génèrent une perte de saponine, peut-être au profit des triterpénoïdes.

Néanmoins la perte de saponine lors du séchage/ensilage n'est pas compensée par la formation de triterpénoïdes (ordres de grandeur différents).

Figure 27

Taux de saponines déterminés dans les 3 types de silphie (calcul tenant compte du taux de matière sèche).



SILPHIE

Conclusions sur la partie analytique

Plusieurs méthodes d'extraction des métabolites de la silphie ont été évaluées. **La méthode de macération à 40 °C a donné les meilleurs résultats**, en utilisant de l'acétate d'éthyle pour extraire les métabolites moins polaires et de l'éthanol à 70 % pour les métabolites polaires. Les acides ursolique et oléanolique ont pu être extraits et analysés dans les extraits à l'acétate d'éthyle grâce à une méthode UPLC. Les saponines ont également été déterminées par spectrophotométrie.

Les trois types de silphie contenaient chacun environ 2 % de saponines, bien que des différences plus marquées aient été observées dans le profil des polyphénols des extraits, tant pour ceux obtenus à l'acétate d'éthyle qu'à l'éthanol à 70 %.

Les extraits de silphie fraîche se distinguaient par la présence dominante de molécules telles que l'isoquercétine, le kaempférol-3-glucoside, l'acide chlorogénique, l'acide cryptochlorogénique, la rutine et l'acide coumarique.

En revanche, la silphie séchée et la silphie ensilée séchée étaient principalement constituées de kaempférol, quercétine et acide protocatechique. **Ces molécules, reconnues pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, suggèrent une possible valorisation de ces extraits.** Il serait également pertinent de développer une méthode d'identification spécifique des saponines afin de mieux détecter les variations de profil qui pourraient être induites par l'ensilage et/ou le séchage.

Impact de l'extraction sur le pouvoir méthanogène de la silphie

L'objectif principal de cette étude sur la silphie est d'**ajouter une boucle de valorisation de la silphie**, et non pas de la détourner de son utilité première qui reste la biométhanisation (voir figure 2). Par conséquent, le pouvoir méthanogène de la silphie (ou plutôt, des résidus d'extraction) se doit de rester performant, même après extraction. C'est pourquoi, trois résidus d'extraction, ainsi que trois échantillons de silphie, ont été envoyés au laboratoire Innolab, afin de mesurer leur pouvoir méthanogène.

SILPHIE

Méthodologie

Les tests sont effectués selon la méthode VDI n° 4630 "Vergärung organischer Stoffe, Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche."

Une quantité précise de produit est ajoutée aux boues anaérobies. La quantité de substrat ajoutée est calculée sur la base des taux de matière sèche et de matière organique.

Un contrôle négatif est également configuré pour quantifier la production de biogaz de

l'inoculum. Le résultat de la production de biogaz du substrat est corrigé au regard de la production de biogaz du contrôle négatif.

Les résultats varient entre 321,5 et 348,7 Nm³/tonne MO. **Les résidus d'extractions ne semblent donc pas posséder un potentiel méthanogène inférieur aux échantillons de silphie.**

Ceci confirme donc la possibilité de réaliser une extraction sur la silphie, sans en compromettre le potentiel méthanogène.

Tableau 14
Potentiel méthanogène des différents échantillons.

	Extrait silphie ensilée	Extrait silphie ensilée	Extrait silphie ensilée	Silphie ensilée broyée et congelée	Silphie fraiche broyée et congelée	Silphie fraiche
Solvant utilisé pour l'extraction	Ethanol 70%	Hexane	Acétate d'éthyle			
Productivité en méthane (Nm ³ /tonne MO)	348,7	340,4	321,5	325	347,7	326,8

SILPHIE

Activités biologiques

Méthodologie

Après avoir identifié certaines molécules présentes dans les extraits de silphie, nous avons testé les propriétés antifongiques d'un de ces extraits, en le mettant en présence de plusieurs pathogènes fongiques.

Les six agents pathogènes fongiques utilisés dans cette étude proviennent des collections du laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de l'Université de Liège :

- *Phytophthora infestans*
- *Sclerotinia sclerotiorum*
- *Alternaria dauci*
- *Penicillium expansum*
- *Botrytis cinerea*
- *Fusarium oxysporum*

Les différentes souches pathogènes ont été réactivées par un premier repiquage sur des boîtes de Pétri. Après une incubation de sept jours à 23°C, les cultures ont été repiquées une seconde fois et incubées pendant sept jours supplémentaires avant leur utilisation pour

les tests. Le milieu de culture RA (Rye Agar) a été utilisé pour *P. infestans*, tandis que le PDA (Potato Dextrose Agar) a servi pour les autres champignons, aussi bien pour la réactivation que pour les tests.

Parmi les six extraits suivants, l'extrait VBS-19 a été sélectionné pour ce test, car présent en plus grande quantité.

- VBS-19 (ensilée, éthanol)
- VBS-21 (ensilée, acétate d'éthyle)
- VBS-25 (ensilée séchée, éthanol)
- VBS-27 (ensilée séchée, acétate d'éthyle)
- VBS-29 (fraîche, éthanol)
- VBS-30 (fraîche, acétate d'éthyle)

L'extrait de silphie VBS-19 a été dissout dans de l'eau distillée stérile par agitation pendant trois heures, dans des conditions stériles.

En raison de la sédimentation des matières insolubles observée dans les premières minutes après le repos de la solution, l'extrait a été filtré à travers un filtre de 0,4 µm. Trois concentrations ont été préparées pour les tests : 1 g/l, 25 g/l et 50 g/l, et les abréviations S1, S2 et S3 ont été respectivement utilisées pour désigner ces solutions dans le présent rapport.

SILPHIE

Ce test avait pour objectif d'évaluer l'efficacité d'extraits de silphie à inhiber ou ralentir la croissance d'un pathogène fongique à l'aide de la méthode diffusion sur disques.

Des disques imprégnés de l'extrait ou de la substance testée sont placés sur un milieu de culture solide, où les molécules actives se diffusent, formant un gradient de concentration décroissant à mesure qu'elles s'éloignent des disques (voir figure 10).

Si l'agent pathogène est sensible, une zone circulaire sans croissance, appelée zone d'inhibition, se forme autour de chaque disque.

La taille de ces zones est proportionnelle à l'efficacité et à la concentration de la substance active, permettant ainsi d'évaluer l'activité antifongique ou antimicrobienne et de comparer différentes concentrations ou formulations.

Résultats

Comme indiqué dans le tableau 15, **l'extrait de silphie VBS-19 n'a révélé aucune inhibition significative** du développement mycélien des six champignons pathogènes étudiés, quel que soit le niveau de concentration testé.

De plus, les traitements S1 et S3 ont induit une légère augmentation, mais significative, du développement mycélien (effet Ti négatif) de *S. sclerotiorum* par rapport au témoin.

Cela suggère que l'extrait pourrait, à certaines concentrations, fournir une source de nutriments additionnelle pour ce champignon par rapport au milieu PDA seul. Ceci semble plausible dans la mesure où les extraits éthanoliques contiennent probablement les sucres comme source de nutriment.

En ce qui concerne *P. expansum*, la pulvérulence de ses spores a entraîné le développement de colonies secondaires indésirables.

Par conséquent, les mesures n'ont pu être effectuées que pour une boîte témoin et deux boîtes traitées avec l'extrait S3.

Néanmoins, il apparaît de manière non quantitative qu'aucune des concentrations de silphie testées ne génère de halo d'inhibition autour des pastilles (figure 28).

SILPHIE

Tableau 15

Taux d'inhibition moyen de *P. infestans*, *S. sclerotiorum*, *A. dauci*, *P. expansum*, *B. cinerea* et *F. oxysporum* en fonction de la concentration en silphie testée (S1, S2, S3) par la méthode de diffusion sur disques.

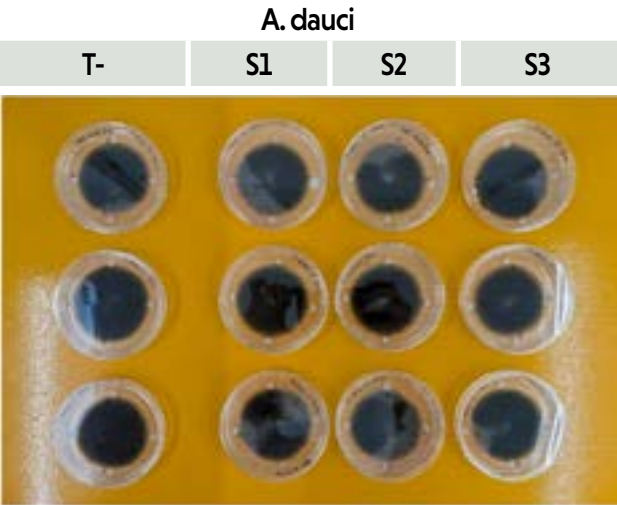
T- : modalité sans extrait, Gr.Stat : groupement statistique et NA: non applicable.

Pour le groupement statistique, les modalités partageant une même lettre ne présentent pas de différences significatives entre eux.

	Modalités	S1	S2	S3	T-
P. infestans	Moyenne	3.0%	-0.9%	-1.5%	1.9%
	Écart type	10.6%	9.1%	7.9%	5.0%
	Gr.Stat.	a	a	a	a
S. sclerotiorum	Moyenne	-2.9%	0.0%	-4.0%	0.8%
	Écart type	4.1%	5.7%	5.8%	5.1%
	Gr.Stat.	a	b	a	b
A. dauci	Moyenne	-0.8%	-2.6%	0.8%	1.2%
	Écart type	4.85%	3.8%	2.4%	3.5.
	Gr.Stat.	a	a	a	a
P. expansum	Moyenne	NA	NA	-0.4%	1.3%
	Écart type	NA	NA	4.6%	4.4%
	Gr.Stat.	NA	NA	NA	NA
B. cinerea	Moyenne	0.2%	2.0%	-3.4%	4.1%
	Écart type	14.4%	7.9%	3.6%	9.1%
	Gr.Stat.	a	a	a	a
F. oxyspo rum	Moyenne	1.0%	-0.4%	4.7%	5.2%
	Écart type	10.2%	14.8%	8.0%	4.3%
	Gr.Stat.	a	a	a	a

Figure 28

Développement mycélien de *A. dauci* en présence de l'extrait de silphie VBS-19.



Conclusion

En conclusion, l'extrait de silphie VBS-19 n'indique aucun effet inhibiteur significatif sur le développement des cinq champignons pathogènes testés.

En revanche, pour *S. sclerotiorum*, les résultats suggèrent que les extraits de silphie pourraient, à certaines concentrations, agir comme une source nutritive pour ce champignon.

Partie 4

Résultats complémentaires et identification des molécules porteuses d'activités biologiques

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Laboratoires impliqués

Profilia

En parallèle de ces essais menés au laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de l'Université de Liège, d'autres essais ont été menés par la start-up Profilia. Les extraits testés sont les trois extraits de chanvre 2024, cinq fractions d'un extrait purifié d'Uso 31 de 2023, et les six extraits de silphie.

Ces essais ont été menés selon une méthodologie en trois séquences :

1. Bioshift (pour tous les extraits);
2. Test d'inhibition de croissance des microorganismes sur base des résultats du Bioshift (pour les extraits présentant un potentiel antimicrobien/insecticide);
3. Fractionnement (pour les 3 extraits de chanvre et un extrait de silphie seulement).

Pour commencer, les extraits transmis par Valbiom ont été repris en DMSO (diméthylsulfoxyde), en tant que solvant standard de travail. Ces extraits ont ensuite été ajustés à des concentrations massique de 100mg/mL (concentration utilisée telle quelle pour le test d'inhibition de croissance

des microorganismes), et dilués à 5mg/mL pour réaliser le test in vitro (Bioshift).

Bioshift

La technologie Bioshift de Profilia repose sur le suivi des températures de dénaturation d'une série de protéines spécifiques, par fluorescence, afin de visualiser de potentielles interactions entre ces protéines et les échantillons à tester. La méthode met en œuvre des protéines de la famille des GST, sous forme de protéines recombinantes produites en système hétérologue au laboratoire. Le protocole est réalisé en microplaque 384 puits, en solution aqueuse tamponnée pour évaluer le potentiel antioxydant, antimicrobien et insecticide des extraits. Il s'agit en quelque sorte d'**une méthode prédictive qui permet d'évaluer le potentiel de certains extraits.**

Dans un premier temps, le potentiel **antimicrobien et antioxydant** des huit échantillons de chanvre (VB-FLP-P1-P5 = fractions purifiées du chanvre 2023, Uso, Santhica et Bialobrzeskie = extraits 2024) et six échantillons de silphie (VBS) ont été évalués.

Les échantillons, préparés à une concentration de 5 mg/mL dans du DMSO, ont été testés avec les sets protéiques à raison de 400 µg dans un milieu réactionnel aqueux final.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Le comportement des protéines est observé à travers un gradient de température provoquant leur dénaturation au fil du temps. La température de dénaturation de chaque protéine est mesurée en présence des extraits et des témoins. Les résultats sont ensuite analysés statistiquement par une analyse en composante principale (ACP) suivie d'une clusterisation hiérarchique ascendante à l'aide de la fonction FactoMineR du logiciel R.

La clusterisation hiérarchique ascendante réalisée identifie six clusters basés sur l'interaction entre les échantillons et les protéines.

- Le cluster 1 regroupe les témoins solvant DMSO et les témoins internes OR et H, montrant une faible réactivité.
- Le cluster 5 contient les extraits VBS-21 et VB-FLP-P1, avec une forte réactivité, indiquant un fort potentiel antimicrobien.
- Les échantillons VB-FLP-P5, VB-FLP-P3 et VB-FLP-P2, dans le cluster 4, montrent également une forte réactivité, bien que leur composition semble différente de celle des échantillons du cluster 5.
- Le cluster 2 regroupe les échantillons VBS-29, VBS-19, VBS-25, VBS-27 et USO 31 T2, montrant une réactivité modérée, plus faible que les échantillons des clusters 4 et 5
- Le cluster 3 regroupe les échantillons Santhica, Bialobrzeskie, VBS-30, VB-FLP-Pol, et présente une réactivité intermédiaire, et légèrement plus élevée que les échantillons du cluster 2, suggérant également un potentiel antimicrobien.

Afin d'évaluer le **potentiel insecticide**, les mêmes échantillons analysés précédemment dans les mêmes conditions (400µg en milieu réactionnel aqueux final) ont été confrontés à un autre set protéique.

- Le groupe 1 comprend le témoin solvant DMSO et le témoin interne H, qui n'ont pas montré de potentiel intéressant.
- Le cluster 2 regroupe les échantillons VBS-25, VBS-19, VBS-29, VBS-27, VB-FLP-P1, VB-FLP-P-Pol, USO 31 T2 et le témoin interne F, qui interagissent principalement avec le système enzymatique fongique, suggérant une forte activité antibactérienne.
- Le cluster 3 inclut les échantillons VBS-21, VBS-30, VB-FLP-P2, Bialobrzeskie, ainsi que les témoins internes EV et MF, qui montrent une double fonctionnalité, à la fois antimicrobienne et insecticide.
- Le cluster 4, avec les échantillons Santhica, VB-FLP-P5 et le témoin interne OR, présente

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

également une double fonctionnalité plus marquée.

- Enfin, le cluster 5 regroupe un seul échantillon, VB-FLP-P3, qui montre un fort potentiel insecticide.

Afin de valider les prédictions in vitro, tant antimicrobiennes qu'insecticides, des expérimentations in vivo ont été réalisées sur différents organismes modèles. Pour la partie antimicrobienne, la capacité à inhiber la croissance de *Fusarium graminearum* (champignon pathogène de grande culture causant la fusariose du blé) a été évaluée pour les extraits de silphie, et de *Phanerochaete chrysosporium* (champignon dégradeur de bois) et *Staphylococcus aureus* (bactérie pathogène pour l'Homme) pour les extraits de silphie et de chanvre.

Test d'inhibition de croissance des microorganismes

Inhibition de croissance chez *Fusarium graminearum* (extraits de silphie)

Dans le but de valider le potentiel antimicrobien des extraits de silphie précédemment analysés, la capacité de ces derniers à inhiber la croissance du champignon pathogène *Fusarium graminearum*, a été évaluée.

Les extraits ont été ajoutés à une concentration finale de 1 mg/mL dans des conditions optimales de croissance (milieu riche Potato Dextrose Broth à 25°C), dans une suspension de 2000 spores. Les courbes de croissance sont présentées aux pages suivantes.

Les courbes de croissance et les données du tableau montrent que le solvant de travail (DMSO) n'affecte pas la germination des spores ni la croissance de *Fusarium graminearum*.

L'extrait VBS-29 présente un comportement de croissance biphasique : après une phase de croissance similaire aux contrôles et une phase de latence, les hyphes recommencent à croître, ce qui suggère une adaptation enzymatique du champignon, permettant l'utilisation de l'extrait comme source de carbone.

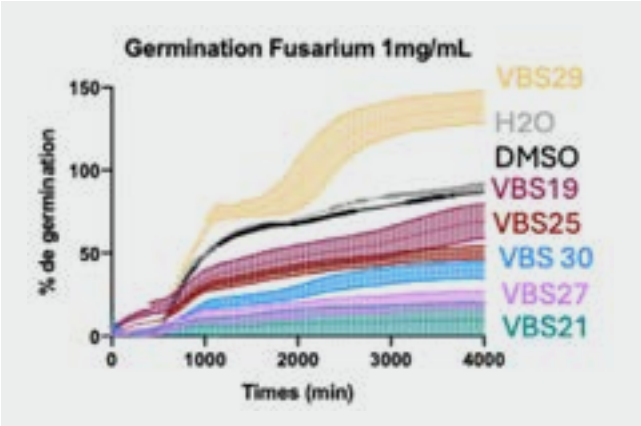
ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Les extraits VBS-19 et VBS-25 entraînent une faible à moyenne perte de biomasse, avec des diminutions de germination des spores respectivement de 8% et 25%. Ils ralentissent également la croissance du champignon.

En revanche, les extraits VBS-30, VBS-27 et VBS-21 montrent des taux d'inhibition plus importants de la germination des spores. L'extrait VBS-21 a l'effet le plus marqué, avec une perte de biomasse de 53% et une vitesse de croissance fortement réduite. VBS-27 suit avec une perte de biomasse de 46% et une croissance également freinée.

Enfin, l'extrait VBS-30, bien qu'il n'affecte pas la vitesse de croissance, réduit significativement la germination des spores (34%) et la croissance des hyphes.

Figure 29
Inhibition de la croissance de *F. graminearum* en présence des extraits à une concentration de 1 mg/mL final dans des conditions optimales de croissance (PDA 30°C).



Échantillons	% de perte de biomasse	Ecart type	Vitesse de croissance (umax)
DMSO	1	0,48	0,029366964
VBS 27	46	3,53	0,005094509
VBS 30	34	3,12	0,034854892
VBS 29	0	0	0,011429973
VBS 25	25	2,13	0,005787325
VBS 19	8	8,82	0,005450525
VBS 21	53	6,51	0,00637695

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Inhibition de croissance chez *Phanerochaete chrysosporium* (extraits de chanvre et silphie)

La capacité des extraits de chanvre et de silphie à inhiber la germination des spores et la croissance des hyphes du champignon dégradateur de bois *Phanerochaete chrysosporium* a également été évaluée.

Les extraits, à une concentration de 1 mg/mL, ont été ajoutés dans un milieu riche (1% Malt) à 25°C, dans une suspension de 2000 spores.

Les courbes de germination et de croissance des hyphes sont présentées en figure 30.

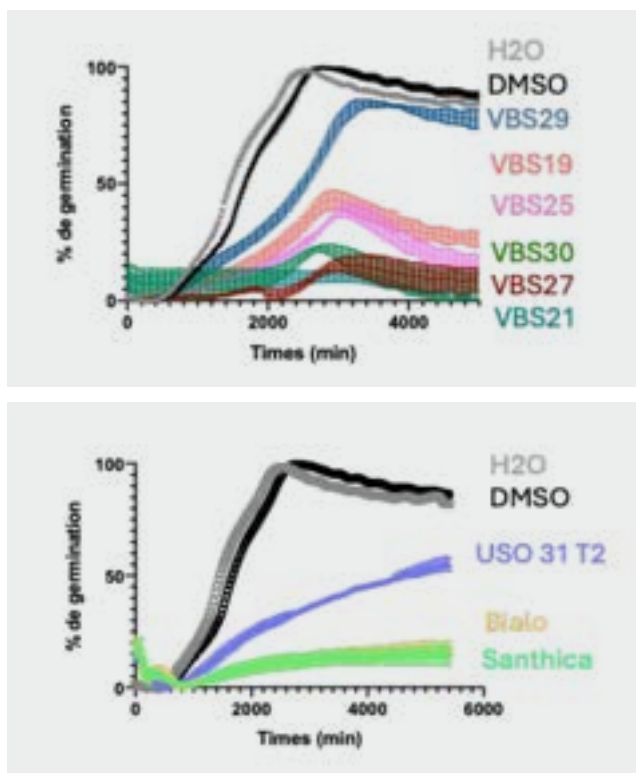
Concernant les extraits de silphie, l'extrait VBS-29 n'a que peu ou pas d'impact sur la germination et la croissance des spores de *Phanerochaete chrysosporium*. Les extraits VBS-19 et VBS-25 affectent de manière plus marquée la germination des spores, avec des pertes de biomasse respectives de 56 % et 61 %.

Enfin, les extraits les plus actifs, avec les pertes de biomasse les plus importantes, sont les extraits VBS-30, VBS-27 et VBS-21.

Ces trois extraits présentent des pertes de biomasse de 77%, 84% et 88 %, et ont également un fort impact sur les vitesses de croissance.

Figure 30

Inhibition de germination de *P. chrysosporium* en présence des extraits de silphie (graphique du haut) et de chanvre (graphique du bas) à une concentration de 1 mg/mL final dans des conditions optimales de croissance (Malt 1% 25°C).



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Les extraits de chanvre, en particulier Bialobrzeskie et Santhica, présentent respectivement des pourcentages de perte de biomasse de 79 % et 81 %.

En plus de provoquer une forte inhibition de la germination et de la croissance des hyphes de *Phanerochaete chrysosporium*, ces extraits impactent également de manière significative les vitesses de croissance.

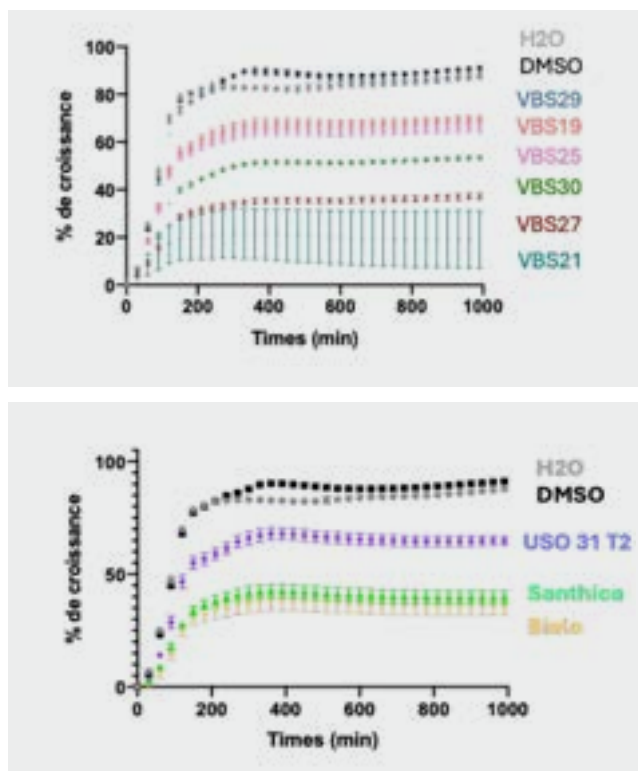
Quant à l'extrait USO 31 T2, bien qu'il affiche un pourcentage de perte de biomasse plus faible (44 %), il présente un potentiel intéressant en altérant également de manière marquée la vitesse de croissance du champignon.

Inhibition de croissance chez *Staphylococcus aureus* (extraits de chanvre et silphie)

La capacité des extraits à inhiber la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* a été évaluée. Les extraits ont été testés à une concentration finale de 0,5 mg/mL dans des conditions optimales de croissance, soit dans un milieu TSB (Trypto-caséine-soja) à une température de 30°C, avec une suspension cellulaire en phase exponentielle de croissance, sous agitation. Les courbes de croissance sont présentées en figure 31.

Figure 31

Inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* des extraits de silphie (graphique du haut) et de chanvre (graphique du bas) à une concentration de 0,5 mg/mL final dans des conditions optimales de croissance (Milieu TSB 37°C).



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Pour les différents extraits de silphie, les observations réalisées lors des précédentes expérimentations semblent se répéter. L'extrait VBS-29 a peu ou pas d'impact sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (seulement 2 % d'inhibition).

Les extraits VBS-19 et VBS-25 affectent plus notablement la croissance de la bactérie, avec des pertes de biomasse respectives de 25 % et 30 %.

Les extraits les plus actifs, avec les pertes de biomasse les plus élevées, sont les extraits VBS-30, VBS-27 et VBS-21.

Ces extraits présentent des pertes de biomasse de 47 %, 56 % et 60 %, avec un impact marqué sur les vitesses de croissance.

En ce qui concerne les extraits de chanvre, notamment Bialobrzeskie et Santhica, ces deux derniers présentent respectivement des pourcentages de perte de biomasse de 63% et 56%.

Pour l'extrait USO 31 T2, ce dernier comporte un pourcentage de perte de biomasse de 26 %.

Bien que comportant un pourcentage de perte de biomasse non-négligeable, il apparaît que cet extrait de chanvre présente le potentiel plus faible.

Les 3 extraits les plus efficaces, VBS-30, VBS-27 et VBS-21, sont les 3 extraits réalisés avec l'acétate d'éthyle comme solvant, contrairement aux 3 autres extraits réalisés avec l'éthanol comme solvant.

Cette hypothèse permettrait d'expliquer la faible activité de l'extrait VBS-19 dans les essais réalisés par l'Université de Liège dans la section précédente.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Évaluation des extraits à potentiel insecticide sur larves de coléoptères

L'objectif de cette étape est de confirmer les résultats du test Bioshift réalisé précédemment pour les extraits Bialobrzeskie, Santhica, USO 31 T2, VB-FLP-P2, VB-FLP-P3 et VB-FLP-P2.

Pour ce faire, l'effet de 0,5 mg de chaque extrait est évalué sur des larves de coléoptères âgées de 4 à 5 semaines, placées dans des boîtes de Pétri contenant une base nutritive.

Chaque test inclut 40 larves par boîte, avec 3 boîtes par condition. Des témoins sont également inclus (agar, solvant, éthanol).

Les échantillons sont déposés en surface des boîtes et laissés à évaporer sous une hotte, ne conservant que les résidus secs.

En plus du témoin solvant (EtOH) et du support alimentaire (agar), trois témoins internes sont utilisés pour suivre d'éventuelles dérives du test ou comportements anormaux des larves (figure 51). Deux extraits, Ctr G (forte activité insecticide) et Ctr OR (activité modérée), sont évalués à cet effet.

Figure 32

Représentation schématique du protocole du test larves



Figure 33

Photographie à J0 des boîtes contenant les larves en présence des échantillons



L'impact du Thiametoxam, insecticide commercial, sur la viabilité des larves est également mesuré.

Les témoins internes montrent des résultats cohérents, permettant l'exploitation des données sur les extraits à potentiel à confirmer.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

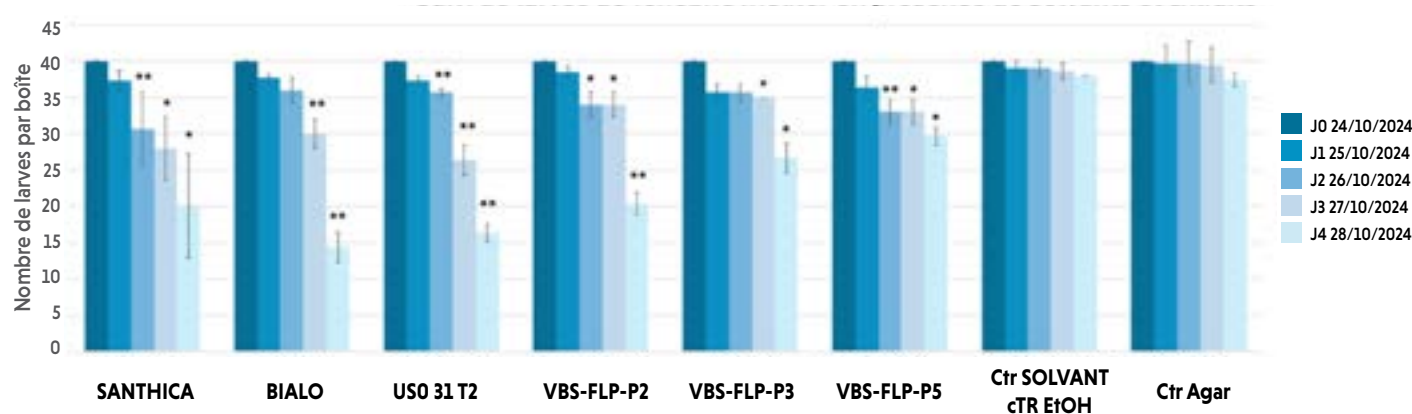
Un test statistique (test de Student) est effectué pour comparer la survie des larves exposées aux extraits Santhica, Bialobrzeskie, Uso 31 T2, VB-FLP-P2, VB-FLP-P3 et VB-FLP-P5 par rapport au témoin solvant (Ctr EtOH, figure 34). Les différences significatives sont indiquées par des étoiles (*, **, ***), selon les p-values (0,05, 0,01 et 0,001).

L'étude statistique entre Ctr Agar et Ctr EtOH ne montre aucune différence, indiquant que le solvant n'affecte pas la viabilité des larves. **L'extrait Santhica provoque une mortalité significative à partir de J2. Pour Bialobrzeskie, la mortalité devient significative à partir de J3, avec une p-value de 0,01. L'extrait Uso 31 T2 montre également une mortalité significative à partir de J2 (p-value de 0,01).**

Concernant les fractions VBS-FLP-P2, VBS-FLP-P3 et VBS-FLP-P5, elles présentent toutes une activité insecticide, mais semblent moins efficaces que les extraits non fractionnés de chanvre. La fraction VBS-FLP-P3 cause une mortalité significative à partir de J3. La fraction VBS-FLP-P5 entraîne une mortalité significative dès J2. Enfin, la fraction VBS-FLP-P2 montre la plus grande activité, avec des taux de mortalité significatifs dès J2.

Pour rappel, les fractions VBS-FLP-P2, VBS-FLP-P3 et VBS-FLP-P5 sont particulièrement riches, respectivement, en CBDA, CBG, et CBD. Ces extraits provenant des fractions purifiées sont potentiellement moins efficaces que les extraits bruts du fait de l'absence d'autres molécules, ce qui laisse suggérer l'importance de l'effet cocktail des différentes familles de molécules.

Figure 34
Protocole suivi afin d'identifier les molécules porteuses de fonctions biologiques



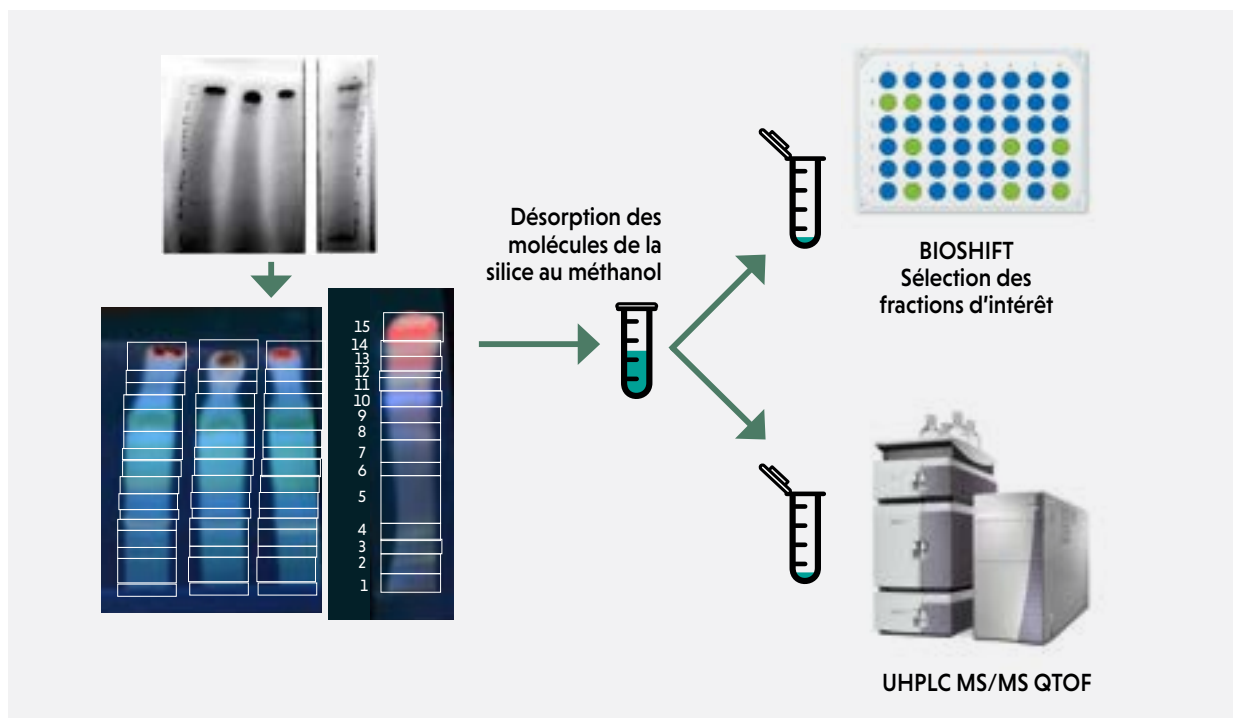
ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Fractionnement des extraits chanvre et silphie par HPTLC et bioguidage par la technologie Bioshift

Dans le but d'identifier les molécules responsables des activités antimicrobiennes et insecticides des trois extraits de chanvre et d'un extrait de silphie (le plus prometteur, VBS-21), les étapes suivantes ont été réalisées: (1) fractionnement des quatre extraits par HPTLC, (2) désorption des molécules de la plaque de silice pour les soumettre à la technologie Bioshift, et (3) après identification des fractions d'intérêt, analyse par HPLC-MS/MS.

Figure 35

Protocole suivi afin d'identifier les molécules porteuses de fonctions biologiques



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Fractionnement par HPTLC

Le fractionnement des extraits par HPTLC (High-Performance Thin Layer Chromatography) est illustré en figure 54. 200 µg de chaque échantillon, préalablement dissous dans du méthanol pur à une concentration de 10 mg/mL, ont été déposés sur une plaque de silice 60 F254nm (Merck).

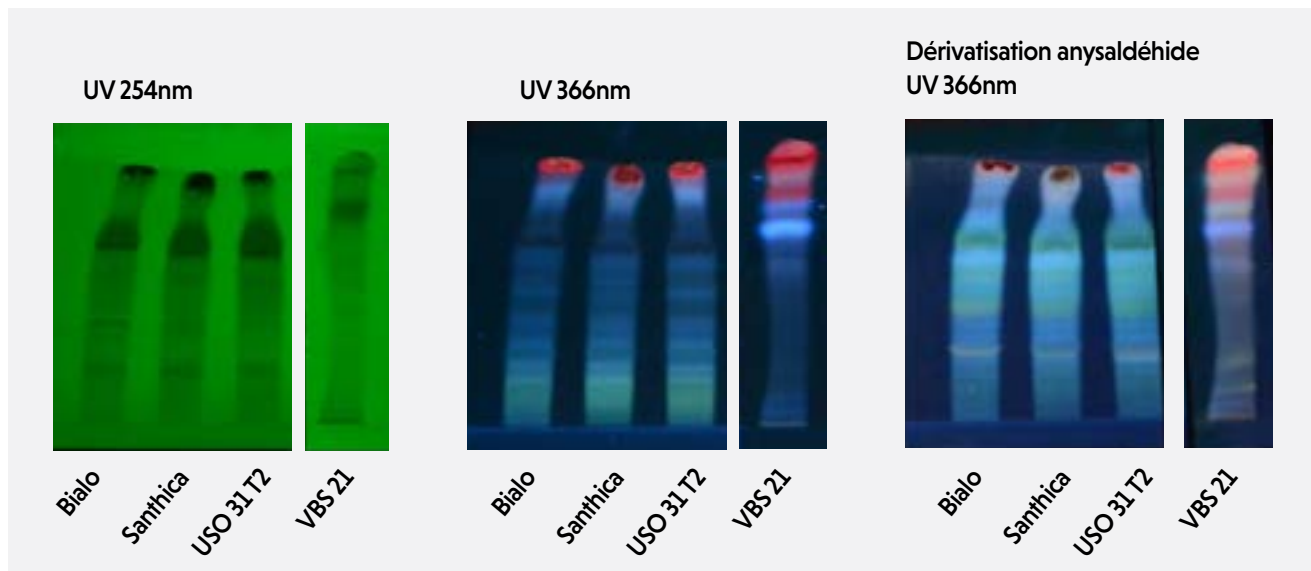
La phase mobile utilisée était composée d'hexane, d'acétate d'éthyle, de méthanol,

d'acide formique et d'acide acétique dans les proportions 2/5/2/2/2.

Après séparation, les molécules présentes dans les extraits ont été révélées par excitation à 254 nm et 366 nm, en plus d'une dérivation au p-anisaldéhyde pour mettre en évidence divers composés comme les stérols, flavonoïdes, terpènes et autres composés phénoliques.

Figure 36

Fractionnement des extraits de chanvre et de l'extrait de silphie VBS-21



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Désorption des molécules de la plaque de silice

Les molécules présentes au sein de ces différentes fractions ont été désorbées à l'aide de 500µL de méthanol sous agitation durant 30 minutes à température ambiante.

La silice a ensuite été éliminée par centrifugation (10 minutes 13.400 rpm) puis le méthanol a été évaporé afin de récupérer les molécules issues de ce fractionnement HPTLC sous une forme de matière sèche. Une partie de ces fractions a été confrontée à notre technologie Bioshift dans le but d'identifier les fractions réactives (graphique en figure 55).

Les fractions issues de l'extrait Bialobrzeskie montrent une forte réactivité des fractions 11, 14 et 16 pour le système fongique (courbe rouge) et une activité intéressante contre l'insecte (courbe verte) pour les fractions 3, 5 et 12.

Pour l'extrait Santhica, les fractions 8 et 14 sont actives contre le champignon, tandis que les fractions 5 et 6 affectent spécifiquement l'insecte. La fraction 16 interagit avec les deux systèmes.

Concernant l'extrait Uso 31 T2, les fractions 4, 14 et 16 agissent sur les deux systèmes enzymatiques, tandis que la fraction 11 est plus spécifique au système insecte.

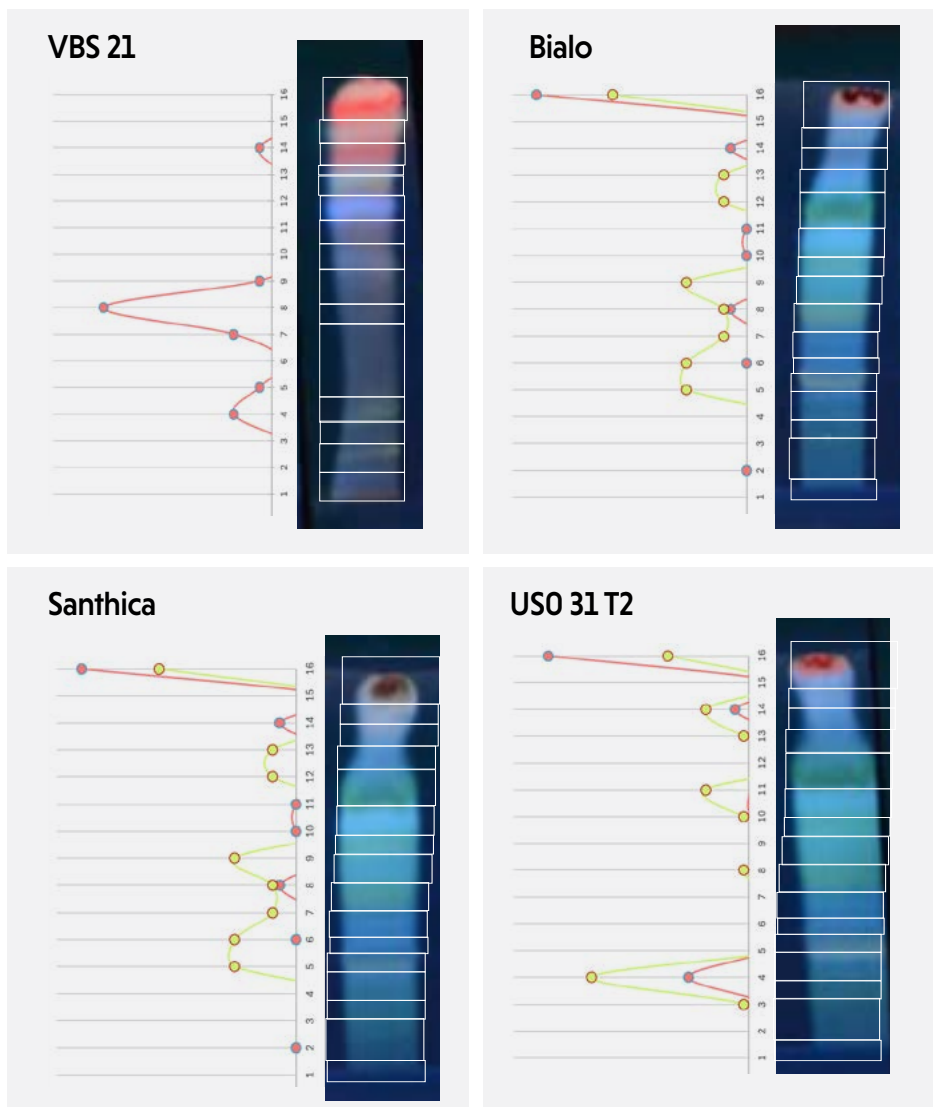
Enfin, pour l'extrait VBS-21, l'analyse fongique met en évidence une réactivité des fractions 4, 7 et 8.

Les fractions identifiées comme réactives ont ensuite été analysées par HPLC-MS/MS à l'institut de chimie des substances naturelles (ICSN) de l'Université Paris-Saclay.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Figure 37

Fractionnement des extraits de chanvre et de l'extrait de silphie VBS-21 suivi de la désorption des molécules sur plaque de silice et suivi des fractions réactives par Bioshift.



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Identification des fractions d'intérêt et analyse par HPLC-MS/MS

Afin d'identifier les familles de molécules responsables des activités antimicrobiennes (extraits Bialobrzieskie, Santhica, Uso 31 T2 et VBS-21) et insecticides (extraits Bialobrzieskie, Santhica, Uso 31 T2), les données d'HPLC-MS/MS ont été intégrées à un réseau moléculaire de l'extractothèque de Profilia, regroupant 26.400 molécules.

Ce réseau permet l'identification des familles moléculaires présentes dans les fractions HPTLC en fonction de la similarité des spectres de fragmentation. **Les résultats sont résumés aux pages suivantes**

De manière générale, les fractions contiennent principalement des composés lipidiques (acides gras, glycérides, stérols).

Pour l'extrait Bialobrzieskie, les molécules antimicrobiennes appartiennent aux familles des acides coumariques, terpènes, flavonoïdes et alcaloïdes.

Les molécules insecticides incluent des isoflavonoïdes, lignanes, flavonoïdes et alcaloïdes phénoliques.

Dans l'extrait USO 31 T2, les molécules antimicrobiennes sont principalement des polyphénols glycosylés ou non, des alcaloïdes tricycliques ou phénoliques, des lactones, des flavonoïdes et des terpènes. Pour les composés insecticides, des coumarines et des dérivés ribonucléosidiques sont également présents.

L'extrait Santhica présente des molécules antimicrobiennes telles que des monoterpènes alcaloïdes, des terpènes glycosylés, des acides carboxyliques et des flavanols.

Les molécules insecticides sont principalement des lignanes, monoterpènes, triterpènes glycosylés et alcaloïdes phénoliques ou non.

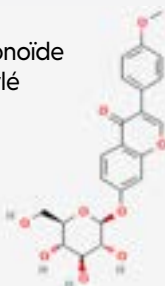
Enfin, pour l'extrait VBS-21 (silphie), l'activité antimicrobienne semble être due à des molécules monophénoliques, des isoflavonoïdes glycosylés, des monoterpènes glycosylés, des isoflavones, des catéchines et des alcaloïdes.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

VBS 21 Fractions fongicides

Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits de silphie VBS-21

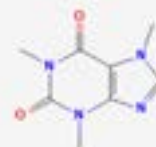
Isoflavonoïde
glycosylé



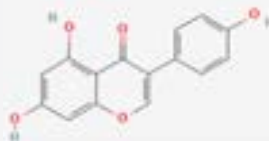
Stérole



Alcaloïde



Isoflavone catéchine



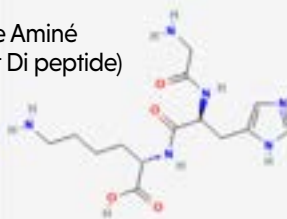
Lipide / acide gras



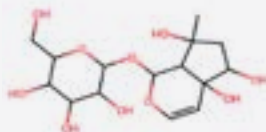
Monoterpène



Acide Aminé
(Tri et Di peptide)



Monoterpène
glycosylé



Monophénole



Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions fongicides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Bialobrzeskie

CCCCCCCC(=O)O

The chemical structure of estradiol is shown, consisting of four fused rings (three six-membered and one five-membered) with various functional groups, including a hydroxyl group at C3 and a ketone at C17.

CC1(C)CC2=C(C(=O)C3=CC=CC=C3C(=O)C2)OC1CCN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2CO=C(O)c1ccc(O)cc1Cc1cc2c(c1)oc(=O)c2=O

Terpènes glycosylés iridoïdes

Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions insecticides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Białobrzeskie

CCCCCCCC(=O)OOc1ccc(cc1)/C=N/c2ccc(O)cc2/C=C/c3c(O)c(O)c(O)c(O)c3O=C1C=CC2=C(C=C1)C=CC=C2

molécules
biologiques



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Santhica Fractions Fongicides

Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions fongicides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Santhica.

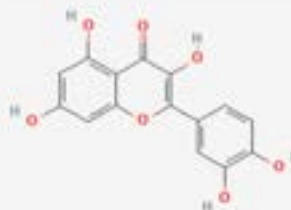
Lipide / acide gras



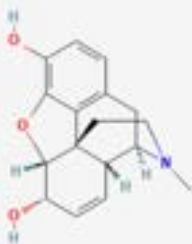
Acide carboxylique



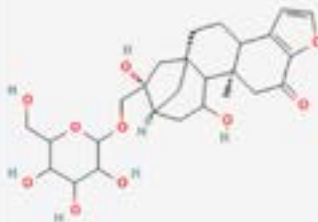
Flavonol



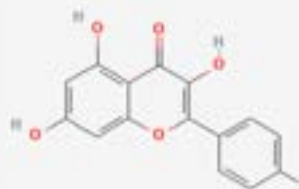
Monoterpène
alcaloïde



Terpènes glycosylés



Flavonoïdes



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

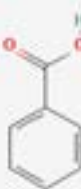
Santhica Fractions Insecticides

Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions insecticides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Santhica.

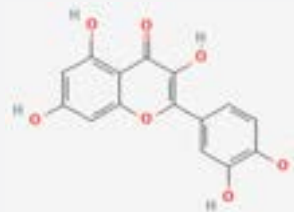
Lipide / acide gras



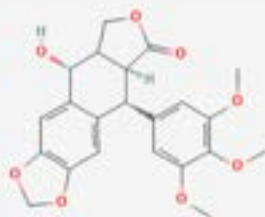
Acide carboxylique
aromatique



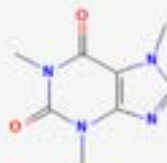
Flavonol



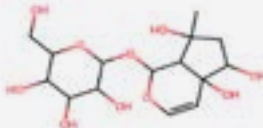
Lignanes



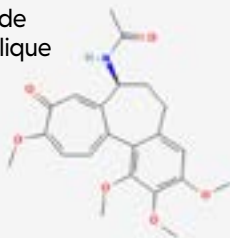
Alcaloïde



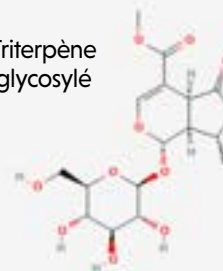
Monoterpène
glycosylé



Alcaloïde
phénolique



Triterpène
glycosylé



ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

USO 31 T2 Fractions Fongicides

Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions fongicides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Uso 31.

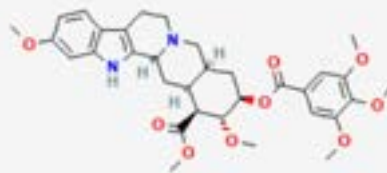
Lipide / acide gras



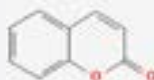
Acide carboxylique
aromatique



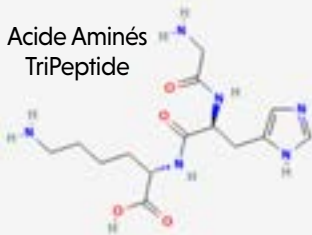
Alcaloïde tricyclique



Coumarines



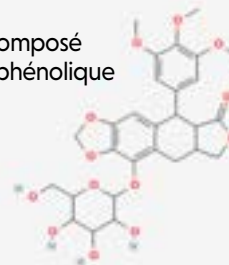
Acide Aminés
TriPeptide



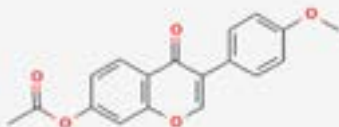
Terpène
glycosylé
iridoïde



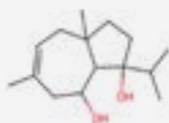
Composé
polyphénolique



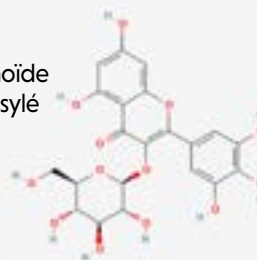
Dérivée de flavonoïde



Sesquiterpène



Flavonoïde
glycosylé



Récapitulatif des familles moléculaires majoritairement identifiées au sein des fractions insecticides identifiées comme portant les fonctions biocides au sein des extraits Uso 31.

CCCCCCCC(=O)OO=C(O)c1ccccc1O=C1C=CC2=C(C=C1)C=CC=C2

glycosylé

CCCCc1ccc(OC)c(OC)c1O=C1NC(=O)C2=C1C(=O)N(C2)C3=CC=CC=C3

monoterpène
glycosylé

CC(=O)Oc1ccc2c(c1)c3cc(OC)ccc3c2=O

O=C(c1ccc(O)cc1)C(=O)c2ccc(O)cc2

Lactone

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES ET IDENTIFICATION DE MOLÉCULES ACTIVES

Conclusion

- **Potentiel antimicrobien confirmé** in vivo pour les extraits de chanvre et de silphie VBS-30, VBS-27 et VBS-21

Les analyses in vitro de prédiction de l'activité antimicrobienne via la technologie Bioshift ont été confirmées in vivo. Les extraits de chanvre Bialobrzieskie et Santhica montrent un fort potentiel antimicrobien, avec des taux d'inhibition de croissance élevés contre le champignon pathogène *Fusarium graminearum*, le champignon lignivore *Phanerochaete chrysosporium*, ainsi que la bactérie gram + *Staphylococcus aureus*. L'extrait Uso 31 T2, bien que moins actif, présente également une activité antimicrobienne intéressante contre ces trois microorganismes.

Concernant les extraits de silphie, VBS-30, VBS-27 et VBS-21 affichent des taux d'inhibition de croissance supérieurs à 30% contre les trois microorganismes testés. Ces tests confirment donc que l'extrait VBS-19, utilisé dans les essais du Laboratoire de Phytopathologie de l'ULiège ne semble pas posséder de fonction antimicrobienne importante.

- **Potentiel insecticide confirmé** in vivo pour les extraits de chanvre et fractions purifiées VBS-FLP-P2, VBS-FLP-P3, et VBS-FLP-P5

Les prédictions d'activité insecticide basées sur Bioshift ont également été confirmées in vivo.

Les extraits de chanvre Bialobrzieskie, Santhica et Uso 31 T2 montrent une activité insecticide modérée. Les taux de mortalité des larves de coléoptère sont significativement différents du témoin à partir de J2 ou J3. De même, les fractions VBS-FLPP2, VBS-FLP-P3 et VBS-FLP-P5 présentent une activité insecticide tardive, significativement différente de la condition contrôle à partir de J2.

- **Identification des familles moléculaires portant les activités biocides**

Le fractionnement suivi d'une analyse détaillée des fractions porteuses des fonctions biocides a été réalisé pour les extraits de chanvre Bialobrzieskie, Santhica et Uso 31 T2, ainsi que pour l'extrait VBS-21 de silphie. Les familles moléculaires responsables de l'activité antimicrobienne dans les extraits de chanvre incluent des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes), des flavonoïdes (isoflavonoïdes, flavanols, flavones), des composés phénoliques (polyphénols, monophénols), des lactones et des alcaloïdes. Pour l'activité insecticide, des lignanes, des alcaloïdes phénoliques et glycosylés, des dérivés ribonucléosidiques et des chalcones sont également impliqués.

L'extrait VBS-21 présente des monoterpènes glycosylés ou non modifiés, des flavonoïdes (isoflavonoïdes glycosylés, isoflavones, catéchines) et des alcaloïdes comme principales molécules antimicrobiennes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le projet ExtraWal a permis de comparer les compositions chimiques et les propriétés biologiques d'extraits de chanvre et de silphie. Les résultats obtenus à travers l'analyse des extraits, leur activité biologique, et leur efficacité contre des pathogènes fongiques ont offert un aperçu précieux de leur **potentiel en tant que ressources naturelles pour la lutte contre les maladies des plantes**.

Les analyses portant sur le chanvre ont révélé un fort potentiel antimicrobien et insecticide.

En particulier, les extraits des variétés Ferimon, Felina, Tygra et Santhica ont démontré une efficacité contre le pathogène *Phytophthora infestans*, tant en utilisation préventive qu'en curative. Les variétés Bialobrzeskie, Santhica et Uso 31, qui ont montré des taux d'inhibition significatifs contre d'autres microorganismes, incluant *Fusarium graminearum*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Staphylococcus aureus*.

Ces extraits ont également révélé une activité insecticide modérée, avec des taux de mortalité des larves de coléoptères significativement différents du témoin.

Les composés responsables de ces effets incluent des terpènes, flavonoïdes et alcaloïdes, ce qui suggère une large gamme d'applications possibles dans la gestion des maladies et des nuisibles.

Les analyses sur la silphie ont permis de mettre en évidence ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, bien que des résultats plus nuancés aient émergé. Certains extraits de silphie (notamment VBS-30, VBS-27 et VBS-21) présentent une activité antimicrobienne contre des pathogènes fongiques, bien que ces effets restent modérés. Cependant, l'extrait VBS-19, utilisé dans les essais in vitro, n'a pas montré d'efficacité significative contre les pathogènes fongiques, ce qui suggère que tous les extraits de silphie ne possèdent pas la même activité.

Le solvant d'extraction semble jouer un rôle important dans l'efficacité des extraits.

En conclusion, ExtraWal a mis en évidence que **tant le chanvre que la silphie possèdent des propriétés intéressantes pour des applications biocides, avec des activités antimicrobiennes et insecticides prometteuses**. Cependant, leur efficacité varie en fonction des extraits, des concentrations et des pathogènes ciblés.

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour optimiser les méthodes d'extraction et de formulation, ainsi que pour évaluer le potentiel de ces plantes dans des conditions réelles de culture et de lutte contre les maladies et nuisibles.

**Des questions?
Un projet?
Contactez-nous!**

valbiom

Info@valbiom.be
www.valbiom.be
081/84 58 87



JE REFAIS
LE TOUR DU
DOCUMENT

Avec le soutien du Plan de Relance de la Wallonie

