Intérêt du rapport Δ -9-THC / CBD dans le contrôle des cultures de chanvre industriel

The advantage of the Δ -9-THC / CBD ratio in the control of industrial hemp crops

Gilbert FOURNIER^{(1)*}, Olivier BEHEREC⁽²⁾, Sylvestre BERTUCELLI⁽²⁾

(1) Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8076, CNRS (BioCIS), Faculté de Pharmacie, 5, rue J.-B. Clément - 92296 CHÂTENAY-MALABRY

(2) Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre (FNPC), 20, rue Paul Ligneul - F-72000 LE MANS

* Auteur à qui adresser la correspondance : Professeur Gilbert FOURNIER, Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8076, CNRS (BioCIS), Faculté de Pharmacie, 5, rue J.-B. Clément - F-92296 CHÂTENAY-MALABRY CEDEX
Tél : 01 46 83 55 97 - Fax : 01 46 83 57 10 - E-mail : gilbert.fournier@cep.u-psud.fr

(Reçu le 7 mai 2003 ; accepté le 12 novembre 2003)

RÉSUMÉ

En France, les cultures de chanvre industriel représentent environ 10 000 hectares chaque année. Selon la réglementation européenne en vigueur depuis 2001, 30 % des superficies du chanvre destiné à la production de fibres doivent être contrôlées : détermination de la teneur en Δ -9-tétrahydrocannabinol (Δ -9-THC, substance responsable des propriétés psychotropes du chanvre). La teneur en Δ -9-THC ne doit pas être supérieure à 0,2 %. Dans la procédure officielle à mettre en œuvre pour de tels contrôles, c'est l'échantillonnage qui est la phase la plus contraignante. Paradoxalement, cette même procédure pourrait être considérablement allégée par la prise en considération d'un critère supplémentaire, la valeur du rapport α = teneur en Δ -9-tétrahydrocannabinol / teneur en cannabidiol (α = Δ -9-THC / CBD). En effet, ce rapport est quasiment constant (0,03 à 0,04 pour la variété Fedora 17, par exemple) d'une part durant toute la végétation et, d'autre part, pour n'importe quelle partie verte de la plante. Ainsi, l'échantillonnage peut se faire à n'importe quel moment, sur une très petite quantité de matière végétale à prélever sur chaque plante. La proposition de retenir la valeur du rapport α = Δ -9-THC / CBD < 0,15, semble adaptée, au niveau européen, au chanvre destiné à la production industrielle de fibres.

MOTS-CLÉS

Chanvre, Cannabis sativa, delta-9-tétrahydrocannabinol, cannabidiol, dosage, réglementation, Δ -9-THC / CBD.

SUMMARY

In France, the industrial hemp crops represent approximately 10,000 ha each year. According to the European regulation in force since 2001, 30 % of hemp areas cultivated for fibre production must be inspected by determination of the Δ -9-tetrahydrocannabinol level (Δ -9-THC) which is the main psychotropic substance of Cannabis. The content of Δ -9-THC must not be higher than 0.2 %. In the official procedure for such controls, sampling is the most demanding phase. Paradoxically, considering an additional parameter should make this procedure easier, calculating the ratio α = Δ -9-tetrahydrocannabinol (%) / cannabidiol (%) (α = Δ -9-THC / CBD). Actually, this ratio is about constant (0.03 to 0.04 for the variety Fedora 17, for example) for all green parts of the plant during all its growth. In this way, sampling can be conducted at any time using a small quantity of plant matter taken on each plant. On the European level, the proposal to consider the value of the ratio α = Δ -9-THC / CBD < 0.15 seems to be adapted to the hemp intended for the industrial production of fibres.

KEY-WORDS

Hemp, Cannabis sativa, delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, quantification, regulation, Δ -9-THC / CBD

Introduction

La culture du chanvre (*Cannabis sativa* L., Cannabaceae) est traditionnelle en France. Elle se fait encore aujourd'hui chaque année sur près de 10 000 ha. Les fibres de la tige ont des utilisations industrielles variées. Des opérations de sélection, menées depuis plus d'une vingtaine d'années, ont permis d'obtenir des variétés à teneur particulièrement faible en Δ -9-tétrahydrocannabinol (Δ -9-THC), principale substance responsable des propriétés psychoactives de la plante (1, 2).

Selon une réglementation datant de l'année 2000, les variétés autorisées à être cultivées doivent présenter une teneur en Δ -9-THC ne dépassant pas 0,2 %. Le texte réglementaire détaille, par ailleurs, la «Méthode communautaire pour la détermination quantitative du Δ -9-THC des variétés de chanvre» (3). Cette méthode officielle a été largement commentée dans un récent travail (4).

Il est, certes, fondamental de déterminer la teneur du chanvre en Δ -9-THC, notamment en termes de santé publique, mais, aujourd'hui, ce seul critère n'est, à l'évidence, plus suffisant pour apprécier le potentiel toxicomanogène ou non d'une culture. Par ailleurs, la méthode communautaire est très contraignante, ce qui oblige à faire des choix quant aux analyses à diligenter.

Après quelques rappels relatifs, d'une part, à la composition chimique du chanvre, puis, d'autre part, à sa réglementation, seront présentées les évolutions des teneurs moyennes en cannabinoïdes au cours de la croissance et selon les parties prélevées. Une meilleure connaissance de ces critères de variation des principales substances chimiques du chanvre, dont le Δ -9-THC, est en effet nécessaire pour envisager de faire la proposition de la prise en compte de paramètres plus stables, donc plus pertinents.

Rappels chimiques

Plus d'une soixantaine de cannabinoïdes ont été décrits dans le chanvre. Il s'agit de substances spécifiques, d'origine terpénique, résultant de la condensation du pyrophosphate de géranyle et de l'olivétol. Le premier cannabinoïde ainsi formé est le cannabigérol (CBG) ; les autres en dérivent, notamment les dérivés du tétrahydrocannabinol (THC), du cannabidiol (CBD) et du cannabichromène (CBC). A noter que le cannabinol (CBN) n'est pas un cannabinoïde naturel, il s'agit d'un produit de dégradation du THC ; il est normalement absent dans les plantes fraîches ou dans les échantillons récemment préparés (5, 6).

La plupart des cannabinoïdes naturels existent sous forme acide (dérivés carboxyliques) dans la plante

fraîche ; au cours du séchage, puis de la conservation, il se produit une décarboxylation conduisant aux formes neutres (5).

Tous les cannabinoïdes possèdent une chaîne latérale hydrocarbonée ; il s'agit le plus fréquemment d'une chaîne pentylique (dérivés C5) ou, plus rarement, propylique (dérivés C3), ou seulement d'un méthyl (dérivés C1). Ainsi, par exemple, pour les tétrahydrocannabinols, selon la position de la double liaison, les dérivés Δ -8 et Δ -9 ont été décrits. Pour chacun d'eux, selon la fraîcheur de l'échantillon analysé, ils se trouvent sous forme acide ou neutre. Pour le Δ -9-THC, selon la nature de la chaîne latérale, ont été identifiés le Δ -9-THC-C5 = Δ -9-THC (Δ -9-tétrahydrocannabinol), le Δ -9-THC-C3 = Δ -9-THCV (Δ -9-tétrahydrocannabivarine) et le Δ -9-THC-C1 (Δ -9-tétrahydrocannabiorcol) (5). Il est à noter que parmi tous ces tétrahydrocannabinols, le Δ -9-THC-C5 est le plus fréquent, les autres étant beaucoup plus rarement rencontrés.

Selon les proportions relatives de Δ -9-THC (principal cannabinoïde responsable des propriétés psychotrope du *Cannabis*) et de CBD (cannabinoïde non psychotrope), on distingue plusieurs phénotypes (encore appelés types chimiques ou chimiotypes) (1, 2, 5 - 14) ; la figure 1 permet de les visualiser (2, 8). Il est désormais classiquement admis que les proportions relatives des principaux cannabinoïdes dépendent de facteurs génétiques, mais que leurs teneurs sont néanmoins influencées par des facteurs écologiques. Concrètement, les facteurs génétiques conditionnent une variation considérable de la teneur en Δ -9-THC (d'un facteur 1 à plus de 1 000) alors que les facteurs écologiques sont responsables d'une variation beaucoup plus faible (de 1 à 2 environ) (2). Pour tenir compte de ces variations, mais aussi pour tenter de classer les différentes variétés, plusieurs méthodes ont été proposées. Elles consistent, pour certaines, à établir différents rapports de teneurs en plusieurs cannabinoïdes :

$(\Delta$ -9-THC + CBN) / CBD : > 1 = phénotype drogue ; < 1 = phénotype fibre (7)

Δ -9-THC / CBD et CBN / CBD : rapports > 1 = chanvre à résine ; rapports < 1 = chanvre textile (12).

Il en est de même pour un autre rapport, plus complexe, où sont pris en considération au numérateur les cannabinoïdes présentant des propriétés psychotropes ou produit de dégradation des précédents (CBN) et au dénominateur des cannabinoïdes non psychotropes comme le CBD, son dérivé C3 : CBDV, le CBC, le CBG et l'un de ses dérivés mono-méthyl-éther (le CBGM) :

$(\Delta$ -9-THC + Δ -9-THCV + CBN + Δ -8-THC) / (CBDV + CBD + CBC + CBG + CBGM). Si ce rapport est

supérieur à 1 : phénotype drogue ; si rapport inférieur à 1 : phénotype fibre (9).

Une autre classification ne retient que les teneurs elles-mêmes en THC et en CBD ; ainsi, si $\text{THC} > 0,3\%$ et $\text{CBD} < 0,5\%$: phénotype drogue ; si $\text{THC} > 0,3\%$ et $\text{CBD} > 0,5\%$: phénotype drogue intermédiaire et si $\text{THC} < 0,3\%$ et $\text{CBD} > 0,5\%$: phénotype non-drogue (8).

A côté de ces trois phénotypes très fréquents (drogue, drogue intermédiaire et fibre), basés sur les proportions relatives de THC et de CBD (cf. figure 1), d'autres, plus rares, ont été décrits. Pour ces derniers, le cannabinoïde majoritaire est alors soit le $\Delta\text{-9-THC-C3}$ (THCV) pour un phénotype retrouvé dans des chanvres originaires d'Afrique du Sud (15), soit le CBG pour un phénotype identifié pour la première fois en France (16).

Mais d'autres méthodes de classification ont été proposées ; certaines sont basées sur la détermination de profils chromatographiques (CPG ou CLHP) (17, 18), ou plus récemment sur des analyses ADN (technique RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) (19-26).

Il est important de remarquer que la plupart de ces propositions de classification ont été faites en se basant sur des analyses individuelles de plantes de différentes variétés et/ou de différentes origines géographiques.

culture est autorisée (tableau I) ne doivent pas avoir une teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ supérieure à $0,3\%$ (28-31). De plus, ces variétés peuvent bénéficier de paiements à la surface de la part de la Communauté Européenne, mais à condition que leur teneur soit inférieure à $0,2\%$ (3, 32-35). A noter qu'une harmonisation des législations est en cours.

Selon l'annexe au Règlement (CE) 2860/2000 de la Commission du 27 décembre 2000 (3), la détermination quantitative du $\Delta\text{-9-THC}$ des variétés doit se faire, selon le cas, en appliquant une procédure A ou une procédure B. Le tableau II rassemble les caractéristiques de ces deux procédures. Il convient de remarquer qu'ici il ne s'agit pas d'analyses individuelles ; en effet, selon la procédure mise en œuvre, l'analyse est effectuée sur des parties différentes de 50 ou 200 sommités de plantes prélevées à des époques différentes.

Commentaires relatifs à la procédure officielle d'échantillonnage

Taille de l'échantillon

La teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ d'un échantillon est, comme cela a été précédemment rappelé, considérablement influencée par la répartition chimiotypique au sein de la variété. Il a été montré que pour une variété constituée de plantes n'appartenant qu'à un seul chimiotype, l'influence du nombre de plantes prélevées est réduite. A l'inverse, pour des variétés non sélectionnées sur des critères chimiotypiques, plus le nombre de plantes dans l'échantillon est faible, plus la variation de la teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ est importante. L'application de la procédure A ou de la procédure B ne peut alors conduire au même résultat. Il a, d'ailleurs et logiquement, été montré que l'application de la méthode A ne peut conduire qu'à un résultat supérieur, plus variable et moins répétable, que lors de l'application de la méthode B (3, 4).

Partie prélevée

Il est aussi classiquement admis que la teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ est plus élevée dans les inflorescences que dans les feuilles (environ x 2 à 4) et que dans les tiers supérieurs (environ x 2) (36-38). Les plantes issues de cultures établies selon une densité de semis importante (cultures industrielles : 50 kg de semences à l'hectare) présentent une teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ comparable au niveau de la plante entière et du tiers supérieur (méthode B) et un peu plus élevée pour la partie «30 cm» (méthode A). Ces résultats sont prévisibles car les parties vertes (feuilles et inflorescences) coïncident avec le tiers supérieur dont les «30 cm» représentent la majeure-

Figure 1 : Principales "variétés chimiques" du chanvre.

Rappels de la législation en vigueur

Dans un récent travail étaient rappelées les réglementations française (Code de la Santé Publique) et européenne (27).

Pour le Code de la Santé Publique, les variétés dont la

Tableau I : Variétés de Chanvre dont la culture est autorisée selon le Code de la Santé Publique et qui peuvent bénéficier d'une aide de la part de l'Union Européenne.

Variétés autorisées	Code de la Santé publique (28-31)	Réglementation européenne (CE) (3, 32-35)		
		2001	2002	2003
Beniko		+	+	+
Bialobrzeskie		+	+	+
Carmagnola	+	+	+	+
Chamaeleon				+
CS	+	+	+	+
Delta 405	+	+	+	+
Delta Llosa	+		+	+
Dioïca 88	+	+	+	+
Epsilon 68	+	+	+	+
Fasamo		+	+	+
Fedora 17	+	+	+	+
Fedora 19	+	+	+	+
Fedrina 74	+	+	+	+
Felina 32	+	+	+	+
Felina 34	+	+	+	+
Ferimon	+	+	+	+
Fibranova	+	+	+	+
Fibrimon 24	+	+	+	+
Fibrimon 56	+	+	+	+
Futura	+	+	+	+
Futura 75	+	+	+	+
Juso 14		+	+	+
Kompolti		+		
Red Petiole				+
Santhica 23	+	+	+	+
Santhica 27			+	+
Uso 31		+	+	+

Tableau II : Conditions d'échantillonnage à appliquer selon le Règlement (CE) 2860/2000 pour la détermination quantitative du Δ-9-THC chez le chanvre (3).

	Procédure A	Procédure B
Champ d'application	Pour le contrôle de la production	Lors de l'inscription dans la liste des variétés éligibles à l'aide
Prélèvements		
Taille de l'échantillon prélevé dans chaque parcelle	50 plantes	200 plantes
Partie à prélever	30 cm supérieurs contenant au moins une inflorescence femelle pour chaque plante sélectionnée	Tiers supérieurs de chaque plante sélectionnée
Époque du prélèvement	Période comprise entre les 20 jours après le début et les 10 jours après la fin de la floraison	Au cours des 10 jours suivant la fin de la floraison

re partie. Pour les plantes issues de cultures mises en place selon une faible densité (1,5 kg de semences à l’hectare), les ramifications, le développement foliaire et celui des inflorescences sont importants. La teneur en Δ -9-THC sera, à l’évidence, très différente selon la méthode (A ou B) d’échantillonnage appliquée (A >> B) (3, 4).

Date du prélèvement

Différents travaux menés sur le chanvre cultivé en France ont montré que la teneur en Δ -9-THC varie au cours du cycle végétatif de la plante. Ainsi, en début de cycle, la plante ne portant que des feuilles, la teneur en Δ -9-THC croît régulièrement mais reste faible. Dès que la floraison débute, la mesure étant effectuée sur un mélange de feuilles et d’inflorescences, il est normal d’avoir un accroissement. A partir de la fin de la floraison, un nouvel accroissement semble avoir pour origine la perte d’une partie des feuilles, augmentant ainsi la proportion de l’inflorescence. Ces constatations permettent de confirmer que les proportions relatives de feuilles et d’inflorescences influent beaucoup sur la teneur en Δ -9-THC au cours du cycle (4). Divers travaux antérieurs menés notamment aux États-Unis (39, 40) ou en République tchèque (41, 42) étaient déjà parvenus à la même conclusion.

Partie prélevée et date de prélèvement ont donc des influences souvent très importantes sur la teneur en Δ -9-THC. Sur ces deux points, les conditions d’échantillonnage n’étant pas les mêmes selon la procédure A ou la procédure B, les résultats des dosages du Δ -9-THC, en appliquant l’une ou l’autre procédure, ne peuvent être identiques ; par contre, la norme s’y rapportant est la même (Δ -9-THC $\leq$ 0,20 %) (4).

En fait, sans occulter la détermination de la teneur en Δ -9-THC qui reste fondamentale pour apprécier le potentiel psychotrope d’un chanvre, ne faudrait-il pas disposer d’un critère beaucoup plus fiable et stable pour évaluer de manière indiscutable le type des plantes de telle ou telle culture, cela à tout moment et à partir de n’importe quelle partie ?

Pour tenter de répondre à cette interrogation, étudions les variations concomitantes des teneurs en Δ -9-THC et en CBD (rappelons que ce dernier est biogénétiquement proche du Δ -9-THC, mais qu’il ne présente pas de propriétés psychoactives).

Méthodologie

Les cultures de chanvre industriel sont établies sur la base de 50 kg de semences à l’hectare, soit 250 à 300 plantes au m². A maturité, les plantes mesurent environ 3m.

Les dosages du Δ -9-THC ont été effectués, selon la procédure officielle (annexe C du règlement (CE) n° 1177/2000 de la Commission du 31 mai 2000) (3), sur les variétés mentionnées dans le tableau III. En effet, pour bénéficier d’une aide communautaire, «30 % des superficies de chanvre destiné à la production de fibres doivent être contrôlées selon une procure instaurée par chaque État membre» (31).

Tableau III : Teneurs en Δ -9-TCH et rapport α = Δ -9-THC / CBD des variétés de chanvre industriel cultivé en France en 2001 et 2002.

Variétés	% Δ -9-THC (m $\pm$ std)	α = Δ -9-THC / CBD (m $\pm$ std)
Uso 31	0,009 $\pm$ 0,005	0,025 $\pm$ 0,008
Epsilon 68	0,030 $\pm$ 0,014	0,040 $\pm$ 0,013
Futura 75	0,030 $\pm$ 0,012	0,040 $\pm$ 0,010
Ferimon	0,047 $\pm$ 0,022	0,055 $\pm$ 0,020
Felina 34	0,063 $\pm$ 0,036	0,071 $\pm$ 0,026
Fedora 17	0,031 $\pm$ 0,014	0,037 $\pm$ 0,011

Échantillonnage

Dans chaque parcelle, les prélèvements sont réalisés pendant la journée, au cours d’une période comprise entre les vingt jours après le début et les dix jours après la fin de la floraison. Le séchage est effectué à une température inférieure à 70° C. Les échantillons secs sont débarrassés des tiges et des graines puis broyés (poudre demi-fine).

Pour suivre l’évolution des teneurs en cannabinoïdes :

- a) au cours de la croissance : les prélèvements sont effectués tous les 2 ou 3 jours (3 prélèvements par semaine) et concernent les tiers supérieurs de 50 plantes ;
- b) selon la partie prélevée : les parties feuillées de 50 plantes de même hauteur sont prélevées lors de la fin de la floraison. Elles sont coupées en tronçons de 20 cm ; le tronçon supérieur porte le numéro 1, celui situé le plus bas porte le numéro 15. Du fait de la grande densité de population dans les cultures industrielles (250 à 300 plantes au m²), la plupart des tronçons ne portent qu’une seule paire de feuilles. Un échantillon à analyser correspond, pour chaque tronçon, au mélange des parties feuillées des 50 plantes. Les teneurs en Δ -9-THC et en CBD sont déterminées 20 fois sur chaque échantillon.

Analyse du contenu en cannabinoïdes

- Réactifs : Δ -9-THC, CBD et squalène chromatographiquement purs (squalène = étalon interne) ; solution d’extraction : solution à 35mg de squalène / 100ml de n hexane.

- Extraction des cannabinoïdes : dans un tube, peser 100 mg de la poudre préparée ci-dessus et extraire par 5 ml de solution d'extraction. Placer dans un bac à ultrasons pendant 20 min. Centrifuger. Prélever le soluté surnageant = solution à chromatographier. Injecter 1µl.
 - Appareillage : chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme et injecteur split/splitless. Colonne capillaire en verre de 25 m de long et 0,22 mm de diamètre. Phase apolaire de type 5 % phényl-méthyl-siloxane. Température du four : 260° C. Température de l'injecteur et du détecteur : 290° C.
 - Gamme d'étalonnage : quatre points : 0,04 - 0,10 - 0,25 et 0,50 mg/ml de Δ-9-THC et de CBD en solution d'extraction.
 - Résultat : il est exprimé en grammes de Δ-9-THC ou de CBD pour 100 grammes d'échantillon d'analyse, séché jusqu'à poids constant. Le résultat est affecté d'une tolérance de 0,03 % en valeur absolue. Dans les conditions de l'analyse chromatographique, les cannabinoïdes acides sont décarboxylés ; le résultat correspond donc à la somme des formes neutres et acides.
- Les échantillons étant analysés très rapidement après avoir été prélevés (en moins de trois mois), le Δ-9-THC n'est pas dégradé de manière significative ; le CBN n'est pas détecté.
- L'expérience que nous avons des variétés industrielles cultivées en France et de leur sélection entreprise il y a plus d'une vingtaine d'années permet d'affirmer qu'aujourd'hui, en particulier sur le critère «teneur en Δ-9-THC», elles se comportent toutes de façon comparable (43). La variété Fedora 17 étant la plus cultivée en France, ce sont les résultats obtenus avec elle qui seront ici pris en compte. Il s'agit d'une variété sélectionnée, commercialisée depuis 2000, inscrite sur la liste des variétés de chanvre destinées à la production de fibres. Elle n'est constituée que de plantes appartenant au chimiotype «fibres». Sa teneur en Δ-9-THC n'a jamais dépassé 0,1 % (43). Secueni est une variété d'origine roumaine, non inscrite sur la liste des variétés destinées à la production de fibres. Cette variété, n'a pas été sélectionnée sur des critères chimiques. Elle est ici prise en compte à titre de comparaison.

Résultats et discussion

Évolution des teneurs en Δ-9-THC et CBD au cours de la croissance

Cette évolution est étudiée pour les deux variétés Fedora 17 et Secueni.

Variété Fedora 17 (F 17)

L'étude de la variation des teneurs en Δ-9-THC et en CBD montre que jusqu'à 50 - 60 jours après la levée, elles évoluent parallèlement et de façon quasiment linéaire. Après cette période, qui coïncide avec la floraison, elles sont plus fluctuantes mais restent parallèles (figure 2). Ainsi, comme le montre la figure 3, le rapport $\alpha = \Delta\text{-9-THC} / \text{CBD}$ est quasi constant $0,038 \pm 0,005$.

Figure 2 : Évolution de la teneur en Δ-9-THC et en CBD au cours de la croissance - Variété Fedora 17.

Figure 3 : Évolution du rapport $\alpha = \Delta\text{-9-THC} / \text{CBD}$ au cours de la croissance - Variété Fedora 17.

Variété Secueni

Les variations des teneurs en Δ-9-THC et en CBD sont reportées sur la figure 4. On peut constater que dès le début de la végétation (25 - 30 jours après la levée = début du mois de juillet), la teneur en Δ-9-THC dépasse 0,2 %. Elle atteint son maximum (environ 1 %) vers 50 - 60 jours après la levée ; ce stade correspond à la floraison. Tout au long de la fructification, les teneurs en Δ-9-THC restent comprises entre 0,4 et 0,6 %. Les variations de la teneur en CBD évoluent de manière quasiment parallèle à celles du Δ-9-THC. Le rapport $\alpha = \Delta\text{-9-THC} / \text{CBD}$ est, de fait et comme le montre la figure 5, relativement constant tout au long de la croissance de la plante. Il se situe à $0,81 \pm 0,17$.

Figure 4 : Évolution de la teneur en Δ-9-THC et en CBD au cours de la croissance - Variété Secueni.

Figure 5 : Évolution du rapport $\alpha = \Delta\text{-}9\text{-THC} / \text{CBD}$ au cours de la croissance - Variété Secueni.

Conséquences pratiques de ces observations

La méthode officielle de dosage du Δ-9-THC impose d'effectuer les prélèvements pendant une période comprise entre vingt jours après le début et dix jours après la fin de la floraison (ici entre 60 et 80 jours après la levée) (procédure A) ou au cours des dix jours suivant la fin de la floraison (ici entre 70 et 80 jours après la levée) (procédure B). Sans attendre si longtemps, tout prélèvement, même précoce (avant la floraison, par exemple), permet de savoir si une culture de chanvre est, ou non, établie à partir d'une variété à fibres. En effet, dans cette étude, la valeur du rapport $\alpha = \Delta\text{-}9\text{-THC} / \text{CBD}$ permet de faire la distinction, efficacement et à tout moment, entre des variétés industrielles ($\alpha < 0,15$) et des variétés constituées de plantes n'appartenant pas au chimiotype «fibres» ($\alpha > 0,50$).

En se basant sur les résultats obtenus en France avec les autres variétés industrielles classiquement cultivées (tableau III) et sur les résultats de divers travaux menés sur l'évolution de chanvres de diverses origines (39, 41, 42, 44), compte tenu des valeurs ici obtenues (existence d'un facteur 10 entre α pour Fedora 17 et α pour Secueni), une proposition pourrait être faite : retenir 0,15 comme limite du rapport $\alpha = \Delta\text{-}9\text{-THC} / \text{CBD}$.

Évolution des teneurs en Δ-9-THC et en CBD selon la partie prélevée

Une étude a été menée sur plusieurs variétés pour évaluer la teneur en cannabinoïdes dans les différentes parties vertes de la plante. Rappelons que les graines n'en contiennent pas (45). A titre d'exemple, les résultats relatifs à la variété Fedora 17 sont ici rapportés. Les moyennes des analyses sont présentées sur la figure 6. On constate que les teneurs en Δ-9-THC et en CBD varient du simple au double et de façon régulière entre le tronçon terminal et le tronçon distal. Le rapport $\alpha = \Delta\text{-}9\text{-THC} / \text{CBD}$, très logiquement, reste constant quel que soit le prélèvement effectué (figure 7).

Figure 6 : Variations des teneurs en Δ-9-THC et en CBD en fonction du tronçon prélevé - Variété Fedora 17.

Figure 7 : Variations du rapport $\alpha = \Delta\text{-}9\text{-THC} / \text{CBD}$ en fonction du tronçon prélevé - Variété Fedora 17.

Par ailleurs, il avait été montré sur plusieurs variétés que la teneur en Δ-9-THC d'un échantillon était influencée par la partie prélevée en vue de l'analyse (4). Cette constatation a pu être, ici, mise en évidence aussi bien sur la variété Fedora 17 que sur la variété Secueni et ce quelle que soit la période de prélèvement. Les figures 8 et 9 montrent l'évolution des teneurs en Δ-9-THC et en CBD dans les feuilles et les inflorescences de ces mêmes variétés au cours de la croissance des plantes. Il convient de remarquer que les évolutions de ces deux cannabinoïdes sont concomitantes.

Figure 8 : Évolution dans les feuilles et les inflorescences de la teneur en Δ -9-THC et en CBD au cours de la croissance - Variété Fedora 17.

Figure 9 : Évolution dans les feuilles et les inflorescences de la teneur en Δ -9-THC et en CBD au cours de la croissance - Variété Secueni.

Les figures 10 et 11 correspondent à l'évolution du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD dans ces deux variétés. Pour chacune d'elles, on constate la quasi superposition des deux courbes.

Figure 10 : Évolution dans les feuilles et les inflorescences du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD au cours de la croissance - Variété Fedora 17.

Figure 11 : Évolution dans les feuilles et les inflorescences du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD au cours de la croissance - Variété Secueni.

Conséquences pratiques

Rappelons que seules sont autorisées les cultures établies à partir de variétés dont la teneur en Δ -9-THC n'est pas supérieure à 0,2 %. Cette teneur est déterminée à partir des 30 cm supérieurs (méthode A) ou des tiers supérieurs (méthode B). Selon le développement de la plante et l'importance relative de l'inflorescence, le résultat de l'analyse diffèrera en fonction de la mise en œuvre de l'une ou l'autre méthode.

La détermination du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD permet de s'affranchir de cette contrainte puisque, quelle que soit la partie prélevée et à quelque période que ce soit, ce rapport reste quasiment constant.

Il s'agit d'un renseignement précieux permettant de facilement distinguer une culture de chanvre à fibres (ici pour Fedora 17 : $\alpha < 0,06$) d'une culture de chanvre constituée majoritairement de plantes ne présentant pas cette caractéristique (ici pour Secueni $\alpha > 0,50$).

De telles constatations s'appuient, notamment, sur les résultats des deux années (2001 et 2002) de contrôles, réalisés sur les cultures françaises de chanvre industriel, en appliquant la méthode A (27). Plus de 500 résultats d'analyses, correspondant à six variétés cultivées pour leurs fibres, ont permis de constater que les cultures françaises sont toutes établies à partir de variétés respectant la norme en vigueur (Δ -9-THC < 0,2 %). Les teneurs en Δ -9-THC et la valeur du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD pour chacune de ces variétés sont colligées dans le tableau III. Le rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD n'a jamais dépassé 0,105. Des expériences similaires, menées sur des chanvres de diverses origines, montrent également bien cette très importante différence selon la partie prélevée (36, 37).

L'ensemble de ces résultats permet, en toute sécurité, à encore de proposer 0,15 comme limite du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD.

Conclusion

La méthode communautaire pour la détermination quantitative du Δ -9-THC telle qu'elle est décrite dans une annexe au règlement CE n° 2860/2000 (3) prévoit une analyse par chromatographie en phase gazeuse. Dans une même analyse, il suffit de déterminer, en plus, la teneur en CBD pour alors disposer d'un paramètre intéressant : le rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD. Un rapport inférieur à 0,15 est typique d'un chanvre destiné à la production de fibres.

Pour l'inscription d'une nouvelle variété dans la liste officielle des variétés autorisées, la procédure B est évidemment à respecter dans son intégralité ; le rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD constitue alors une information complémentaire importante pour apprécier la conformité de la variété.

Cependant, les auteurs montrent que la procédure peut être simplifiée pour le contrôle de routine des surfaces cultivées avec des variétés autorisées. En effet, de telles variétés sont constituées de plantes présentant le chimiotype «fibre» (cf. figure 1) ; leur teneur en Δ -9-THC n'est pas supérieure à 0,20 %. Rappelons que cette caractéristique est d'ordre génétique et ne peut donc pas être modifiée au cours du développement de la plante. La détermination du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD a alors l'avantage, comme cela a été montré ci-dessus, de pouvoir être réalisée en ne prélevant qu'une seule feuille, à n'importe quel niveau de chaque plante et à n'importe quel moment de sa végétation. Ainsi, en conservant un prélèvement aléatoire sur 50 plantes par parcelle, l'échantillon, alors constitué de 50 feuilles, est très réduit. Le traitement ultérieur de cet échantillon réduit est décrit dans la méthode officielle (séchage et broyage). Les teneurs en Δ -9-THC et en CBD sont déterminées lors de la même analyse et le rapport calculé. Pour être conforme, une culture doit présenter comme caractéristique d'avoir un rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC / CBD inférieur à 0,15, ceci afin de garantir que la teneur en Δ -9-THC n'excède pas 0,20 %.

Cette méthode plus souple, moins contraignante et indépendante des contingences du calendrier est une alternative intéressante à la procédure A. Elle ne la remplace cependant pas en cas d'incertitude sur l'origine des semences (absence de certificat, par exemple) ou sur l'aspect non classique de la culture.

Remerciements : à la Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre (FNPC) et à la Coopérative Centrale des Producteurs de Semences de Chanvre (CCPSC) pour la fourniture des échantillons.

Références

1. Mathieu J.P., Fournier G. La sélection du Chanvre en France. *Psychotropes* 1996 ; 2 : 53-60.
2. Fournier G. La sélection du chanvre à fibres (*Cannabis sativa* L.) en France. Chanvre et THC. C. R. Acad. Agric. Fr. 2000 ; 86 : 209-17.
3. Journal Officiel des Communautés européennes - Règlement (CE) n° 1177/2000 de la Commission du 31 mai 2000 modifiant le règlement (CEE) n° 1164/89 relatif aux modalités d'aide concernant le lin textile et le chanvre. Journal Officiel des Communautés européennes du 1.6.2000, p 131-138.
4. Fournier G., Beherec O., Bertucelli S., Mathieu J.P. A propos des conditions d'échantillonnage pour le dosage du delta-9-tétrahydrocannabinol dans les variétés de chanvre à usage industriel. *Ann. Toxicol. Anal.* 2001 ; 13 : 275-81.
5. Turner C.E., Elsohly M.A., Boeren E.G. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the neutral constituents. *J. Nat. Prod.* 1980 ; 43(2) : 169-234.
6. Turner C.E., Elsohly M.A. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVI. A possible Decomposition of Δ -9-Tetrahydrocannabinol to Cannabinol. *J. Heterocycl. Chem.* 1979 ; 16 : 1667-8.
7. Fetterman P.S., Keith E.S., Waller C.W., Guerrero O., Doorenbos N.J., Quimby M.W. Mississippi-Grown *Cannabis sativa* L. : Preliminary Observation on Chemical Definition of Phenotype and Variations in Tetrahydrocannabinol Content versus Age, Sex, and Plant Part. *J. Pharm. Sci.* 1971 ; 60 : 1246-1249.
8. Small E., Beckstead H.D. Cannabinoid Phenotypes in *Cannabis sativa*. *Nature* 1973 ; 245 : 147-148.
9. Turner C.E., Elsohly M.A., Cheng P.C., Lewis G. Constituents of *Cannabis sativa* L., XIV : Intrinsic problems in classifying Cannabis based on a single cannabinoid analysis. *J. Nat. Prod.* 1979 ; 42 : 317-319.
10. Fournier G. Les chimiotypes du chanvre (*Cannabis sativa* L.). Intérêt pour un programme de sélection. *Agronomie*. 1981 ; 1 : 679-688.
11. Fournier G., Paris M. Détermination de chimiotypes à partir des cannabinoïdes chez le Chanvre à fibres monoïque (*Cannabis sativa* L.). Possibilités de sélection. *Physiol. Vég.* 1980 ; 18 : 349-356.
12. Debruyne D., Moulin M., Bigot M.C., Camsonne R. Identification and differentiation of resinous cannabis and textile cannabis : combined use of HPLC and High-resolution GLC. *Bull. Narcotics, United Nations Publ.* 1981 ; 33(2) : 49-58.
13. de Meijer E.P.M., van der Kamp H.J., Eeuwijk F.A. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* 1992 ; 62 : 187-200.
14. Giroud C. Analysis of Cannabinoids in Hemp Plants. *Chimia* 2002 ; 56(3) : 80-3.
15. Field B.I., Arndt R.R. Cannabinoid compounds in South African *Cannabis sativa* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 1980 ; 32 : 21-24.
16. Fournier G., Richez-Dumanois C., Duvezin J., Mathieu J.P., Paris M. Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa* L. cannabigerol-dominant plants. Biogenetic and agronomic prospects. *Planta Med.* 1987 ; 53 : 277-80.

17. Brenneisen R., ElSohly M.A. Chromatographic and Spectroscopic Profiles of Cannabis of Different Origins : Part I. J. Forensic Sci. 1988 ; 33 : 1385-404.
18. Lehmann T., Brenneisen R. High performance liquid chromatographic profiling of cannabis products. J. Liquid Chrom. 1995 ; 18(4) : 689-700.
19. Rustichelli C., Ferioli V., Baraldi M., Zanolli P., Gamberini G. Analysis of Cannabinoids in Fiber Hemp Plant Varieties (*Cannabis sativa* L.) by High-Performance Liquid Chromatography. Chromatographia 1998 ; 47 : 215-22.
20. Gillan R., Cole M.D., Linacre A., Thorpe J.W., Watson N.D. Comparison of *Cannabis sativa* by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids : a preliminary study. Sc. Justice 1995 ; 35(3) : 169-77.
21. Jagadish V., Robertson J., Gibbs A. RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. For. Sci. Int. 1996 ; 79 : 113-21.
22. Shirota O., Watanabe A., Yamazaki M., Saito K., Shibato K., Sekita S., Satake M. Random Amplified Polymorphic DNA and Restriction Fragment Length Polymorphism analyses of *Cannabis sativa*. Natural Med. 1998 ; 52(2) : 160-6.
23. Lucchese C., Venturi G., Amaducci M.T., Lovato A. Electrophoretic polymorphism of *Cannabis sativa* L. cultivars : characterisation and geographical classification. Seed Sci. Technol. 2001 ; 29 : 239-48.
24. Gilmore S., Peakall R., Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa* : implications for forensic investigations. For. Sci. Int. 2003 ; 131(1) : 65-74.
25. Hsieh H.M., Hou R.J., Tsai L.C., Wei C.S., Liu S.W., Huang L.H., Kuo Y.C., Linacre A., Lee J.C. A highly polymorphism STR locus in *Cannabis sativa*. For. Sci. Int. 2003 ; 131(1) : 53-8.
26. de Meijer E.P.M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.M.C., Ranalli P., Mandolino G. The inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa*. Genetics 2003 ; 163 : 335-46.
27. Fournier G. Le chanvre et sa réglementation européenne en 2003. Teneur en Δ -9-THC des variétés cultivées en France. Ann. Toxicol. Anal. 2003 ; 15 : 190-6 à paraître.
28. Code de la Santé Publique - Article R. 5181 - Décret n° 88-1231 du 29 décembre 1988, art. 1er J.O. du 31 décembre 1988.
29. Code de la Santé Publique - Arrêté du 22 août 1990 portant application de l'article R. 5181 J.O. du 4 octobre 1990.
30. Code de la Santé Publique - Arrêté du 27 mai 1997 modifiant l'arrêté du 22 août 1990 portant application de l'article R. 5181 du code de la santé publique pour le cannabis - J.O. du 31 mai 1997.
31. Code de la Santé Publique - Arrêté du 2 juillet 1999 modifiant l'arrêté du 22 août 1990 portant application de l'article R. 5181 du code de la santé publique pour le cannabis - J.O. du 8 juillet 1999.
32. Journal officiel des Communautés européennes - Règlement (CE) n° 1672/2000 de la Conseil du 27 juillet 2000 modifiant le règlement (CE) n° 1251/1999 instituant un régime de soutien aux producteurs de certaines cultures arables, pour y inclure le lin et le chanvre destinés à la production de fibres.
33. Journal officiel des Communautés européennes - Règlement (CE) n° 2860/2000 de la Commission du 27 décembre 2000 modifiant le règlement (CE) n° 2316/1999 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1251/1999 du Conseil instituant un régime de soutien aux producteurs de certaines cultures arables pour y inclure le lin et le chanvre destinés à la production de fibres, préciser les règles concernant les superficies gelées et modifier les superficies de base pour la Grèce et le Portugal.
34. Journal officiel des Communautés européennes - Règlement (CE) n° 327/2002 de la Commission du 21 février 2002 modifiant le règlement (CEE) n° 2316/1999 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1251/1999 du Conseil instituant un régime de soutien aux producteurs de certaines cultures arables.
35. Journal officiel des Communautés européennes - Règlement (CE) n° 335/2003 de la Commission du 21 février 2003 modifiant le règlement (CEE) n° 2316/1999 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1251/1999 du Conseil instituant un régime de soutien aux producteurs de certaines cultures arables.
36. Turner J.C., Hemphill J.K., Mahlberg P.G. Quantitative determination of cannabinoids in individual glandular trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). Amer. J. Bot. 1978 ; 65 : 1103-1106.
37. Turner J.C., Hemphill J.K., Mahlberg P.G. Trichomes and cannabinoid content of developing leaves and bracts of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). Amer. J. Bot. 1980 ; 67 : 1387-1406.
38. Hemphill J.K., Turner J.C., Mahlberg P.G. Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *Cannabis sativa* L. J. Nat. Prod. 1980 ; 43 : 112-120.
39. Latta R.P., Eaton B.J. Seasonal Fluctuations in Cannabinoid Content of Kansas Marijuana. Econ. Bot. 1975 ; 29 : 153-163.
40. Vogelmann A.F., Turner J.C., Mahlberg P.G. Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of *Cannabis sativa*. J. Nat. Prod. 1988 ; 51 : 1075-1079.
41. Hanus L., Krejci Z. Dynamics of changes in the content of cannabinoid substances during the vegetation period of *Cannabis sativa* L. Acta Univ. Palacki. Olomuc. 1986 ; 114 : 11-29.
42. Hanus L., Subova D Z. The amount of main cannabinoid substances in hemp, cultivated for industrial fibre production and their changes in the course of one vegetation period. Acta Univ. Palacki. Olomuc. 1989 ; 122 : 11-23.
43. Fournier G. A propos de la teneur en delta-9-THC dans les variétés de chanvre à fibres cultivées en France. Ann. Toxicol. Anal. 2003 ; 15 : 30-34.
44. Avico U., Pacifici R., Zuccaro P. Variations of tetrahydrocannabinol content in cannabis plants distinguish the fibre-type from drug type plants. Bull. Narcotics 1985 ; 37(4) : 61-5.
45. Mölleken H., Husmann H. Cannabinoids in seed extracts of *Cannabis sativa* cultivars. J. Intern. Hemp Ass. 1997 ; 4 : 75-83.