

## Alternative au glyphosate:

sélection d'écotypes allélopathiques et peu concurrentiels pour une maîtrise durable et écologique des adventices en viticulture et arboriculture

## Rapport final



Nicolas Delabays<sup>1</sup>, Matteo Mota<sup>2</sup>, Umberto Piantini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut Terre-Nature-Environnement, HEPIA, HES-SO

<sup>2</sup>Institut Technologies du vivant, HEVS, HES-SO

<sup>3</sup>Institut de Viticulture et d'œnologie, Changins, HES-SO

## Résumé

Actuellement, la maîtrise des adventices en viticulture et en arboriculture repose encore majoritairement sur l'utilisation d'herbicides, principalement de glyphosate. L'entretien du rang de culture (cavaillon), en particulier, représente un véritable défi technique. Parmi les alternatives possibles à l'utilisation d'herbicides figure l'installation d'une couverture végétale, peu compétitive vis-à-vis de la culture, mais néanmoins capable de se maintenir et de maîtriser le développement d'une flore spontanée agressive. Le projet NOGLYPHOS a visé la sélection d'espèces et d'écotypes, peu concurrentiels et allélopathiques, à même d'être utilisés pour l'établissement de ces couverts végétaux, y compris sur le cavaillon.

Un des premiers acquis du projet est le développement de biotests consolidés, tant pour la détection rapide de plantes présentant des propriétés phytotoxiques (biotest de *screening*), que pour la détection des molécules impliquées dans des extraits de plus en plus purifiés (micro-biotest).

L'application de ces biotests a permis de sélectionner plusieurs espèces potentiellement très fortement allélopathiques : *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*, *Origanum vulgare*. Pour *M. lupulina*, une variation significative, d'origine génétique (héritabilité au sens large), a été mise en évidence à l'intérieur de l'espèce concernant ces propriétés phytotoxiques ; cette observation ouvre des perspectives prometteuses pour la sélection de lignées améliorées, c'est-à-dire particulièrement allélopathiques.

Trois espèces – *B. tectorum*, *C. vulgare* et *M. lupulina* - ont fait l'objet d'analyses phytochimiques approfondies, en vue de la description des molécules impliquées dans les effets phytotoxiques observés lors de l'application des biotests. Ces analyses ont permis de déterminer les 3 composés actifs principaux de *B. tectorum* (l'acide chlorogénique, un cynaroside ou une lutéoline glycosylée, et une quercétine). Des indications ont également été rassemblées concernant les molécules actives de *C. vulgare* (l'acide chicorique ou un de ces dérivés, ainsi que la lutéoline-7-o-glucuronide ou la thermoposide). La connaissance des molécules impliquées, outre qu'elle offre des perspectives pour le développement de lignées particulièrement allélopathiques, va permettre de préciser la dynamique saisonnière de leur production dans la plante, et donc d'optimiser sa gestion au champ (régime de fauches par exemple, en vue de la production d'un mulch particulièrement allélopathique).

A cet égard, l'étude au champ de la gestion (intensité du régime de fauches) d'une collection d'espèces et d'écotypes, ainsi que leurs traits fonctionnels, nous permet de proposer aujourd'hui un mélange, optimal pour la couverture du cavaillon, composé des 3 espèces suivantes : *B. tectorum*, *M. lupulina* et *Arenaria serpyllifolia*. Ces plantes, en association, se sont révélées particulièrement efficaces et complémentaires pour les premières phases d'installation d'un couvert. *C. vulgare* et *O. vulgare* se sont pour leur part imposées seulement durant la deuxième saison qui a suivi le semis. Ces 2 espèces ont par ailleurs un potentiel de concurrence plus élevé, et sont donc moins adaptées à un semis sur le rang de culture. Elles présentent toutefois un intérêt potentiel pour la couverture des inter-rangs de cultures mécanisables, car les différentes variantes de fauches ont mis en évidence une importante plasticité phénotypique (accommodats) : ces espèces se développent au ras du sol lorsqu'elles sont régulièrement fauchées. Elles présenteraient dès lors l'intérêt de limiter, par allélopathie et par la couverture du sol, le développement d'adventices indésirables.

Actuellement, plusieurs écotypes de *M. lupulina* ayant présenté des caractéristiques morphologiques et allélopathiques prometteuses sont en phase de production à grande échelle. Plus généralement, les connaissances acquises, ainsi que le matériel sélectionné, dans le cadre du projet NOGLYPHOS vont directement bénéficier au projet national VIGNE-SOL, consacré aux techniques innovantes d'entretien du sol en viticulture, initié cette année (2021).

# 1. Introduction

Les adventices des cultures (mauvaises herbes) génèrent des pertes de récoltes considérables, plus importantes même que celles dues aux maladies et aux ravageurs (Oerke 2006). Dans de nombreux cas, elles sont également à l'origine de la perte de qualité de la récolte et des produits alimentaires qui en sont issus : effets de la compétition hydro-azotée, contaminations directes, hôte de contaminants biologiques. Depuis plusieurs décades, ces pertes quantitatives et qualitatives provoquées par la flore adventice sont limitées par l'utilisation généralisée d'herbicides de synthèse. Ces applications massives et régulières d'herbicides sont cependant à l'origine de nombreux problèmes, dont l'acuité va croissante, en Suisse également : contamination des eaux souterraines et de surface, développement et dissémination de biotypes d'adventices résistants, perte de biodiversité dans les agroécosystèmes, présence de résidus dans les denrées alimentaires.

Ces problèmes, accompagnés de pressions sociétales croissantes, provoquent un urgent besoin de nouvelles stratégies et méthodes de maîtrise des mauvaises herbes, plus écologiques et durables. Les méthodes alternatives classiques, telles que la lutte mécanique ou le brûlage, outre le fait qu'elles ne sont elles-mêmes pas exemptes de défauts – forte consommation d'énergies fossiles, risques d'érosion des sols, baisse des taux de matières organiques du sol – offrent par ailleurs des efficacités aléatoires. De fait, la crainte d'une perte de maîtrise des adventices est un des éléments majeurs qui limite la conversion des agriculteurs à un mode de production biologique (= sans intrants de synthèse) dans notre pays, voire justifie un retour à des méthodes conventionnelles.

Dans les cultures spéciales pérennes comme la viticulture, l'arboriculture, la culture de baies et les pépinières, l'entretien du rang de culture – soit la ligne sur laquelle sont plantées les cultures (cavaillon) – reste le principal défi pour une gestion sans herbicides (figure 1). Leur utilisation constitue généralement la solution la plus facile à mettre en œuvre et la moins coûteuse. Aujourd'hui, dans la quasi-totalité des parcelles, c'est le glyphosate qui est majoritairement utilisé à cette fin ; le pesticide le plus utilisé au monde et dont l'interdiction à terme n'est pas exclue, voire probable.



Figure 1. En viticulture comme dans les autres cultures spéciales pérennes, le rang de culture, ou cavaillon (en jaune), est une zone dont l'entretien est plus difficile que l'inter-rang (en bleu).

Parmi les méthodes innovantes prometteuses figure l'utilisation des phénomènes d'allélopathie (Mushtaq *et al.* 2020) : de nombreuses espèces végétales synthétisent, et relâchent dans l'environnement des métabolites secondaires capables d'inhiber la germination et la croissance de plantes avoisinantes. Parmi les applications concrètes possibles de ce phénomène figure l'installation, y compris sur le rang de culture, d'un enherbement allélopathique dans les cultures spéciales pérennes. Une meilleure compréhension de ce phénomène et des molécules impliquées peut contribuer à résoudre une des principales difficultés rencontrées dans l'installation d'un enherbement

sur le cavaillon : celui-ci doit être pérenne et permettre une bonne maîtrise de la flore adventice agressive, tout en restant peu vigoureux et peu concurrentiel vis-à-vis de la culture.

Ce projet vise donc à la sélection ciblée d'espèces, voire d'écotypes, sur la base de leurs propriétés allélopathiques, de leurs traits morphologiques (habitus nanisant et/ou rampant) et phénologiques (cycle décalé par rapport à la vigne) et de leur métabolisme (taux de croissance), pour l'installation d'une couverture pérenne et peu concurrentielle.

## 2. Rappel des objectifs du projet

Ce projet s'inscrit dans le développement d'une alternative concrète, innovante et commercialisable à l'utilisation d'herbicides de synthèse et en particulier au plus controversé d'entre eux : le glyphosate. Ceci contribuera à une production écologique et durable de denrées alimentaires saines et de bonne qualité organoleptique. Plus précisément, il vise au remplacement de l'utilisation d'herbicides dans les cultures spéciales pérennes (viticulture, arboriculture, cultures de baies, pépinières). Concrètement, il s'agit de repérer, caractériser et sélectionner des espèces végétales et leurs écotypes, adaptés à une culture sur le cavaillon et synthétisant des composés phytotoxiques. Ces plantes sont destinées à être utilisées comme couverture permanente en parcelles cultivées, dans le but d'assurer une maîtrise des adventices indésirables sans utilisation d'herbicides de synthèse.

Le projet est décomposé selon les objectifs et étapes suivants :

1. Sélection de plantes adaptées à une couverture du cavaillon : établissement d'une collection d'espèces et d'écotypes indigènes, mise en culture et mesure de leurs traits fonctionnels (morphologie phénologie, physiologie) et services écosystémiques.
2. Développement et optimisation de biotests *in vitro* : repérage d'espèces potentiellement allélopathiques (biotests de *screening*) et confirmation des effets phytotoxiques d'extraits végétaux purifiés, voire de molécules isolées (micro-biotests).
3. Application des biotests aux espèces de la collection, ainsi qu'à d'autres espèces de la flore indigène susceptibles d'être intégrées dans des mélanges destinés à l'enherbement des cultures spéciales pérennes, y compris sous le rang de culture.
4. Elaborer des extraits liquides des espèces ayant présenté un effet positif lors des biotests.
5. Séparer par chromatographie haute performance les phytoactifs impliqués dans les effets phytotoxiques mis en évidence dans les biotests, les caractériser par spectrométrie de masse et, si un effet allélopathique significatif est observé, en isoler une quantité suffisante pour l'identification structurale par RMN.
6. Déterminer la variabilité génétique (héritabilité au sens large) des propriétés phytotoxiques des espèces repérées dans le cadre de l'application des biotests, ainsi que de leurs teneurs en métabolites secondaires allélopathiques (variabilité intra- et inter-population des collections rassemblées) : une information nécessaire à l'intéressement de partenaire industriels (semenciers).

### 3. Parties expérimentales

#### 3.1 Pré-sélection des espèces étudiées

Au départ du projet NOGLYPHOS, de nombreuses observations avaient déjà été rassemblées sur des espèces potentiellement prometteuses pour l'enherbement des vignes et des vergers (Delabays *et al.* 2000, Delabays *et al.* 2016, Delabays 2020) ; et pour plusieurs d'entre elles, la présence de propriétés allélopathiques avait déjà été suggérée (Delabays *et al.* 2006, Delabays *et al.* 2009). Ainsi, une première sélection d'espèces prometteuses avait été établie sur la base d'observations floristiques effectuées dans le cadre d'un essai de comparaison de couverts viticoles (*tableau 1*) (Delabays *et al.* 2016). Puis un mélange viticole pilote a été élaboré et testé durant 3 ans, dans un réseau de parcelles (Delabays 2020). Plusieurs espèces ont confirmé leur intérêt pour un enherbement optimal des inter-rangs (*Achillea millefolium*, *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Lotus corniculatus*, *Medicago lupulina*, *Poa compressa*, *Prunella vulgaris*) ; et certaines d'entre elles (*B. tectorum*, *C. vulgare*, *M. lupulina*, *P. vulgaris*) ont présenté des caractéristiques (habitus nanisant ou traçant) permettant d'envisager leur utilisation pour la couverture sur le rang de culture (cavaillon).

*Tableau 1. Evaluation agronomique et environnementale - biodiversité fonctionnelle et conservation - d'espèces destinées à l'enherbement des cultures spéciales pérennes lémaniques (Delabays et al. 2016)*

espèces	Critères agronomiques		Biodiversité fonctionnelle	Enjeu de protection	Remarques (slr: utilisation sur le rang de culture)
	Pérennité	vigueur			
<b>Espèces du mélange pilote</b>					
<i>Achillea millefolium</i>	+++	++	+++		
<i>Agrostis capillaris</i>	++	++	+		
<i>Bellis perennis</i>	++	+++	++		
<i>Bromus tectorum</i>	+	++	+++		
<i>Lotus corniculatus</i>	+++	++	+++	(+++)	<i>L. maritimus</i> (GE)
<i>Medicago lupulina</i>	++	++	+++		slr
<i>Mentha arvensis</i>	+	++	++		
<i>Origanum vulgare</i>	++	+++	++		
<i>Pimpinella saxifraga</i>	++	++	+++		
<i>Poa compressa</i>	+	++	++		
<i>Potentilla. verna</i>	++	+++	+++		slr
<i>Prunella vulgaris</i>	+++	++	+++		slr
<i>Sanguisorba minor</i>	+++	+	++		
<i>Thymus pulgioides</i>	+	+++	+++		
<i>Veronica chamaedrys</i>	+++	+++	+		slr
<b>Espèces complémentaires proposées</b>					
<i>Althea hirsuta</i>	+	+	+++	+++	
<i>Anthyllis vulneraria</i>	+	++	+++	(++)	<i>ss carpatica</i> (GE)
<i>Calendula arvensis</i>	+	++	+++	+++	
<i>Geaga vilosa</i>	+	++	+++	+++	
<i>Fragaria viridis</i>	++	++	++	+++	slr
<i>Medicago falcata</i>	+	++	+++	+++	Protection (Genève)
<i>Medicago minima</i>	+	+++	+++	+++	slr
<i>Ononis natrix</i>	+	++	+++	+++	Protection (Genève)
<i>Teucrium chamaedrys</i>	+++	+++	++	++	slr
<i>Teucrium montanum</i>	+	+++	++	+++	Protection (Genève)
<i>Thymus praecox</i>	+	+++	+++	++++	
<i>Trifolium dubium</i>	+	++			
<i>Trifolium pratensis</i>	+	++			

## 3.2. Développement et applications de biotests

L'allélopathie est donc un des volets de l'interférence entre plantes, celui qui se réalise par l'intermédiaire de molécules chimiques, généralement des métabolites secondaires ; l'autre concerne la compétition proprement dite pour les ressources de l'environnement (lumière, eau, nutriments). Pratiquement, et même expérimentalement, il est souvent difficile de distinguer ces 2 volets (en situations réelles, naturelles ou agricoles, ils agissent généralement de concert).

De nombreux biotests ont été développés pour étudier les propriétés allélopathiques d'une plante : ils visent généralement à mettre en évidence les effets phytotoxique de la plante, de certains de ses tissus ou de ses extraits.

Plusieurs de ces biotests ont été appliqués dans le cadre du projet NOGLYPHOS. Certains, de type « bioautographie », sont décrit en détails par Vermeulen (2018). Au final, deux catégories principales de biotests ont été retenues et optimisées pour la réalisation de nos objectifs : a) un biotest de *screening*, pour le repérage rapide d'espèces et de lignées potentiellement allélopathiques, et b) un micro-biotest spécifiquement destinés à la détermination des molécules impliquées.

Les protocoles et les résultats bruts de l'ensemble des biotests effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS sont rassemblés dans le recueil annexé (annexe 1) au présent rapport (*Compte-rendu détaillé des biotests effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS*).

### 3.2.1. Biotests de screening

Nous décrivons succinctement, ci-dessous, l'évolution des protocoles des biotests de *screening* appliqués, détaillons le protocole du biotest optimisé, réalisé directement sur un substrat viticole, et synthétisons les principaux résultats obtenus.

#### 3.2.1.1. Protocoles

##### Biotests préliminaires

Ce biotest a régulièrement évolué au cours du projet. Au départ réalisé sur milieu gélosé, dans des plaques multi-puits (figure 2a), il a ensuite été appliqué sur sable de silice (figure 2b).



Figure 2. Biotests de screening pour la mise en évidence des propriétés phytotoxiques de tissus végétaux : a) à gauche, sur milieu gélosé, b) à droite, sur sable de silice.



Les protocoles retenus sont les suivants :

*Sur milieu gélosé :*

- Broyer le matériel végétal (sec) à tester.
- Déposer 30 mg du matériel broyé dans chaque puit d'une plaque multi-puits (6 puits) ; garder 1 puit témoin, sans matériel végétal. Préparer 4 ou 5 plaques (répétitions).
- Couler, dans chacun des puits, 3 ml d'agar à 1%; laisser refroidir.
- Couler par-dessus 4 ml d'agar à 1 %; laisser refroidir.
- Déposer 5 graines (par puit) de cresson alénois (*Lepidim sativum*), des graines préalablement imbibées durant 120 min. dans de l'eau distillée (élimination des graines flottantes, et sélection des graines les plus volumineuses).
- Déposer 1 ml d'agar à 1 % (stabilisation des graines).
- Mesure après 72 heures : taux de germination, taille des racines et des hypocotyles, états et colorations des différents organes de la plantule (chlorose, brunissement, nécroses, ...).

*Sur sable de silice :*

- Émietter finement le matériel végétal (sec) à tester
- Incorporer 200 mg de matériel végétal dans 40 g de sable siliceux ( $\geq 0.6$  mm)
- Répartir le mélange entre 4 plaques multi-puits (= 4 blocs), 1 puit par plaque et par espèce testée, avec un puit témoin sans matériel végétal incorporé.
- Ajouter de 5g de de sable siliceux ( $\geq 0.6$  mm) dans chacun des 24 puits
- Ajouter de 4.5 ml d'H<sub>2</sub>O dans chacun des 24 puits
- Déposer 5 graines (par puit) de cresson alénois (préalablement imbibées dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures)
- Mesure après 96 heures : taux de germination, taille des racine et des hypocotyles, états et colorations des différents organes de la plantule (chlorose, brunissement, nécroses,...).

-

### **Biotest optimisé, sur substrat viticole**

Le biotest optimisé, retenu à la fin du processus de développement, est réalisé directement sur un substrat viticole (figure 3).

#### A. Préparation du substrat

Ce biotest s'effectue sur un substrat composé de terre végétale et de sable de quartz lavé. Ce sable inerte améliore la pénétrabilité du substrat et diminue les risques de casser les racines lors de la récolte des données (mesures), sans changer les propriétés chimiques du sol.

La terre végétale (TV) est récoltée sur les 10 premiers centimètres du sol (horizon A) et est nettoyées au maximum des débris végétaux. Elle est séchée si besoin 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2 mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baunit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

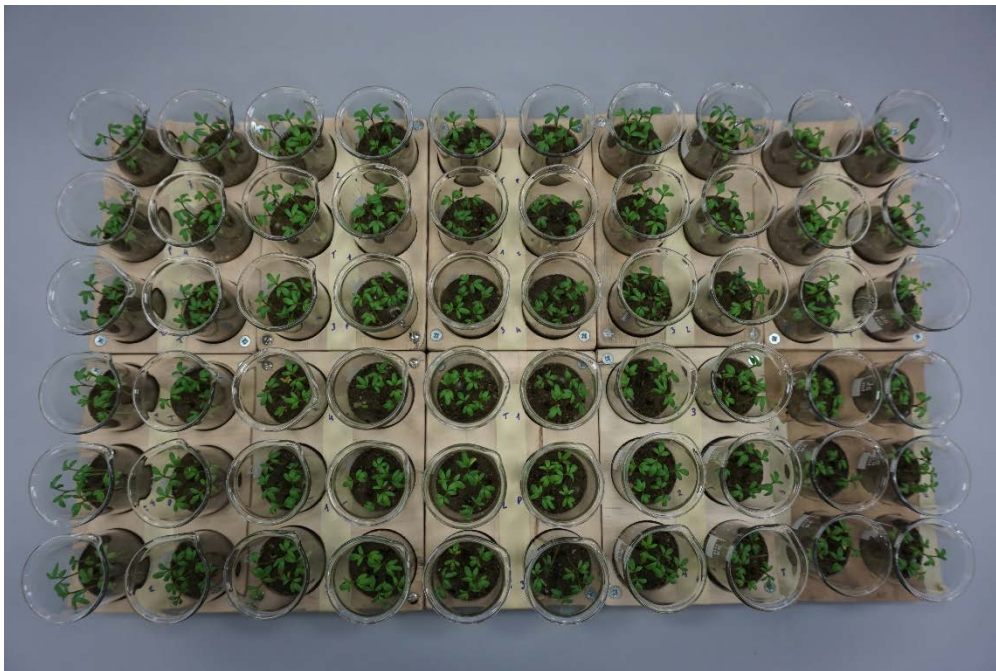


Figure 3. Biotests de screening, effectué directement sur un substrat viticole, pour la mise en évidence des propriétés phytotoxiques de tissus végétal

#### B. Préparation du matériel végétal

Ce biotest est prévu pour évaluer les propriétés allélopathiques des parties aériennes sèches des végétaux (type litière). Il est important de bien noter le stade phénologique de la plante au moment de sa récolte, ainsi que tous les détails importants du type : état phytosanitaire, emplacement de la plante, proportion de feuille/tige/fleur/graines dans l'échantillon récolté, la méthode de récolte etc.

Les échantillons de plantes sont séchés à température ambiante, les organes faisant l'objet du biotest (feuilles, tiges, etc.) sont sélectionnés puis broyés au mixeur et tamisé (<2 mm). L'échantillon prêt est conservé dans un sachet en papier à l'abri de la lumière et de l'humidité.

#### C. Mise en place du biotest et récolte des résultats

Ce biotest permet, d'une part, de confirmer ou d'infirmer les propriétés allélopathiques présumées d'une espèce (ou d'un écotpe) sur la croissance des racines d'une plante modèle. Rapide et peu coûteux, il permet de réaliser un screening large de plantes potentiellement intéressantes. Il permet d'autre part de tester l'influence de certains facteurs sur ces propriétés, comme par exemple le type de sol, la concentration de plante dans le substrat, la température, etc. La concentration de plante dans le mélange est choisie en fonction des rendements réels de la plante au champ.

En plus du témoin « substrat seul » (uniquement terre + sable), sont inclus dans le protocole un témoin « positif », utilisant des feuilles d'une lignée d'*Artemisia annua* particulière riche en artémisinine (Delabays *et al.* 2008), une molécule connue pour ses puissantes propriétés phytotoxiques, ainsi qu'un témoin « négatif », *Prunelle vulgaris*, caractérisé par de faibles de propriété allélopathiques.

Mettre les semences de cressons alénois à tremper 24h.

Les prochaines étapes se déroulent sous hotte. L'échantillon de plante broyée est mélangé au substrat à une concentration donnée (ex. 0.2g/100ml de terre végétale = 21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé de manière aléatoire (au sein d'un bloc) dans un puits à raison de 10ml/puits.

Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation à l'aide d'une pipette 10ml (environ 5ml d'eau, mais dépend de l'humidité du substrat). Les graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), une fois imbibées, sont disposées (5/puits) sur le substrat humidifié.



Les plaques multipuits sont placées avec leur couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

Après 4 jours, la mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule) se fait à l'aide d'un papier millimétrique. Le traitement des résultats se fait en % du témoin « terre seule ». Le % de germination est également relevé.

#### D. Traitement des données

Les traitements des données de fait sur Excel en calculant la moyenne par bloc (=plaque multipuits, gén. nb de blocs = nb de répétitions) mise en % du témoin « substrat seul ».

Une moyenne des moyennes 'bloc en % par traitement' (p.ex. espèce) est calculée, ainsi que son erreur standard.

Ces résultats sont représentés grâce à un histogramme avec des barres d'erreur correspondant à + ou - l'erreur standard.

Pour déterminer si une différence est statistiquement significative, les données sont transférées sur un fichier Minitab, permettant de réaliser une ANOVA, ou un test de comparaison non paramétrique, si les conditions de l'ANOVA ne sont pas remplies.

#### 3.2.1.2. Principaux résultats et synthèse

Ces différents biotests ont donc été appliqués sur une série de tissus végétaux (cf. le document annexé : *Compte-rendu détaillé des biotests effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS*) afin de sélectionner rapidement le matériel fortement phytotoxique, et donc issu de plantes potentiellement allélopathiques. A titre d'exemple, la figure 4 présente les résultats du biotest n°NG5, effectué sur sable de silice (Delabays *et al.* 2019).

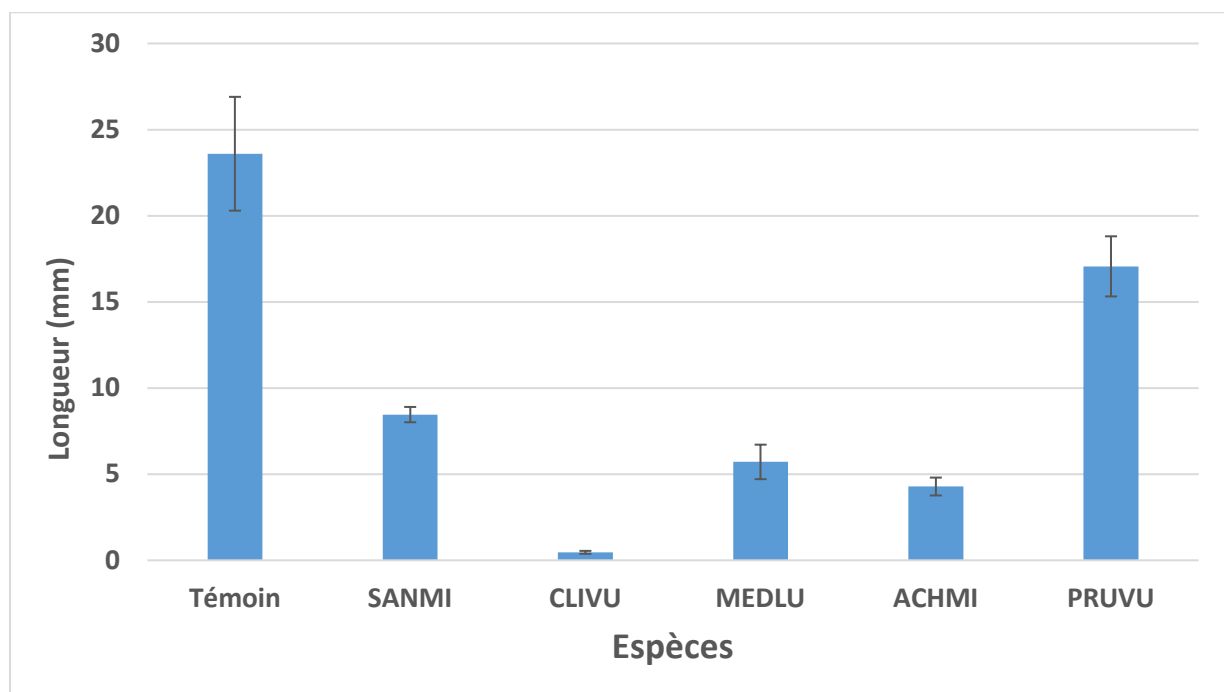


Figure 4. Biotest sur substrat de silice : effets, sur la longueur des racines de cresson alénois, de l'incorporation de feuilles sèches 5 espèces végétales (moyenne  $\pm$  ESM ; n=4). (SANMI : *Sanguisorba minor* ; CLIVU : *Clinopodium vulgare* ; MEDLU : *Medicago lupulina* ; ACHMI : *Achillea millefolium* ; PRUVU : *Prunella vulgaris*).

Globalement, les connaissances et compétences acquises dans ce volet du projet NOGLYPHOS peuvent être énumérées comme suit :

- Repérage de plantes présentant de fortes propriétés allélopathiques et sélection des espèces prioritaires pour les analyses phytochimiques approfondies : *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare* et *Medicago lupulina* (Delabays *et al.* 2019).
- Sélection d'une espèce très peu active, *Prunella vulgaris* (figure 4), utilisée aujourd'hui comme témoin négatif dans notre biotest optimisé.
- Inclusion d'une lignée sélectionnée d'*Artemisia annua* (Delabays & Bohren, 2008), riche en artémisinine (environ 1 % w/w dans les feuilles sèches), comme témoin positif dans notre biotest optimisé.
- Confirmation d'une variation des propriétés allélopathiques entre différentes lignées de *Medicago lupulina* (figure 5): présence chez cette espèce d'une héritabilité (au sens large) significative sur ce critère (Delabays & Berthet, en prép.).
- Dynamique saisonnière des propriétés allélopathiques de *Bromus tectorum*, probablement liée à la phénologie (Delabays *et al.*, en prép.).
- Maîtrise d'un biotest optimisé et consolidé pour la sélection (*screening*) de matériel allélopathique, directement sur substrat agricole (Berthet & Delabays, en prép.).

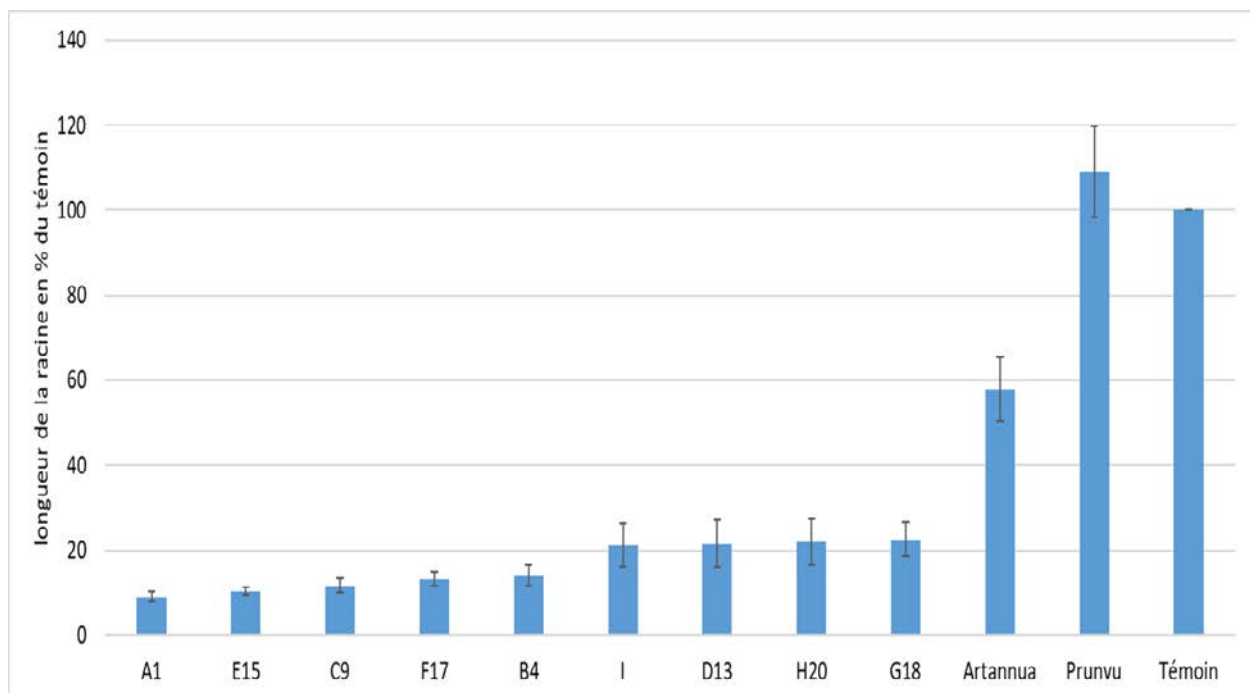


Figure 5. Biotest sur substrat viticole : effets, sur la longueur des racines de cresson alénois, de l'incorporation de feuilles sèches de 9 lignées de *Medicago lupulina* (A1 à G18) (moyennes  $\pm$  ESM ;  $n=10$ ). *Artannua* (*Artemisia annua*) : témoin positif ; *Prunvu* (*Prunella vulgaris*) : témoin négatif.

### 3.2.2. Micro-biotest *in vitro*

Parallèlement, un micro-biotest, effectué sur milieu gélosé en embouts de pipette (figure 6), et destiné à vérifier les propriétés phytotoxiques d'extraits végétaux de plus en plus fractionnés, voire de molécules isolées, a été développé.



Figure 6. Micro-biotest pour la mise en évidence de propriétés phytotoxiques d'extraits végétaux purifiés et de molécules isolées (Vermeulen 2018)

Le protocole optimisé est le suivant :

#### Micro-biotest sandwich en embout (MSE)

- Echantillons : reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul d'agar à 2 %
- Préparation des embouts (18 répétitions) : 100 ul d'agar 1% + 25 ul échantillons + 75 ml agar 1% + dépôt 1 graine de cresson alénois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures) + 20 ul d'agar 1 % (stabilisation).
- Mesure après 72 heures : taux de germination, taille des racines et des hypocotyles, état et coloration des différents organes de la plantule (chlorose, brunissement, nécroses, ...).

Ce biotest a été appliqué régulièrement (cf. Annexe 1. *Compte-rendu détaillé des biotests effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS*) sur des extraits progressivement fractionnés et purifiés de *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare* et *Medicago lupulina* (figure 7 et 8) ; les trois espèces sélectionnées avec notre biotest de *screening* décrit précédemment (cf. § 3.2.1.).

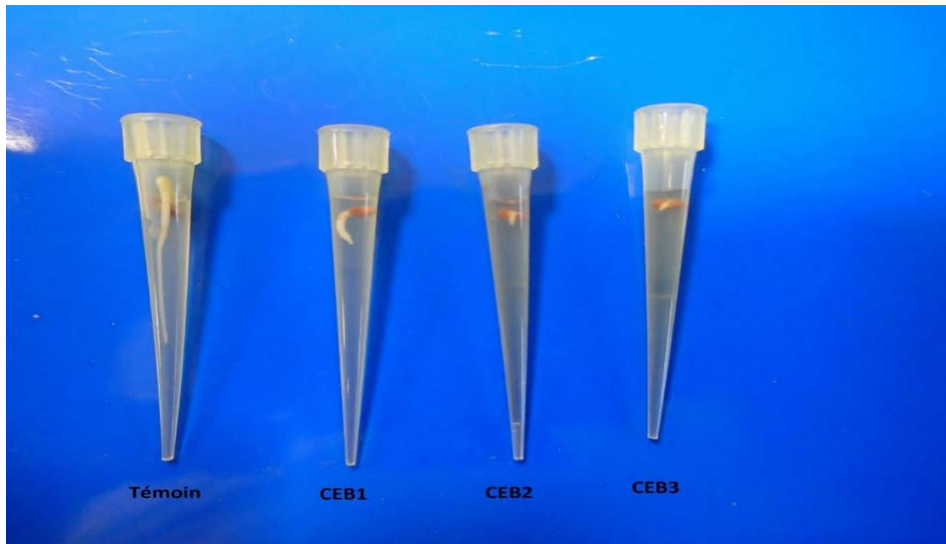


Figure 7. Micro-biotest pour la mise en évidence de propriétés phytotoxique d'extraits végétaux purifiés : applications sur des fractions d'extraits de Clinopodium vulgare (CEB 1, CEB 2 et CEB 3)

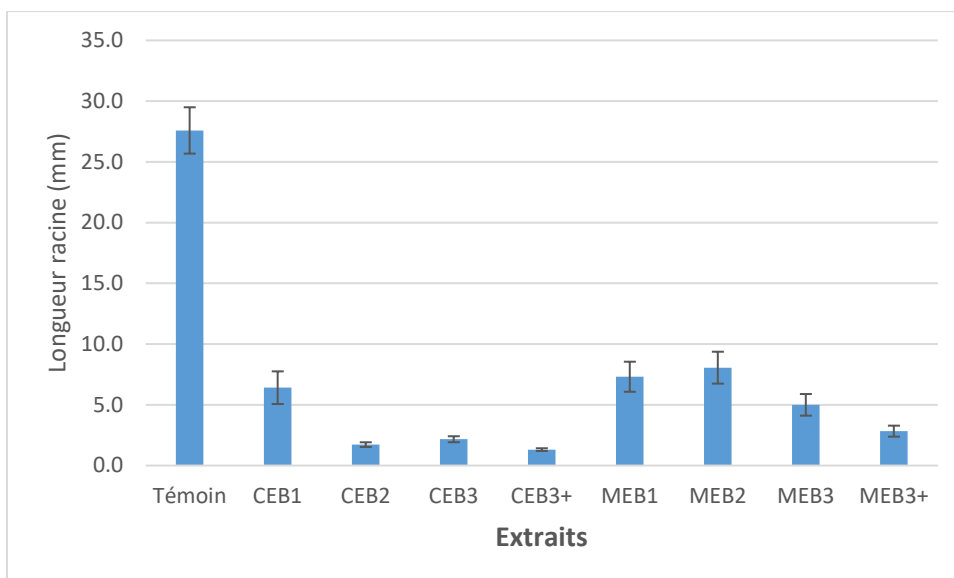


Figure 8. Effets sur la croissance de racines de cresson alénois de différents extraits (échantillons) de Clinopodium vulgare (CEB) et de Medicago lupulina (MEB). (Moyenne  $\pm$  erreur-type de la moyenne, n entre 16 et 18).

Les résultats des analyses phytochimiques sont détaillées au § 3.3.

### 3.3. Analyses phytochimiques

#### 3.3.1 Principe général

La phytochimie s'occupe plus particulièrement d'isoler et d'identifier les principes actifs d'origine végétale. Elle comporte plusieurs étapes :

- La sélection et l'identification botanique d'une plante potentiellement intéressante.
- La récolte et le séchage.
- La préparation d'extraits.
- Des tests biologiques sur les extraits obtenus afin de déterminer si des propriétés pharmacologiques peuvent être mises en évidence.
- La séparation des extraits par diverses techniques chimiques afin d'isoler et de caractériser les substances actives.

Si les trois premières étapes font partie intégrante de la préparation normalisée des matières végétales, des tests biologiques spécifiques et performants ont été développés et présentés dans les paragraphes précédents. Ces derniers ont permis une identification simple et très rapide des effets phytotoxiques des différents extraits végétaux préparés qui ont pu être classifiés selon leur activité biocide.

A ce stade, il nous a semblé important d'essayer de déterminer quels composés chimiques pourraient être responsable des effets observés. Pour ce faire, plusieurs étapes de purification des extraits primaires sont nécessaires, il faut d'abord développer et mettre au point une méthode chromatographique permettant de séparer les différentes familles chimiques présentes dans les extraits bruts. La sélectivité de cette étape ne peut être que faiblement modulée ce qui rend indispensable de raffiner ces extraits purifiés à l'aide d'une méthode chromatographique préparative spécifique. Cette méthodologie est très efficace mais très coûteuse en temps (développement et mise au point des différentes méthodes chromatographiques) et surtout en matériel végétal. En effet le principe actif recherché peut n'être présent qu'en infime concentration, ne fournissant finalement que quelques mg de principe actif à partir de dizaines de kg de matériel végétal sec qui seront ensuite analysés par spectroscopie de masse haute résolutions et résonance magnétique nucléaire à deux dimensions. La complexité des étapes ainsi que l'optimisation spécifiques des différentes extractions sont très consommatrices de temps et d'énergie et c'est pourquoi notre recherche s'est concentrée principalement sur le brome des toits (*Bromus tectorum*), la luzerne lupuline (*Medicago lupulina*) et finalement la sarriette commune (*Clinopodium vulgare*) dont les premiers essais ont démontré des effets positifs (cf. § 3.2.1.).

#### 3.3.2. Extraction ASE

##### Préparation des échantillons

Le choix de la méthode d'extraction solide-liquide des différents échantillons de végétal séché et broyé s'est portée sur l'extraction accélérée par solvants (ASE), à l'aide de méthodes très efficaces et sélectives mises au point dans notre laboratoire. L'échantillon est placé dans une cellule d'extraction, une pompe amène le solvant dans la cellule, puis cette dernière est verrouillée et chauffée. Après un temps d'extraction donné, la vanne statique est ouverte, la cellule est vidée et purgée par un flux d'azote. Ce cycle peut être répété plusieurs fois si nécessaire.

Le solvant d'extraction est ensuite récupéré dans un tube en verre et analysé. La figure 9 présente un schéma de l'appareillage ainsi que les conditions opératoires.



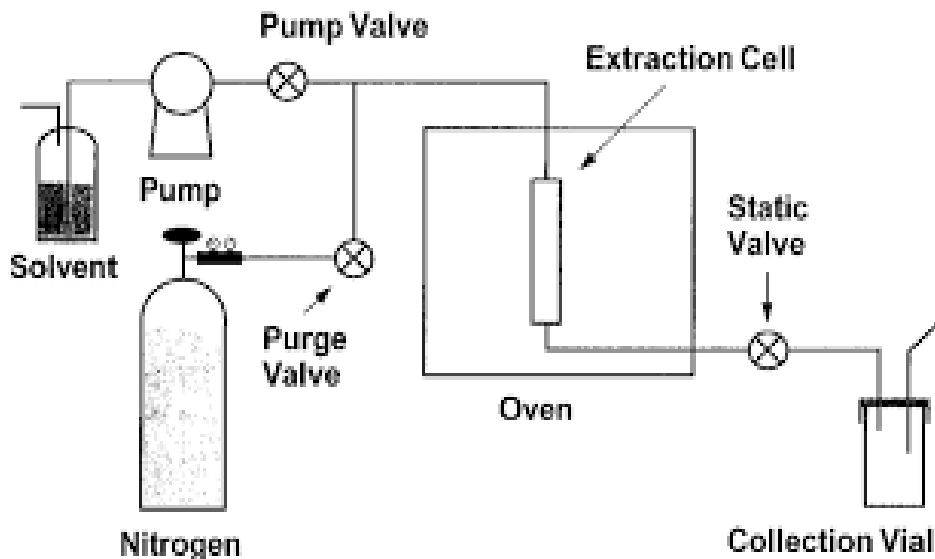


Figure 9. Schéma d'extraction

### Extraction par solvants accélérés

- Matériel usuel de laboratoire
- Découpeur centrifuge ZM 100 avec tamis annulaire de diamètre 1.0mm (Retsch ; Haan bei Düsseldorf, Allemagne)
- Accelerated Solvent Extractor ASE 2000 (Dionex; Sunnyvale/CA, USA)
- Vials avec septum
- Cellules d'extraction

### 3.3.3. Analyses spectrales

L'analyse biologique de ces différentes fractions de plantes obtenues par extractions ASE a clairement démontré que certaines de ces fractions possédaient un intéressant pouvoir inhibiteur de croissance. Afin de déterminer la structure des extraits potentiellement intéressants, un raffinage des fractions actives a été entrepris par chromatographie préparative et la méthode de séparation des différents composants a été optimisée par détection DAD.

#### Méthode HPLC

Une méthode de séparation par HPLC a été développée afin de déterminer le profil UV des composés les plus abondants et de permettre la collection de fractions de pics suffisamment isolés et abondants. Toutes les séparations présentées ont été effectuées sur la même colonne, une C18 CC125/4 Nucleosil 100-5 de Macherey-Nagel et avec le même gradient, résumé dans le tableau 2, le tout sur un HPLC 1221 Infinity LC (Agilent, US), avec un volume d'injection de 100 $\mu$ l.

Tableau 2. Gradient des séparations HPLC

Temps [min]	ACN [%]	H2O +0.5% ac. Formique [%]
0	5	95
20	20	80
25	30	70
35	95	5
40	95	5

### Analyse de structure

Trois extraits raffinés et microfiltrés de quantité suffisante pour une analyse RMN et HPLC ont ainsi pu être isolés et ensuite analysés. Les analyses RMN des solutions d'extraits secs dans du D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD 30% ont été réalisées sur un appareil à 400 MHz de la marque Bruker tandis que l'analyse chromatographique a été réalisée sur un UPLC-Qtof de la marque Agilent.

Les structures des différents extraits ont été déterminées à l'aide de plusieurs techniques analytiques complémentaires, à savoir d'abord une analyse de masse à l'aide d'un spectromètre haute performance de type qTOF. Les masses précises ainsi obtenues ont permis de formuler des hypothèses concernant des structures possibles. Les structures ainsi proposées ont été ensuite confirmées par analyse de résonance magnétique <sup>1</sup>H-1D (déplacement chimiques) et surtout 2D (COSY) et lorsque les quantités étaient suffisantes également par <sup>13</sup>C-RMN 2D. Les résultats des différents extraits présentés dans les parties suivantes proviennent non seulement de recoupements d'informations concordantes entre les différentes techniques analytiques mais également par comparaison avec la bibliographie appropriée.

Les paragraphes suivants présentent les résumés des résultats (souvent partiels) obtenus à partir des analyses effectuées. La qualité des hypothèses et des structures proposées dépend fortement de la pureté des fractions obtenue, pureté qui malgré tous nos efforts a été souvent insuffisante pour interpréter les spectres RMN.

#### 3.3.4. *Bromus tectorum*

Comme cela a été le premier extrait obtenu dont le raffinage a permis une caractérisation convaincante des principes actifs isolés, nous allons présenter en détail cette démarche, qui sera reprise telle quelle pour les deux autres extraits, mais avec moins de succès

#### Analyse par spectroscopie de masse

Le raffinage des fractions purifiées a permis d'obtenir trois fractions (EP1, EP2 et EP3) relativement pures sur lesquelles les analyses instrumentales de pointe ont pu être réalisées. L'analyse de masse a été effectuée par UPLC-qTOF. Tous les extraits ont été filtrés à 0.45 µm et analysés selon les conditions de séparation et de détection mentionnées dans le tableau 3.

Tableau 3. Paramètres appliqués sur l'UPLC-qToF. Solvants : l'acétonitrile (ACN) et l'acide formique (HCO<sub>2</sub>H).

Méthode de séparation		
débit	0.600 ml/min	
volume d'injection	0.2 µl	
gradient	0 min	10.0% ACN / 90.0% HCO <sub>2</sub> H à 0.1%
	8 min	85.0% ACN / 15.0% HCO <sub>2</sub> H à 0.1%
	15 min	85.0% ACN / 15.0% HCO <sub>2</sub> H à 0.1%
Méthode de détection		
longueurs d'ondes (DAD)	214 nm; 260 nm; 336 nm; 366 nm	
ionisation	ionisation par électrospray (ESI)	
fragmentation	60	
polarité	positive et négative	
domaine d'acquisition	100 m/z à 3200 m/z	
fréquence d'acquisition	1.0 spectre/s	

### Identification de l'extrait EP1

La figure 10 présente le spectre de masse réalisé par UPLC-qTOF de l'extrait EP1. Les signaux observés correspondent et suggèrent la présence de l'acide chlorogénique de masse exacte 354.10 g/mol (figure 11).

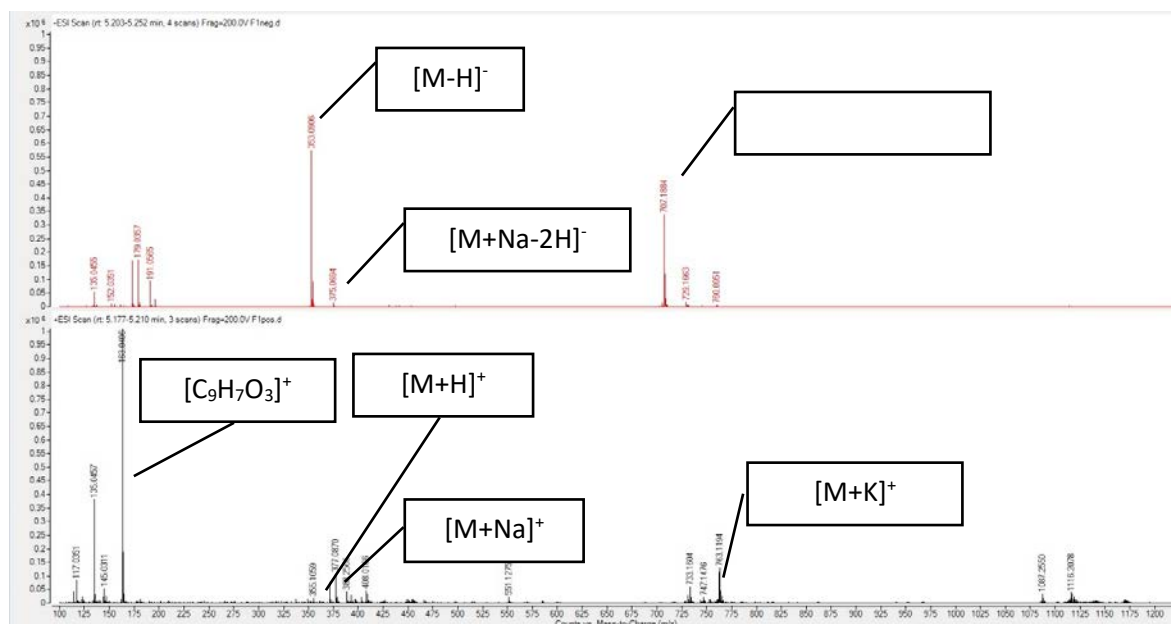


Figure 10. Spectre de masse de l'extrait EP1: Ionisation négative (haut); Ionisation positive (bas).

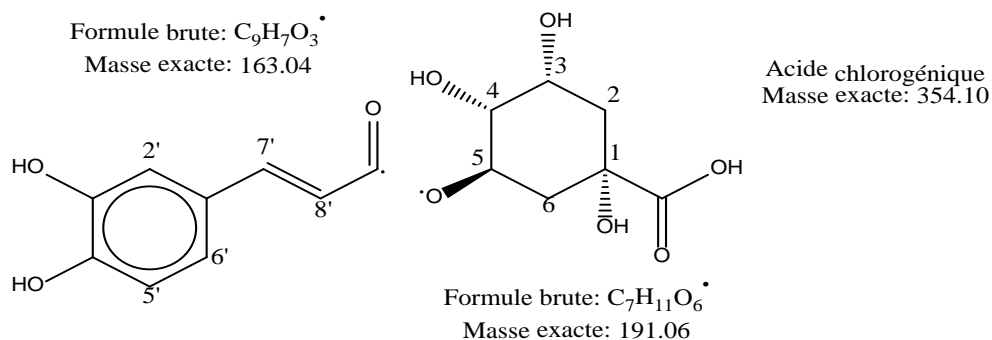


Figure 11. Extrait EP1 identifié : Acide Chlorogénique

L'analyse effectuée par <sup>1</sup>H-RMN à 400 MHz dans une solution MeOD 30% dans de l'eau lourde permet de confirmer la présence d'acide chlorogénique dans l'extrait EP1

L'acide cinnamique, partie de la molécule à 163 m/z, est observable sur le spectre RMN du proton (Davet 2018). Les déplacements chimiques présentés sont comparés avec la littérature. Pour ce qui est de l'identification de la partie restante de la molécule, un spectre COSY mettant en évidence les couplages entre protons est nécessaire. Le tableau 4 présente les observations faites sur le spectre COSY en comparaison à la littérature.

Tableau 4. valeurs indicatives Du spectre RMN du proton pour l'extrait EP1 et comparaison avec la littérature (M.Forino, G.C.. Tenore, L. Tartaglione, D.A. Carmela, E. Novellino and P. Ciminiello « (1S,3R,4S,5R)-5-O-Caffeoylquinic acid : isolation , stereo-structure characterization and biological activity » in Food Chemistry, vol 178, 306-310, 2015): déplacement chimique δ [ppm], multiplicité mult. et constante de couplage J<sup>n</sup>.

proton	δ [ppm] mult. J <sup>n</sup> mesuré	δ [ppm] mult. J <sup>n</sup> tiré de [31]	proton	δ [ppm] mult. J <sup>n</sup> mesuré	δ [ppm] mult. J <sup>n</sup> tiré de [31]
<b>H2'</b>	7.24 s.	7.07 d. 1.8 Hz	<b>H5</b>	3.68 ddd. 7.3 Hz	5.39 ddd. 4.3 Hz; 3.7 Hz; 3.3 Hz
<b>H5'</b>	6.95 d. 8 Hz	6.79 d. 8.2 Hz	<b>H4</b>	1.21 dd. 7.04 Hz	1.91 dd. 13.9 Hz; 3.3 Hz
<b>H6'</b>	7.17 d. 8 Hz	6.97 dd. 1.8 Hz; 8.2 Hz	<b>H3</b>	1.30 Pseudo d. 7.04Hz	1.93 dd. 13.8 Hz; 8.8 Hz
<b>H7'</b>	7.73 d. 16 Hz	7.59 d. 15.9 Hz	<b>H2</b>	4.19 m. *	3.98 dt. 8.8 Hz; 4.1 Hz
<b>H8'</b>	6.50 d. 16 Hz	6.30 d. 15.9Hz	<b>H6</b>	3.04 m. *	3.79 dd. 8.8 Hz; 4.1 Hz

## Identification de l'extrait EP2

La figure 12 présente le spectre de masse réalisé par UPLC-qTOF. Les signaux observés sont compatibles avec la structure d'une lutéoline glycosylée. L'étude relative à l'identification de cette lutéoline par  $^1\text{H}$ -RMN à 400 MHz dans une solution MeOD 30% dans l'eau lourde, montre qu'il s'agirait du cynaroside présenté à la figure 13.

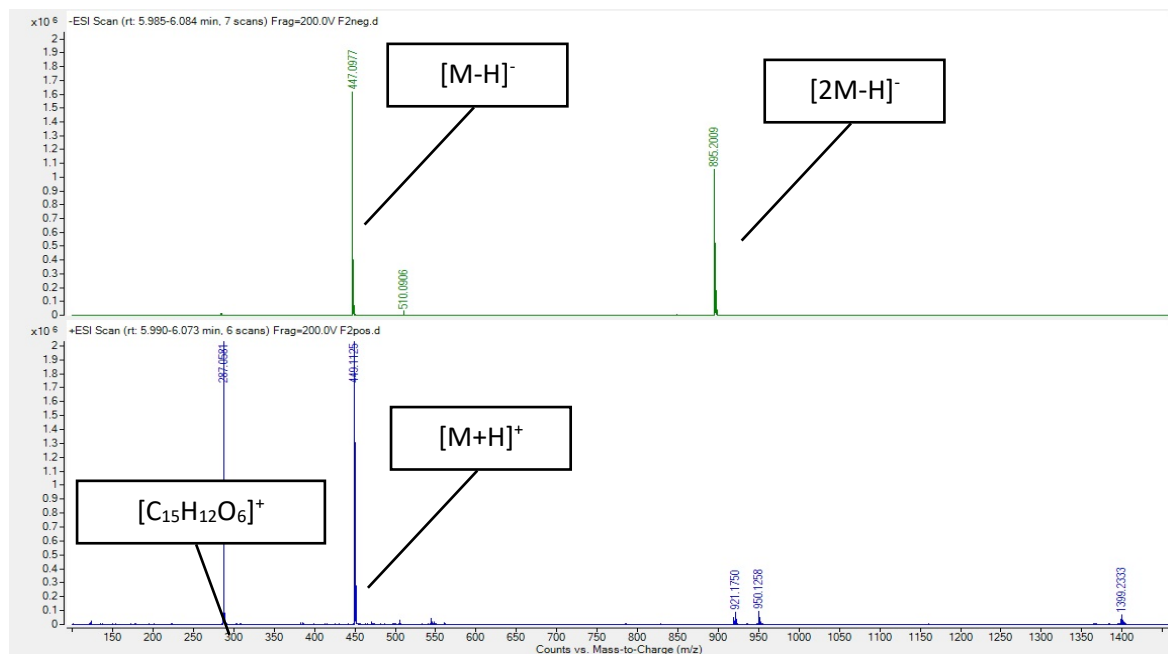


Figure 12 - Spectre de masse de l'extrait EP2: Ionisation négative (haut); Ionisation positive (bas).

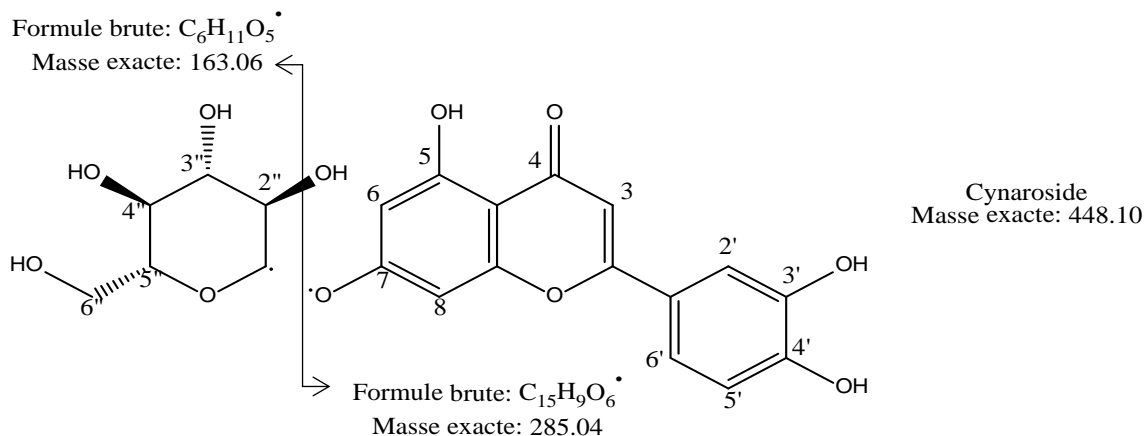


Figure 13. Extrait EP2 identifié: Cynaroside.

Une analyse RMN plus approfondie de la partie glycosylée a permis d'attribuer les protons avec les carbones correspondants (analyse RMN-HSQC) et de confirmer la structure postulée (tableau 5).



Tableau 5. Valeurs indicatives du spectre RMN du proton pour l'extrait EP2: déplacement chimique  $\delta$  [ppm], multiplicité mult. et constante de couplage  $J^n$ .

proton	$\delta$ [ppm] mult. $J^n$	proton	$\delta$ [ppm] mult. $J^n$	proton	$\delta$ [ppm] mult. $J^n$
<b>H6'</b>	7.47 d. 8 Hz	<b>H5'</b>	6.95 d. 8 Hz	<b>H3</b>	6.65 s.
<b>H2'</b>	6.66 s.	<b>H8</b>	6.85 d. 2 Hz	<b>H6</b>	6.55 d. 2 Hz

Le tableau 6 montre la corrélation entre les déplacements chimiques des carbones observés et ceux décrits dans la littérature (Scotti, et al., 2011; Lee et al 2011).

Tableau 6. valeurs indicatives Du spectre RMN-HSQC [22] pour l'extrait EP2 et Comparaison avec la littérature: déplacement chimique  $\delta$  [ppm].

carbone	$\delta$ [ppm]		carbone	$\delta$ [ppm]		carbone	$\delta$ [ppm]	
	mesuré	litt.		mesuré	litt.		mesuré	litt.
<b>C3</b>	103.6	103.3	<b>C5'</b>	116.5	116.4	<b>C3''</b>	78.1	77.2
<b>C6</b>	101.0	99.2	<b>C6'</b>	121.2	122.1	<b>C4''</b>	70.3	69.6
<b>C8</b>	95.1	94.2	<b>C2''</b>	74.0	73.1	<b>C5''</b>	77.5	76.4
<b>C2'</b>	114.1	113.8				<b>C6''</b>	61.5	60.6

### Identification de l'extrait EP3

La figure 14 présente le spectre de masse réalisé par UPLC-qTOF. Les signaux observés correspondraient à la présence d'une quercétine glycosylée de masse exacte 536.12 g/mol qui pourrait être le 6-hydroxy-7-méthoxyquercétin-3-O-(2"-O-acétyl)-(3"-hydroxy)- $\beta$ -D-glucopyranoside présenté à la figure 15.

L'étude relative à l'identification de cette quercétine par  $^1\text{H}$ -RMN à 400 MHz dans une solution MeOD 30% dans l'eau lourde montre qu'il s'agirait du quercétinoïde. Cependant, lors de l'interprétation du spectre COSY (Davet 2018), une autre hypothèse sur l'identification du métabolite présent dans l'extrait EP3 a été faite : il s'agirait d'une lutéoline glycosylée similaire au cynaroside de l'extrait EP2.

Comme l'extrait EP3 ne peut pas être considéré comme suffisamment pur, la coexistence des deux composés cités est possible. Toutefois, le constituant principal devrait être la quercétine glycosylée mentionnée à la figure 15.

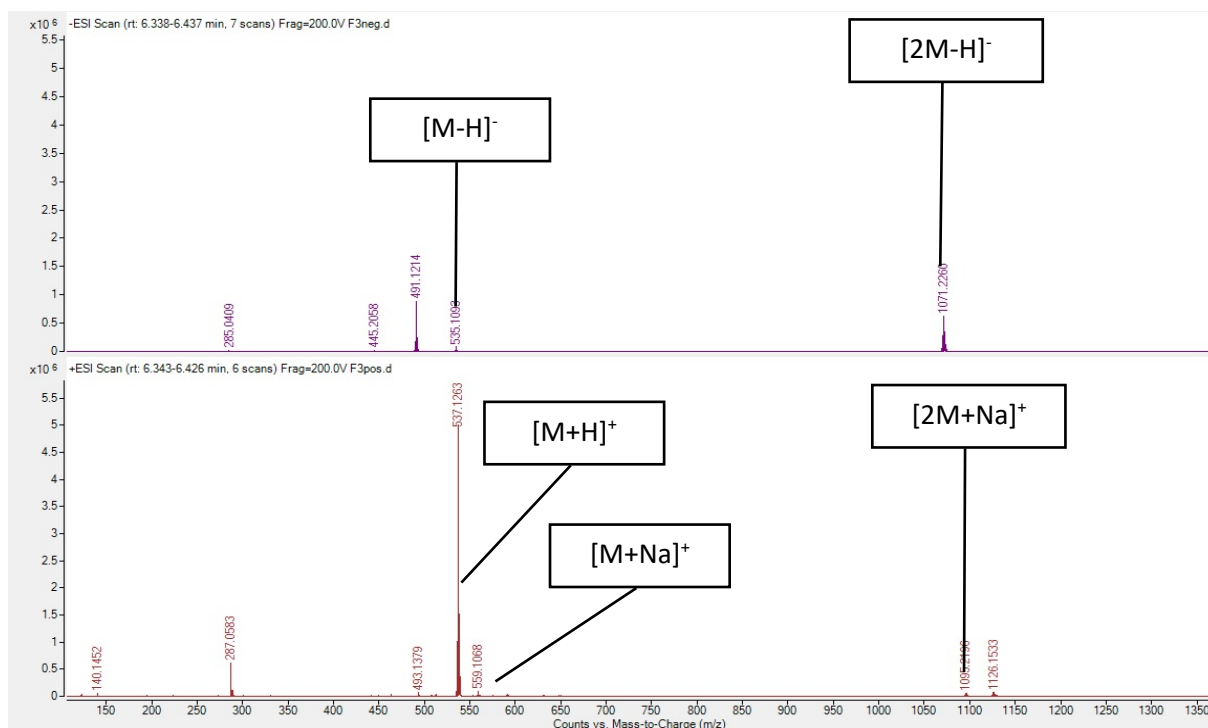


Figure 14 - Spectre de masse de l'extrait EP3: Ionisation négative (haut); Ionisation positive (bas).

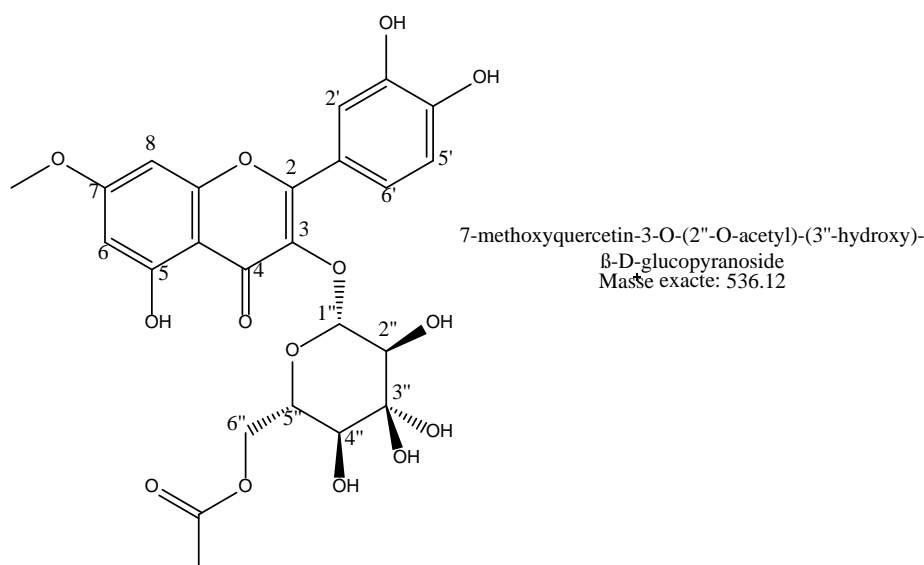


Figure 15 - Extrait EP3 identifié hypothétiquement comme le 7-méthoxyquercétin-3-O-(2''-O-acétyl)-(3''-hydroxy)-β-D-glucopyranoside.

### Résumé (*Bromus tectorum*)

Les extraits purifiés EPx ont fait l'objet d'analyses chimiques et ont pu être identifiés. L'acide chlorogénique de l'extrait EP1 est confondu par ses spectres UV-visible et de masse. Le cynaroside de l'extrait EP2 est identifié par spectroscopie UV-visible, spectrométrie de masse ainsi que par RMN. Pour ce qui est de l'extrait EP3 dont la pureté est insuffisante, seule une hypothèse structurale solide peut être proposée ; il s'agirait d'une quercétine: le composé 6-hydroxy-7-méthoxyquercétin-3-O-(2''-O-acétyl)-(3''-hydroxy)-β-D-glucopyranoside.

### 3.3.5.

### 3.3.6. *Medicago lupulina*

Une deuxième plante qui a également fait l'objet d'une caractérisation spectrale de ses extraits « actifs » par rapport au pouvoir inhibiteur. Le but du travail était de caractériser les composés actifs présents dans la plante avec des analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse en tandem Quadripôle – temps de vol (MS Q-TOF), après extraction et isolation grâce à un chromatographe liquide à haute pression (HPLC) muni d'un détecteur à ultraviolet (UV) et d'un fractionneur.

En analogie totale avec les investigations effectuées sur le brome des toits et avec les mêmes méthodes, plusieurs extraits de *Medicago lupulina* ont été effectués par ASE et testés par rapport au pouvoir inhibiteur de ces derniers. Si des différences notables ont pu être mises en évidence par rapport à leur activité, il n'a malheureusement pas été possible de purifier convenablement une quantité suffisamment importante de métabolite pour réaliser des mesures RMN interprétables. La présence de solvants résiduel masquait systématiquement les minuscules signaux présents. De plus, il s'est agi à chaque fraction de mélanges de plusieurs composés dont la pauvre résolution des spectres n'a pas permis d'identification précise. On a seulement pu distinguer la présence de composés phénoliques et de sucres (présence de signaux anomériques). Les spectres HPLC enregistrés sans analyse complémentaire de la RMN n'ont pas permis non plus de mettre en évidence une structure plausible. La seule observation est la présence surprenante de relativement grandes concentrations d'ions de zinc pour les fractions possédant le plus grand pouvoir inhibiteur. Cette corrélation directe n'a malheureusement pas pu être corroborée par une étude approfondie de la littérature qui ne signale aucun effet inhibiteur de croissance allélopathique du au zinc. Nous restons persuadés qu'il s'agit d'un artefact et que l'allélopathie reste un effet de métabolites organiques.

### 3.3.7. *Clinopodium vulgare*

Dans la dernière partie de ce projet, toujours en utilisant la stratégie décrite plus haut, différents échantillons de végétal séché et broyé de *Clinopodium vulgare* ont été obtenus par ASE puis purifiés par chromatographie préparative après de nombreuses étapes d'optimisation de la méthode. Plusieurs fractions actives ont ainsi pu être obtenues dont deux (CER1 et CER2) ont été raffinées afin d'être analysées par spectrométrie de masse haute résolution.

Les différents chromatogrammes obtenus ont été interprétés et si la fraction CR1, pas très pure, n'a permis que de déduire la présence d'un composé phénolique compatible avec une structure d'hexoside caféique (caffeoyle hexoside) de masse 539, la fraction CR2 nous a permis de mettre en évidence plusieurs composés intéressants. Parmi ceux-ci on notera la présence d'acide chicorique ou d'un dérivé de ce dernier accompagné d'un composé de masse 462 correspondant à de la lutéoline-7-o-glucuronide (figure 16) ou à de la thermopsoside (figure 17).

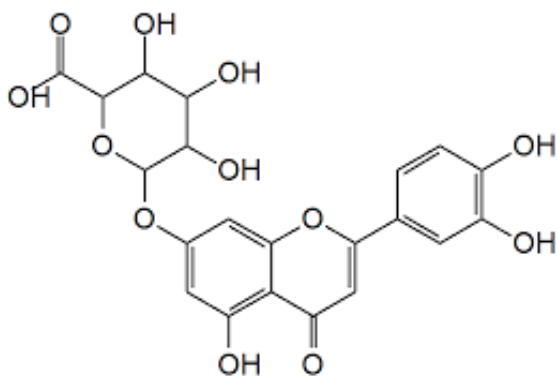


Figure 16. Lutéoline-7-o-glucuronide

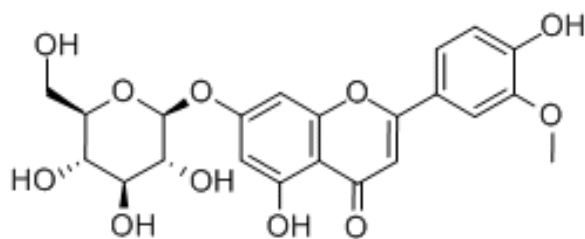


Figure 17. *Thermopside*

Un composé de masse 463 correspondant à de la quercétine hexoside ou diglycoside a également été détecté, accompagné d'un cynaroside de type: 3,4,7,8-tétrahydroxyflavone-7-o-(6''-o-acétyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside.

### 3.3.8. Conclusions

Les différents travaux exécutés sur les trois plantes sélectionnées ont permis de mettre en évidence plusieurs structures plausibles pour des principes actifs possiblement présents dans les extraits végétaux investigués. Ces multiples propositions de structure, si fascinantes soient-elles, doivent encore être confirmées par analyse structurale de type résonance magnétique nucléaire à deux dimensions du carbone, ce qui va nécessiter des quantités encore plus importantes de plantes sèches puisque la sensibilité de cette technique est beaucoup plus faible que celle des protons.

Une autre problématique que nous avons observée lors des précédents travaux est l'effet synergétiques des composés présents dans les extraits. En effet, un extrait analysé peut présenter des caractéristiques intéressantes, mais dès que l'on commence à le raffiner pour identifier les composés actifs présents, on remarque que l'extrait purifié ne présente plus d'effet inhibiteur.

Enfin, il ne faut pas oublier que l'extrait obtenu et analysé dépend fortement des conditions opératoires choisies et ne reflète pas nécessairement la composition réelle de la plante.

### 3.4. Gestion et traits fonctionnels

Une collection d'écotypes a été mise en culture en plein champ en automne 2018, sur le site de Changins. Cet essai a été mené hors vignes, pour des raisons pratiques, mais sur un terrain viticole possédant des caractéristiques pédoclimatiques typiques d'une vigne de La Côte. Le terrain appartient à Agroscope et a fait l'objet d'un accord au sein d'une UMR entre l'école de Changins et la station fédérale de recherche agronomique. Un travail de Master a été mené sur l'essai par Serena Fantasia : suivi de l'automne 2018 au printemps 2020. L'essai a été poursuivi jusqu'à l'été 2021 pour des observations générales, sans suivi poussé. Une description détaillée de l'itinéraire de culture, accompagnée d'illustrations, est proposée en annexe (annexe 2).

Cette collection a été constituée à partir des graines disponibles des divers écotypes des espèces sélectionnées en possession des trois principaux semenciers fournissant la viticulture : OH Semences, Eric Schweizer SA et UFA. Les deux premières sociétés ont fourni les semences gracieusement en échange de retours sur les résultats de leurs semences. UFA n'a pas souhaité participer et n'a pas été en mesure de fournir les semences lors d'une deuxième session de semis. Pour cette raison, les variantes de leurs semis ont été abandonnées et remplacées par des essais de mélanges en automne 2019.

Parallèlement à la sélection de plantes sur la base de leur propriétés phytochimiques en laboratoire, cet essai a eu pour but de sélectionner les meilleurs semis en plein champ pour leur simplicité d'entretien et leurs services écosystémiques et de définir des recommandations de sélection et d'entretien en vue du développement d'un semis commercial.

Trois intensités de fauche différentes ont été comparées (figure 18) sur des espèces semées pures et en mélange, en automne et au printemps, avec des témoins de flore spontanée et de désherbages chimique et mécanique. Le détail de cet essai se trouve dans l'article de Fantasia *et al.* (2020) en annexe (annexe 3). Les informations et conclusions ci-dessous se basent également sur des données non incluses dans l'article.



Figure 18. Parcelle de l'essai constituée du même semis, avec 3 intensités de fauches différentes : à gauche, aucune fauche ; au milieu, une seule fauche par an, réalisée fin août ; à droite, 3 fauches annuelles. Photo prise à la fin du printemps 2021, traitement Mix1.

Les variantes ont été constituées de semis monospécifiques de 11 écotypes de 5 espèces (*Bromus tectorum*, *Medicago lupulina*, *Origanum vulgare*, *Clinopodium vulgare*, *Prunella vulgaris*), d'un premier mélange de ces 5 espèces à proportions égales, de 3 mélanges de 3 espèces (*B. tectorum* 50 %, *M. lupulina* 25 % (3 écotypes, 1 différent dans chacun des 3 mélanges) et *Arenaria serpyllifolia* 25 %) et de trois couverts de flores spontanées qui se sont développés à partir des mêmes préparations du sol. Les



compositions et densités de ces semis sont présentés dans le tableau 7. Avec les deux témoins (désherbage chimique et désherbage mécanique), cela porte le nombre de variantes à 20.

Tableau 7 : Listes et origines de la collection d'espèces et écotypes testés au champ (Changins/VD) dans le cadre du projet NOGLYPHOS.

Treatment	Code	sp	Firme	Indications de l'emballage	Poids (g) 1000 grains	Taux germin. estimé	g/m2 pour objectif 600 plantules	g/m2 réalisé	Nb de graines/m2 (densité du semis) réalisé (sans prise en compte du taux de germin.)	Prix/kg
Medlu22OHS	Medlu22OHS	<i>Medicago lupulina</i> 22	OHS	chMedicago lupulina Gelbklee 183536/Q001 Reg 22	1.88	0.5	2.256	2.333	1241	307
Medlu41OHS	Medlu41OHS	<i>Medicago lupulina</i> 41	OHS	chMedicago lupulina Gelbklee 183536/Q003 Reg 41	1.88	0.5	2.256	2.333	1241	307
MedluStaOHS	MedluStaOHS	<i>Medicago lupulina</i> Standard	OHS	Gelbklee 183148/R001	1.88	0.5	2.256	2.333	1241	15
Pruvu22OHS	Pruvu22OHS	<i>Prunella vulgaris</i> 22	OHS	chPrunella vulgaris Gewöhnliche Brunelle 183615/Q001 Reg 22	0.65	0.5	0.78	0.833	1282	1008
Orivu22OHS	Orivu22OHS	<i>Origanum vulgare</i> 22	OHS	chOriganum vulgare Dost Majoran 183565/S101 Reg 22	0.09	0.5	0.108	0.167	1852	1260
Clivu22OHS	Clivu22OHS	<i>Clinopodium vulgare</i> 22	OHS	chClinopodium vulgare Wirbeldost 183642/Q001 Reg 22	0.4	0.5	0.48	0.500	1250	1404
Clivu32OHS	Clivu32OHS	<i>Clinopodium vulgare</i> 32	OHS	chClinopodium vulgare Wirbeldost 183642/Q002 Reg 32	0.4	0.5	0.48	0.500	1250	1404
Brote41OHS	Brote41OHS	<i>Bromus tectorum</i> 41	OHS	chBromus tectorum früh 183338/Q001 Reg 41	4	0.5	4.8	5.000	1250	41
Medlu22SCH	Medlu22SCH	<i>Medicago lupulina</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B12490 Art. nr:21240 Reg 22	1.88	0.5	2.256	2.333	1241	265
Pruvu22SCH	Pruvu22SCH	<i>Prunella vulgaris</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B13927 Art. nr:21803 Reg 22	0.65	0.5	0.78	0.833	1282	970
Orivu22SCH	Orivu22SCH	<i>Origanum vulgare</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B10123 Art. nr:21521 Reg 22	0.09	0.5	0.108	0.167	1852	1280
Clivu22SCH	Clivu22SCH	<i>Clinopodium vulgare</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B11605 Art. nr:20406 Reg 22	0.4	0.5	0.48	0.500	1250	1450
Medlu22UFA	Medlu22UFA	<i>Medicago lupulina</i> 22	UFA	<i>Medicago lupulina</i> -Reg 22	1.78	0.21	2	2.000	1124	360
MedluKriUFA	MedluKriUFA	<i>Medicago lupulina</i> -Kriechend-Standard	UFA	<i>Medicago lupulina</i> -Kriechend	1.2	0.12	4	4.000	3333	360
Pruvu22UFA	Pruvu22UFA	<i>Prunella vulgaris</i> 22	UFA	<i>Prunella vulgaris</i> -Reg 22	0.69	0.78	1	1.000	1449	1170
Orivu22UFA	Orivu22UFA	<i>Origanum vulgare</i> 22	UFA	<i>Origanum vulgare</i> -Reg 22	0.1	0.51	0.2	0.200	2000	2700
Clivu22UFA	Clivu22UFA	<i>Clinopodium vulgare</i> 22	UFA	<i>Clinopodium vulgare</i> -Reg 22	0.4	0.68	0.5	0.500	1250	2700
Mix1	Brote41OHS	<i>Bromus tectorum</i> 41	OHS	chBromus tectorum früh 183338/Q001 Reg 41	4	0.5		1.250	313	41
Mix1	MedluKriUFA	<i>Medicago lupulina</i> -Kriechend-Standard	UFA	<i>Medicago lupulina</i> -Kriechend	1.2	0.12		0.958	799	360
Mix1	Pruvu22SCH	<i>Prunella vulgaris</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B13927 Art. nr:21803 Reg 22	0.65	0.5		0.200	308	970
Mix1	Orivu22OHS	<i>Origanum vulgare</i> 22	OHS	chOriganum vulgare Dost Majoran 183565/S101 Reg 22	0.09	0.5		0.033	370	1260
Mix1	Clivu22UFA	<i>Clinopodium vulgare</i> 22	UFA	<i>Clinopodium vulgare</i> -Reg 22	0.4	0.68		0.117	292	2700
Mix1	TOTAL								2081	
MixStaOHS19	MedluStaOHS	<i>Medicago lupulina</i> Standard	OHS	Gelbklee 183148/R001	1.88	0.5	2.256	0.846	450	15
MixStaOHS19	Arese22OHS	<i>Arenaria serpyllifolia</i> 22	OHS		0.067	0.5	0.08	0.03	450	789
MixStaOHS19	Brote41OHS	<i>Bromus tectorum</i> 41	OHS	chBromus tectorum früh 183338/Q001 Reg 41	4	0.5	4.8	3.6	900	41
MixStaOHS19	TOTAL								1800	
Mix22OHS19	Medlu22OHS	<i>Medicago lupulina</i> 22	OHS	chMedicago lupulina Gelbklee 183536/Q001 Reg 22	1.88	0.5	2.256	0.846	450	307
Mix22OHS19	Arese22OHS	<i>Arenaria serpyllifolia</i> 22	OHS		0.067	0.5	0.08	0.03	450	789
Mix22OHS19	Brote41OHS	<i>Bromus tectorum</i> 41	OHS	chBromus tectorum früh 183338/Q001 Reg 41	4	0.5	4.8	3.6	900	41
Mix22OHS19	TOTAL								1800	
Mix22SCH19	Medlu22SCH	<i>Medicago lupulina</i> 22	Schweizer	Lot 140090570 B12490 Art. nr:21240 Reg 22	1.88	0.5	2.256	0.846	450	265
Mix22SCH19	Arese22SCH	<i>Arenaria serpyllifolia</i> 22	OHS		0.067	0.5	0.08	0.03	450	789
Mix22SCH19	Brote41OHS	<i>Bromus tectorum</i> 41	OHS	chBromus tectorum früh 183338/Q001 Reg 41	4	0.5	4.8	3.6	900	41
Mix22SCH19	TOTAL								1800	

Chacune de ces 20 variantes a été installée sur une parcelle élémentaire de 12 m<sup>2</sup> (6 x 2 m). Ces traitements ont été répartis dans un essai en blocs randomisés à 4 répétitions, ce qui représente un total 80 parcelles élémentaires (figure 19). De plus, celles contenant les 18 couverts végétaux ont été subdivisés en 3 sous-parcelles de 4 m<sup>2</sup> (2 x 2 m) dans lesquelles 3 variantes d'intensité de fauche ont été étudiées : sans aucune fauche (MI0), une seule fauche tardive (MI1) et plusieurs fauches, en moyenne 3 par an (MI2). Au total, l'expérimentation comportait ainsi 56 procédés différents, répétés 4 fois. 7 séries de relevés ont été réalisées (relevés floristiques et hauteur du couvert, principalement) sur un nombre croissant de variantes. Un total de 936 échantillonnages a été réalisé.

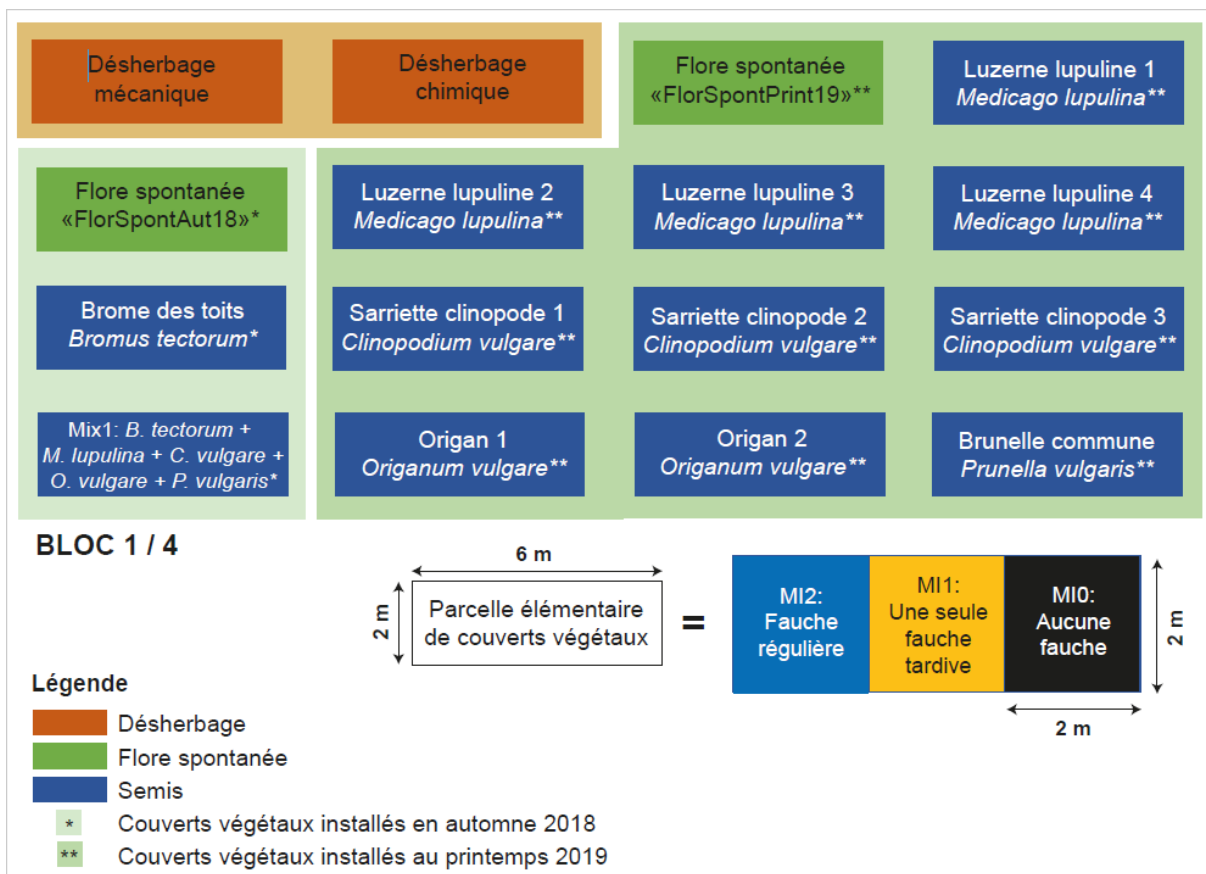


Figure 19. Schéma d'un des quatre blocs de répétitions de 16 traitements sur les 20 de l'essai (schéma réalisé avant ajout de 3 mélanges et d'un témoin supplémentaire). Chaque traitement est installé sur une parcelle élémentaire de 2 x 6m. Ces traitements sont des dés herbages et des couverts végétaux. Les couverts végétaux sont constitués de flore spontanée ou de semis et ont été installés en automne 2018, au printemps 2019 ou en automne 2019 (les 4 variantes non représentées). Tous les couverts sont subdivisés en 3 sous-parcelles variant par l'intensité de fauche.

Les conclusions de cet essai sont détaillées et illustrées dans l'article de Fantasia *et al.* (2020) (annexe 3). Nous reprenons ci-dessous les principales conclusions.

Après une première année d'essai, il ressort que **les semis d'automne sont à préférer aux semis printaniers**, pour leur plus grand nombre de services écosystémiques durant la saison végétative (protection du sol, levée moins importante d'adventices indésirables, biodiversité plus élevée en première année, meilleur succès des espèces hivernantes, qui sont moins concurrentielles). Les semis installés en automne 2018 (\*) contiennent en moyenne 16 % de recouvrement par des plantes indésirables contre 54 % pour les semis du printemps 2019 (\*\*) (figure 20).

**La gestion de la fauche a été déterminante** pour l'évolution des différents couverts végétaux l'année suivante : *B. tectorum* semble grandement favorisé par l'exécution d'une seule fauche tardive (début septembre) et est au contraire défavorisé par l'absence ou l'excès de fauche (figure 21) ; selon l'écotype utilisé, *M. lupulina* a été plutôt favorisé par une seule fauche tardive ou par plusieurs fauches, mais dans aucun cas par l'absence de fauche. Sur la figure 18, on constate que la composition spécifique est différente selon l'entretien. La zone centrale, fauchée une seule fois, est la seule à permettre la pérennisation du *Bromus tectorum*. La zone non fauchée est quant à elle occupée par *Clinopodium* et *Origanum*.

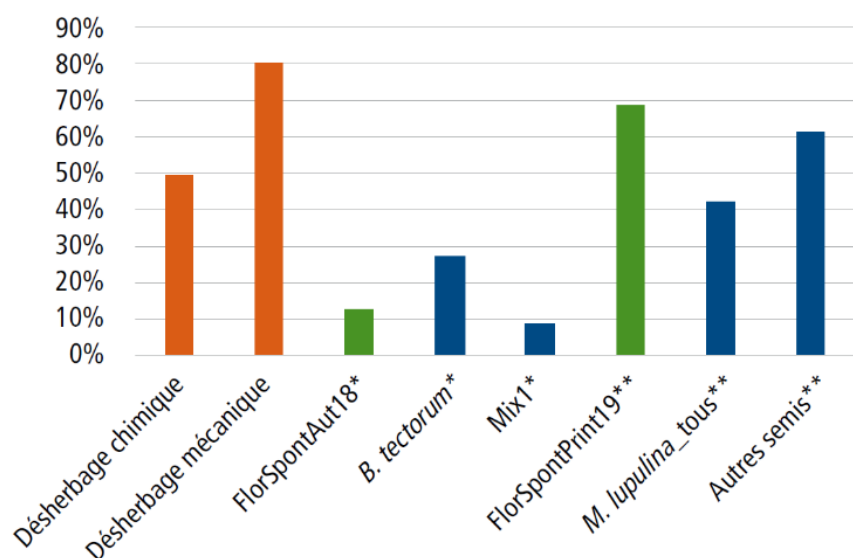


Figure 20. Pourcentage du recouvrement total des plantes adventices «indésirables» (vs autres plantes) des relevés floristiques réalisés entre juin et août (trois séries de relevés) selon la période et la composition des semis. \*Installation en automne 2018; \*\*installation au printemps 2019.

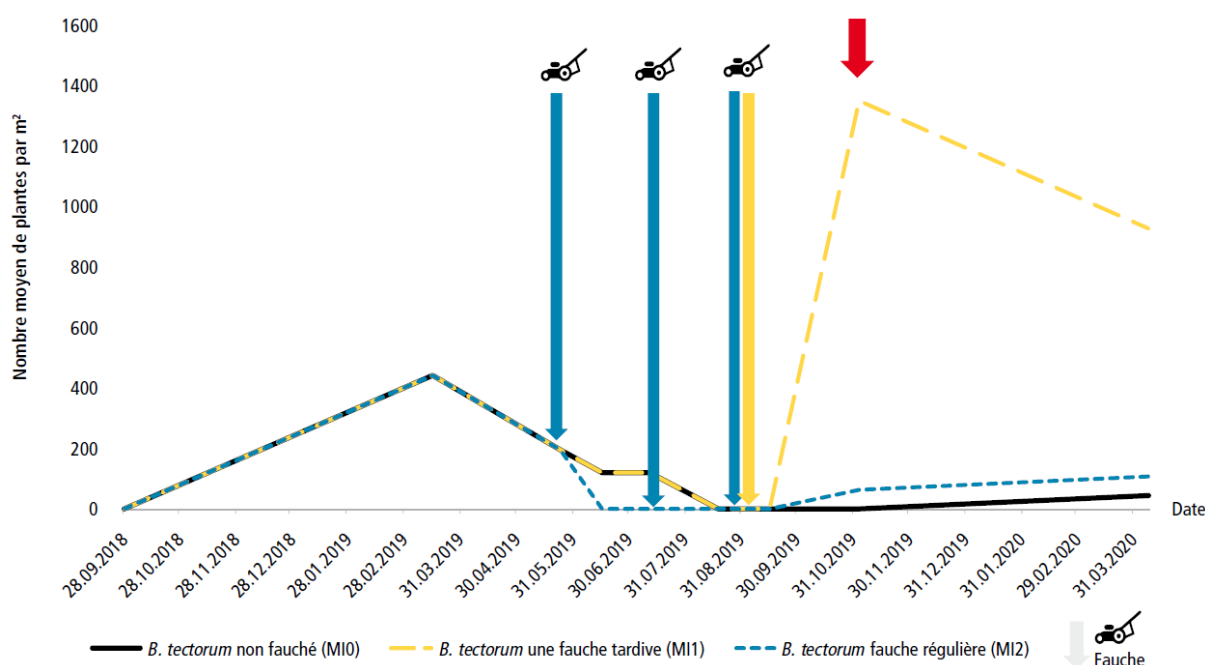


Figure 21. Dynamique de l'installation du brome des toits (*B. tectorum*) et de son ressemis au deuxième automne, selon l'intensité des fauches. La flèche rouge indique la date du relevé réalisé environ un an après le semis.

**L'absence totale de fauche s'est globalement révélée inadaptée**, car elle favorise la reprise des plantes géophytes indésirables l'année suivante.

Un **mélange d'espèces complémentaires** du point de vue de leurs traits fonctionnels (stratégie C-R-S, Compétitives, Rudérales ou tolérantes au Stress, type biologique, phénologie, famille) a offert les meilleurs services par rapport aux semis monospécifiques. *B. tectorum*, *M. lupulina* et *Arenaria serpyllifolia* semblent être des plantes particulièrement efficaces et complémentaires pour les premières phases d'installation d'un couvert. *Clinopodium vulgare*, *Origanum vulgare* et dans une moindre mesure *Prunella vulgaris* se sont pour leur part imposées seulement durant la deuxième saison qui a suivi le semis.

Concernant la hauteur des espèces et écotypes, le succès de certaines variantes de *C. vulgare* et *O. vulgare* est à nuancer par la hauteur importante de ces plantes et leur cycle simultané au cycle végétatif de la vigne. De plus, leurs profondeurs d'enracinement sont également importantes. Ces éléments suggèrent que ces espèces ont un potentiel de concurrence élevé et qu'elles ne sont pas adaptées à un semis sur le rang de culture où l'on cherche à limiter les fauches. Ces plantes présentent toutefois un intérêt potentiel pour les rangs de culture mécanisables (entretien facile par faucheuse à satellite ou brosse type « Bioliner ») car les différentes variantes de fauche ont mis en évidence une importante plasticité phénotypique (accommodats) de ces espèces, qui se développent au ras du sol lorsqu'elles sont régulièrement fauchées. *P. vulgaris*, montre le même type d'adaptation de son phénotype. Ces trois espèces présenteraient dès lors l'intérêt de limiter par allélopathie et par la couverture du sol la pousse d'adventices indésirables.

Pour finir, cet essai a mis une fois de plus en évidence le fait que les comportements des plantes peuvent s'avérer variables – voire même totalement opposés – entre écotypes d'une même espèce.

Sur la base de ces conclusions, un mélange de trois espèces, communément appelé le mélange « Noglyphos » a été mis au point. Il s'agit de *Bromus tectorum*, *Medicago lupulina* et *Arenaria serpyllifolia* (figure 22). Ce mélange représente un compromis entre la promotion d'espèces très peu concurrentielles et la limitation du coût des semences. La biodiversité, en termes de nombre d'espèces dans le mélange, a donc été reléguée à un second plan. Des essais ont été menés sur cette même parcelle et dans le vignoble des Rives de Prangins avec 3 variantes de ce mélange, comprenant 3 écotypes différents de *Medicago lupulina*.



Figure 22. Photographie des trois espèces composant le mélange « Noglyphos » : *Bromus tectorum* (la graminée qui occupe le haut de l'image), *Medicago lupulina* (la fleur jaune) et *Arenaria serpyllifolia* (la fleur blanche). Photo M. Mota.



## 3.5. Essais aux champs

### 3.5.1. Vignobles cantonaux vaudois (Marcelin) et genevois (Bernex/Lully)

En 2020, 2 essais de couverture du cavaillon ont été installés à Marcelin (VD) et à Bernex/Lully (GE), et suivi dans le cadre d'un travail de bachelor (Favre 2020). Les espèces testées sont issues des premiers screenings effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS (cf § 3.2.1.2.) ; il s'agit de : *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina* et *Prunella vulgaris*. Sur ces 2 sites, les plantes ont été semées à la fin du mois d'avril, seules ou en mélange, puis leur germination et leur développement ont été suivis au cours de la saison. Une différence de développement de ces espèces a été observée entre les 2 sites : la forte vigueur de la flore spontanée du site de Marcelin a fortement limité le développement des espèces semées, malgré une bonne germination. Seule *M. lupulina* s'est bien exprimée. Sur le site de Lully, toutes les espèces ont été bien représentées, sauf *B. tectorum* qui se sème normalement en automne. En seconde année (2021), dans la vigne de Lully, la pérennité de *M. lupulina* s'est confirmée (figure 23), malgré la présence d'une flore spontanée relativement agressive, bien mise en évidence dans les parcelles témoins, notamment *Amaranthus retroflexus* et *Convolvulus arvensis*.



Figure 23. Pérennité d'un semis de *Medicago lupulina* sur le cavaillon : couverture assurée 12 mois avec le semis (Favre, 2020).

Il est intéressant de comparer ces observations aux résultats obtenus parallèlement en laboratoire : au cours de la saison, du matériel végétal a été récolté, puis les propriétés phytotoxiques des diverses espèces ont été évaluées à l'aide du protocole optimisé, développé dans le cadre du projet NOGLYPHOS (cf. § 3.2.1.), en utilisant directement le substrat des parcelles. Dans le cadre de ces tests, *M. lupulina* a confirmé de fortes propriétés phytotoxiques (figure 24), plus importantes même que celles de notre témoin positif, une lignée d'*Artemisia annua* particulièrement riche en artémisinine (Delabays *et al*, 2008). *C. vulgare* et *B. tectorum* possèdent également de bons pouvoirs phytotoxiques, parfois proches de celui de l'*A. annua*. Les faibles propriétés phytotoxiques de *Prunella vulgaris* se confirment également, ce qui justifie l'utilisation de cette espèce comme témoin négatif dans nos biotests (cf. § 3.2.1.2).

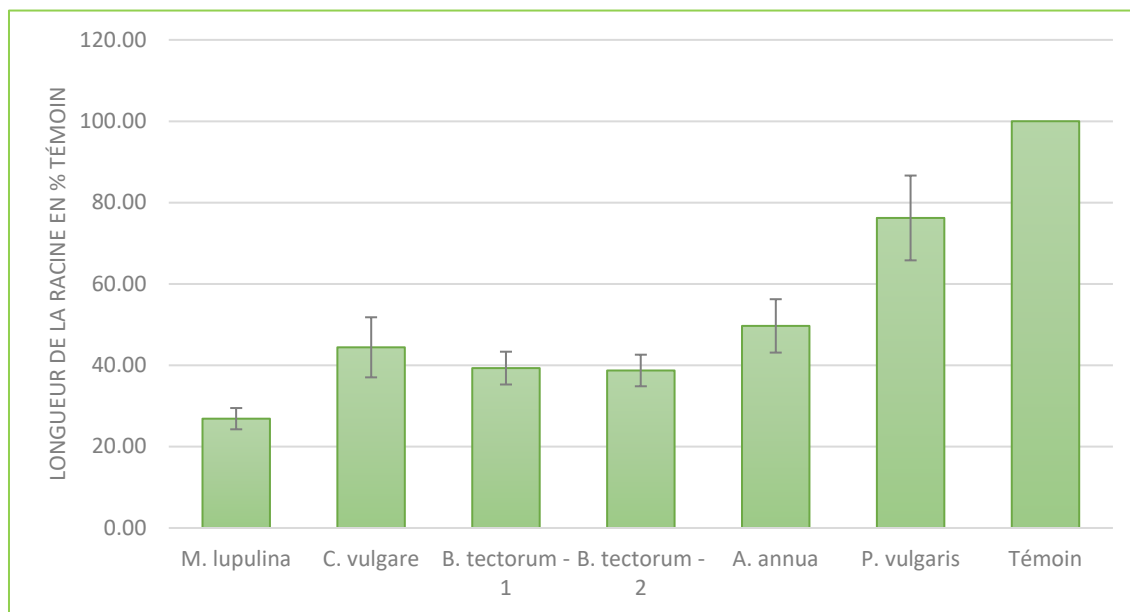


Figure 24. Effet, sur la croissance de racines de *Lepidium sativum*, de l'incorporation à un substrat viticole de résidus secs (parties aériennes) de différentes espèces végétales (Favre 2020)

### 3.5.2. Vignoble des Rives de Prangins

Un essai sous le rang de vignes de Chasselas a été mené dans le vignoble expérimental de la Haute école de Changins. Le semis a été effectué en automne 2019 avec trois mélanges de *B. tectorum*, *M. lupulina* et *A. serpyllifolia* et deux témoins : (1) travail du sol avec disques crénelés et étoiles bineuses et (2) flore spontanée. Un travail de Bachelor est actuellement en cours de traitement des résultats de cet essai. Celui-ci, en plus du suivi floristique, a consisté en de nombreuses mesures sur la vigne et sur le raisin. Les résultats aujourd'hui disponibles montrent une levée du semis peu concluante en 2020. La cause probable réside dans la fertilité excessive du sol et dans l'implantation depuis plusieurs années de nombreuses adventices problématiques (*Elymus repens*, *Potentilla reptans*, *Cirsium arvense*, *Bromus sterilis* (plus vigoureux et tardif que *B. tectorum*)...). Aucune différence n'a été observée sur la vigne ou sur les moûts entre les variantes, ce qui n'est pas surprenant au vu du terrain fertile et des réserves que possède la vigne. C'est généralement à partir de la deuxième année que l'on peut constater des différences marquées. Malgré tout, au printemps 2021, la variante fauchée à la débroussailluse début septembre 2020 montre une levée impressionnante de *B. tectorum*, ce qui tend à confirmer les observations réalisées avec une seule fauche tardive dans l'essai de Changins.

Cet essai a également permis la mise en évidence d'une problématique concernant la réalisation de semis dans les vignobles en agriculture biologique, en particulier dans les zones non mécanisables : l'impossibilité d'utiliser un herbicide avant semis ne permet pas toujours de lutter efficacement contre la concurrence des adventices vivaces bien installées.

Une autre problématique consiste en l'adaptation du semis à des vignes situées en pédoclimats à tendance humide. Ce mélange est en effet constitué de plantes des milieux secs et peu fertiles.

## **3.6. Synthèse de la partie expérimentale et espèces sélectionnées**

### **3.6.1. *Arenaria serpyllifolia***

L'espèce s'est révélée particulièrement prometteuse dans les essais au champ, en particulier comme espèce « accompagnatrice » au stade de l'installation du couvert. A noter que l'intérêt de cette plante, compte tenu de sa phénologie (printanière précoce) et de son comportement (croissance modeste, peu vigoureuse) avait été relevée empiriquement dans le cadre de suivi de plusieurs parcelles enherbées, notamment en Valais (Emmery, comm. pers.).

### **3.6.2. *Bromus tectorum***

Le brome des toits (*B. tectorum*), sur la base de son comportement au champ, avait déjà été repéré dans un essai de comparaison d'espèces destinées à l'enherbement des vignes (Delabays *et al* 2000); à l'époque, nous avons suggéré la présence d'effets allélopathiques pour expliquer la bonne maîtrise des adventices offerte par cette espèce. Les résultats obtenus dans le cadre du projet Noglyphos ont confirmé l'existence de fortes propriétés phytotoxiques chez cette espèce. Surtout, ils ont permis de déterminer 3 molécules impliquées : l'acide chlorogénique, le cynaroside et une quercétine. Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour la sélection d'écotypes particulièrement allélopathiques. Parallèlement, il va permettre de préciser la dynamique saisonnière de production de ces molécules dans la plante, et donc d'optimiser sa gestion au champ (régime de fauches par exemple, en vue de la production d'un mulch particulièrement allélopathique).

En tant qu'annuelle (hivernale), sa pérennité est souvent délicate à assurer. Cette étude a permis de mettre en évidence qu'une gestion mieux adaptée (fauche basse ou travail superficiel du sol en fin d'été) peut favoriser de nouvelles germinations spontanées à l'automne. Actuellement, c'est une utilisation en mélange qui est aujourd'hui envisagée.

### **3.6.3. *Clinopodium vulgare***

L'espèce, et plusieurs de ses extraits, se sont révélés fortement allélopathiques. Les molécules impliquées n'ont pas encore été déterminées avec précision, mais les chromatogrammes obtenus indiquent la présence d'un composé phénolique (de type hexoside cafféique) et d'acide chicorique, ou d'un dérivé de ce dernier (lutéoline-7-o-glucuronide ou thermopsoside). Dans le cadre de ce projet, la plante présente un comportement au champ a priori peu adapté à une utilisation sur le cavaillon (forte croissance). Néanmoins, certaines observations dans les essais au champ suggèrent qu'un régime de fauche adapté pourrait générer un développement et un comportement acceptable. A ce stade, l'espèce reste très intéressante pour une utilisation dans les mélanges destinés à l'enherbement des inter-rangs.

### **3.6.4. *Medicago lupulina***

L'espèce présente de très fortes propriétés phytotoxiques en laboratoire. A ce stade, les molécules impliquées n'ont pas été déterminées, mais l'ensemble des accessions testées se sont révélées très actives dans nos biotests, souvent même plus que notre témoin positif (une lignée d'*Artemisia annua* particulièrement riche en artémisinine). Une variation importante existe par ailleurs entre les accessions étudiées : le matériel testé ayant été produit et récolté en parallèle, dans des conditions environnementales identiques, il est très probable que cette variation soit d'origine génétique (héritabilité au sens large), ce qui ouvre des perspectives de création de lignées améliorées. Les populations sauvages de l'espèce offrent également une importante variabilité au niveau morphologique, avec des types nanisants et/ou traçants (rampants), potentiellement bien adaptés pour l'enherbement des cavaillons (figure 25).





Figure 25: Ecotypes de *Medicago lupulina*, d'origine suisse, cultivés en parallèle (conditions environnementales identiques), et présentant une morphologie (*habitus*) et une phénologie très variables.

Les variétés fourragères sont également allélopathiques, mais trop vigoureuses pour une utilisation optimale sur le cavaillon. La production de semences de lignées sélectionnée se justifie donc pleinement (cf § 4).

#### 3.6.4. *Origanum vulgare*

Cette espèce également a montré d'intéressantes propriétés phyto-toxiques dans le cadre de nos biotests. Cependant, comme pour *C. vulgare*, sa hauteur relativement importante, son cycle végétatif synchronisé avec celui de la vigne et la profondeur de son enracinement suggèrent que l'espèce est probablement relativement concurrentielle, et donc peu adaptée à un semis sur le rang de la culture. Comme *C. vulgare*, elle présente toutefois un intérêt potentiel pour une utilisation dans les inter-rangs de cultures mécanisables.

## 4. Multiplication et utilisation des lignées sélectionnées

Plusieurs lignées de *Medicago lupulina* ont été rassemblées et décrites dans le cadre du travail de Quarta (2018), d'autres écotypes et espèces sont issus de récoltes réalisées en parcelles viticoles (tableau 8).

Tableau 8. Espèces et écotypes spontanés récoltés dans diverses parcelles viticoles dans le cadre du projet NOGLYPHO.S

Espèces	Lieu de récolte	Année de récolte
<i>Bromus madritensis</i>	Puplinges	2018
<i>Clinopodium vulgare</i>	Bernex	2018
<i>Lotus corniculatus</i>	Bernex	2018
<i>Lotus corniculatus</i>	Satigny	2018
<i>Medicago lupulina</i>	Bernex	2018
<i>Medicago minima</i>	Soral	2018
<i>Prunella vulgaris</i>	Puplinges	2018
<i>Prunella vulgaris</i>	Bernex	2018
<i>Clinopodium vulgare</i>	Bernex	2019
<i>Lamium purpureum</i>	Confignon	2019
<i>Lamium purpureum</i>	Puplinges	2019
<i>Lotus corniculatus</i>	Satigny	2019
<i>Medicago lupulina</i>	Dardagny	2019
<i>Medicago minima</i>	Soral	2019
<i>Lamium purpureum</i>	Confignon	2019
<i>Lamium purpureum</i>	Presinges	2019
<i>Veronica persica</i>	Confignon	2019
<i>Veronica persica</i>	Bernex	2019
<i>Medicago minima</i>	Leytron	2020

Au total, dans le cadre de ce projet, 25 écotypes, issus de 8 espèces (tableau 9), ont été sélectionnés sur la base de leur comportement au champ et/ou de leurs propriétés phyto-toxiques mises en évidence avec nos biotests de *screening* (cf. § 3.2.1.2).

Tableau 9. Nombre d'écotypes, par espèce, rassemblés dans le cadre du projet NOGLYPHOS

Espèces	Nombre d'écotypes
<i>Bromus madritensis</i>	1
<i>Clinopodium vulgare</i>	2
<i>Lamium purpureum</i>	2
<i>Lotus corniculatus</i>	3
<i>Medicago lupulina</i>	9
<i>Medicago minima</i>	2
<i>Prunella vulgaris</i>	4
<i>Veronica persica</i>	2

Les quantités de semences d'origine, parfois récoltées sur 1 seul individu, sont donc généralement très réduites. Des premiers cycles de multiplication des semences ont été réalisés sur le site de Lullier (GE) en 2019 et 2020.

De ces lots, des semences de 5 écotypes de *Medicago lupulina* ont été remis au printemps 2021, pour expérimentations au champ (Marcelin/VD), à l'antenne romande du FiBI (David Marchand).

Parallèlement, une partie de ce matériel sera également utilisée, dès l'automne 2021, dans le cadre du projet national VIGNESOL (cf. § 6), sur le domaine expérimental de l'Agroscope, à Changins.

Pour une production à plus grandes échelles, des lots de semences de *Lamium purpureum* (2 écotypes), *Medicago lupulina* (5 écotypes) et *Veronica persica* (2 écotypes) ont été remis à la firme OH Semences, notre partenaire sur ce projet.

## 5. Autres mises en valeurs

### 5.1 Publications en lien avec la projet NOGLYPHOS

Berthet A., Delabays N., 2021. Heritability of phytotoxic properties of *Medicago lupulina* : application of an optimised biotest on dry leaves tissues of different accessions. (en prép.)

Burki L. ; 2019. *Caractérisation structurelle des métabolites allélopathiques de Medicago lupulina L.* Travail de bachelor, EIV (Sion), 18 p.

Davet H. ; 2018. *Caractérisation structurelle de métabolites allélopathiques de Bromus tectorum L.* Travail de bachelor, EIV (Sion), 28 p.

Delabays N, Grogg A.-F., Mota M., Piantini U. ; 2019. Selection of plant species for permanent ground cover in vineyards: looking for an agronomic and environmental optimum. *BIO Web of Conferences* **15** (42nd World Congress of Vine and Wine), <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191501007>

Delabays N, Fantasia S., Berthet A., Davet H, Piantini U., Mota M., 2021. Couverts viticoles et arboricoles: utilisation de lignées végétales peu concurrentielles, sélectionnées pour leurs propriétés allélopathiques. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* (en prép.)

Fantasia S. 2021; Alternative to herbicide use : functional traits characterization of promising plants for vine row sowing. Travail de master, HES-SO (Changins), 72 p.

Fantasia, S., Delabays, N., Heger, T., Zufferey, V., Noll, D., Lamy, F., Mota, M., 2020. Alternative aux herbicides : choix et entretien d'espèces pour la couverture du rang de culture. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **52** (5), 282-291.

Favre, E., 2020. *Etude d'espèces végétales optimales pour la couverture en cultures spéciales.* Thèse de bachelor, HES-SO hepia, Genève, 90 p.

Hossli, C. 2021. Alternatives aux herbicides : Impact de semis spécifiques sur la flore et le comportement de la vigne. Travail de Bachelor, Haute école de Changins (en prép.)

Quarta I. ; 2018. Création d'un mélange optimal de couverture en cultures spéciales pérennes: suivi de parcelles expérimentales pilotes et établissement d'une collection de *Medicago lupulina*. Thèse de bachelor, HES-SO hepia, Genève, 84 p.

Vermeulen H., 2018. *Développement d'un biotest in vitro pour l'isolation des molécules allélopathiques de plantes de couverture.* Thèse de Bachelor, HES-SO hepia, Genève, 107 p.

### 5.2 Articles dans la presse (professionnelle)

Pillonel, L. 2018. L'interférence chimique entre plantes à l'étude, pour maîtriser les adventices. *AgriHebdo*, 15 juin 2028.

Guigard B. 2021. En préparation, *Terre et Nature*, août 2021

### 5.3 Conférences et présentations

42<sup>nd</sup> World Congress of Vine and Wine, Genève, 12 juillet 2019 : *Selection of plant species for permanent ground cover in vineyards: looking for an agronomic and environmental optimum.*

Journée d'information de l'Union fruitière lémanique et Forum Bio Arbo Romand 2020, 6 février 2020, Marcellin (VD) : *Comment choisir les espèces pour un enherbement optimal.*

Séances d'informations Viti+, Prometerre (vulgarisation agricole vaudoise), 7 et 8 avril 2021, Lausanne : *Gestion des plantes indésirables au vignobles.*

## 6. Conclusion générale et perspectives

Un des premiers acquis du projet NOGLYPHOS est le développement de biotests consolidés. Le biotest de *screening*, destiné à la détection rapide de plantes présentant des propriétés phytotoxiques, nous a permis de sélectionner plusieurs espèces potentiellement très fortement allélopathiques : *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*, *Origanum vulgare*. Réalisé directement sur des substrats issus de parcelles agricoles, il peut aujourd'hui être appliqué, en routine, pour la recherche de plantes intéressantes dans d'autres situations agronomiques également : sélection de variétés cultivées allélopathiques, ou de plantes de couverture en grandes cultures, par exemple. L'inclusion de témoins négatif (*Prunella vulgaris*) et positif (une lignée d'*Artemisia annua* riche en artémisinine) constitue une optimisation importante de ce biotest. De même, l'application du micro-biotest, en parallèle aux protocoles d'extraction, de purification et d'analyses phytochimiques développés dans le cadre du projet, qui nous ont notamment permis de déterminer 3 des molécules actives de *Bromus tectorum*, constituent un outil performant pour la recherche de composés allélopathiques.

Aujourd'hui, sur la base des analyses phytochimiques réalisées sur le matériel issu de l'application de ces biotests, ainsi que sur les observations effectuées au champ, plusieurs espèces ont pu être sélectionnées en vue d'une utilisation optimale dans des couverts viticoles ou arboricoles, y compris sur le rang de culture. Nous pouvons ainsi proposer un mélange destiné à la couverture du cavaillon, composé des 3 espèces suivantes : *B. tectorum*, *M. lupulina* et *A. serpyllifolium*. Cette association de plantes s'est avérée particulièrement efficace et complémentaire pour les premières phases d'installation d'un couvert. *C. vulgare* et *O. vulgare*, des espèces potentiellement très allélopathiques, ont présenté un potentiel de concurrence plus élevé : moins adaptées donc à un semis sur le rang de culture, elles présentent toutefois un intérêt potentiel pour l'enherbement des inter-rangs de culture mécanisables.

D'une manière générale, les observations rassemblées dans le cadre du projet NOGLYPHOS révèlent une grande variabilité, entre espèces, mais également entre lignées d'une même espèce, en ce qui concerne leurs propriétés phytotoxiques, leurs traits fonctionnels et leurs comportements au champ. Ce constat ouvre des perspectives d'amélioration dans l'installation de ces couverts végétaux au travers d'un choix ciblé des espèces à utiliser, voire par la création de lignées optimisées (programme d'amélioration génétique). Parallèlement, les dynamiques de végétation, parfois fortement divergentes, observées avec certaines espèces en fonction de la gestion appliquée (régimes de fauches) indiquent également des pistes d'amélioration dans l'entretien de ces couverts. A l'avenir, ce sera probablement la combinaison entre un choix ciblé des espèces et un protocole de gestion précis, par ailleurs adaptées aux conditions pédo-climatiques et à la situation agronomique (cépage, mode de conduite) des parcelles, qui permettra un entretien optimal du sol.

Concernant les suites directes du projet NOGLYPHOS, on peut mentionner la production de semences, maintenant initiée à large échelle par l'entreprise partenaire du projet, de lignées sélectionnées sur la base de leurs caractéristiques phyto-chimiques et morphologiques. Parallèlement, les connaissances et le matériel acquis dans le cadre du projet NOGLYPHOS bénéficieront directement à l'important projet national VIGNE-SOL, initié cette année, consacré aux techniques innovantes d'entretien du sol en viticulture. Ce projet fédérateur, soutenu par l'OFAG et bénéficiant d'un budget de plus de CHF 700'000.-, réunit le FiBL, l'Agroscope, l'école de Changins et la filière « Agronomie » de l'HEPIA.

## 7. Bibliographie

- Berthet A., Delabays N., 2021. Heritability of phytotoxic properties of *Medicago lupulina* : application of an optimised biotests with dry leaves tissues of different accessions. (en prép.)
- Burki L. ; 2019. *Caractérisation structurelle des métabolites allélopathiques de Medicago lupulina L.* Travail de bachelor, EIV (Sion), 18 p.
- Davet H. ; 2018. *Caractérisation structurelle de métabolites allélopathiques de Bromus tectorum L.* Travail de bachelor, EIV (Sion), 28 p.
- Delabays N.; 2020. *Projet: Enherbement et biodiversité en viticulture (BIODIVITI 2027-2029). Rapport 2019 (Rapport final)*, hepia, Genève, 32 p.
- Delabays N. , Bohren C. ; 2008. Herbicidal potential of artemisinin and allelopathic properties of *Artemisia annua* L.: from the laboratory to the field. *Journal of Plant Diseases and Protection* **22**, 317-322.
- Delabays N, Grogg A.-F., Mota M., Piantini U. ; 2019. Selection of plant species for permanent ground cover in vineyards: looking for an agronomic and environmental optimum. *BIO Web of Conferences* **15** (42nd World Congress of Vine and Wine), <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191501007>
- Delabays N., Pétremand G., Fleury D.; 2016. Comparaison de 6 mélanges pour l'enherbement viticole dans l'arc lémanique. *Revue suisse Vitic., Arboric., Horti* **48**, 322-329.
- Delabays N., Slacanin I., Bohren C. (2008). Herbicidal potential of artemisinin and allelopathic properties of *Artemisia annua* L: from the laboratory to the field. *J. Plant Dis. Protect.*, Special Issue XXI: 317–322
- Delabays N., Spring J.-L., Mermillod G., 2006. Essai d'enherbement de la vigne avec des espèces peu concurrentielles: aspects botaniques et malherbologiques. *Revue suisse Vitic., Arboric., Horti* **33**, 344-354.
- Delabays N., Spring J.-L., Ançay A., Mosimann E., Schmid A., 2000. Sélection d'espèces pour l'enherbement des cultures spéciales. *Revue suisse Vitic., Arboric., Horti* **32**, 95 - 104.
- Delabays N., Wirth J., Bohren C., Mermillod G., De Joffrey J.-P., 2009. L'allélopathie: un phénomène controversé, mais prometteur. Etude et applications à l'agronomie. *Revue suisse Agric.* **41**, 313-319.
- Fantasia S. ; Alternative to herbicide use : functional traits characterization of promising plants for vine row sowing. Travail de master, HES-SO (Changins), 72 p.
- Fantasia, S., Delabays, N., Heger, T., Zufferey, V., Noll, D., Lamy, F., Mota, M., 2020. Alternative aux herbicides : choix et entretien d'espèces pour la couverture du rang de culture. *Revue suisse Vitic., Arboric., Horti* **52** (5), 282-291.
- Favre, E., 2020. Etude d'espèces végétales optimales pour la couverture en cultures spéciales. Thèse de bachelor, HES-SO hepia, Genève, 90 p.
- Lee S. *et al.*; 2011. Simultaneous determination of luteolin and luteoloside in dandelions using HPLC. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **52** (5), 536.
- Mushtaq, W., Siddiqui, M.B., Hakeem, K.R., 2020. *Allelopathy. Potential for green agriculture*. Springer International Publishing,

Oerke E.-C., 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144** (1), 31 - 43

Quarta I. ; 2018. Création d'un mélange optimal de couverture en cultures spéciales pérennes: suivi de parcelles expérimentales pilotes et établissement d'une collection de *Medicago lupulina*. Thèse de bachelor, HES-SO hepia, Genève, 84 p.

Scotti L. *et al.*; 2011. <sup>13</sup>C NMR spectral data and molecular descriptors to predict the antioxidant activity of flavonoids. *Braz. J. pharm. Sci.*, **47** (2), 2011.

Vermeulen H., 2018. *Développement d'un biotest in vitro pour l'isolation des molécules allélopathiques de plantes de couverture*. Thèse de Bachelor, HES-SO hepia, Genève, 107 p.