

**Université de POITIERS**

**Faculté de Médecine et de Pharmacie**

2014

Thèse n°

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement  
le 24 Octobre 2014 à POITIERS  
par Monsieur DELPECH Vincent  
11 Janvier 1984

Substances toxiques d'origine végétale présentes dans le miel.

A partir de deux exemples : les Alcaloïdes pyrrolizidiniques et les  
Grayanotoxines

Composition du jury :

Président : Madame PAIN Stéphanie, Maître de conférences

Membre : Monsieur BOURGOIN Pierre, Docteur en Pharmacie

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur FAUCONNEAU Bernard



**PHARMACIE**

**Professeurs**

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

**Maîtres de Conférences**

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

**PAST - Maître de Conférences Associé**

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

**Professeur 2<sup>nd</sup> degré**

- DEBAIL Didier

**Maître de Langue - Anglais**

- PERKINS Marguerite,

## *Remerciements*

### **A mon président de Jury, Madame Stéphanie PAIN,**

Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Soyez assurée de ma respectueuse reconnaissance.

### **A mon directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Bernard FAUCONNEAU,**

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse.

Je vous exprime mes sincères remerciements pour vos encouragements, votre disponibilité et votre patience.

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

### **A Monsieur le Docteur Pierre BOURGOIN**

Tu m'as fait l'honneur de participer au jury de cette thèse

Je te remercie pour toutes ces années d'amitié passées à la fac, pour ta gentillesse et ta générosité.  
Un grand merci pour cette mémorable chasse au Dahu !

Veillez trouver ici le témoignage de mon amitié et de mon profond respect.

### **A Monsieur le Docteur Denis BELLENOT,**

Je vous remercie de m'avoir suivi pour mon stage de fin d'étude et de m'avoir inspiré pour le sujet de cette thèse.

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre grande patience et votre aide tout au long de ce travail de thèse.

Soyez assuré de ma respectueuse reconnaissance.

**A mes amis de la faculté de Poitiers**, Nathalie, Marie, Angélique, Frédérique, Loucif et Sarah, merci pour tous ces bons moments.

**A Guillaume et Marie, Augustin et Laura**, que vos unions soient des plus heureuses. Merci pour votre soutien, votre amitié et pour tous ces très bons moments passés, et à venir.

**A l'Amicale des Charentais**, tous en selle avec nos nouvelles recrues.

A ma famille,

A mes parents,

A mon frère Pierre-Olivier, ma belle-sœur Céline et à ma nièce Hortense,

A mon parrain et ma marraine,

A mes beaux-parents, (un grand merci d'avoir pris soin de nous pendant ces derniers mois d'attente).

A mes beaux-frères, mes belles-sœurs et toute la ribambelle de petits neveux et nièces,

Merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années de Pharmacie.

A Domitille et mon fils Thomas,

Avec tout mon amour.

## Abréviations

AP : Alcaloïdes pyrrolizidiniques

ppm : Partie par million

ppb : Partie par billion

HVOD : Veino Occlusive Disease Hepatic

MOS : Maladie d'Obstruction Sinusoïdale

DHP : 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxyméthyl-5H-pyrrolizidine

## Sommaire

### Contenu

Remerciements.....	3
Sommaire .....	6
Introduction.....	8
<b>Le Miel.....</b>	<b>9</b>
I. Histoire et symbolique du miel .....	10
II. Les abeilles et la fabrication du miel .....	12
A. Les abeilles.....	12
1. Classification.....	12
2. Anatomie .....	13
3. Les étapes de l'élaboration du miel [8] .....	14
III. Les plantes mellifères .....	16
A. Le nectar .....	17
1. Composition chimique du nectar .....	17
IV. Le miel et sa composition.....	20
V. Réglementation et critères de qualité.....	22
VI. Propriétés et usages du miel .....	23
A. Le miel comme aliment .....	24
B. Le miel comme médicament .....	24
1. Propriétés antibactériennes, antivirales et antiparasitaires .....	25
2. Propriétés cicatrisantes.....	26
3. Autres propriétés attribuées au miel .....	26
VII. Le marché du miel en France et en Europe.....	27
VIII. Les risques pour la santé humaine .....	28
<b>Les alcaloïdes pyrrolizidiniques.....</b>	<b>28</b>
I. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques, métabolites secondaires de la plante.....	30
A. Généralités .....	30
B. Structure des alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	30
II. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans la plante.....	32
A. Les plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques .....	32
B. Les plantes mellifères à alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	33

C.	Biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques .....	35
1.	Site de la biosynthèse.....	37
2.	La migration des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans la plante .....	37
3.	Les organes d'accumulations .....	37
D.	Fonctions des alcaloïdes dans la plante .....	38
1.	Relation entre les insectes et les alcaloïdes pyrrolizidiniques .....	39
2.	Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le nectar et le pollen .....	41
III.	Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel.....	41
A.	Contamination des miels monofloraux et de zones contrôlées.....	42
B.	Contamination des miels du commerce.....	45
IV.	La toxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques chez l'Homme .....	46
A.	Les sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'alimentation.....	46
B.	Les intoxications provoquées par les alcaloïdes pyrrolizidiniques du miel.....	47
C.	La Toxicité chez l'Homme.....	48
1.	Les symptômes : .....	49
2.	Mécanisme de la toxicité.....	51
3.	Le syndrome veino-occlusif du foie (HVOD) ou syndrome d'obstruction sinusoidale.....	56
4.	Troubles pulmonaires et cardiaques .....	57
5.	Génotoxicité .....	57
A.	Quelques cas d'intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	58
V.	Le miel est-il toxique ?.....	59
VI.	Conclusion : .....	60
	<b>Les grayanotoxines.....</b>	<b>60</b>
I.	Les grayanotoxines, métabolites secondaires dans la plante .....	62
A.	Structure des grayanotoxines.....	63
B.	Les Grayanotoxines, une source botanique limitée dans la famille des Ericaceae .....	66
C.	Les plantes mellifères à grayanotoxines .....	68
D.	La biosynthèse des dérivés terpéniques .....	71
II.	Rôle des grayanotoxines dans l'interaction entre les insectes et les plantes .....	73
III.	Le miel .....	74
IV.	Toxicité des grayanotoxines chez l'homme .....	75
A.	Cas d'intoxication aux grayanotoxines.....	76
1.	Régions touchées et origine du miel : .....	76
2.	Origine botanique du miel.....	77

3. Mode de consommation .....	77
4. Age et sexe .....	77
5. Quantité de miel ingéré.....	78
B. Les symptômes d'une intoxication.....	78
1. Intoxications aiguës.....	78
2. Intoxications chroniques .....	79
C. Temps d'apparition des premiers symptômes.....	79
D. Diagnostic et prise en charge clinique.....	80
E. Mécanisme de la toxicité.....	80
F. Relation structure / activité.....	81
V. Conclusion .....	83
Conclusion générale.....	83
Bibliographie.....	85
Annexe .....	95
Résumé .....	100
Le Serment de Galien .....	101

## Introduction

Le miel, produit naturel par excellence, issu du nectar des végétaux et transformé par les abeilles, a été chez l'homme une source non négligeable de nourriture, de remède et a fait l'objet de nombreux mythes et légendes tout au long de l'histoire. Encore de nos jours, cette substance est largement consommée soit comme aliment soit comme remède et suscite encore des interrogations sur sa composition et sur ses mécanismes d'action.

Bien que le miel soit présenté comme étant dénué de risque, souvent à juste titre, il a été rapporté que dans plusieurs pays, des miels ont été à l'origine d'intoxications engendrées par un dérivé terpénique présent naturellement dans le miel faisant partie des grayanoides. D'autres métabolites secondaires - les alcaloïdes pyrrolizidiniques - présents dans le nectar et les grains de pollen des fleurs et retrouvés dans le miel, sont à l'origine de troubles pouvant être graves lors d'une exposition importante ou répétée. L'origine de ces substances et leur impact sur la santé humaine seront développés dans deux parties distinctes de cette étude.

Afin de positionner l'enjeu de nos recherches sur les alcaloïdes pyrrolizidiniques et sur les grayanotoxines présents dans certains miels, il est nécessaire de comprendre d'où vient le miel, de quoi il est constitué et de quelle façon le miel est employé dans l'alimentation et en thérapeutique.

# Le miel

---

## I. Histoire et symbolique du miel

Tout au long de l'histoire de l'homme, on retrouve des traces de l'utilisation du miel tout d'abord comme source de sucre dans l'alimentation, puis en tant que remède. Des peintures rupestres datant de près de 9000 ans ont été découvertes en 1924 à Bicorp en Espagne, représentant une récolte de miel [Photo 1]. D'autres traces de la « Chasse au miel » ont été retrouvées en Afrique et en Asie [1]. Des tablettes d'argiles de Mésopotamie datant de 2700 ans av J.-C présentent des inscriptions décrivant des remèdes constitués de miel et de plantes médicinales [2]. Dans l'Égypte antique, les hommes récoltaient le miel qui était utilisé pour embaumer les corps et pour accompagner leurs âmes. Ces découvertes illustrent la présence du miel dans les différentes civilisations et la place importante qu'il avait à la fois dans l'alimentation, dans la médecine et les cultes religieux.

L'origine du miel a longtemps été la source d'inspiration de nombreuses histoires et légendes. Autrefois, les hommes pensaient que le miel était élaboré dans le ciel et qu'il tombait sur les fleurs. Aristote disait que les abeilles le récoltaient directement sur les fleurs [1], et Pline l'Ancien précise dans *Histoire naturelle* Livre XI, que le miel était élaboré dans des conditions particulières, surtout la nuit, quand « Sirius est dans tout son éclat, jamais avant le lever des Pléiades et vers le point du jour ». Ces références se rapportent souvent au divin. Provenant des Dieux, le miel passera du simple aliment à un produit divin auquel sera attribué des pouvoirs de purification, d'immortalité dans l'Égypte Pharaonique [1], ou aura un rôle d'offrande aux Dieux chez les Babyloniens ou pour les morts dans l'Iliade [3].

Plus récemment, des références au miel sont mentionnées dans les écrits de la Bible et du Coran qui le considèrent comme le symbole de l'abondance et de la prospérité. Dans l'ancien testament, Samson prend du miel dans la gueule d'un lion mort [1]. Mahomet fait le lien entre le miel qui devient un médicament pour toutes les maladies du corps et le Coran qui soigne l'esprit [4].

Encore aujourd'hui, le miel est omniprésent dans notre environnement. Il se retrouve bien évidemment dans notre alimentation mais sous des formes diverses et variées, associé ou non avec d'autres aliments. Des livres et des histoires pour enfants associent le miel aux ours (Winnie l'Ourson, Boucle d'Or et les trois ours...) et le « miel » se retrouve même dans nos expressions pour exprimer la douceur mais aussi l'hypocrisie « *doux comme le miel* », l'amabilité et la douce parole « *être tout miel et tout sucre ou tout sucre et tout miel* » [5], sans oublier le terme de « lune de miel » apparu en France au XVIIIe siècle pour désigner la période la plus douce qui suit le mariage.

Mais ce qui fait que le miel ait suscité un intérêt particulier chez l'homme, ce sont ses multiples effets bénéfiques sur la santé et ses propriétés conservatrices qui ont été depuis longtemps exploitées dans les médecines traditionnelles comme nous le montrent des écrits d'Hippocrate ou plus éloignés encore retrouvés sur des tablettes égyptiennes et de Mésopotamie [2].

Toutes ces références au miel dans l'histoire attestent à quel point ce produit naturel a fasciné l'homme et a soulevé de nombreuses interrogations. Encore de nos jours, il suscite la curiosité des chercheurs comme l'illustre le nombre important d'articles traitant du miel, et de ses nombreuses propriétés. Cependant, l'histoire nous montre que malgré les effets thérapeutiques non négligeables du miel en raison de sa composition, il existe certains miels qui ont été décrits comme entraînant des effets indésirables à long ou à court terme. Afin de mieux comprendre d'où peut venir la toxicité du miel, il est nécessaire de faire un point sur son origine et de voir comment celui-ci est produit.

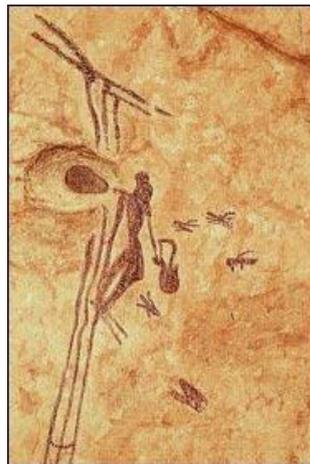


Photo 1 : peinture rupestre représentant une récolte de miel [48]

## II. Les abeilles et la fabrication du miel

### A. Les abeilles

#### 1. Classification

Du fait de la présence de ses deux paires d'ailes membraneuses, les abeilles font partie de l'ordre des Hyménoptères. Elles appartiennent à la famille des Apides ou « abeilles vraies ».

Le genre *Apis* regroupe neuf espèces répertoriées pour huit d'entre elles dans les pays asiatiques d'où elles sont originaires, avec par exemple *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis cerena*... et une espèce en Europe et en Afrique avec *Apis mellifera* ou abeille domestique [6], [7]. Elle a été introduite avec succès sur le continent américain dès l'arrivée des colons et cette espèce est devenue la principale espèce élevée pour la production de miel [1]. Six variétés d'abeilles sont exploitées pour la production de miel, le choix se faisant en fonction de leur résistance à l'environnement, de leur productivité et de leur agressivité [8] :

- *Apis mellifera mellifera* : Abeille noire du nord des Alpes,
- *Apis mellifera ligustica* : Sud des Alpes, en Italie,
- *Apis mellifera carnica* : Slovénie,
- *Apis mellifera caucasica* : abeille noire du Caucase,
- *Apis mellifera adansonii* : Afrique subsaharienne,
- *Apis mellifera capensis* : Afrique du Sud.

Le nom d'espèce « *mellifera* » signifiant « qui transporte le miel » vient de ce que les hommes ont longtemps pensé que le miel était directement prélevé sur les fleurs [9]. Hors Linné se rendant compte de l'erreur a cherché à rebaptiser l'abeille en *Apis mellifica* L. qui signifie « qui fabrique le miel », d'où la présence dans certains ouvrages de cette seconde appellation.



Photo 2 : Profile d'une abeille, Parque de la Tête d'Or, Lyon

## 2. Anatomie

*Apis mellifera* est un insecte mesurant entre 12 et 20 mm de long, divisé en 3 segments avec la tête, le thorax et l'abdomen.

La tête dispose d'un ensemble d'organes sensoriels ainsi que des pièces buccales de type lécheur-suceur divisées en plusieurs éléments :

- deux mandibules servant au malaxage des aliments solides, à la préhension et à la manipulation de la cire ou de la propolis.

- le proboscis formé des maxillaires et du labium, utilisé pour ingérer les liquides, le nectar, l'eau et le miel, et pour échanger la nourriture entre les individus.

[9], [10].

Les deux paires d'ailes membraneuses de ces Hyménoptères sont au niveau des deux derniers segments du thorax. Elles permettent aux abeilles d'une part de se déplacer et d'autre part de ventiler la ruche. Le thorax porte trois paires de pattes spécialisées utilisées dans la récolte et le transport du pollen grâce à la présence de peignes sur les pattes postérieures.

L'abdomen est composé de sept anneaux et renferme les systèmes respiratoire, circulatoire, un certain nombre de glandes (glandes cirières), et le système digestif. Il se termine par le dard et deux poches à venin chez les ouvrières et la reine.

Le jabot est un organe extensible relié aux pièces buccales par l'œsophage qui traverse le thorax. Il intervient dans le stockage du miel qui sera consommé par l'abeille lors des déplacements, puis dans le stockage du nectar qui sera rapporté à la ruche et régurgité par le labium. Celui-ci peut contenir jusqu'à 60mg de nectar [1]. Il est relié à l'intestin par le pro-ventricule et se poursuit par l'intestin grêle puis par l'ampoule rectale [8], [11].

Le système circulatoire des abeilles est dit ouvert car il n'existe pas de vaisseaux proprement dit et les organes baignent directement dans l'hémolymphe [13]. Le système respiratoire est composé de trachées s'ouvrant sur la surface du corps au niveau de stigmates. Les échanges gazeux se feront directement entre le milieu extérieur et les organes par simple diffusion [13].

Le système glandulaire de l'abeille est complexe et varie en fonction de l'âge et du rôle de l'individu dans la ruche. Les principales glandes indépendantes sont présentées dans le tableau ci-dessous [8], [11], [13].

Tableau 1 : Principales glandes chez l'abeille et leurs fonctions

glandes	localisation	fonctions
Les glandes hypopharyngiennes	Au niveau de la tête	Sécrétion protéinée de la gelée royale chez les ouvrières; sécrétion de l'invertase par les butineuses et les ouvrières.
Les glandes salivaires	Une paire au niveau de la tête et une paire dans le thorax	Sécrétion huileuse (thoracique) et aqueuse (céphalique) pour dissoudre les sucres et transformer la cire.
Les glandes mandibulaires	Base des mandibules	Sécrétion blanche de la gelée royale et phéromone d'alarme.
Les glandes de Nasonov		Phéromone de rassemblement des abeilles lors de l'essaimage.
Les glandes cirières	4 paires sous l'abdomen	Production par les ouvrières de la cire liquide.
Les glandes d'Arnhart	Extrémité des pattes	Phéromone empreinte pour les reines.

L'ensemble des éléments composés du système nerveux et des organes sensoriels vont permettre à une abeille seule d'évoluer dans l'environnement hostile tout en étant capable de s'orienter, de se déplacer et de repérer des sources de nourriture qui seront indispensables pour apporter l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des organes. Chez les abeilles sociales, ces systèmes permettront aux individus de communiquer et de former un ensemble cohérent capable de se déplacer, de se développer, de se défendre contre les intrus et de rechercher de la nourriture pour faire des réserves de miel et de pollen indispensables à la survie de la colonie.

### 3. Les étapes de l'élaboration du miel [8]

Le miel que nous consommons est élaboré par les abeilles mellifères, *Apis mellifera*, à partir du nectar ou du miellat rejeté par les Hémiptères (pucerons, cochenilles, psylles ou cigales). Le nectar, tout comme le miellat, le pollen ou la propolis, sont récoltés lors du butinage sur les plantes mellifères, étape qui regroupe l'ensemble des activités extérieures de l'abeille ouvrière [14]. Les abeilles prélèvent les sécrétions florales à l'aide du proboscis, pour les stocker dans leur jabot jusqu'au retour à la ruche. Le contenu du jabot subit alors une première action de maturation grâce à la présence de sécrétions produites par les glandes hypopharyngiennes et les glandes salivaires, apportant les enzymes intervenant dans l'hydrolyse des oligosaccharides du nectar. Parmi ces enzymes se trouvent les diastases, les invertases, les glucose-oxydases. Arrivé dans la ruche, le nectar est échangé par trophallaxie (régurgitation de nourriture entre les membres d'une colonie d'insectes)

avec d'autres ouvrières. Cette régurgitation entre abeilles est répétée plusieurs fois durant la maturation du miel primitif, car elle favorise l'augmentation de la teneur en ferments (diastase, invertase, glucose-oxydase).

- Les diastases sont des  $\alpha$ -amylases situées à la fois dans le nectar des fleurs mais aussi dans les sécrétions glandulaires de l'abeille. Elles hydrolysent l'amidon en dextrines, oligo-, di- et monosaccharides.
- Les invertases sont sécrétées par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille et vont hydrolyser le saccharose du nectar en fructose et en glucose pendant la période de maturation du miel.
- La glucose-oxydase est une enzyme se trouvant à la fois dans le nectar et les sécrétions des abeilles. Elle oxyde le glucose pour former de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène, qui contribue aux propriétés antimicrobiennes du miel.

La teneur en eau du nectar sécrété par la fleur est importante, de l'ordre de 30 à 80% [11] en fonction de l'origine botanique. Le miel fini atteint une teneur en eau allant de 15 à 25% [15], [16]. Pour en arriver là, le miel est séché dans les alvéoles qui sont ventilées grâce aux battements des ailes des ouvrières. Cette étape de séchage s'accompagne par le déplacement à plusieurs reprises du miel d'une alvéole à l'autre. Lorsque le miel est suffisamment déshydraté, les abeilles le stockent dans des alvéoles au fond de la ruche, puis le recouvrent d'un opercule de cire étanche jusqu'à ce qu'il soit consommé. Le miel représente, avec le pollen, l'une des principales sources d'énergie de la colonie permettant de survivre pendant les périodes difficiles et de nourrir les couvains [1].

Une ruche peut produire en moyenne 3kg de miel par jour en fonction des conditions environnementales et de l'état de l'essaim. Sachant que le jabot d'une abeille peut contenir 60mg de nectar, pour un poids de l'abeille à vide de 80 mg, et qu'il faut entre 1000 et 1500 fleurs de trèfle par exemple pour le remplir, il faudrait qu'une seule abeille visite 20 millions de fleurs pour obtenir 1 kg de miel soit 20 000 sorties [1], [14]. Heureusement, l'essaim renferme entre 100 000 et 200 000 butineuses durant un été et une abeille effectue 3 à 10 voyages par jour. Approximativement, une colonie récolte entre 60 kg et 1600 kg de nectar par an, pour une production annuelle de 30 à 800 kg de miel [7].

Les abeilles se nourrissent du pollen et du miel qu'elles ont récolté. On estime qu'une colonie consomme en moyenne 80 kg de miel et 20 kg de pollen par an [17]. La nature offre un large choix de nourriture pour les abeilles, leur permettant de sélectionner celles qui présentent le plus d'intérêt. Seules quelques espèces de plantes seront toutefois visitées par les abeilles, mais il se peut que durant des périodes difficiles, elles se tournent vers des plantes dites de famine qui pourront contenir des substances nocives pour les abeilles.

### III. Les plantes mellifères

Les Angiospermes ou plantes à fleurs, vont avoir une pollinisation du type entomophile, faisant intervenir les insectes. Ces plantes sont très diversifiées et ont développé au cours de l'évolution des mécanismes permettant d'améliorer la propagation de leur pollen en attirant les insectes vers les organes reproducteurs. Parmi ces stimuli se trouvent les couleurs, les formes, les odeurs et le nectar, qui sont pour les abeilles des signes indiquant la présence de nourriture.



Figure 3 : Abeille sur une fleur de *Prunus sp.*

Ce mode de pollinisation des plantes à fleurs a entraîné une dépendance entre les insectes et les plantes. Ces échanges nourriture contre pollinisation, sont devenus indispensables pour la survie des deux partis et le maintien de la diversité de la flore et de la faune. Près de 80% des plantes à fleurs sont pollinisées par les insectes et parmi celles-ci, 85% le sont par les abeilles soit près de 170 000 espèces de fleurs [7]. L'existence d'un grand nombre d'espèces de plantes à fleurs permet aux abeilles d'avoir un large choix de nourriture, et nécessite en même temps que les plantes « élaborent » des stratagèmes pour attirer les pollinisateurs les plus efficaces. Les organes floraux sont les éléments centraux de ce mécanisme d'attraction basé sur l'indication de la présence de nourriture. Certaines de ces plantes visitées le seront pour la récolte de pollen ou de la propolis. On parlera alors de plantes dites pollinifères (exp. le thym, *Thymus sp. L.*, *Lamiaceae* ; la luzerne, *Medicago sativa L.*, *Fabaceae*). D'autres plantes dites nectarifères le sont pour le butinage du nectar ou du miellat (exp : noisetier, *Corylus sp. L.*, *Betulaceae* ; coquelicot, *Papaver rhoeas L.*, *Papaveraceae* ...). Il n'est pas rare de retrouver des plantes pouvant être classées dans ces deux groupes comme le pissenlit, *Taraxacum spp.*, *Asteraceae* ou le saule *Salix spp.*, *Salicaceae*. Les fleurs ont évolué et des adaptations structurales, spectrales, et olfactives vont avoir une influence sur l'attraction des insectes.

## A. Le nectar

Le nectar constitue la matière première pour l'élaboration du miel par les abeilles. Ce liquide sucré est sécrété par les nectaires. Ces sécrétions sont pour la plante un moyen non seulement d'attirer les insectes mutualistes mais également un moyen de protéger les organes végétatifs et reproducteurs contre les prédateurs et les microorganismes pathogènes [18]. Les organes sécréteurs peuvent être présents soit au niveau des fleurs, on parlera alors de nectaires floraux, soit au niveau des autres organes pour les nectaires extrafloraux, retrouvés sur les feuilles, les pétioles ou les tiges. La composition des nectars varie en fonction de leur lieu de sécrétion et a un impact sur l'attraction des insectes.

La quantité de nectar libéré par une fleur ne peut être généralisée. Elle est de l'ordre du micro litre pour une fleur unique d'Astéreceae, jusqu'à quelques millilitres par fleur (ex : 9,4 ml chez *Ochroma lagopus*, Bombacaceae) [19], (ex : entre 10 et 40  $\mu$ l de nectar par fleur chez *Nicotiana tabacum* L. Solianaceae [20]), et a lieu essentiellement de jour [20]. Le volume de nectar dépendra de l'humidité de l'air, de l'intensité lumineuse, de la pluie et du vent mais aussi de la quantité de nectar prélevée par les insectes. Le mécanisme de régulation de la sécrétion n'est pas encore élucidé. La sécrétion du nectar constitue pour la plante un investissement en énergie. Il lui est donc nécessaire qu'elle soit optimisée afin de limiter les pertes mais suffisamment importante pour assurer la visite des insectes pollinisateurs. Nous allons voir que la composition du nectar joue un rôle non négligeable pour favoriser l'attraction de ces insectes mutualistes et pour repousser les autres insectes non pollinisateurs.

### 1. Composition chimique du nectar

La composition du nectar des fleurs varie en fonction de leurs espèces. Au sein d'une même espèce, la constitution du nectar pourra varier selon les conditions climatiques, du sol et parfois même de la position de la fleur sur la plante. Le nectar a une composition proche de celle de la sève élaborée. Il contient des sucres en plus grande proportion, des acides aminés et des enzymes, des lipides, des ions minéraux et à des doses plus faibles, des alcaloïdes, des composés phénoliques, des dérivés terpéniques qui pourront être spécifiques de la plante d'où le nectar provient [19]. Ces composés seront dissous dans l'eau qui représente entre 30 et 80% du nectar [11]. Des glycosides toxiques pour les insectes, ainsi que des alcaloïdes (les alcaloïdes pyrrolizidiniques) et des substances bactéricides ont été également retrouvés dans des nectars de certaines plantes [21]. Ces composés ont un impact sur le goût, la couleur, la texture et les propriétés du nectar, et influencent l'attractivité ou la répulsion des insectes et donc des abeilles.

### *a) Les sucres*

Les sucres dissous dans l'eau, constituent l'essentiel du nectar avec une proportion allant de 8 à 80% selon l'espèce et les conditions environnementales [19]. Trois sucres principaux sont identifiés dans pratiquement tous les nectars : le saccharose, le fructose et le glucose. Le glucose et le fructose sont la plupart du temps associés et en quantité équilibrée [22]. La proportion relative entre le saccharose et le glucose / fructose reste proche pour une espèce donnée mais elle peut être différente entre deux espèces très voisines. Le saccharose composant le nectar provient directement de la sève élaborée qui transporte les produits de la photosynthèse, mais aussi de l'hydrolyse que subissent les réserves d'amidons au niveau des tissus parenchymateux nectarifères [23]. Les sucres simples proviennent de l'action des invertases sur le saccharose soit directement dans les espaces intercellulaires soit dans les cellules parenchymateuses. La proportion entre ces disaccharides et ces monosaccharides sont donc régulée par la quantité d'hydrolases (invertases) dans les tissus, mais le mécanisme permettant de moduler la synthèse de ces enzymes n'a pas encore été élucidé. Une activité limitée des invertases donne un nectar riche en saccharose [23].

Associées aux sucres dominants, des traces d'autres sucres sont décrites avec des proportions moindres et donnent parfois des mélanges complexes [22].

### *b) Les acides aminés*

Les 20 acides aminés sont retrouvés dans plusieurs nectars différents, avec des proportions variables [23]. Les plus fréquents sont l'alanine, la sérine, la thréonine, la proline et la glycine. En revanche l'histidine, la glutamine et l'asparagine sont rares. Certains auteurs ont supposé que la composition en acides aminés des nectars de fleurs d'une même espèce était préservée (Baker et al. 1977 ; Zandonella P. 1981), mais des études plus récentes semblent démontrer le contraire (Petanidou et al. 1996 cités dans [23]). La variation des proportions en acides aminés et leurs concentrations vont avoir, tout comme dans le cas des sucres, une influence sur l'attraction des insectes, en modifiant la saveur du nectar [24], [23].

### *c) Les protéines*

Comme les acides aminés, les protéines synthétisées et sécrétées par les plantes, sont pour les insectes une source de composés azotés. Elles ont en revanche une fonction répulsive contre les herbivores et défensive contre les infections microbiennes [18], [25]. Des protéines à action enzymatique, les glucose-oxydases [25], vont intervenir dans la production en grande quantité de peroxyde d'hydrogène à propriété bactéricide [23]. D'autres enzymes interviennent dans le maintien du pH et l'équilibre de l'oxydo/réduction

dans le nectar (anhydrase carbonique et la mono-deshydroascorbate réductase, retrouvés chez *Nicotiana attenuata*, *Solanaceae*) [25].

Des enzymes interviennent directement dans la maturation du nectar avant et pendant la sécrétion. On retrouve en premier lieu les invertases qui hydrolysent le saccharose, les trans-glucosidases qui polymérisent le glucose, des phosphatases aux fonctions multiples (transduction du signal, déphosphorylation...), des estérases et plusieurs enzymes oxydantes (ascorbates oxydase, cytochrome oxydase...). Ces protéines peuvent représenter 87 µg/ml de nectar [23].

#### d) *Autres composés du nectar*

En plus des sucres, des acides aminés et des protéines, le nectar renferme également des substances en plus faible quantité mais qui ont une influence sur le comportement des insectes. On trouve notamment des composés lipidiques, des sels minéraux, des vitamines, des composés odorants et d'autres métabolites secondaires comme la gelsemine chez *Gelsemium sempervirens* (*Gelsemiaceae*) [18].

La grande variabilité de ces différents composés permet aux fleurs d'optimiser l'attraction des insectes pour faciliter la pollinisation tout en limitant les pertes en repoussant les herbivores et les non-mutualistes par l'élaboration de composés toxiques. A leur tour, les insectes vont développer des moyens pour contourner la toxicité des nectars soit par excrétion, séquestration ou métabolisme de la toxine ce qui aboutit à une coévolution entre les insectes et les plantes [26].

Parmi le large choix de nectar, les abeilles ne butinent qu'un nombre limité de plantes soit à cause d'un apport nutritionnel insuffisant ou pour un problème de goût, soit pour des raisons de toxicité. La composition du nectar détermine celle du miel. Cela explique pourquoi il en existe un grand nombre de variétés. Certains des métabolites secondaires ont des propriétés intéressantes chez l'homme, mais à l'inverse, il existe aussi des substances toxiques pour l'homme et supportées par les abeilles. Nous retrouvons en particulier les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les grayanotoxines.

## IV. Le miel et sa composition

Le miel n'est autre que du nectar digéré et conservé par les abeilles. Certaines de ces substances sont spécifiques d'une source florale et d'autres proviennent du métabolisme des abeilles ou des modifications chimiques apportés lors de la conservation du miel. Les miels sont donc très variés avec des couleurs, des odeurs et des aspects différents selon leur provenance.

De manière générale, le miel contient les éléments suivants :

- L'eau pour une teneur comprise entre 15 et 20% [15] (au lieu de 30 à 80% dans le nectar [11]).
- Les sucres sont les composants majoritaires, représentant près de 80% de la matière sèche [15]. En revanche, suite à l'action des enzymes sécrétés par les glandes digestives des abeilles, la proportion de ces sucres va être modifiée. Le saccharose y est en plus faible quantité que dans le nectar (entre 0,1 et 4,8%) car il est hydrolysé en fructose (entre 30 et 45%) et glucose (24 à 40%) [27], [15] par les invertases [1]. Un miel plus riche en fructose comme celui de l'acacia, cristallise moins vite et a une saveur plus sucrée qu'un miel ayant plus de glucose comme le miel de colza [28].
- Les protéines et les acides aminés représentent entre 0,2% et 0,4% du miel [15], et proviennent du nectar mais aussi du pollen et de la salive des abeilles. Les invertases sont les plus importantes enzymes du miel car elles sont responsables de la conversion du nectar et du miellat en miel. D'autres enzymes sont présentes : amylase ou diastase, glucose-oxydase, provenant essentiellement des glandes hypopharyngiennes de l'ouvrière et les catalases, phosphatases en plus faible proportion provenant du nectar [16]. L'activité diastasique peut être un marqueur de la qualité du miel. La glucose-oxydase est considérée comme une inhibine, car elle entraîne la production de peroxyde d'hydrogène et d'acide gluconique à partir de l'eau et du glucose. A l'inverse, les catalases représentent les antagonistes des glucose-oxydases car ce sont des antioxydants.
- Des dérivés terpéniques comme le vomifoliol ou le linalol, qui sont retrouvés à la fois dans le nectar et dans le miel sous forme inchangée. Ces composés volatiles interviennent dans l'odeur particulière des miels tout comme les dérivés benzéniques et isopréniques [29].
- Les dérivés phénoliques comme les tanins ou les flavonoides [28], ainsi que les caroténoïdes, provenant du nectar qui vont donner les couleurs caractéristiques des miels, en fonction de leur origine botanique.

- Les minéraux et oligoéléments représentent entre 0,1 et 1% de la matière sèche du miel [15]. Des miels foncés contiennent généralement plus de minéraux que les miels clairs [30].
- Les vitamines, essentiellement du groupe B.
- les lipidiques (acides gras et triglycérides) sont présents en très faible quantité [15], [16].

D'autres composés du miel peuvent être présents en très faible quantité, et retrouvés dans une seule variété de miel. Il se peut que ces substances soient toxiques. Ces composés peuvent provenir des traitements phytosanitaires utilisés en agricultures, des métaux lourds comme le plomb ou le cadmium [30], mais aussi des substances issues de la maturation du miel avec l'hydroxy-méthyl-furfural HMF. Les alcaloïdes et les dérivés terpéniques retrouvés dans le nectar de certaines plantes sont également présents dans le miel.

L'hydroxyméthylfurfural (HMF) provient de la réaction de déshydratation à chaud des sucres (principalement du fructose), en milieu acide. Cette réaction a lieu spontanément durant la conservation du miel mais elle est d'autant plus rapide que les conditions de stockage sont défavorables. La chaleur, l'utilisation de conteneur métallique et l'origine du miel auront un impact sur la vitesse de la réaction. Dans nos régions, l'augmentation en HMF est de 5 à 10 mg/kg par an. Le chauffage du miel dans le but de limiter la cristallisation ou de stériliser le miel entraîne l'augmentation de la teneur en HMF si la chauffe n'est pas maîtrisée [31]. Le dosage de l'hydroxyméthylfurfural dans le miel est un moyen employé pour évaluer la fraîcheur du miel et pour déterminer s'il a été trop chauffé avant le conditionnement. Depuis quelques années, des études se penchent sur la toxicité des HMF. Des travaux ont montré une corrélation entre l'administration d'HMF chez des souris et des rats et l'apparition de carcinomes [32].

La connaissance de la composition des miels est un élément important pour la détermination de leurs origines botaniques, de leur état de conservation mais surtout pour mieux comprendre les effets thérapeutiques de cette substance utilisée depuis des millénaires par l'homme.

## V. Réglementation et critères de qualité

Comme de très nombreux produits commercialisés dans les différents pays, le miel doit respecter des normes permettant de le commercialiser dans le monde et de garantir la sécurité des consommateurs.

Le miel est défini selon la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) comme étant « une substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment, en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. A l'exception du miel filtré, aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré, sauf si cela est inévitable lors de l'élimination de matières organiques et inorganiques étrangères. » [33]

Dans l'annexe 1 du décret n°2003-587 du 30 juin 2003 du code de la consommation, les miels ont été classés selon leurs origines. On distingue :

- le miel de nectar qui est obtenu à partir des nectars de plantes,
- le miel de miellat obtenu à partir des excréments laissés sur les plantes par des insectes suceurs (Hémiptères).

L'origine botanique des miels intervient également dans leur classification. On retrouve les miels dits « toutes fleurs » ou « miels de printemps », « d'été »... qui proviennent naturellement de plusieurs espèces de fleurs présentes sur un même site de butinage et fleurissant durant une même période. Il est difficile de déterminer avec précision l'origine exacte des nectars des fleurs la composant. Il ne faut pas les confondre avec le miel « mélangé » qui provient du mélange de miels récoltés dans différentes ruches et regroupés pour être commercialisés.

Les miels mono-floraux se distinguent des poly-floraux par leur provenance majoritaire d'une seule source de fleurs de même espèce et dont il est possible de définir l'origine par des analyses physico-chimiques, sensorielles et microscopiques [34]. Nous pouvons citer à titre d'exemple les miels de tournesol ou de colza qui sont les plus répandus en France. D'autres miels sont plus recherchés comme les miels de lavande, de framboisier, de romarin, etc.

D'une façon générale, les miels destinés à la consommation humaine devront respecter certains critères de qualité retrouvés dans l'annexe 2 du décret n°2003-587 du 30 juin 2003 du code de la consommation. Aucune substance ou aucun composant ne devra avoir été ajouté au miel, et celui-ci ne devra présenter aucune odeur ni saveur autre que celle du miel [33].

Pour assurer la bonne qualité de ces produits, la protection de la santé des consommateurs et la pratique loyale de l'apiculture, les normes ont été établies par la commission du Codex Alimentarius en 1981 et révisés en 2001. Ces normes présentent les analyses et les valeurs seuils permettant d'assurer la qualité des produits [35]. Un certain nombre de règles communes seront réitérées au sein de l'Union Européenne dans la directive 2001/110/CE du conseil du 20 décembre 2001 relative au Miel [36], retranscrite en France dans le décret n°2003-587 du 30 juin 2003 pour l'application de l'article L.214-1 du code de la consommation en ce qui concerne le miel [33]. Les données analytiques, physico-chimiques et organoleptiques sont présentées dans le tableau en **annexe 1**. Ces outils permettent de déterminer la qualité et d'identifier des miels.

Les normes du Codex Alimentarius et la directive de l'Union Européenne font l'objet d'une révision permettant de prendre en considération les nouvelles avancées sur l'étude des miels.

Actuellement, les normes du Codex Alimentarius et la directive de l'Union Européenne mentionnent les critères concernant les contaminations par les résidus de métaux lourds et de pesticides, mais il n'est pas fait référence aux miels pouvant présenter des substances toxiques d'origine végétale telles que les alcaloïdes pyrrolizidiniques ou les grayanotoxines, bien que plusieurs études en font référence et que d'un point de vue historique, ces miels toxiques sont connus depuis longtemps. Des mises à jour sont en cours d'étude notamment en ce qui concerne les alcaloïdes pyrrolizidiniques qui font l'objet de travaux dans le programme mixte FAO/OMS (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture / Organisation Mondiale de la Santé) sur les normes alimentaires du Codex Alimentarius au sujet des contaminants dans les aliments [37], [38]. De plus, il est mentionné dans le paragraphe 5 « hygiène » du projet de révision des normes relatives au miel du Codex Alimentarius, que les miels « ne doivent pas contenir de substances provenant de microorganismes et de plantes susceptibles de menacer la santé de l'homme » [39].

## VI. Propriétés et usages du miel

Le miel est avant tout un produit alimentaire, consommé comme tel ou cuisiné, ou entrant dans la composition de préparations dans l'industrie agroalimentaire. En plus d'avoir un intérêt dans l'alimentation humaine, le miel présente de nombreuses vertus qui ont été très tôt remarquées dans l'histoire. Avec la généralisation de la médecine moderne durant le XXème siècle, l'utilisation du miel en thérapeutique a été délaissée pour les produits de synthèse. De nos jours, l'intérêt pour les médecines traditionnelles s'amplifie et la publication de nombreuses études confirme les propriétés de ce produit que l'on retrouve même en milieu hospitalier.

## A. Le miel comme aliment

Au marché, chez les apiculteurs ou dans la grande distribution, le miel est présent sur les étals. Un large choix de miel toutes fleurs ou mono-floraux (lavande, tilleul, colza, fleur d'oranger, litchi...) nous est proposé provenant de différentes régions du monde (miel des Landes, du Jura...). En raison de sa concentration en sucre, le miel est une source énergétique importante avec un apport de l'ordre de 300 Kcal pour 100g de miel [40]. Ces miels pourront être consommés à tous âges tel quel ou en l'incorporant dans des plats ou des gâteaux. Plusieurs grands chefs l'intègrent dans leur carte et le remettent aux goûts du jour. De nombreux livres sont dédiés à la cuisine au miel. La présence des sucres, des vitamines, des protéines et acides aminés, des oligoéléments et autres constituants du miel en font un aliment au profil nutritionnel élevé.

Dans l'industrie agroalimentaire, ses multiples propriétés sont mises à profit pour la conservation des plats, comme anti brunissement et anti oxydant des denrées alimentaires [41], comme agent colorant dans les viandes, les boissons et les pâtisseries ; comme tampon du pH dans les boissons et les produits laitiers ; comme aromatisant dans un grand nombre de produits comme les confiseries, les boissons, les sauces... [40].

## B. Le miel comme médicament

Le miel a été très tôt la panacée dans le traitement de nombreuses maladies comme le décrivent certains auteurs illustres. Nous citerons par exemple Hippocrate qui le prescrit pour les brûlures, les abcès, les furoncles. Dioscoride, médecin de l'armée romaine, l'emploie pour traiter les affections intestinales, les fistules, les inflammations de la gorge... Galien le recommande encore dans les cas d'empoisonnements et les affections buccales.

Aujourd'hui, il n'est pas rare de retrouver des ouvrages et des articles de journaux décrivant les mérites du miel et des produits de la ruche sur la santé et le bien-être de la peau. La thérapie par le miel ou apithérapie fait son grand retour dans la médecine traditionnelle et est utilisée dans les centres hospitaliers comme par exemple dans le service de chirurgie viscérale au CHU de Limoges [42]. L'augmentation importante des publications sur le miel illustre l'intérêt de cette substance dans les différents domaines de la cosmétique et de la médecine. Cela pourrait s'expliquer par l'apparition de bactéries multirésistantes après l'essor des antibiotiques dès les années 1920. De même, en raison du coût dérisoire du miel en comparaison avec le pris des recherches sur les produits de synthèse, ce produit représente une alternative pour certains pays n'ayant pas les moyens de se procurer des médicaments trop onéreux. De plus, la méfiance grandissante de la population vis-à-vis des laboratoires pharmaceutiques entraîne une recrudescence de l'utilisation des remèdes dits « de grand-mère ».

Nous ne pourrions citer ici toutes les vertus qui ont été attribuées aux miels en raison d'une part de la variation de ces propriétés en fonction de leurs origines et d'autre part du manque de documentation démontrant leur intérêt. Parmi les principaux effets thérapeutiques pouvant être attribués au miel, nous retrouvons :

### 1. Propriétés antibactériennes, antivirales et antiparasitaires

La recrudescence des bactéries résistantes aux antibiotiques incite les chercheurs à trouver de nouvelles méthodes de prise en charge des infections. Plusieurs études dans le monde se sont focalisées sur les propriétés antimicrobiennes du miel. Nous avons vu préalablement que la composition du nectar des fleurs limitait la prolifération de certaines bactéries, champignons et parasites. Des observations ont également été faites avec le miel *in vitro* et après application sur des plaies. Les mécanismes d'actions bactéricide et bactériostatique ne sont pas encore totalement élucidés mais des éléments permettent d'expliquer en partie cet effet.

- L'osmolarité du miel du fait de la forte concentration en sucres. Cela va limiter la disponibilité de l'eau indispensable pour le développement des microorganismes [43].
- La formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par l'action de la glucose-oxydase sur le glucose et l'eau. Le peroxyde d'hydrogène a une forte propriété antiseptique. En plus de la formation du peroxyde d'hydrogène, la réaction d'oxydation de l'eau et de glucose va produire de l'acide gluconique qui augmentera l'acidité du milieu [42], [44]. La Glucose-oxydase sera essentiellement d'origine animale.
- Le pH acide du miel (de 3,5 et 4,5) limite la prolifération de certaines bactéries [42].
- Les composants plus spécifiques du miel d'origine végétale peuvent avoir un impact sur le développement des bactéries. On retrouve notamment les flavonoïdes, des dérivés phénoliques (acides caféiques, acides féruliques...), des terpènes [43].
- La défensine produite par les abeilles au niveau des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires. Ces peptides antimicrobiens sont également retrouvés chez l'homme et interviennent dans la réaction immunitaire spécifique et innée.

Ces éléments semblent être les principaux responsables de l'action antibactérienne mais là encore, l'origine du miel influence ces propriétés et il n'est pas exclu que d'autres composants interviennent. Le spectre antibactérien du miel est large. On retrouve parmi les genres sensibles : *Acinetobacter sp.* ; *Escherichia coli* (et souches à beta-lactamase) ; *Enterobacter cloacae* ; *Enterococcus sp.* (et souches résistantes à la vancomycine) ; *Pseudomonas aeruginosa* (et souches résistantes à la ciprofloxacine) ; *Staphylococcus aureus* (et souches résistantes à la méthicilline) ; *Streptococcus sp.* [15], [42], [43]. Ces propriétés antimicrobiennes sont mises à profit dans le traitement des plaies, ulcères, escarres [15], [42]... mais aussi en ophtalmologie dans le cas de conjonctivites et de kératites [43].

## 2. Propriétés cicatrisantes

Le miel facilite la cicatrisation des plaies, des brûlures, des escarres, des ulcères... De nombreuses études ont montré l'implication du miel dans l'amélioration de la régénération des tissus épithéliaux, fibreux et vasculaires tout en limitant l'inflammation et la formation d'œdèmes. Le maintien d'un pH acide et l'hygroscopicité du miel favorisent le développement des bourgeons cicatriciels [42], [43]. La formation de peroxyde d'hydrogène dans le miel stimule la multiplication cellulaire au niveau des plaies [73] et l'oxyde nitrique et ses dérivés activeront l'angiogenèse. A cette action cicatrisante s'ajoute la propriété antibactérienne limitant les infections des plaies. L'efficacité du miel dans la cicatrisation a largement été observée notamment dans le service de chirurgie viscérale du CHU de Limoges [42].

## 3. Autres propriétés attribuées au miel

- Propriété anti-inflammatoire : le mécanisme n'est pas encore élucidé mais le miel diminuerait la synthèse de la prostaglandine qui est un médiateur de l'inflammation et de la douleur [43].
- Propriétés anti-oxydantes : les dérivés phénoliques (acides caféiques, acides féruliques, acide ascorbique ...), les flavonoïdes, les catalases, les caroténoïdes retrouvés en plus ou moins grande quantité dans le miel, limitent la formation de radicaux libres intervenant dans le mécanisme d'inflammation [45], [43], dans l'apparition de maladies cardiovasculaires ou de troubles métaboliques [44]. Les miels foncés sont les plus actifs. (miel de Manuka) [43].
- propriétés antitussives, expectorantes et adoucissantes dans le cas de pharyngites, laryngites. (miel de sarrasin).
- propriétés laxatives [44], dûes à la concentration importante en fructose.
- antiulcéreux gastrique car le miel inhibe l'activité d'*helicobacter pylori*.
- vertus calmantes.

Bien d'autres vertus sont attribuées au miel mais ne sont encore que peu documentées. De plus, il faut souligner que ces propriétés varient en fonction des miels étudiés, de leurs origines et du mode de conservation. Le miel ne peut à lui seul résoudre tous les problèmes et en fonction de la gravité du trouble ou de l'affection, il devra être associé ou non à un traitement conventionnel et faire l'objet d'un suivi médical.

En pharmacie, le miel entre dans la composition de plusieurs produits principalement pour son pouvoir sucrant et son arôme, mais plus rarement comme principe actif : en particulier pour les traitements de la toux, du mal de gorge et de l'enrouement passager (Pastille Drill<sup>®</sup>, Activox Pastilles<sup>®</sup>...), sous forme de sirops, de pastilles. En cosmétique, un grand nombre de produits sont proposés sous différentes formes : baume à lèvres, lotions pour soin du visage, crèmes hydratantes, savons et shampooings, etc.

En milieu hospitalier, le miel de qualité médical stérilisé aux rayons gamma peut être utilisé pour la cicatrisation des plaies chirurgicales et pour les brûlures (gamme de produit à base de miel REVAMIL<sup>®</sup>, les pansements ACTRYS<sup>®</sup> des laboratoires AGUETTANT).

Le miel ne présente pas de contre-indication et ne provoque pas d'effets secondaires sauf parfois des douleurs gastriques après une consommation trop importante et en peu de temps. Il est toutefois recommandé de ne pas donner de miel non stérilisé pour les enfants de moins de 1 an en raison d'un risque de contamination du miel par les spores de *Clostridium botulinum*, forme de résistance du bacille Gram positif produisant une toxine qui agit sur la transmission neuromusculaire en l'inhibant, provoquant une paralysie généralisée [44]. Les nouveaux nés sont plus sensibles que les adultes et les enfants en raison de leur flore intestinale non mature. Chez les diabétiques, le miel ne peut pas être recommandé, mais il ne présente pas de contre-indication dans le cadre strict de la ration de glucose journalière autorisée. Le miel est également déconseillé pour les personnes ayant une hypertriglycéridémie.

## VII. Le marché du miel en France et en Europe

L'apiculture en France est une activité importante à la fois dans la production de produits de la ruche (miel, pollen, gelée royale...) mais également pour l'agriculture puisqu'elle assure la pollinisation de nombreuses cultures. En 2012, la France a produit 18 500 tonnes de miel et disposait de 1 560 000 ruches recensées réparties sur 75 000 apiculteurs [46]. 5 régions du sud de la France représentent 52% du miel produit. La France se situe au 3<sup>ème</sup> rang des producteurs en Europe derrière l'Espagne et la Grèce.

La consommation française de miel est de l'ordre de 40 000 tonnes par an et reste stable depuis 2004. En revanche, la production du miel Français a diminué de 28% pour atteindre moins de 20 000 tonnes en 2012. L'importation de miel est devenue nécessaire pour répondre à la demande. En 2012, elle a représenté 25 500 tonnes soit 1/5<sup>ème</sup> des importations européennes de miel, venant en premier lieu de l'Espagne, d'Allemagne, de Belgique (80%) et de pays en dehors de l'Union Européenne pour 20% (Argentine, Chine,...). La France est le 5<sup>ème</sup> pays importateur [47]. Une proportion importante du miel d'importation sera commercialisée dans les grandes et moyennes surfaces (71% du miel commercialisé) et utilisée en industrie agro-alimentaire (91% du miel utilisé provient de l'importation) [46].

L'exportation française ne dépasse pas 4 000 tonnes par an, essentiellement vers le Royaume Uni, l'Espagne et la Suède [46].

Au niveau international, la FAO (Food and Agriculture Organization) et la Commission Européenne ont évalué à 1,54 millions de tonnes le miel produit en 2010. L'Asie est la

principale productrice avec 42% de la production mondiale, vient ensuite l'Europe avec 23% dont 17% pour les pays de l'UE. Depuis 2005, la production mondiale a augmenté de 9% [46].

Les pays de l'UE sont largement déficitaires en termes de production, nécessitant l'importation de plus grandes quantités de miel en provenance des pays en dehors de l'Union Européenne. Ce phénomène prend de l'ampleur en raison des prix deux à trois fois moins élevés pour les miels importés d'Asie, et par la diminution de la production. Cependant en 2002, des contrôles ont révélé l'importation de miels frelatés en provenance de Chine et d'Argentine qui ont abouti à l'interdiction pendant un temps de leur importation. De nos jours, ces interdictions ont été levées et ces miels sont de nouveau présents sur le marché européen.

## VIII. Les risques pour la santé humaine

Dans cette première partie nous avons vu que le miel était un aliment consommé par les humains depuis des temps immémoriaux. Ce produit totalement naturel, a apporté à l'homme non seulement une importante source énergétique, mais également un moyen de se soigner contre de nombreux troubles. De nos jours, l'intérêt pour le miel s'intensifie notamment en thérapeutique et de nombreuses études cherchent à élucider les mécanismes des effets bénéfiques des miels sur notre organisme. Cette tâche reste cependant laborieuse en raison de la grande diversité de l'origine botanique et géographique de ces produits. Les nouvelles méthodes d'analyse permettent tout de même d'identifier des substances synthétisées dans le nectar des fleurs, que l'on retrouvera en petite quantité dans le miel, leur donnant leurs propriétés spécifiques.

Bien que son utilisation soit présentée comme étant dénuée de risques, souvent à juste titre, le miel, comme tout aliment naturel, n'échappe pas aux risques d'être exposé aux diverses contaminations. Il a été fait état de miels dont les teneurs en antibiotiques, en pesticides ou en métaux lourds dépassaient les normes fixées par l'Union Européenne et le Codex Alimentarius. Nous citerons pour exemple la présence de chloramphénicol dans le miel provenant de Chine, antibiotique utilisé pour traiter les abeilles contre la loque [44] mais pouvant être responsable de troubles graves chez l'homme comme l'induction d'aplasie médullaire.

Nous savons maintenant que les plantes synthétisent et sécrètent des substances dans le nectar intervenant dans la défense contre les herbivores et les microorganismes. Nous nous intéressons particulièrement aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et aux grayanotoxines. Ces substances sont plus ou moins inoffensives pour les abeilles mais peuvent avoir des effets non négligeables sur la santé humaine. Les intoxications au miel sont exceptionnelles et ne concernent qu'un nombre limité de variétés de miel.

# Les alcaloïdes Pyrrolizidiniques

---

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des métabolites secondaires très largement diversifiés et synthétisés par quelques familles botaniques retrouvées sur de vastes zones géographiques de notre planète. Ces métabolites interviennent dans la relation entre ces plantes et les phytophages. Leur présence dans certaines parties de la plante peut influencer le comportement alimentaire des animaux et en particulier celui des abeilles.

Les plantes ont été utilisées depuis des millénaires comme aliment et comme remède. Un certain nombre d'entre elles contient des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Encore de nos jours, ces plantes peuvent être retrouvées dans les médecines traditionnelles chinoises avec près de 50 plantes [49], ou dans la médecine Ayurvédique Indienne, ainsi que dans d'autres régions du monde comme l'Afrique du Sud, la Jamaïque, le Mexique, etc. Les effets bénéfiques de ces plantes sur la santé ne sont pas liés à la présence des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En revanche, leur présence dans l'alimentation humaine ou dans des remèdes est à l'origine de troubles hépatiques pouvant être mortels.

La consommation de plantes par l'homme n'est pas la seule source potentielle d'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. Ces substances peuvent également être retrouvées dans le lait, les œufs produits par des animaux consommant du fourrage ou des céréales contaminées par les plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques. Le miel représente également une source potentielle d'alcaloïdes.

# I. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques, métabolites secondaires de la plante

## A. Généralités

Selon W. Meisner, un alcaloïde pyrrolizidinique est un composé organique azoté, d'origine naturelle, réagissant comme une base et de distribution restreinte [50]. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle, et la complexité de ces structures est à l'origine d'une grande diversité de propriétés pharmacologiques [50]. Ces alcaloïdes sont majoritairement produits par les végétaux. Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde mais elles peuvent toutefois présenter un alcaloïde majoritaire accompagné d'autres alcaloïdes, qui ont généralement une origine biogénétique commune.

## B. Structure des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Approximativement 350 structures d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme d'amine tertiaire sont connues à ce jour [51]. La grande majorité de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des esters formés entre une nécine ou base nécique [Figure 1] et un ou deux acides néciques [Figure 5] [52].

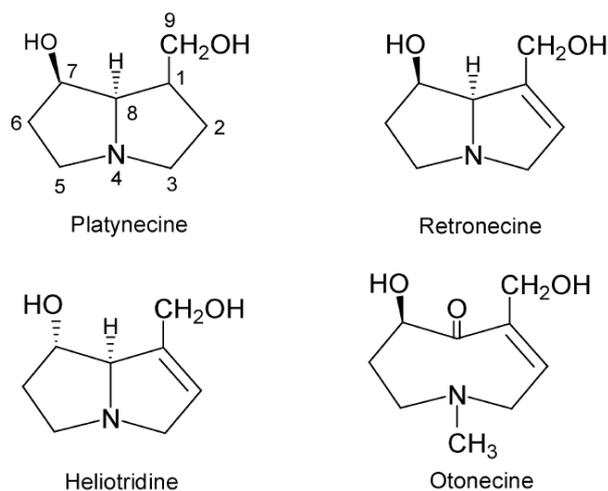


Figure 1 : Représentation des quatre noyaux néciques sous la forme N-tertiaire. [51]

Les bases néciques présentent le plus souvent :

- une structure à deux cycles comportant cinq sommets. Le carbone C8 et l'azote N4 forment des sommets communs aux deux cycles,
- une configuration  $\alpha$  H8,
- une insaturation en C1-C2 ou non,

- une substitution par un groupement hydroxyméthyle en C1
- et plusieurs degrés d'hydroxylation :
  - o alcool primaire du groupement hydroxyméthyle
  - o alcool secondaire en C7 (rétronécine, héliotridine...)
  - o troisième hydroxyle en C2 (rosmarinécine) ou en C6 (crotanécine).

Dans la plante, l'amine en position 4 de la nécine sera soit sous la forme N-oxyde, soit sous la forme d'amine tertiaire (N-tertiaire) [Figure 2].

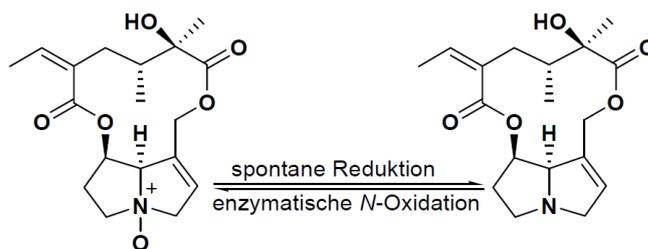


Figure 2: Noyau type rétronécine sous forme d'amine tertiaire et sous forme d'amine N-oxydée (sénécionine et sénécionine N-oxyde) [53]

Quatre structures de bases néciques sont distinguées en fonction de la présence de l'insaturation en position C1-C2, de la configuration du groupement hydroxyle en position C7, et de l'ouverture du noyau pyrrolique en un macrocycle avec un groupement méthyle en N4. On retrouve la platynécine (saturé en C1-C2), la rétronécine et son diastéréoisomère en position C7, la rétronécine et l'otonecine [Figure 1].

Les acides néciques sont des acides aliphatiques pouvant être ramifiés et hydroxylés, ayant 5 à 10 atomes de carbone et formant avec les amino-alcools des liaisons esters. Ces réactions d'estérifications ont lieu sur le groupement hydroxyle en position C7 (Lasiocarpine) et/ou sur l'hydroxyméthyle en C9 (Lycopsamine), soit par un ou deux acides néciques pour donner une structure ouverte (Lasiocarpine) soit par un acide dicarboxylique pour former des diesters macrocycliques (Riddelliine) [figure 3]. Ces acides néciques dérivent d'acides aminés tel que la L-isoleucine ou plus rarement de la L-Leucine dans le cas des structures macrocycliques [53].

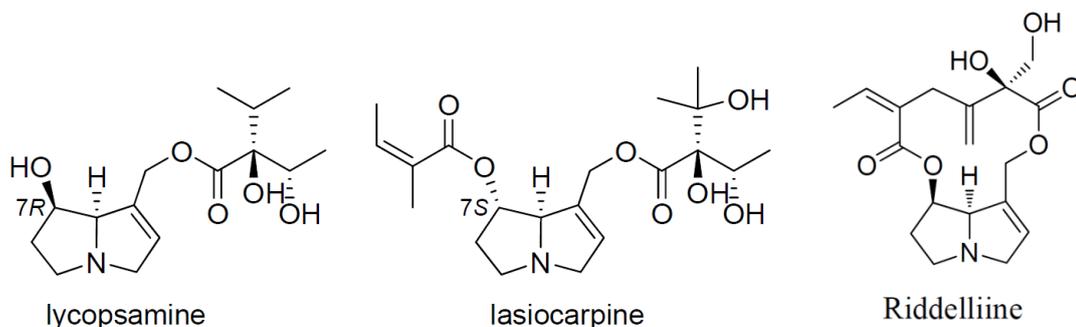


Figure 3 : Exemples d'alcaloïdes pyrrolizidiniques estérifiés [51]

Les mono- et diesters d'acides mono-carboxyliques sont caractéristiques des *Boraginaceae* et les diesters d'acides di-carboxyliques sont, dans leur grande majorité, des constituants des *Asteraceae*.

La diversité des alcaloïdes pyrrolizidiniques repose sur la combinaison entre les acides néciques de structures variées et les quatre types de noyaux néciques [Figure 4]. La forme d'amine tertiaire et d'amine oxydée augmente la diversification et les propriétés de ces métabolites.

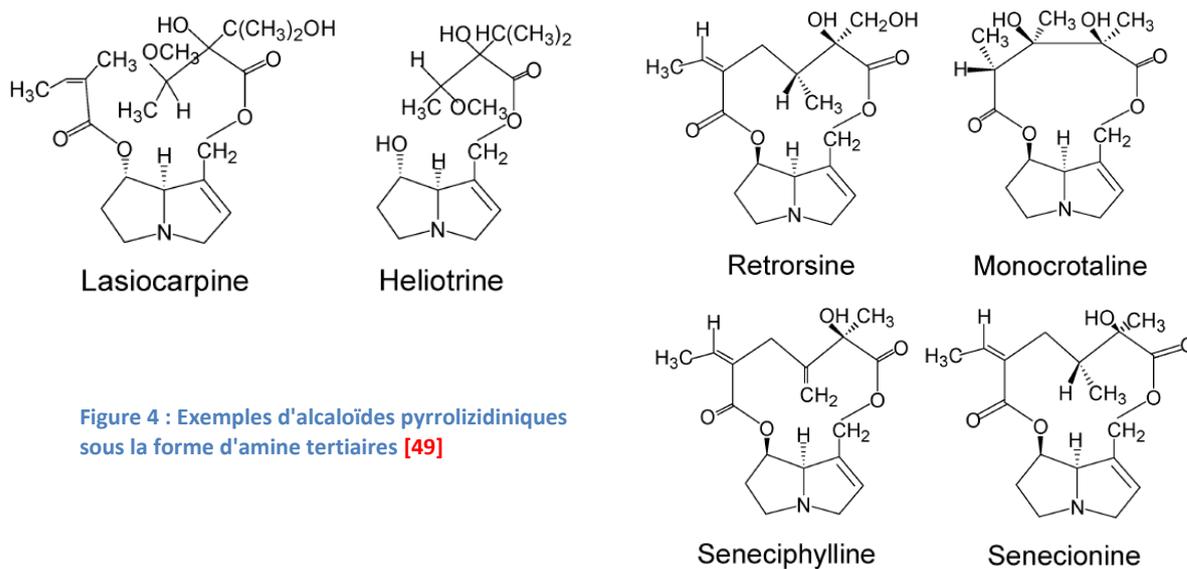


Figure 4 : Exemples d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme d'amine tertiaires [49]

## II. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans la plante

### A. Les plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques

Les espèces de plantes biosynthétisant des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont, pour la plupart, des plantes herbacées annuelles ou vivaces, et parfois même des arbustes ou des plantes grimpantes. Certaines plantes sont rares et d'autres dominent la végétation pionnière et peuvent être considérées comme des mauvaises herbes nuisibles. On estime en se basant sur les données chimiotaxonomiques que 6 000 espèces végétales contiennent des alcaloïdes pyrrolizidiniques [52], soit 3% des plantes à fleurs [51], [54]. Seules près de 400 de ces espèces de plantes sont identifiées [55].

Trois grandes familles regroupent 95% de ces plantes avec les *Asteraceae*, les *Boraginaceae* et les *Fabaceae* [53]. On les retrouve également chez les *Orchidaceae* et dans certains cas isolées au sein de quelques espèces chez les *Celastraceae*, les *Convolvulaceae*, *Ranunculaceae*, *Rhizophoraceae*, *Santalaceae*, *Sapotaceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae* et les *Euphorbiaceae* [56].

Certaines de ces plantes sont encore utilisées comme remèdes dans les médecines traditionnelles. La bourrache (*Symphytum officinale* L. *Boraginaceae*) est utilisée depuis près de 2 000 ans comme remède, en tisane ou en salade, pour faciliter la cicatrisation des plaies, la réparation des fractures osseuses, limiter les inflammations des articulations [49], [57]. D'autres plantes du genre *Echinacea* spp. de la famille des *Asteraceae*, ont été utilisées pour soigner les infections respiratoires et les fièvres, et comme stimulant du système immunitaire [57].

## B. Les plantes mellifères à alcaloïdes pyrrolizidiniques

Parmi ces plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques, seules quelques-unes servent de source de pollen et de nectar pour les abeilles mellifères. Une liste non exhaustive de plantes a été proposée dans le Codex Alimentarius [58] se basant sur la présence de pollen dans les miels étudiés [Tableau 2]. On retrouve notamment en Europe les plantes du genre *Echium* spp. appelées couramment vipérines, appartenant à la famille des *Boraginaceae* [Photo 4], le genre *Borago* spp. de la famille des *Boraginaceae* [Photo 5], ainsi que le genre *Eupatorium* spp. (*Asteraceae*) [Photo 6]... Ces plantes sont largement visitées par les abeilles [59]. En revanche, les plantes du genre *Senecio* spp. ou séneçon le sont moins, probablement en raison de la plus forte concentration en alcaloïdes pyrrolizidiniques sécrétés dans le nectar [53], [59].



Photo 4 : Abeille sur un fleur d'*Echium* sp.



Photo 5 : Abeille sur une fleur de bourrache, *Borago* sp.



Photo 6 : *Eupatorium cannabinum*

Tableau 2 : Liste non exhaustive des plantes mellifères et pollinifères contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques [58], [60].

Famille	Genre	espèces	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	
Asteraceae	<i>Ageratum</i>		rinderine	
	<i>Chromolaena</i>			
	<i>Eupatorium</i>	<i>Eupatorium cannabinum</i>	Intermedine, lycopsamine, amabiline, supinine, Senkirkine, rinderine, echinatine,	
	<i>Senecio</i>		<i>Senecio jacobaea ou vulgaris</i>	Sénécionine, intergerrimine, senecivernine, seneciphylline, spartioidine, retrorsine, usaramine, riddelliine, jacobine, jacozine, jacoline, jaconine
			<i>Senecio nemorensis</i>	
			<i>Senecio scandens</i>	
			<i>Senecio Vernalis</i>	
	<i>Solanecio</i>		<i>Solanecio gigas</i>	Sénécionine, intergerrimine, seneciphylline
<i>Solanecio angulatus</i>				
Boraginaceae	<i>Borago</i>	<i>Borago officinalis</i>	Lycopsamine, intermedine, supinine	
	<i>Cynoglossum</i>	<i>Cynoglossum officinale</i>	Senkirkine, Seneciphylline et N-ox, Senecionine et N-ox, Lycopsamine et N-ox, Echimidine et N –ox [60]	
	<i>Echium</i>	<i>Echium plantagineum</i>	Echimidine, echiumine, echiuplatine	
		<i>Echium vulgare</i>		
	<i>Heliotropium</i>	<i>Heliotropium amplexicaule</i>	Indicine, heliospathine	
	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis palustris</i>		
	<i>Symphytum</i> [53]		Echimidine, Heliotridine, Lycopsamine, Senecionine, Seneciphylline, Senkirkine, [60]	
Fabaceae	<i>Crotalaria</i> [53]		Retrorsine, monocrotaline, intergerrimine, riddelline, seneciphylline, [61]	

Ces plantes poussent sur un grand nombre de territoires. Certaines sont adaptées aux régions tempérées, d'autres résistent aux conditions plus sèches comme la vipérine, ou plus humides comme l'eupatoire.

## C. Biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Les études sur des espèces de séneçons montrent que la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques se déroule en deux grandes étapes avec la formation du noyau nécique puis l'estérification des groupements hydroxyles par les acides néciques.

La formation des noyaux néciques (du type rétronecine, héliotridine ou platynecine) a lieu à partir de la condensation entre une molécule de putrescine et une molécule de spermidine. La putrescine est un substrat du métabolisme secondaire de la plante dérivant des acides aminés, l'ornithine et l'arginine [62]. La spermidine dérive de la condensation d'une molécule de putrescine et d'un groupement aminopropyle par l'action de la spermidine synthase. Le transfert du groupement amino-butyle de la putrescine sur la spermidine aboutit à la formation de l'homospermidine. Cette réaction est catalysée par l'homospermidine synthase [61]. Cette molécule symétrique se cyclise par un mécanisme de désamination oxydative suivi de la formation d'une base de Schiff puis d'une nouvelle désamination oxydative et enfin d'une réduction de Mannich intramoléculaire [50].

Les acides néciques dérivent principalement de la L-valine, de la L-leucine, de la L-isoleucine, et de la L-threonine [62]. Ces précurseurs suivent plusieurs voies de biosynthèses encore mal connues pour aboutir à de nombreux acides néciques comme l'acide angelic en C5, l'acide lasiocarpic en C7, l'acide riddelliic en C10, etc. [63].

Sur le schéma 5 représentant les étapes de la biosynthèse de la sénécionine N-oxyde chez les espèces de séneçon, l'acide nécique dérivant de l'isoleucine est estérifié à la rétronecine [53].

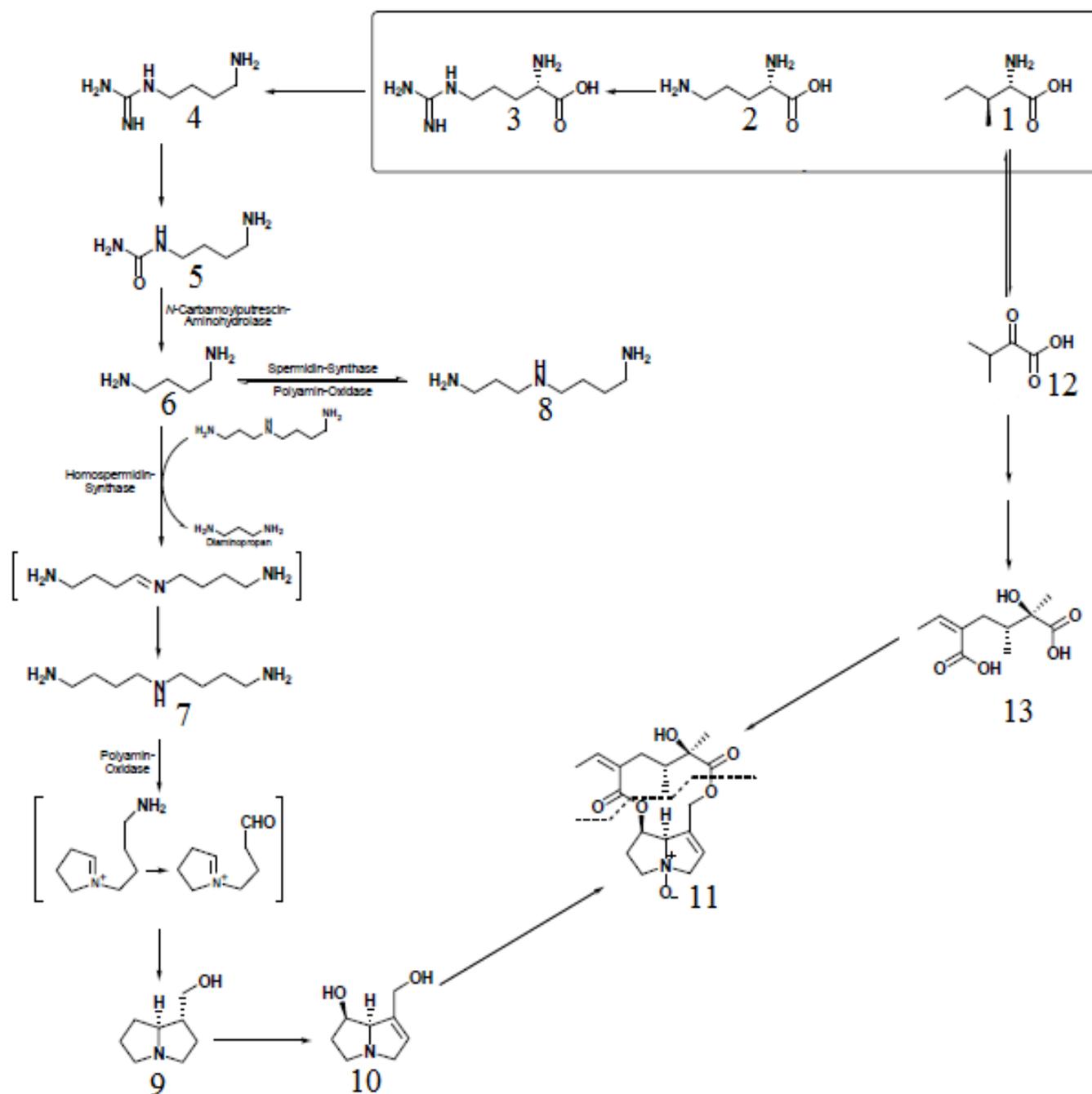


Figure 5 : Biosynthèse de la rétronecine puis de la sénécionine sous forme N-oxyde chez les sénécions [53]

1- L-Isoleucine ; 2- L-Ornithine ; 3- L-Arginine ; 4- Agmatin ; 5- N-Carbamoylputrescine ; 6- Putrescine ; 7- Homospermidine ; 8- Spermidine ; 9- (-)-trachelanthamidine ; 10- rétronecine ; 11- Sénécionine N-oxyde ; 12- Acide 2- oxoisocaproïque, 13- Acide sénécionique

L'estérification entre les acides néciques et les bases néciques puis la diversification des alcaloïdes ont lieu dans des organes distincts de la plante [61].

## 1. Site de la biosynthèse

Des études ont montré que la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques a lieu dans des organes différents selon l'espèce considérée. Un certain nombre de publications sur le séneçon commun *Senecio vulgaris* L. ont identifié les racines comme étant le site de biosynthèse chez ces *Asteraceae* [62], [64]. La majorité des réactions sont localisées plus spécifiquement au niveau du cortex racinaire (zone de croissance des racines). L'homospermidine synthase, enzyme clé dans la synthèse des noyaux néciques, est exprimée essentiellement dans les cellules parenchymateuses et dans l'endoderme du cortex racinaire chez *Senecio* sp. [61], [65]. Chez certains *Orchidaceae* et chez *Eupatorium* sp. *Asteraceae*, l'homospermidine synthase est retrouvée au niveau des jeunes bourgeons [61]. L'expression de ces enzymes essentiellement dans les zones de croissance laisse à penser que la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques est étroitement liée à la production de biomasse et au développement de la plante [65].

## 2. La migration des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans la plante

Ces alcaloïdes pyrrolizidiniques sont synthétisés sous la forme N-oxyde solubles en milieu aqueux ce qui leur permet d'être transportés dans la sève élaborée du phloème et d'être stockés dans les vacuoles des cellules [62], [64], [61]. Le mécanisme de transport des alcaloïdes pyrrolizidiniques N-oxyde de cellule en cellule vers le phloème et du phloème vers les cellules de stockages se fait lentement mais n'est pas encore élucidé [66]. Le passage de ces métabolites secondaires vers les vacuoles nécessite cependant l'intervention de transporteurs spécifiques (non identifiés) comme dans le cas des alcaloïdes tropaniques par exemple [61].

## 3. Les organes d'accumulations

Dans les plantes, les alcaloïdes pyrrolizidiniques s'accumulent dans les jeunes parties aériennes et principalement dans les bourgeons et les inflorescences [62], [61] au niveau des vacuoles des cellules constituant les tissus périphériques [64]. Les boutons floraux de *Senecio* sp. renferment entre 60 et 80% des alcaloïdes de la plante [61]. Ces concentrations peuvent être de 10 à 30 fois plus importantes que dans les autres organes végétatifs [53].

La teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme N-oxyde mesurée dans les jeunes pousses de *Senecio vulgaris* est moins élevée qu'au niveau des racines. En moyenne, les jeunes pousses contiennent 6 fois plus d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme d'amine tertiaire que les racines [67]. Les alcaloïdes sont réduits spontanément en amines tertiaires par les ions métalliques et les agents réducteurs endogènes de la plante. Cette réduction continue se fait lentement et de façon spontanée. A l'inverse, les alcaloïdes sous

leur forme réduite subissent une oxydation en N-oxyde mais cette fois-ci par l'action d'enzymes tels que la sénécionine-N-oxygénase, (qui sont déjà retrouvées dans la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques au niveau des racines) [67]. L'intervention des enzymes permet de réguler la teneur entre les deux formes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. La proportion d'une forme par rapport à l'autre est globalement préservée dans le cas du *Senecio vulgaris* [67].

## D. Fonctions des alcaloïdes dans la plante

Certains phytophages (nématode, insectes et mammifères) sont sensibles à la présence des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans leur nourriture. Le type d'alcaloïde et leur concentration dans la plante vont avoir un effet anti appétant pour certain prédateur, limitant ainsi leur consommation [66]. Pour une même espèce, une douzaine d'alcaloïdes pyrrolizidiniques différents peuvent être retrouvés avec des concentrations pouvant varier de façon très importante au cours d'une saison [55]. Par exemple les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques de *Senecio madagascariensis*, peuvent varier de 217 à 1 990 µg/g de plante sèche [55]. Les données actuelles ne permettent pas de généraliser les concentrations de ces métabolites chez les plantes d'une même espèce.

La dégradation du tissu végétal (feuille, racine) par un prédateur (herbivores, micro-organisme...) a un impact variable selon le genre de plante et les conditions environnementales. Cette situation de stress n'entraîne généralement pas de modification quantitative des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En revanche, elle engendre une augmentation des alcaloïdes sous la forme N-oxydé ainsi qu'une diversification de leurs formes [61].

Dans des conditions défavorables (sol pauvre et manque d'eau), une plante a une croissance moins importante mais développe plus rapidement les inflorescences. Pour protéger plus efficacement les nouvelles pousses contre les prédateurs, la concentration en alcaloïdes pyrrolizidiniques est plus importante dans les nouvelles pousses mais la quantité totale de ces métabolites ne semble pas subir de modifications dans l'ensemble de la plante [61].

A l'inverse, dans les conditions favorables de croissance (apports en engrais et en eau suffisants), la concentration des alcaloïdes pyrrolizidiniques est moins importante. La plante disposant suffisamment de ressources pour se développer, compensera plus facilement les pertes de matière. La répulsion des prédateurs par la forte concentration en métabolites toxiques est moins importante et les alcaloïdes sont répartis dans la plante [68].

## 1. Relation entre les insectes et les alcaloïdes pyrrolizidiniques

Comme bon nombre de métabolites secondaires biosynthétisés par les plantes, les alcaloïdes pyrrolizidiniques interviennent dans la défense chimique contre les prédateurs. Chez certains insectes, les effets dissuasifs peuvent s'exprimer par une inhibition de leur croissance voire même entraîner la mort de l'intrus, mais le goût désagréable des alcaloïdes pyrrolizidiniques suffit généralement à les repousser et à reconnaître les plantes qui leur sont non comestibles [55].

Tous les insectes n'ont pas la même sensibilité vis à vis de ces métabolites toxiques. Certains d'entre eux vont développer des stratégies de contournement en les séquestrant, en les métabolisant ou en les excréant pour leur propre défense ou pour servir d'hormones sexuelles [55], [69]. Ainsi, le papillon Carmin (*Tyria jacobaea*, *Arctiinae*) sélectionne les plants de *Senecio jacobaea* sur lesquels il dépose ses œufs en fonction de la composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques. Les chenilles se nourriront ensuite de la plante et utiliseront les métabolites toxiques pour leur propre défense [66], [70]. Ces résistances aux toxines ont permis de développer des interactions mutualistes entre insectes et plantes, les insectes recevant un moyen de se protéger, et les plantes un moyen plus efficace de propager leurs pollens vers d'autres plantes de même espèce [71].

Pour les abeilles, les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne présentent pas un réel risque. Celles-ci ont développé une certaine tolérance vis-à-vis de ces métabolites toxiques [53], mais ce mécanisme de résistance n'a pas encore été élucidé. En revanche les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont un effet dissuasif ou peuvent entraîner la mort en fonction de la concentration et de la composition de ces métabolites dans la nourriture des abeilles [66], [72]. Une étude publiée en 2009 par Reinhard A. et son équipe a montré que des solutions sucrées avec une teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques supérieure à 0,2% ont un effet répulsif chez les abeilles. Pour des solutions à 2% d'alcaloïdes, la mortalité des abeilles est élevée [72]. Ils ont montré dans cette même étude que deux éléments interviennent dans le mécanisme de la toxicité de ces alcaloïdes.

D'une part, les alcaloïdes sous la forme d'amine tertiaire étant moins solubles en milieu aqueux sont plus difficilement éliminés dans les excréments. Ces pro-toxines peuvent alors être bioactivées par actions enzymatiques et former des structures qui réagissent facilement avec les éléments nucléophiles cellulaires [72]. La forme d'amine tertiaire est présente dans le nectar et le pollen mais ce sont les alcaloïdes pyrrolizidiniques sous leur forme N-oxyde qui prédominent dans la plante [62], [64]. La forme N-oxyde peut être plus facilement éliminée, mais ces alcaloïdes sont en partie réduits spontanément en leur amine tertiaire correspondant par des agents réducteurs présents dans l'intestin de l'abeille [72]. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sous leur forme N-oxyde ne sont pas directement toxiques pour les abeilles même pour de fortes concentrations, mais donnent tout de même des métabolites toxiques après leur réduction. Il a été observé que la forme oxydée avait un pouvoir répulsif plus important que les alcaloïdes sous la forme d'amine tertiaire [72].

A l'inverse d'autres insectes qui vont pouvoir oxyder les alcaloïdes pyrrolizidiniques pour les excréter, les abeilles n'ont pas de mécanisme spécifique permettant de maintenir les alcaloïdes N-oxydes dans leur forme inoffensive ni d'oxyder les formes d'amine tertiaire en N-oxyde [72].

Le second facteur intervenant dans le mécanisme de toxicité chez les abeilles est la présence d'une insaturation en position C1-C2 sur le noyau nécique [Figure 1]. Des abeilles ayant été nourries avec une solution sucrée contenant la 1,2-dihydromonocrotaline [Figure 6] n'ont pas présenté de signes d'intoxication. A l'inverse, les groupes d'abeilles soumises aux alcaloïdes pyrrolizidiniques 1-2 insaturés ont présenté un taux de mortalité élevé pour des teneurs en alcaloïde supérieures à 0,2% [72]. Le mécanisme de toxicité n'est pas encore élucidé mais des effets mutagènes proches de ceux observés chez les mammifères sont suspectés.

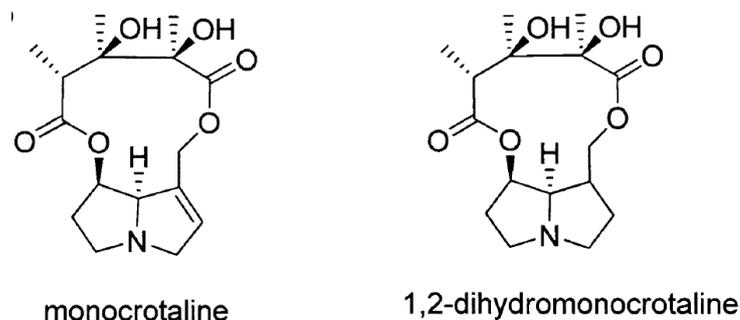


Figure 6 : représentation de la monocrotaline sous sa forme C1-C2 insaturée et sous sa forme saturée [72]

Dans la nature, les abeilles ne vont pas être attirées par les plantes présentant des nectars trop riches en alcaloïdes pyrrolizidiniques comme dans le cas du Sénéçon (*Senecio spp. Asteraceae*) [53]. Si les ressources de nourriture viennent à manquer, alors les butineuses se tournent vers des plantes moins recherchées mais, arrivées à la ruche, les abeilles chargées de stocker le nectar dans les alvéoles vont contrôler la récolte et peuvent limiter les échanges par trophallaxie si le nectar est trop riche en alcaloïdes pyrrolizidiniques [53]. L'effet dissuasif de ces métabolites limite donc la contamination des réserves de miel bien que les abeilles soient tolérantes vis à vis de ces substances. En revanche, les larves ont une sensibilité plus importante quand elles sont nourries avec le miel dérivant de ces nectars [59], ce qui peut être une cause de la réduction des effectifs de certains essaims lorsque les abeilles se trouvent dans une zone riche en plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques.

## 2. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le nectar et le pollen

Un certain nombre d'études a mis en évidence la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le pollen mais aussi dans le nectar floral [24].

La présence de ces métabolites dans le nectar ne semble pas surprenante étant donné que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont transportés par la sève du phloème et que le nectar dérive de celle-ci. En revanche, une étude menée sur une plante tropicale *Chromolaena odorata* L. *Asteraceae* indique que, bien que ces métabolites soient présents dans les racines et les fleurs, ils n'ont pas été décelés dans le nectar de la plante [73]. A ce jour, les données quantitatives de ces substances dans le nectar ne sont pas disponibles dans la littérature.

A l'inverse du nectar, des études quantitatives ont été réalisées sur les grains de pollen. Des études menées sur le pollen de *Echium vulgare* L. ont évalué les concentrations entre 8,22 et 13,98 µg/g pour du pollen prélevé sur la plante (Boppré et al. 2005) et entre 6 et 350 µg/g pour du pollen récolté par les abeilles (Boppré et al. 2008) [53], [55]. Un autre auteur a mesuré la concentration des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le pollen provenant de fleurs de *Senecio jacobaea* L. et de *S. vernalis* L.. Les teneurs ont été évaluées entre 500 et 5 000 µg/g avec comme principal alcaloïde la sénéciphylline [74]. Ces concentrations dépassent de loin les concentrations retrouvées dans le miel. Elles peuvent y être entre 30 et 100 fois plus importante [53], [74].

Une partie importante des alcaloïdes pyrrolizidiniques retrouvés dans le pollen sont sous la forme oxydée chez les *Boraginaceae* [55] mais la couche externe lipophile du grain de pollen renferme essentiellement les alcaloïdes sous leur forme tertiaire [53]. La concentration importante des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le pollen contribue à leur présence dans le miel [53], [74].

## III. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel

Il n'est pas surprenant de retrouver des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel, celui-ci provenant de la maturation du nectar floral. Le nectar ne semble pas être la seule raison de la présence de ces métabolites dans le miel. Le pollen y contribue à des degrés variables [54], [53], [74].

Actuellement le lien entre la quantité de pollen et la quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel n'est pas totalement établi. Un miel dont la concentration en alcaloïdes pyrrolizidiniques est élevée peut ne contenir qu'une faible proportion de pollen

issu de plantes à alcaloïdes. A l'inverse, un miel pauvre en alcaloïdes pyrrolizidiniques pourra contenir une forte proportion de pollen [53].

En revanche, l'origine botanique et la concentration en métabolite du pollen semble intervenir dans la contamination des miels. Selon une étude de Kempf et al. 2009, l'augmentation de la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel est proportionnellement corrélée avec l'ajout de pollen de concentration connue [53]. Dans le cas du séneçon dont les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques du pollen sont évaluées entre 500 et 5 000 µg/g [74], des miels fortement contaminés en alcaloïdes pourront ne présenter qu'une faible proportion de pollen [75]. A l'inverse, un miel de vipérine (*Echium spp.*) peu concentré, peut contenir une forte quantité de pollen car leurs concentrations sont moins importantes (entre 6 et 350 µg/g) [53], [55].

Il reste encore de nombreuses inconnues sur les facteurs qui influencent la contamination des miels par les alcaloïdes pyrrolizidiniques. Les études de ces 10 dernières années ont permis de montrer que le nectar n'était pas la seule source de contamination du miel mais que le pollen intervenait de façon non négligeable. Les essais de filtration du miel pour limiter leur présence n'ont cependant pas permis de diminuer de façon significative la contamination par les alcaloïdes pyrrolizidiniques [53], ce qui laisse supposer que la diffusion de ces métabolites à partir du pollen dans le miel se fait rapidement lors de la maturation dans la ruche [74].

## A. Contamination des miels monofloraux et de zones contrôlées

Depuis la fin des années 1970, plusieurs auteurs se sont intéressés à la contamination naturelle des miels par ces métabolites. Des échantillons de miel récoltés sur des sites contrôlés riches en plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été analysés lors de diverses études pour déterminer la teneur et le type d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'ils contenaient. Les origines botaniques et les alcaloïdes pyrrolizidiniques majoritaires de ces échantillons de miel sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Données sur les études de composition des miels monofloraux

Origine botanique du miel	Localisation de l'échantillon	Nombre d'échantillons	(Teneur totale) Concentration en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel	Alcaloïdes pyrrolizidiniques rencontrés	Source de l'analyse
<i>Senecio jacobaea</i> L. <i>Asteraceae</i>	Ouest de l'Oregon et Ouest de Washington Etats-Unis	4 échantillons de miel de séneçon jacobé	Entre 0,3 et 3,9µg/g	Senecionine, seneciophylline, jacobine, jaconine, jacoline, jacozine.	Deinzer et al. 1977 [76]
<i>Senecio jacobaea</i> L. <i>Asteraceae</i>	Non renseignée	10 échantillons sur 23	0,002 à 1,48 µg/g	Non renseignés	Crews et al. cité dans Kempf et al. 2008 [77]
<i>Senecio jacobaea vulgaris</i> L. <i>Asteraceae</i> De 0 à 6,3% de pollen	Pays-Bas	31 échantillons	0 à 13,019µg/g en équivalent rétronécine. Moyenne de 1,26µg/g	Sénécionine, seneciophylline, et N-oxyde	Kempf et al 2011 [75]
<i>Echium plantagineum</i> L. <i>Boraginaceae</i>	Sud de l'Australie	5 échantillons de miel d' Echium	Concentration allant de 0,3 à 0,95 µg/g	Echimidine et echiumine, majoritairement (lycopsamine, intermedine, 7-angelylretronecine, uplandicine)	Culvenor et al. 1981 ; [78] Culvenor 1983, 1985
<i>Echium plantagineum</i> , L. ; <i>Heliotropium amplexicoaule</i> Vahl. ; <i>H. europaeum</i> <i>Boraginaceae</i>	Non renseignée	29 échantillons	0,033 à 2,2 µg/g	Non renseignés	Beales et al. 2004
<i>Echium</i> spp. 61 à 80% de pollen	Nouvelle Zélande	8 échantillons	0,311 à 0,520 µg/g équivalent rétronécine	Echimidine a pres de 98%, Echimidine N-oxyde entre 1 et 2% et lycopsamine pour 0,2%	Kempf et al 2011 [75]
<i>Echium</i> spp.	Espagne	103 échantillons dont 94,2% contiennent des alcaloïdes pyrrolizidiniques	0,001 à 0,237 µg/g et une moyenne de 0,048 µg/g	Echimidine, lycopsamine, senecionine, héliotridine et leurs N-oxyde	Orantes-Bermejo et al. 2013 [74]

Parmi ces études, deux variétés de miel sont le plus couramment retrouvées:

Le miel de *Senecio jacobaea* L. *Asteraceae* : Ce miel dit « de séneçon » ne renferme que très peu de grains de pollen provenant de cette plante. Ces grains de pollen peuvent atteindre 10% du pollen total [75]. Bien que la quantité de pollen de séneçon puisse être faible, les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques mesurées dans les différentes études atteignent 3,9 µg/g de miel [76], [77], [75]. Les miels de « séneçon » ne renferment pas tous des alcaloïdes pyrrolizidiniques à des concentrations aussi élevées. Les teneurs sont cependant plus élevées que dans les miels du commerce, jusqu'à atteindre des valeurs cent fois plus grandes dans certains miels [75]. Ces études montrent aussi que des miels de séneçon peuvent ne contenir que peu de pollen de cette plante mais être fortement concentrés en alcaloïdes pyrrolizidiniques. Le nectar de *Senecio spp.* est donc la source majoritaire en alcaloïdes dans le miel [53]. Cela explique en partie pourquoi les abeilles évitent de butiner ce nectar en raison de la trop grande présence de ces métabolites qui ont donc un effet répulsif. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques majoritaires qui ont été identifiés dans les échantillons sont la senecionine, la seneciphylline, la jacoline, la jaconine, la jacobine et la jacozine. Ces miels sombres et cireux, ont généralement un goût fort et amer [63] et par conséquent ne sont pas commercialisés.

- Le miel d'*Echium spp.* L. *Boraginaceae* : Contrairement aux miels de séneçon, le miel d'*Echium* ou miel de vipérine est retrouvé sur certains marchés. Il est notamment très apprécié en Nouvelle Zélande et en Australie à cause de son parfum suave, de son goût agréable et de sa couleur ambrée claire. Ce miel renferme pourtant des alcaloïdes pyrrolizidiniques à des concentrations allant de 0,001 à 0,95 µg/g [78], [74]. Les alcaloïdes retrouvés sont l'échimidine, l'échiumine, l'intermedine et la lycopsamine. L'échimidine sous la forme tertiaire représente près de 98% des alcaloïdes pyrrolizidiniques du miel de *Echium spp.* [75]. Ces alcaloïdes proviennent principalement du pollen [53], [75]. Ces faibles teneurs dans le nectar peuvent expliquer pourquoi les abeilles préfèrent le nectar d'*Echium spp.* à celui du *Senecio spp.* [55].

Il faut toutefois relever que ces études ont été réalisées sur des miels récoltés dans des zones géographiques contrôlées, riches en *Echium spp.* ou en *Senecio spp.* Les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques sont par conséquent plus importantes que pour les miels retrouvés sur le commerce. Un miel pourra donc atteindre des concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques allant jusqu'à 4µg/g [55] si celui-ci n'a pas été mélangé à d'autres miels. De plus, il est intéressant de noter que ces miels sont retrouvés dans de nombreux pays sur pratiquement tous les continents.

## B. Contamination des miels du commerce

Des études à plus grande échelle sur des miels du commerce provenant de plusieurs pays ont été réalisées pour évaluer l'étendue de la présence des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Quelques résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous [Tableau 4].

Tableau 4 : Données sur les études de la composition de miels du commerce.

Nombre d'échantillons de miel et origine	Nombre de miels contenant des AP	Concentration maximale des AP	Concentration moyenne des AP	Origine botanique de la contamination des miels	source
39 échantillons de miels	19 échantillons de miel contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques	0,800 µg/g	Non précisée	<i>Echium plantagineum</i> , L. ; <i>Heliotropium amplexicaule</i> Vahl. ; <i>H. europaeum</i> <i>Boraginaceae</i>	Beales et al., 2004
171 miels du commerce ou d'importation	28% des miels commercialisés	0,36 µg/g	Non précisée	Nombreuses sources botaniques non précisées.	VWA, 2007 [58]
8 miels de ruches proches de zones à Sénéçon Jacob	50% des 8 échantillons	0,01 µg/g	Non précisée	Essentiellement <i>Senecio Jacobaea</i> , mais pas uniquement	
216 miels : 94 miels d'Europe, 34 d'Amérique centrale et du Sud, 6 des Etats Unis et Canada, 22 d'Australie et Nouvelle Zélande, 60 non précisés.	19 échantillons mais aucun en provenance de l'UE	0,12 µg/g équivalent rétronécine soit approximativement 0,25 µg/g d'AP	0,056 µg/g équivalent rétronécine soit approximativement 0,115 µg/g d'AP	<i>Echium</i> spp . et <i>Eupatorium</i> spp.	Kempf et al 2008 [77]
31 échantillons de miels provenant du marché allemand.	Non précisé	0,150 µg/g	0,023µg/g avec une médiane à 0,008µg/g	Non précisée	Michel et al. 2009 [60]

Ces quelques études nous indiquent que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont présents dans les miels retrouvés dans le commerce et peuvent provenir de nombreuses régions du monde comme la Nouvelle Zélande, l'Australie, l'Amérique centrale, et du Sud, de Chine ou d'Europe [77]. Cependant, les miels d'Amérique, d'Asie et d'Australie ont des teneurs généralement plus élevées que les miels d'Europe [60], [77].

Nous constatons que les teneurs en alcaloïdes pyrrolizidiniques retrouvées pour les miels du commerce sont dans la majorité des cas bien moins importantes que pour celles mesurées dans les miels provenant de zones contrôlées (riches en plantes à alcaloïdes

pyrrolizidiniques). Les teneurs relevées dans les miels du commerce sont de l'ordre de 1 *ppb* ( $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{kg}$ ) à quelques centaines de *ppb* ( $0,365 \mu\text{g}/\text{g}$  pour un miel du commerce [58]), alors que la teneur des miels prélevés sur des zones contrôlées atteignent des teneurs de l'ordre de 1 *ppm* ( $1 \mu\text{g}/\text{g}$ ) [75]. L'une des explications de cette différence de teneur est que les miels du commerce sont généralement mélangés lors de la récolte et du conditionnement ce qui entraîne une dilution de ces métabolites.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques retrouvés dans les miels du commerce sont l'échimidine, la lasiocarpine, la lycopsamine et la lycopsamine N-oxyde [58], ainsi que la sénécionine, la sénéciphylline et la rétronécine [76], [58]. D'autres alcaloïdes sont identifiés mais pour des teneurs moins importantes. Dans le cas des miels du commerce, ces métabolites secondaires proviennent de plusieurs origines botaniques avec par exemple :

- *Echium plantagineum* L. *Boraginaceae* [77]
- *Heliotropium amplexicaule* Vhal. *Boraginaceae*
- *Heliotropium Europaeum* L. *Boraginaceae*
- *Senecio Jacobaea* L. *Asteraceae* [58]

De nombreuses plantes à travers le monde biosynthétisent ces métabolites secondaires mais seule une partie d'entre elles sera visitée par les abeilles.

## IV. La toxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques chez l'Homme

### A. Les sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'alimentation

Comme nous l'avons vu précédemment, les plantes biosynthétisant les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont largement réparties à la surface de la planète. Un certain nombre d'entre elles sont utilisées dans l'alimentation sous forme de salade, ou comme remède dans les médecines traditionnelles en Inde [79], en Chine (feuilles et racines de *Symphytum officinale* L. *Boraginaceae*) [80], à Madagascar [81] ou en Europe [61]. Ces plantes sont utilisées sous forme d'infusion par exemple. Un certain nombre d'intoxications chroniques et aiguës ont été signalées à la suite de confusion ou des mésusages de ces plantes et dérivés [57]. Ces intoxications sont décrites dans les pays en voie de développement tels que l'Afrique, les Antilles, la Jamaïque... [54] pays dans lesquels l'accès à la médecine dite moderne est encore difficile.

Une autre source importante d'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques est la présence de graines de plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les récoltes de céréales, contaminant ainsi les farines et les aliments qui en découlent [57]. La contamination de ces farines a ainsi entraîné des épidémies d'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques dans certaines régions du monde lors de périodes de famine et de sécheresse. Ces cas

d'intoxications à grande échelle sont principalement retrouvés dans les pays en voie de développement [82], comme l'Inde, l'Afghanistan, le Tadjikistan... [49], [54].

Bien que ces plantes soient habituellement délaissées par les animaux, l'absence d'autre nourriture ou la contamination des fourrages et ensilages par *Senecio jacobaea* L. ou *Heliotropium sp.* par exemple peuvent conduire à une consommation accidentelle d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. Ces métabolites toxiques ont alors été retrouvés dans le lait, les œufs et le miel [54].

Dans les pays Occidentaux, les médecines dites « douces » sont remises au goût du jour et l'utilisation de compléments alimentaires à base de plantes, de miel ou de pollen s'amplifie. Les remèdes à base de plantes et les compléments alimentaires sont généralement à l'origine des cas sporadiques d'intoxications provoquées par les alcaloïdes pyrrolizidiniques [82].

De façon générale, l'origine des intoxications aiguës est rapidement identifiée mais il n'en est pas de même dans le cas des intoxications chroniques où il est difficile de faire le rapprochement entre les symptômes et la toxine.

## **B. Les intoxications provoquées par les alcaloïdes pyrrolizidiniques du miel**

Bien que le miel soit aussi une source potentielle d'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, il n'y a pas eu à ce jour de cas connus d'intoxications engendrées exclusivement par leur consommation. Cependant, le miel étant un aliment largement utilisé dans l'alimentation sous de multiples formes, dans les compléments alimentaires et en médecine, les risques restent réels d'autant plus que le miel n'est pas la seule source d'exposition. De plus, malgré les étapes de transformation que peut subir le miel pour l'incorporer dans les plats, les boissons, des traces d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été détectées [74]. Le passage de ces toxines dans les aliments, même après transformation, peut être considéré comme un risque pour la santé humaine.

La consommation de miel pour une personne est très variable. Selon Deinzer et al. elle est aux Etats Unis de 600 g par an et par personne [76]. En Europe, la consommation moyenne par personne est estimée à 3,9 g/jour, mais cette valeur est bien inférieure à la consommation estimée en Grande Bretagne, où la dose journalière atteint près de 90 g/jour chez les adultes et 30 g/jour pour les enfants [77] sachant qu'une cuiller à café représente approximativement 10 g de miel.

En se basant sur ces évaluations de consommation et sur les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques relevées dans le miel du commerce et de zones contrôlées, nous pouvons faire une estimation de la quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ingérés pour une personne mangeant le même miel chaque jour [Tableau 5].

Tableau 5 : Estimation des quantités d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ingérés par jour, basée sur les concentrations hautes relevées dans les miels du commerce et de zones contrôlées.

	Concentration en AP dans miel du commerce : $1.10^{-3}$ $\mu\text{g/g}$	Concentration en AP dans le miel de zones contrôlées : $1 \mu\text{g/g}$
Consommation moyenne Européenne de miel : 3,9 g/j [77]	0,0039 $\mu\text{g d'AP / jour}$	3,9 $\mu\text{g d'AP / jour}$
Consommation moyenne d'un adulte en Grande Bretagne : 90 g/j [77]	0,09 $\mu\text{g d'AP / jour}$	90 $\mu\text{g d'AP / jour}$
Consommation moyenne d'un enfant en Grande Bretagne : 30 g/j [77]	0,03 $\mu\text{g d'AP / jour}$	30 $\mu\text{g d'AP / jour}$

Ces valeurs se rapprochent de celles évaluées par Culvenor et al [78] qui estime que la consommation de miel peut atteindre 80g miel/ jour soit une consommation d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de l'ordre de 80  $\mu\text{g/jour}$  dans le cas du miel de *Echium sp.* avec une concentration proche de 1ppm (1  $\mu\text{g/g}$ ).

Il faut tout de même noter qu'une personne ne mange généralement pas le même miel tout au long de l'année. Les miels du commerce ne renferment pas tous des alcaloïdes pyrrolizidiniques et ceux-ci sont généralement mélangés avec d'autres miels lors de la récolte et du conditionnement.

### C. La Toxicité chez l'Homme

Les cas d'intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques chez l'homme ne sont pas très courants. Il est cependant possible d'identifier des symptômes récurrents retrouvés chez plusieurs patients intoxiqués. Parmi le tableau clinique permettant d'orienter un diagnostic vers une intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, on retrouve principalement des atteintes hépatiques avec un syndrome d'obstruction sinusoidale du foie (HVOD) dit aussi maladie d'occlusion sinusoidale (MOS), associées ou non à une insuffisance pulmonaire et cardiaque [55], [82], [83]. Les troubles hépatiques sont retrouvés principalement lors d'intoxication massive (ou aiguë), par exemple lorsque le patient consomme sur une courte période des aliments contaminés (tisane, farine). Ces effets sont parfois retardés, parfois même de plusieurs années [55].

## 1. Les symptômes :

Lors d'une intoxication aiguë, les premiers symptômes se manifestent plusieurs semaines, voire plusieurs mois après le début de l'intoxication. Ils sont marqués en premier lieu par une hépatalgie. Ces douleurs abdominales s'accompagnent rapidement d'une hépatomégalie douloureuse et de signes généraux tels que lassitude, malaise et vomissements [82], [84]. Après quelques semaines ou quelques mois, les signes cliniques et biologiques d'atteinte hépatique régressent entièrement et la guérison peut survenir sans séquelles. Dans les formes typiques, le tableau clinique représente un aspect de maladie veino occlusive du foie proche du syndrome de Budd Chiari. L'hépatomégalie s'accompagne d'une ascite d'installation rapide et souvent très abondante [52], parfois associée à une oligurie et un épanchement pleural. L'évolution peut se faire alors selon trois modalités [82]:

- décès par coma (rare mais touche surtout les jeunes), 20% des patients,
- évolution vers la maladie veino-occlusive chronique avec persistance de l'hépatomégalie et développement d'une cirrhose hépatique (puis décès par rupture de varices œsophagiennes ou par coma hépatique) dans 30% des cas,
- guérison sans séquelles qui semble plus fréquente chez les sujets jeunes (50 % des cas [85]).

Dans les deux premiers cas, la mortalité peut être élevée, survenant entre 2 semaines et 2 ans [52].

Le syndrome veino-occlusif hépatique peut s'accompagner d'une hypertension artérielle pulmonaire provoquée par l'inflammation et l'épaississement des parois des vaisseaux inter-alvéolaires pulmonaires. Ceci conduit à l'altération de la circulation sanguine pulmonaire et à l'augmentation de l'activité du ventricule cardiaque droit, aboutissant à une insuffisance cardiaque congestive [52]. Les reins, le pancréas, le tractus gastro-intestinal, la moelle osseuse et les tissus nerveux pourront également être atteints [83].

Plus récemment, des études sur des animaux ont montré que certains alcaloïdes pyrrolizidiniques sont génotoxiques et entraînent des mutations génétiques et chromosomiques. Ces mutations sont observées dans les cas de contaminations chroniques aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. Il est généralement plus difficile de faire le lien entre l'apparition de la tumeur et l'origine de l'intoxication.

Les effets d'une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques restent variables selon le contexte de l'intoxication. Plusieurs facteurs interviennent sur les effets toxiques de ces métabolites :

### *a) Le facteur humain*

L'âge, le sexe et l'état de santé du patient peuvent avoir une influence sur la gravité des symptômes. Il est observé que les jeunes enfants sont plus sensibles à une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques [84], notamment à l'héliotridine dans les cas présentés lors d'une épidémie au Tadjikistan [82]. Le passage des alcaloïdes pyrrolizidiniques insaturés à travers le placenta et dans le lait a été observé chez le rat [52] et un cas d'intoxication fœtal a été observé chez l'homme [54].

La différence de sensibilité vis-à-vis de ces substances chez l'homme est décrite à plusieurs reprises notamment pour des personnes d'une même famille ayant mangé le même pain contaminé [86]. Pour être toxiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques doivent être activés par des réactions enzymatiques et notamment par oxydation avec les cytochromes P450 3A4. L'activité de ces enzymes chez l'homme est variable, ce qui peut être un élément permettant de comprendre pourquoi certains membres d'une même famille sont plus sensibles que d'autres [83], [85]. L'alimentation riche en protéines et variée permettrait également de diminuer les symptômes de l'intoxication [54].

### *b) « La dose fait le poison »*

De façon générale, selon la théorie de Paracelse « c'est la dose qui fait le poison ». Une dose suffisante d'une substance et un temps d'exposition suffisant peuvent entraîner des effets toxiques. Tous les alcaloïdes pyrrolizidiniques n'auront pas les mêmes effets toxiques chez l'homme en fonction de leur structure.

- Dans le cas des épidémies à héliotropium en Afghanistan, la dose toxique entraînant une atteinte hépatique (HVD) a été estimée entre 4 et 10 mg par kg de masse corporelle et par jour pour une période de 3 à 7 semaines [86].
- En 2001, l'ANZFA (Food Standards Australia New Zealand) a proposé une Dose Journalière Tolérable Provisoire (DJTP) de 1µg/kg/jour sur la base de la maladie veino-occlusive du foie en tant que principal effet toxicologique de l'exposition chronique. La Dose sans effet observable (NOEL = no observed effect level) est évaluée à 10 µg/kg de masse corporelle [51].
- Actuellement, l'estimation de la dose toxique pour l'homme à long terme entraînant un syndrome veino-occlusif du foie est de 15µg AP/kg/jour [51].

### c) *La relation structure/ activité*

Le niveau de toxicité est inégal en fonction de la structure des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

La toxicité est liée: [51]

- à la présence d'une insaturation en position C1-C2 du noyau pyrrolique. Cela concerne donc les noyaux du type rétronécine, héliotridine, et otonécine mais pas le type platinécine dont le noyau pyrrolique est saturé en position C1-C2 [51].
- au degré d'estérification : en règle générale, les monoesters sont moins toxiques que les diesters acycliques qui sont eux-mêmes moins toxiques que les diesters macrocycliques d'au moins une estérification. Par exemple, les diesters des noyaux héliotridine et rétronécine sont plus toxiques que les monoesters [51].
- à la ramification de la chaîne latérale alkyle d'au moins l'un des acides néciques.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne sont pas toxiques tels quels. Ils devront être métabolisés par les enzymes de l'organisme pour donner des métabolites actifs.

## 2. Mécanisme de la toxicité

Après l'absorption par voie orale, une grande partie des alcaloïdes pyrrolizidiniques est excrétée dans les urines et dans les fèces sous forme inchangée au bout de 24h [85]. Une autre partie de ces substances est absorbée au niveau de l'intestin pour passer dans le foie par l'intermédiaire de la circulation sanguine, où elle subit soit des réactions de bio-activation soit au contraire des réactions enzymatiques permettant de l'inactiver et de l'éliminer dans les urines.

### a) *Voies de bio-activation des alcaloïdes pyrrolizidiniques :*

- Réduction des amines tertiaires en amines oxydés

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont rapidement absorbés après la prise orale [52]. Comme nous l'avons vu précédemment, les alcaloïdes pyrrolizidiniques se présentent sous une forme d'amine tertiaire et sous une forme d'amine N-oxydé, majoritaires dans les plantes [62], [64]. Les alcaloïdes sous la forme N-oxyde étant plus hydrosolubles que leurs formes N-tertiaires respectives, ils sont par conséquent éliminés plus rapidement dans les urines ou dans les fèces.

Cependant, une partie de ces alcaloïdes N-oxyde est spontanément réduite par des agents réducteurs de l'intestin et du foie pour leur donner leur forme respective d'amine tertiaire

[54]. Les alcaloïdes sous la forme d'amine oxydée ne sont pas directement toxiques. En revanche, la bioactivation des formes d'amines tertiaires aboutit à des intermédiaires toxiques [72].

- Oxydation des amines tertiaires C1-C2 insaturés (rétronécine et héliotridine)

Au niveau hépatique, les alcaloïdes pyrrolizidiniques C1-C2 insaturés (noyaux types rétronécine et héliotridine) sous la forme d'amine tertiaire subissent une oxydation par l'intervention des enzymes *cytochrome P450 3A4* [83]. Un groupement hydroxyle est greffé en C3 ou en C8 du noyau nécique par la mono oxygénase pour former soit les 3-hydroxynécines soit les 8-hydroxynécines [84]. Ces hydroxy-AP sont instables et subissent une déshydratation rapide pour aboutir à la di-deshydropyrrolizidine. Cette déshydratation se traduit par une deuxième insaturation du noyau nécique [54]. (Exemple avec l'oxydation de la riddelliine [Figure 7]).

Cette réaction d'oxydation par les cytochromes P450 3A4 est considérée comme la principale voie d'activation des métabolites. Or, l'activité de ces enzymes varie en fonction des personnes. Une personne ayant une forte activité de ces mono-oxygénases a plus de risques d'être intoxiquée [83].

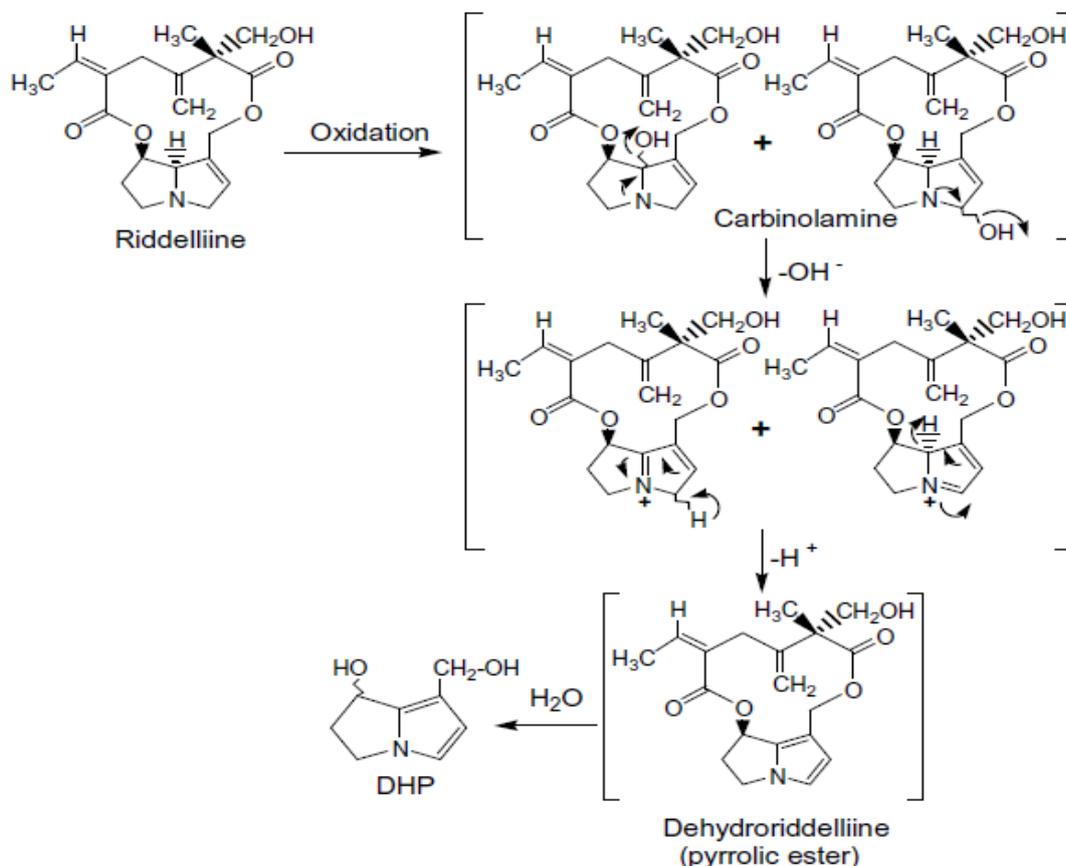


Figure 7 : Voie de bio-activation par oxydation puis hydrolyse de la Riddelliine [83]

- N-déméthylation oxydative de l'otonécine

Les noyaux types otonécines sont également des protoxines. Ils sont métabolisés en hydroxy-AP par N-déméthylation oxydative. L'otonécine porte une fonction méthyle sur l'azote qui est hydroxylé. L'hydroxyméthyle est perdu sous forme de formaldéhyde et donne une amine secondaire. Celle-ci subit une condensation avec la fonction cétone en C8 pour aboutir à un noyau bicyclique portant un groupement hydroxyle en C8. Ce noyau subit aussi une déshydratation pour aboutir à la di-deshydropyrrolizidine [54], [83]. [Figure 8]

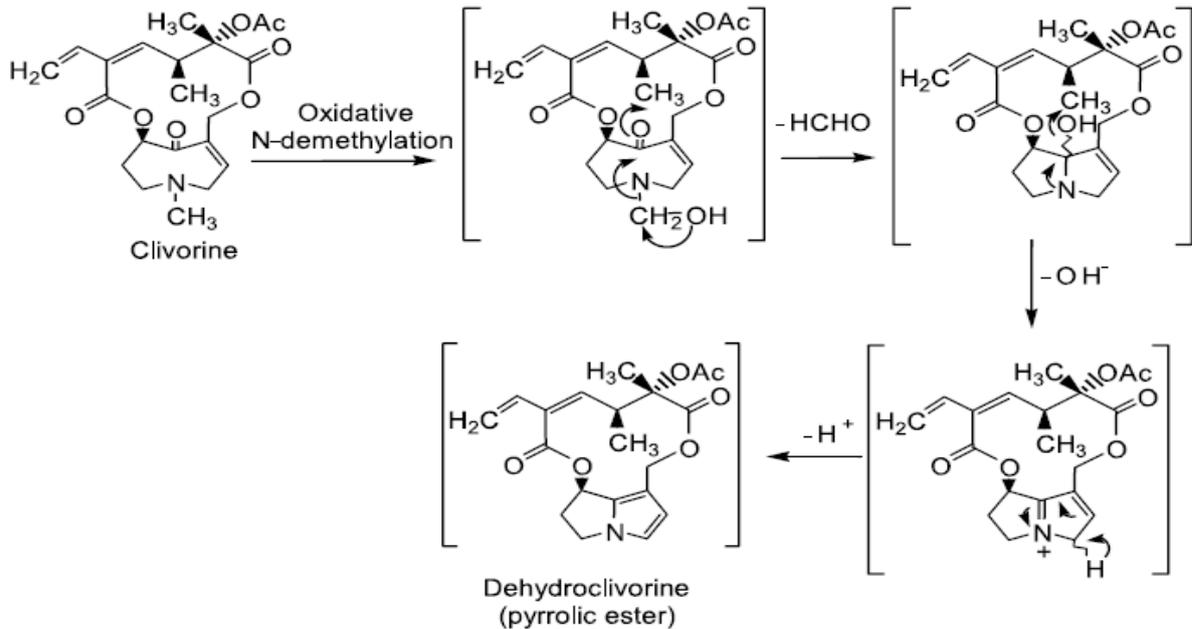


Figure 8 : Voie métabolique du noyau type otonécine [83]

Les di-deshydropyrrolizidines obtenus sont chimiquement et biologiquement réactifs. Ils réagissent rapidement avec les fonctions nucléophiles [54], [83] telles que les groupements hydroxyles et amines des protéines et des bases puriques et pyrimidiques des nucléotides de l'ADN et de l'ARN [61]. Etant donné que ces métabolismes ont lieu principalement dans le foie, cela explique pourquoi cet organe est le plus fréquemment atteint.

- Hydrolyse de la di-deshydropyrrolizidine

Les liaisons estérifiées de la di-deshydropyrrolizidine sont hydrolysées pour former un mélange racémique de la 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxyméthyl-5H-pyrrolizidine ou DHP. La di-deshydropyrrolizidine donne par réarrangement spontané un carbonium chargé positivement en position C7 de la base. Le carbonium réagit avec une molécule d'eau d'un côté ou de l'autre du plan formé par le noyau nécique ce qui aboutira au mélange racémique de la DHP [83] [Figure 7]. Ces métabolites secondaires sont plus solubles en milieu aqueux et

seront facilement transportés par le sang vers les autres organes. Ils seront en partie éliminés dans les urines mais la DHP est également un métabolite toxique secondaire pouvant rapidement réagir avec les fonctions nucléophiles au niveau des autres organes [83].

Ces réactions de réduction des alcaloïdes N-oxyde en N tertiaires, d'oxydation des alcaloïdes C1-C2 insaturés en di-deshydropyrrolizidine, et d'hydrolyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques estérifiés en DHP sont à l'origine des métabolites électrophiles toxiques responsables de l'hépatotoxicité et de la génotoxicité de ces substances naturelles.

Il existe cependant des réactions de défense contre ces métabolites toxiques qui permettent de les rendre inactifs et facilitent leur élimination.

### *b) Voies de détoxification des alcaloïdes pyrrolizidiniques*

- Hydrolyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques estérifiés [Figure 9]

Les quatre types de noyaux néciques estérifiés sont hydrolysés par les carboxyles-estérasés ou par des microorganismes symbiotiques [55], [83], libérant ainsi les noyaux néciques libres et les acides néciques. Les noyaux et les acides néciques sont non toxiques et sont solubles dans l'eau donc facilement excrétés dans les urines. Chez les souris, l'activité estérasique est très faible au niveau du foie ce qui explique pourquoi elles sont très sensibles [63]. L'hydrolyse des liaisons esters est dépendante de l'encombrement stérique des noyaux. Cela explique pourquoi les alcaloïdes pyrrolizidiniques mono-estérifiés sont moins toxiques que les di-estérifiés non cycliques et les macrocycles [54].

- Gluco-conjugaison des alcaloïdes pyrrolizidiniques [Figure 9]

L'oxydation des alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2 insaturés par les cytochromes P450 donne la di-deshydropyrrolizidine. Ce métabolite toxique très réactif peut être conjugué avec une ou deux molécules de glutathion par la glutathion-S-transférase pour former la 7-glutathionyl-6,7-dihydro-1-hydroxyméthyl-5H-pyrrolizine (7-GSH-DHP) ou la 7,9-diglutathionyle-6,7-dihydro-1-hydroxyméthyl-5H-pyrrolizine (7,9-diGSH-DHP) [83]. La forme conjuguée facilitera son excrétion et son élimination dans les urines [84]. La gluco-conjugaison peut aussi se faire sur les bases néciques après hydrolyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques estérifiés [63]. Ce mécanisme de conjugaison par la glutathion S-transférase est considéré comme la voie principale de détoxification.

- La N-oxydation des alcaloïdes pyrrolizidiniques [Figure 9]

Les formes N-oxydes des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont également des métabolites solubles dans l'eau et peuvent aussi être considérées comme des formes de détoxification [54]. Les alcaloïdes N tertiaires peuvent être N-oxydés par les cytochromes P450 2B et par

les flavines mono-oxygénases [83] pour permettre de les éliminer dans les urines et les fèces dans une moindre mesure [84]. En revanche les noyaux types otonecine ne peuvent pas être oxydés car ils portent déjà une fonction méthyle sur l'azote.

Les azotes oxydés peuvent de nouveau être réduits et devenir toxiques.

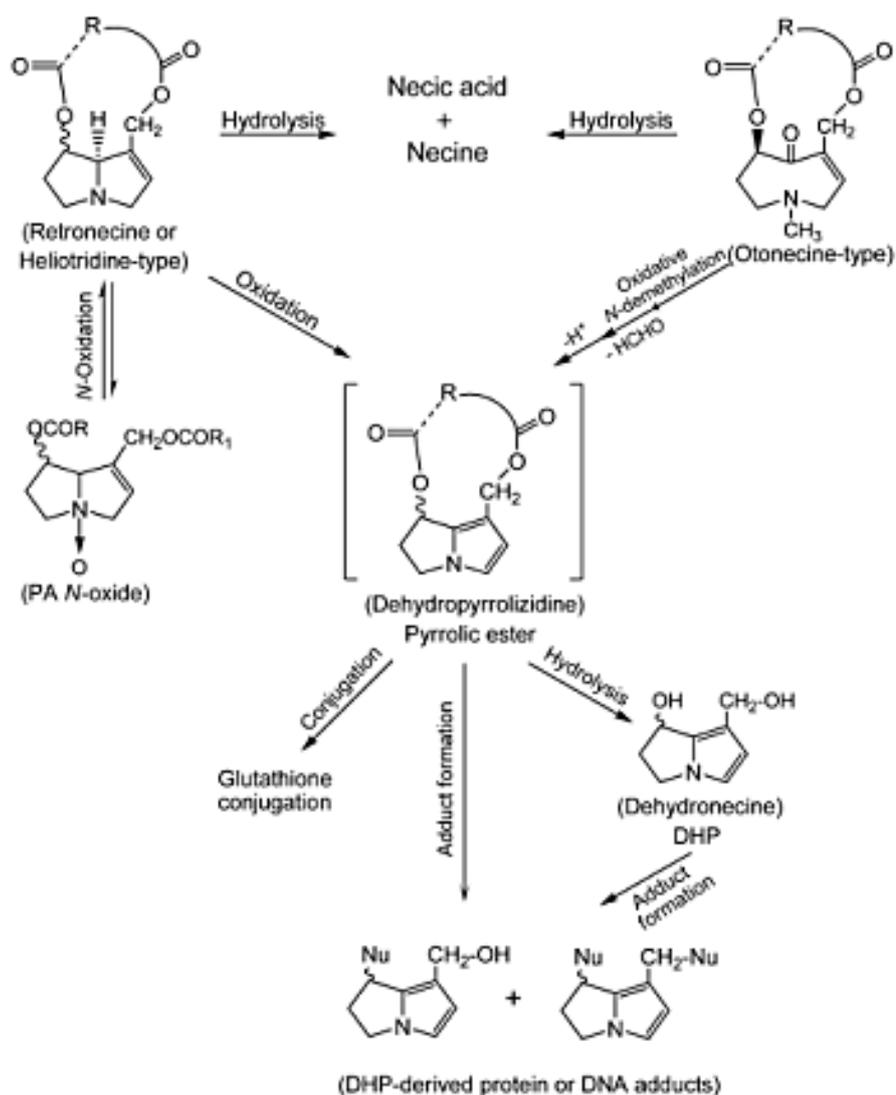


Figure 9: Représentation des principales voies métaboliques des alcaloïdes pyrrolizidiniques [84]

La 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxyméthyl-5H-pyrrolizidine DHP tout comme la di-deshydropyrrolizidine provenant des étapes de bioactivation des alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2 insaturés, sont les principaux métabolites responsables de la toxicité de ces substances naturelles. Les enzymes intervenant dans leur métabolisation sont principalement retrouvés au niveau du foie, expliquant ainsi pourquoi cet organe est majoritairement atteint lors des intoxications.

### 3. Le syndrome veino-occlusif du foie (HVOD) ou syndrome d'obstruction sinusoidale

Après avoir été absorbés au niveau de l'intestin, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont transportés par le sang vers le foie. Ils sont distribués dans les travées d'hépatocytes par le sang sinusoidal hépatique et passent dans les hépatocytes où ils subissent la plupart des réactions métaboliques. Une partie des métabolites obtenus peut être éliminée dans les urines alors que d'autres formes très électrophiles se lient de façon covalente avec les fonctions nucléophiles des macromolécules cellulaires [85]. Les deshydropyrrolizidines réagiront avec les molécules d'ADN et des protéines nucléaires, ce qui peut entraîner leur réticulation. Ces métabolites ont sur les cellules hépatiques un effet antimitotique. En bloquant la capacité des hépatocytes à se diviser et en stimulant leur régénération suite à leurs lésions, les cellules vont grossir et former des mégaloctes [85].

L'apparition de mégaloctes touche initialement les cellules endothéliales sinusoidales [87] et peut avoir lieu en quelques semaines [85]. La formation de mégaloctes s'accompagne de l'accumulation de débris cellulaires dans les zones centro-lobulaire, entraînant des modifications de la perfusion hépatique, une dilatation des sinusoides, un œdème sub-endothélial, un dépôt de fibrinogène dans les sinusoides et les veinules hépatiques. Ces événements évoluent vers une ischémie suivie d'une nécrose hépatocytaires et d'une fibrose sinusoidale [88]. Ces atteintes cellulaires sont à la base du tableau clinique du syndrome d'obstruction sinusoidale. Le tableau clinique associe typiquement une hépatomégalie sensible, de l'ascite, un ictère et dans les cas graves, une insuffisance hépatocellulaire [82]. On voit apparaître au stade terminal une cirrhose du foie, généralement lors des intoxications chroniques [54]. La dose la plus faible susceptible d'induire l'apparition de ces syndromes d'oblitération sinusoidale est actuellement estimée à 15µg/kg/jour [51], [89].

Le diagnostic repose essentiellement sur le tableau clinique qui est confirmé par une biopsie hépatique et l'étude histologique des tissus. L'échographie couplée au doppler des vaisseaux hépatiques permet de mettre en évidence un épaississement et une thrombose de la veine porte, un ralentissement ou une inversion du flux portal et une augmentation de l'indice de résistance au flux artériel hépatique [87], [90].

La prise en charge du patient vise à diminuer l'ascite par ponction du liquide et administration d'albumine et de diurétique (Spironolactone et Hydrochlorothiazide) [90].

Le traitement de la HVOD vise à pallier l'insuffisance hépatique avec l'administration de diurétiques et la pratique d'hémodialyse. Une approche plus récente propose l'administration de la défibrotide (polydésoxyribonucléotide simple brin) entre 5 et 60 mg/kg/j. Il s'agit d'un anticoagulant avec une activité antithrombotique et thrombolytique. Ce médicament est désigné comme médicament orphelin en raison du nombre réduit de cas

de HVOD. Ce médicament est essentiellement retrouvé dans le traitement préventif des HVOD engendré par des chimiothérapies ou des greffes du foie [91].

La transplantation hépatique a lieu en dernier recours.

#### 4. Troubles pulmonaires et cardiaques

Après le foie, les poumons sont les organes couramment touchés lors des intoxications. Les métabolites toxiques formés au niveau du foie vont circuler dans le sang jusqu'aux poumons où ils entraînent des thrombus veineux, des inflammations aiguës et des épaissements des parois des vaisseaux conduisant à une occlusion. Ces effets ainsi que la fibrose inter alvéolaire conduisent à une hypertension pulmonaire. Cette hypertension pulmonaire altère la circulation sanguine et oblige le ventricule droit à travailler plus, ce qui entraîne une hypertrophie du muscle et aboutit à une insuffisance cardiaque congestive [85].

#### 5. Génotoxicité

Bien qu'il n'y ait pas de données épidémiologiques concernant la cancérogénicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques chez l'homme, des études menées sur des animaux ont révélé les potentiels effets génotoxiques et tumorigènes de certains de ces métabolites.

Comme dans le cas des atteintes hépatiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques doivent être métabolisés pour donner des agents alkylants génotoxiques. Les étapes de bioactivation des alcaloïdes pyrrolizidiniques aboutissent à la production de la deshydropyrrolizidinique et de la DHP. Ces agents présentent deux fonctions électrophiles réactives en position C7 et C9 de la base nécique qui réagissent avec les groupements nucléophiles de macromolécules cellulaires telles que l'ADN ou des protéines nucléaires [83].

Ces interactions avec les acides nucléiques ont plusieurs effets [84]:

- la réticulation entre des brins d'ADN ou entre des macromolécules d'ADN et des protéines,
- des cassures de brins d'acides nucléiques,
- des échanges de chromatides sœurs.

Il a été observé lors d'études de génotoxicité sur des rats et des souris, que la formation des interactions avec l'ADN pouvait induire des transversions d'acide nucléique avec le changement d'une base purique par une base pyrimidique et inversement. Des substitutions d'acides nucléiques ont également été signalées [84].

Les interactions de ces substances avec les éléments cellulaires sont susceptibles d'entraîner des mutations génétiques ou chromosomiques. Les observations directes des

aberrations chromosomiques induites par les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont rares chez l'homme mais ont été décrites sur des cellules sanguines d'enfants présentant une maladie d'occlusion sinusoidale ou HVOD [84].

Les premières études menées en 1954 sur des souris et des rats ont montré l'apparition de tumeurs après administration de la rétrorsine [92]. En 2001, les essais sur la riddelliine ont entraîné l'apparition d'hémangiosarcomes dans le foie de rats [92] et des rats ont développé des tumeurs pour des doses de lasiocarpine de 0,2mg/kg/jour [92].

Là encore chez l'homme, le pouvoir tumorigène des alcaloïdes pyrrolizidiniques n'a pas été directement établi bien que des épisodes de recrudescence de tumeurs hépatiques aient été signalés chez certaines populations d'Afrique Centrale et du Sud consommant des plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques [84].

Les résultats des études *in vitro* et *in vivo* ainsi que les rares cas observés chez l'homme permettent d'en déduire que certains alcaloïdes pyrrolizidiniques métabolisés seraient responsables de génotoxicités et tumorigénités chez l'homme [52], [84].

## A. Quelques cas d'intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques

Plusieurs cas d'intoxications ayant pour origine les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été décrits dans la littérature. Il n'est pas toujours évident de faire le lien entre les premiers signes de l'intoxication et l'origine de celle-ci car les symptômes peuvent survenir quelques semaines, voire quelques mois après l'exposition aux toxines. Parmi les cas décrits, on retrouve des événements localisés sporadiques, provoqués généralement par la consommation de tisane. On retrouve ces cas dans les pays où les médecines traditionnelles sont encore bien présentes. Les pays industrialisés sont également concernés avec la recrudescence des médecines dites « douces » [82]. Des cas de maladies d'obstruction sinusoidale et d'hypertension pulmonaire sévère ont été signalés suite à la consommation de tisane à base de consoude *Symphytum officinales* [72]. Au Mexique, deux jeunes enfants ont succombé après qu'on leur ait donné des tisanes de *Senecio longilobus* sur une courte période (4 à 14 jours). Les doses en alcaloïdes pyrrolizidiniques (principalement la riddelliine, la sénéciphylline et la sénécionine) qu'ils auraient ingéré ont été estimées entre 0,8 et 3 µg/g/ jour [52]. En Chine, le *Gynura segetum Asteraceae* a été dans plusieurs cas la cause d'intoxications entraînant des troubles hépatiques caractéristiques [93].

Des épisodes d'intoxications à grande échelle sont aussi à signaler. Les épidémies touchent des populations des pays en voie de développement au Proche Orient, en Afrique du Sud, en Irak, en Asie Centrale, Afghanistan, Inde [82]. Elles sont généralement provoquées par la consommation de farine contaminée par des plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques qui envahissent les cultures. Les graines d'héliotrope ou *Heliotropium lasocarpium* ou *popovii* ont été retrouvées par exemple dans les récoltes de blé qui ont

entraîné une épidémie de maladies d'obstruction sinusoidale en 1992 et 1993 au Tadjikistan [82]. D'autres épidémies ont été signalées en 1974 puis en 2008 à l'ouest de l'Afghanistan [86].

Ces cas d'intoxications décrits dans la littérature ont comme points communs la présence du syndrome veino-occlusif du foie et l'importante exposition aux métabolites toxiques sur une courte période ou de façon répétée. Cependant, la relation dose/effet reste encore obscure et les sensibilités interindividuelles sont importantes.

## IX. Le miel est-il toxique ?

Il est maintenant bien établi que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont néfastes pour l'homme suite à une exposition chronique ou aiguë. L'action de la di-deshydropyrrolizidine et de la DHP provenant de l'activation enzymatique des alcaloïdes pyrrolizidiniques 1-2 insaturés, vont principalement entraîner chez l'homme un syndrome d'obstruction sinusoidale du foie et dans certain cas une insuffisance respiratoire et cardiaque. En se basant sur l'apparition des troubles hépatiques, la plus faible dose entraînant une toxicité chronique a été établie provisoirement à 15 µg/kg/jour soit une dose de 1 000 µg/jour pour un adulte de 70Kg sur une période de 6 mois [51], [86], [89].

En se basant sur les cas d'intoxications observés en Afghanistan [86] et au Mexique [52], les doses engendrant une toxicité sur une courte période (4 à 14 jours dans le cas observé au Mexique) sont près de 100 fois plus importantes que pour une intoxication chronique, soit une dose estimée à  $1.10^5$  µg/jour pour un adulte.

Dans le paragraphe « La consommation de miel contaminé », nous avons évalué la quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'un adulte européen et anglais pouvait ingérer lors de la consommation du miel du commerce ou d'un miel récolté dans les ruches disposées sur des zones contrôlées [Tableau 5]. Dans le cas du miel du commerce pouvant contenir près de 1µg d'AP/kg de miel, la dose ingérée chez un Européen est estimée à 0,0039 µg d'AP par jour, et à 0,09 µg d'AP par jour pour un adulte anglais. Pour les miels de zones « contrôlées », les doses sont près de 1000 fois plus importantes avec pour un consommateur Européen, 3,9 µg d'AP par jour et 90 µg d'AP par jour pour un adulte anglais.

En comparant ces valeurs d'exposition aux doses d'alcaloïdes pyrrolizidiniques pouvant entraîner une intoxication à court terme ( $1.10^5$  µg/jour) ou chronique (1 000 µg/jour), nous pouvons en déduire que la teneur en métabolite des miels retrouvés dans les commerces ou en provenance de zones contrôlées n'est pas suffisante pour induire de syndrome d'obstruction sinusoidale du foie.

L'estimation de ces doses toxiques ne prend pas en compte le pouvoir génotoxique et cancérigène des alcaloïdes pyrrolizidiniques insaturés. Les données épidémiologiques sur les tumeurs induites par ces métabolites toxiques chez l'homme sont encore insuffisantes. A partir des études toxicologiques sur les animaux, l'Union Européenne a tout de même établi un seuil de 0,007 µg d'AP/kg de poids corporel et par jour en dessous de laquelle le risque d'induire un cancer est faible [52]. Pour une personne de 70Kg, la dose tolérable en alcaloïdes pyrrolizidiniques est donc de 0,49 µg par jour.

En comparant les doses d'alcaloïdes pyrrolizidiniques absorbées avec les différents miels [Tableau 5] et le seuil établi à 0,007 µg d'AP/kg de poids corporel et par jour, nous constatons que certains miels monofloraux peuvent présenter une teneur en métabolites toxiques supérieure à cette valeur.

Afin de limiter les risques pour la santé humaine, des seuils en alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été établis depuis 1992 en Allemagne. Pour une prise orale n'excédant pas six semaines, la teneur en alcaloïde pyrrolizidinique insaturé ne doit pas dépasser 1µg / jour. Au-delà des 6 semaines, la teneur journalière ne doit pas dépasser 0,1µg/jour [58]. Ce règlement s'applique qu'à un nombre restreint et identifié de produits à bases de plantes. Ces seuils sont actuellement utilisés dans les autres états de l'Union Européenne. En revanche, les teneurs en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les miels ne font actuellement pas l'objet d'une réglementation spécifique.

## **X. Conclusion :**

Le miel peut renfermer des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Les teneurs hautes retrouvées dans certains miels du commerce ont été estimées à 1 µg/kg et à 1 000 µg/kg dans les miels récoltés sur des zones contrôlées. Le miel est un aliment très apprécié chez les Européens mais les quantités absorbées ne permettent pas d'induire à elles seules de syndromes d'obstruction sinusoidale, troubles caractéristiques des intoxications aiguës ou chroniques aux alcaloïdes pyrrolizidiniques insaturés. En revanche, le manque de données sur le pouvoir génotoxique et cancérigène des alcaloïdes pyrrolizidiniques ne permet pas d'exclure les risques engendrés par ces métabolites toxiques présents dans le miel et principalement les miels de plantes à alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Afin de limiter la présence des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les miels, les apiculteurs devraient être informés sur ces risques et formés afin de reconnaître les plantes synthétisant ces métabolites, leur permettant ainsi de réduire autant que possible la visite de ces fleurs par les abeilles.

# Les Grayanotoxines

---

A l'inverse des miels contenant les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les effets toxiques des grayanotoxines présentes dans certains miels ont depuis longtemps été décrits dans quelques régions du monde. Le récit le plus connu à ce sujet est sûrement celui relaté par Xénophon dans l'Anabase lors de l'expédition de Cyrus et la retraite des dix mille, 401 ans avant J.C [Annexe 2]. Cette histoire nous raconte pour la première fois avec précision l'intoxication de masse qu'ont subi les troupes de mercenaires grecs après avoir consommé du miel produit en grande quantité dans une région correspondant à la région orientale de la Turquie sur les côtes de la Mer Noire.

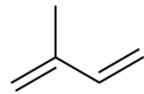
Par la suite, d'autres auteurs comme Pline l'Ancien dans « Histoire Naturelle », livre X, ou plus récemment encore Joseph Pitton de Tournefort en 1717, ont fait une description d'une plante à partir de laquelle les abeilles ont élaboré un « miel vénéneux ». La description que ces auteurs font de ces plantes permet de les identifier comme étant une espèce de rhododendron, *Rhododendron ponticum*, appartenant à la famille des *Ericaceae*.

Vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, les grayanotoxines ont été identifiées comme étant les substances responsables des effets toxiques de ces miels et en 1889, ces métabolites ont été isolés pour la première fois dans des échantillons de rhododendron par Plugge et Zaayer [94].

Encore de nos jours, des intoxications au miel à grayanotoxines sont décrites dans quelques pays du monde. Parmi les symptômes retrouvés, les troubles cardiaques sont les principaux événements observés lors de ces expositions. L'amélioration des connaissances sur ces intoxications a facilité la prise en charge des patients et a permis d'identifier plus rapidement l'origine des troubles.

## I. Les grayanotoxines, métabolites secondaires dans la plante

Les grayanotoxines sont des métabolites secondaires présentes chez certains genres de la famille des *Ericaceae*. Ces toxines également connues sous le nom d'andromédotoxine, d'acethylandromedol ou encore de rhodotoxine, sont des dérivés terpéniques [95]. Les dérivés terpéniques sont retrouvés de façon ubiquitaire chez les végétaux et les animaux [96], mais certains composés sont spécifiquement présents chez un nombre restreint de plantes. De façon générale, les terpènes sont composés d'unités isopréniques à 5 carbones donnant une structure du type 2-méthyle-1,3-diène [Figure 10]. Ces unités vont se combiner entre elles pour former des chaînes carbonées allant de 10 carbones dans le cas des monoterpènes, jusqu'à plus d'une dizaine d'unités isopréniques pour donner des polyterpènes comme par exemple avec le caoutchouc [Figure 11] [97]. Le nombre d'unités isopréniques, la cyclisation des chaînes carbonées et les différents groupements (hydroxyle, époxyde, insaturation, estérification...) permettent d'offrir une très grande diversité de structures terpéniques.



isoprène

Figure 10 : Unité isoprénique 2-méthyle-1,3-diène [97]

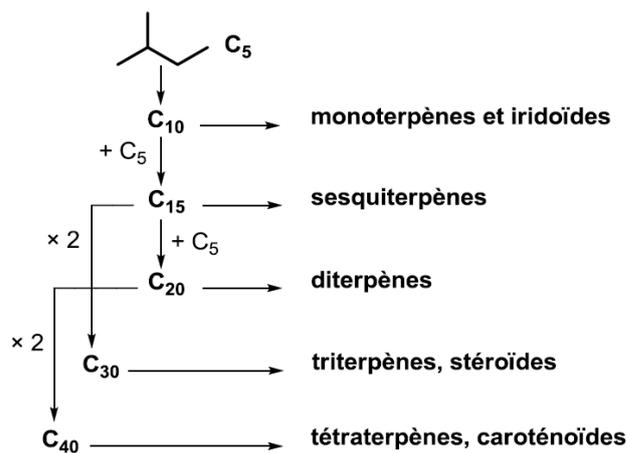


Figure 11 : Classification des Terpènes selon le nombre d'unités terpéniques [97]

## A. Structure des grayanotoxines

Les grayanotoxines sont des métabolites diterpéniques regroupés dans un ensemble de structures appelé les grayanoides. 128 composés y ont été regroupés. Les grayanoides se divisent à nouveau en 6 structures diterpéniques distinctes. On retrouve les grayananes, structure de base des grayanotoxines. Les 5 autres structures dérivent du noyau grayanane avec les 3,4-seco-grayananes, les 9,10-seco-grayananes, les noyaux kalmanes, Leucothanes et 1,5-seco-grayananes [Figure 12]. Ces grayanoides ont pour origine commune le noyau type ent-kaurene [98].

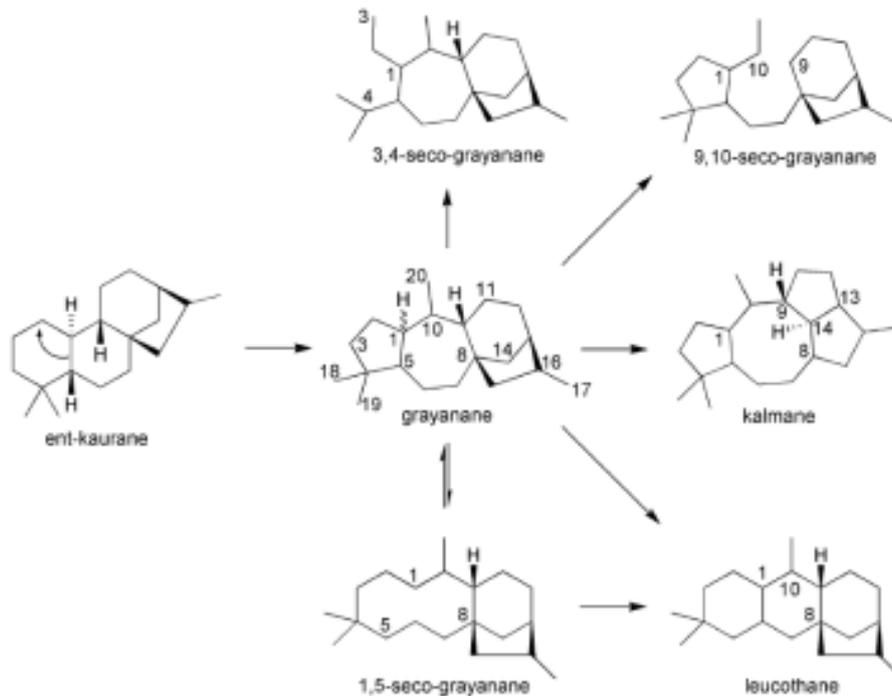


Figure 12: Représentation des 6 structures types des grayanoides dérivant du noyau ent-Kaurene [98]

Les grayananes sont des métabolites à 20 carbones formant une structure tétracyclique type 5/7/6/5 [Figure 13]. Sur ce squelette viendront se greffer plusieurs fonctions hydroxyles. Ces grayananes sont représentées par 3 sous-groupes :

- Les grayananes (exemples : grayanotoxine I, II, III, etc.) [Figure 14, 15 et 16]
- Les 2,3-epoxy-grayananes (exemple : rhodojaponine III etc.) [Figure 17]
- Les 5,9-epoxy-grayananes

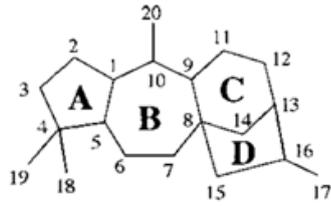


Figure 13: squelette tétracyclique type des grayanotoxines [99]

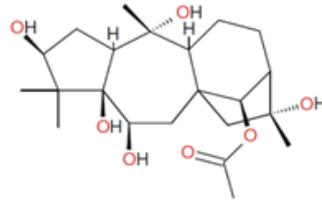


Figure 14: Grayanotoxine I [100]

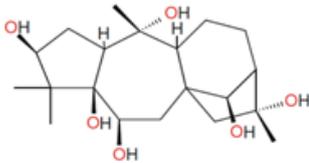


Figure 15 : Grayanotoxine III [100]

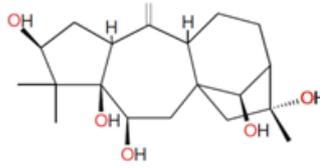


Figure 16 : Grayanotoxine II [100]

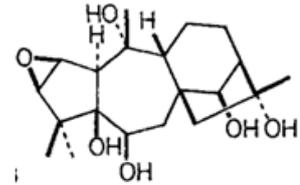


Figure 17 : Rhodojaponine III [100]

- Les grayanotoxines type grayanane présentent la structure de base avec le noyau tétracyclique sur lequel se grefferont plusieurs fonctions. Des fonctions hydroxyles sont généralement retrouvées sur les carbones en position C3, C5 et C6 et plus rarement en C11 et C12. Dans le cas du lyoniol D [Figure 18] isolées chez *Lyonia ovalifolia*, le carbone en C14 ne porte pas de groupement hydroxyle [98]. D'autres fonctions sont portées par les grayananes avec des groupements propionyles en C6 ; C7 ou C14 dans le cas des asebotoxines [Figure 19] isolés dans les fleurs de *Pieris japonica*. Dans cette même plante, des grayananes glycosilées en C3 ont également été identifiées avec les pierosides [Figure 20] [98].

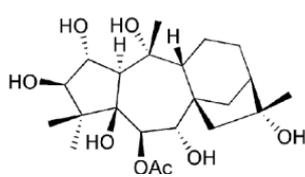


Figure 18 : Lyoniol D [98]

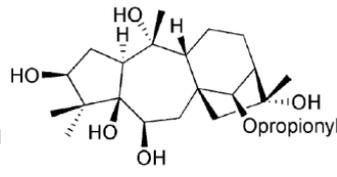


Figure 19 : Asebotoxine I [98]

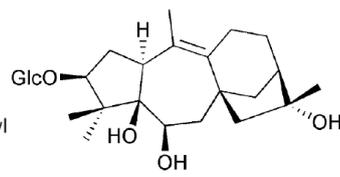


Figure 20 : Pieroside D [98]

- Les 2,3-epoxy-grayananes ont le noyau tetracyclique des grayananes mais ces molécules sont différenciées par une fonction époxyde en position C2, C3. On retrouvera par exemple les rhodojaponines I et III [Figure 17], isolées dans *Rhododendron japonicum*.

- Le dernier sous-groupe des 5,9-epoxy-grayanane est plus rare. Actuellement, seules trois structures de ce type ont été isolées. La structure de base des grayananes est présente avec une fonction époxyde portée par les carbones C5 et C9. On retrouve par exemple la grayanotoxine XV [Figure 21] isolée à partir de *Leucothoe grayana*.

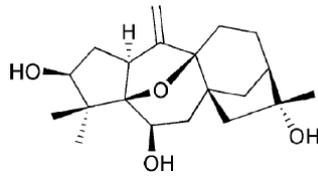


Figure 21 : Grayanotoxine XV [98]

A partir du noyau grayanane se formeront d'autres grayanoides retrouvés également chez les *Ericaceae*. La structure tétracyclique est généralement modifiée avec l'ouverture de l'un des cycles et réarrangement de la structure. Nous pouvons citer par exemple :

- Les 3,4-seco-grayananes : ces composés ont une fonction lactone obtenue par une estérification intramoléculaire. (exemple : pierisformotoxines isolées chez *Pieris formosa*) [Figure 22].

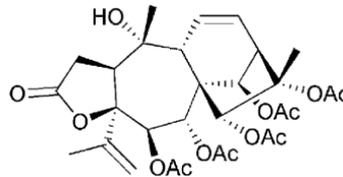


Figure 22 : structure 3,4-seco-grayanane avec la pierisformotoxine [98]

- Les 9,10-seco-grayananes : exemple : lyonine A isolé dans *Pieris formosa* [Figure 23]

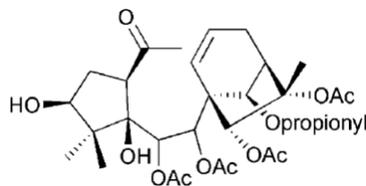


Figure 23 : Structure 9,10-seco-grayanane avec la Lyonine A [98]

- Les 1,2-seco-grayananes : exemple des grayanol A et B isolées dans *Leucothoe grayana* [Figure 24]

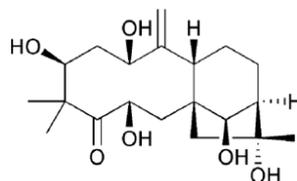


Figure 24 : Structure 9,10-seco-grayanane avec la grayanol A [98]

- Les kalmanes : structure à noyau tétracyclique mais du type 5/8/5/5. Exemple : le kalmanol isolé chez *Kalmia angustifolia* [Figure 25]

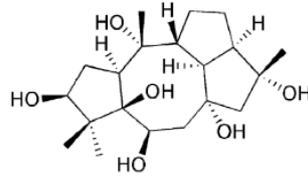


Figure 25 : Structure kalmane avec la kalmanol [98]

- Les leucothanes : structure tetracyclique du type 6/6/6/5. Exemple : Leucothol A retrouvé chez *Leucothoe grayana* [Figure 26]

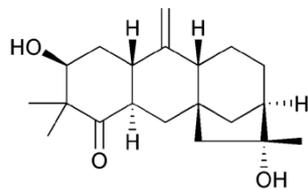


Figure 26 : structure leucothane avec leucothol A [98]

Toutes ces structures sont des dérivés diterpéniques qui subiront lors de leur biosynthèse des étapes de cyclisation, de fonctionnalisation et de réarrangement. Plusieurs de ces métabolites ont été isolés chez une seule espèce. De même, un métabolite peut être retrouvé chez plusieurs espèces.

## B. Les Grayanotoxines, une source botanique limitée dans la famille des Ericaceae

Les grayanotoxines ont été isolées chez un nombre limité de plantes appartenant exclusivement à la famille des *Ericaceae* [101]. Les *Ericaceae* comprennent entre 106 et 130 genres, regroupant près de 2700 à 4100 espèces. Ce sont des plantes qui sont typiquement retrouvées sur des sols acides, plus particulièrement dans des régions tempérées fraîches, à la fois dans les hémisphères nord et sud. Sous les tropiques, ces plantes seront localisées préférentiellement en altitude [102]. En Europe, les *Ericaceae* sont représentés entre autres par les bruyères, les rhododendrons que l'on peut retrouver à l'état sauvage ou comme plantes d'ornementation. Certaines d'entre elles produisent des fruits comestibles comme les canneberges ou les myrtilles appartenant au genre *Vaccinium*.

Tous les *Ericaceae* ne biosynthétisent pas ces métabolites secondaires. Les grayanotoxines ont été isolées en particulier dans des plantes appartenant au genre *Kalmie*

*ssp.*, *Leucothoe ssp.*, *Lyonia ssp.*, *Pieris ssp.*, *Agarista ssp.* et *Rhododendron ssp.* [103]. Le tableau 6 ci-dessous reprend les principaux genres dans lesquels ont été identifiées les grayanotoxines. Une soixantaine de formes de grayanotoxines ont été retrouvées dans ces plantes [95]. Parmi elles, certaines se sont révélées être toxiques pour les animaux mais aussi pour l'homme.

Tableau 6 : Les grayanoides identifiées dans les genres de la famille des *Ericaceae*

genre	espèces	toxines	Références
<i>Kalmia</i>		Grayanotoxines I, II, III	Tallent et al. 1957
<i>Leucothoe</i>		Grayanotoxines I, II, III, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XVIII; Grayanosides A, B; Leucothol B, D	Tallent et al. 1957 ; ; Sakakibara et al. 1979 1981
	<i>grayana</i>	Leucothol ; grayanol ; grayathol; 1,5-seco-grayanotoxine	[107], [106]
<i>Lyonia</i>		Grayanotoxine I ; Lyoniatoxin	Tallent et al. 1957 ;
	<i>ovalifolia</i>	Lyoniatoxine	[107]
<i>Craibiodendron</i>	<i>yunnanense</i>	craibiotoxin	Zhang 2005
<i>Pieris</i>		Pieristoxin A, B, C ; Asebotoxine I, II, III, IV, V, XVIII, grayanoside B, pieroside B	Tallent et al. 1957 ; Schindler 1962 Sakakibara et al. 1979 1981
	<i>japonica</i>	asebobiotoxine	[107]
<i>Rhododendron</i>		Grayanotoxines I, III ; Rhodojaponin I, II, III, IV, V, VII	Hardikar 1922, Tallent 1957, [95]
	<i>decorum</i>	Grayanotoxine I, IV, craibiotoxine IX	[108]
	<i>ponticum</i>	Grayanotoxine I, II, III	[95], [124]
	<i>molle</i>	Rhodojaponine III	[109]
	<i>japonica</i>	Rhodojaponine	[107]
	<i>flavum</i>	Grayanotoxine I et II	[100]
	<i>simsii</i> (Hong Kong)	Grayanotoxine I	[100]

Wong et son équipe ont publié une étude sur *Rhododendron ponticum*. Ils ont cherché à déterminer la teneur de la grayanotoxine I et de la grayanotoxine III dans les différentes parties de la plante par GC-Masse. Les résultats sont retranscrits dans le tableau suivant [94].

Tableau 7 : études quantitatives des grayanotoxines I et III dans les différentes organes de *Rhododendron ponticum* [94]

Partie de la plante	Teneur en Grayanotoxine I (mg/g de matière sèche)	Teneur en Grayanotoxine III (mg/g de matière sèche)
Boutons floraux frais	55,26	88,61
Feuilles fraîches	9,40	33,74
Bourgeons foliaires	9,25	77,72
Tiges vertes	7,60	4,20
Rameaux	4,90	11,19
Feuilles sèches	3,91	68,64
Bois, bois mort et racine	>0,1	Entre 3,5 et >0,1

Ces valeurs montrent que la concentration de la grayanotoxine III est plus importante que pour la grayanotoxine I dans toutes les parties de la plante. De plus, ces métabolites sont retrouvés dans les deux cas, principalement dans les jeunes pousses de la plante comme les bourgeons, les jeunes feuilles et les jeunes tiges [94].

### C. Les plantes mellifères à grayanotoxines

Les *Ericaceae* sont des plantes entomophiles. Leur mode de reproduction fait intervenir les insectes pour disséminer leurs grains de pollen. Quelques-unes d'entre elles sont butinées par les abeilles mellifères qui vont élaborer un miel parfois recherché pour leurs saveurs particulières ou pour leurs propriétés. En France, une trentaine d'espèces réunies en dix genres appartenant à la famille des *Ericaceae* ont été recensées. Une étude menée en 1966 sur le pollen des *Ericaceae* dans le miel produit en France a permis d'établir une liste de 16 espèces pouvant être considérées comme pollinifères et mellifères à des degrés variés [104]. Nous citerons ici pour exemple le *Rhododendron ferrugineum* L. et *Rhododendron hirsutum* L., la myrtille *Vaccinium myrtillus* L., la bruyère *Calluna vulgaris* SALISB., l'arbousier *Arbutus unedo* L., *A. alpina* L., *A. uva-ursi* L., *Erica vagans* L., *E. ciliaris* L., etc. [104].



Photo 7 : Abeille sur des fleurs de *Calluna* sp.

Actuellement, aucun miel dérivant de ces plantes retrouvées en France métropolitaine n'a entraîné d'intoxication ayant fait l'objet d'une déclaration auprès des autorités sanitaires. En revanche, il est reconnu que dans certaines régions du monde on puisse trouver des plantes de cette même famille produisant du nectar rendant le miel toxique. Une liste de ces plantes mellifères est présentée ci-dessous [95], [105].

Tableau 8 : Genre et espèce de la famille des Ericaceae identifiés comme étant des sources de nectar toxique et de pollen pour les abeilles.

Famille	genre	espèce	référence
Ericaceae	<i>Agauria</i>	<i>saliciflora</i>	[95] ; [110] ; [111]
	<i>Kalmia</i>	<i>latifolia</i> (laurier de montagne)	[95] ; [111]
		<i>angustifolia</i>	[95] ; [111]
	<i>Rhododendron</i>	<i>luteum</i>	[95] ; [111]
		<i>ponticum</i>	[95] ; [111]

- Le *Rhododendron ponticum* [Photo 8] est probablement la source de grayanotoxine dans le miel la plus décrite dans la littérature. Cette plante est à l'origine du nectar rendant le miel toxique en Turquie et plus particulièrement sur les côtes de la mer Noire. Cette plante originaire de l'Asie Mineure (ou Turquie) est également retrouvée dans d'autres régions du monde comme le Népal, l'Espagne, le Portugal, le Japon, le Brésil, les Etats-Unis, etc. [112]. Sur les côtes turques de la Mer Noire, elle va recouvrir des collines entières empêchant la croissance d'autres espèces végétales. Celle-ci est considérée comme une espèce invasive dans certaines régions du monde comme dans le nord du Pays de Galle [94] ou en Basse Normandie (France) où elle est considérée comme une plante invasive avérée [113]. Cette plante pousse dans les forêts, les landes et les dunes, essentiellement sur des sols acides.

Ce sont des arbustes pouvant atteindre 8 mètres de haut, aux feuilles simples persistantes et aux fleurs de couleur violacée ou jaune de 5 cm de diamètre [113]. L'ensemble de la plante renferme des grayanotoxines dont les trois principales sont les grayanotoxines I, II et la grayanotoxine III qui est la toxine majoritaire [94], [114]. Toute la plante est considérée comme toxique pour les animaux comme pour l'homme [94]. Selon les apiculteurs de la région de la Mer Noire, le nectar des rhododendrons est plus riche en grayanotoxine au printemps, lors de la première floraison.



Photo 8 : *Rhododendron ponticum* L. [113]

Une autre espèce de rhododendron, le *R. luteum* est également une plante visitée par les abeilles et qui est une source probable de miel toxique. Les grayanotoxines I, II et III ont été retrouvées dans les miels contenant des grains de pollen de ce rhododendron [114]. Cette plante est retrouvée de l'Est de l'Europe jusqu'au Caucase. On la trouve en grandes quantités en Syrie et en Turquie. C'est un arbuste à feuilles caduques et aux fleurs jaunes, pouvant atteindre 4 à 5 mètres de hauteur.

- Le genre *Kalmia* et plus particulièrement *kalmia latifolia* et *K. angustifolia* appartient également à la famille des *Ericaceae*. Ces plantes sont, avec les *Rhododendrons ponticum*, une source non négligeable de miel toxique essentiellement en Amérique du Nord [95].

*Kalmia latifolia*, ou laurier des montagnes, [Photo 9] est un arbuste aux feuilles persistantes originaire de l'est de l'Amérique du Nord [105]. On le retrouve dans les étroites vallées encaissées offrant aux insectes entre mai et juillet une grande quantité de fleurs de couleur rose pâle à foncée. Ces plantes ont été importées dans divers pays comme la France où elles sont retrouvées dans les jardins comme plante d'ornementation.



Photo 9 : *Kalmia latifolia* L.

*Kalmia angustifolia*, ou laurier des moutons [Photo 10], est un arbuste ne dépassant pas 1 mètre de hauteur, aux feuilles allongées et persistantes. Les fleurs roses sont de petite taille et fleurissent entre juin et juillet selon la latitude. Ces plantes se situent principalement au nord-est de l'Amérique du Nord, sur des sols acides et en peuplement clairsemé.



Photo 10 : *Kalmia angustifolia* L.

- Les *Agauria salicifolia* Lam. [Photo 11] sont des arbres de 15 à 20 mètre de haut, endémiques dans la zone sud-ouest de l'océan Indien. Elles sont retrouvées principalement en Afrique de l'est, à Madagascar ainsi que sur l'île de la Réunion. Cette plante de la famille des *Ericaceae* pousse en moyenne altitude sur les terres volcaniques. Elles sont considérées comme des plantes pionnières car ce sont les premières espèces végétales à coloniser les coulées de lave. Le nectar de cette plante est une source secondaire de nourriture pour les abeilles. Leurs fleurs en forme de clochettes rouges seront visitées par ces insectes lorsque la floraison des plantes habituellement butinées est en retard. Les miels de cette plante sont donc moins fréquents mais des cas d'intoxication ont tout de même été signalés dans l'île de la Réunion [111].



Photo 11 : *Agauria saliciflora*

Cette liste de plantes biosynthétisant des grayanotoxines se retrouvant dans le miel n'est probablement pas complète. Le nectar de ces plantes est généralement délaissé par les abeilles sauf dans des conditions climatiques particulières de sécheresse, ou lorsque les sources habituelles de nourriture viennent à manquer comme dans le cas cité ci-dessus de *Agauria saliciflora*. De plus, il se peut que des miels d'origines botaniques variées contiennent malgré tout de faibles quantités de grayanotoxine qui n'entraîneront pas d'effets toxiques.

#### D. La biosynthèse des dérivés terpéniques

Comme nous l'avons décrit précédemment, les grayanotoxines sont des composés diterpéniques. Le mécanisme de biosynthèse des grayanoides n'est pas encore élucidé bien que les premières étapes de la formation des précurseurs diterpénique soient connues. La première étape de la biosynthèse est la formation de l'isopentényl diphosphate (IPP), précurseur des terpènes, à partir de l'acétyl coenzyme A. Cette première étape, appelée voie de biosynthèse du Méthylérythritol phosphate ou voie MEP, a lieu dans les plastes à partir de l'acide pyruvique et de la glycéraldéhyde-3-phosphate. L'IPP et son isomère le diméthylallyle diphosphate DMAPP, sont reliés sous l'action de la prényl-transférase pour donner le géranyle diphosphate en C 10. Les diterpènes dérivent donc de la liaison entre deux unités géranyle diphosphates pour aboutir à une chaîne alkyle en C20 (diterpène) [96].

Ces précurseurs linéaires vont se cycliser pour donner des métabolites complexes. Plusieurs réactions enzymatiques permettent d'augmenter la diversité de ces dérivés terpéniques. On retrouve entre autres les hydrolases, des déshydrogénases, des réductases, des méthyltransférases et des glucosyltransférases [96].

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que la voie de biosynthèse des grayanotoxines suit celle des noyaux ent-kaurene [115], [108], [116]. Le noyau kaurene provient de la cyclisation de la chaîne diterpénique. Elle est initiée par la formation d'un carbocation réactif par la protonation d'une double liaison du géranyl-géranyl diphosphate [97]. La formation du carbocation réactif entraîne une succession d'attaques nucléophiles puis un réarrangement du type Wagner Meerwein aboutissant à la formation du noyau kaurene tétracyclique [Figure 27] [97].

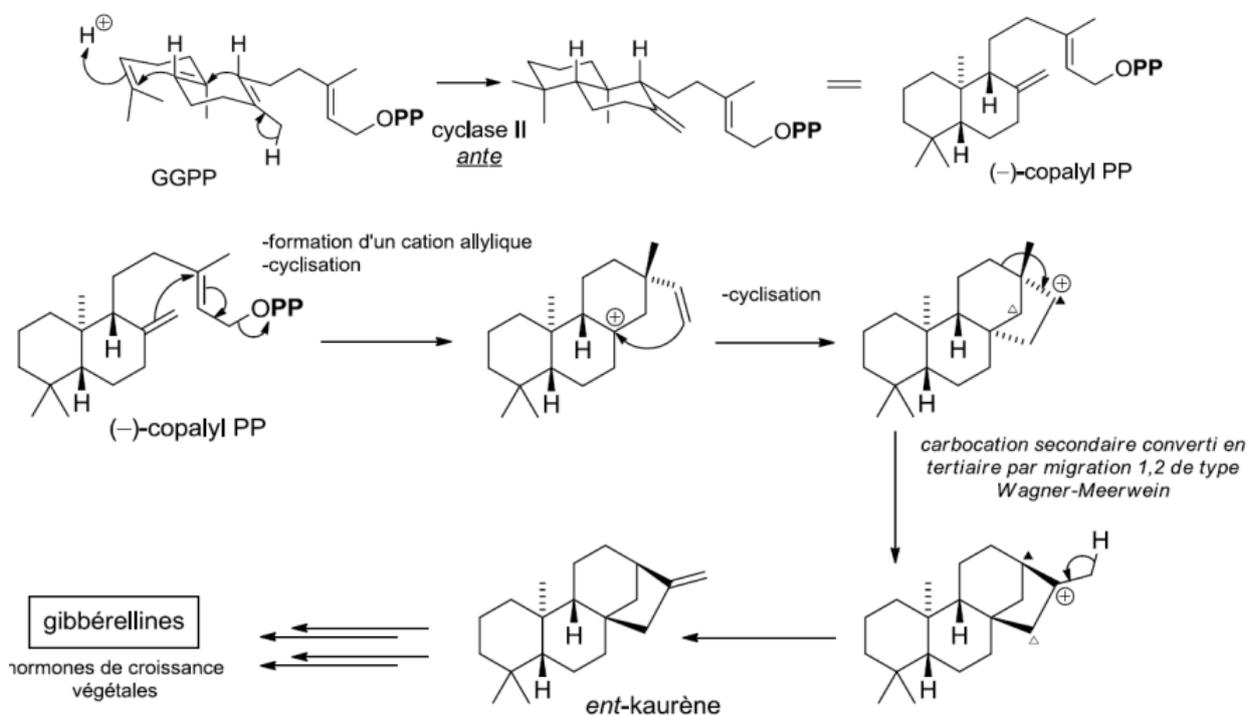


Figure 27 : mécanisme de cyclisation du géranyl-géranyl diphosphate dans la voie de biosynthèse du noyau Kaurene [97]

Ce noyau kaurene est également le précurseur d'une phytohormone de croissance retrouvée chez les végétaux, la gibbérelline [97]. L'intervention d'enzymes retrouvées exclusivement chez les Ericaceae peut être à l'origine de la présence limitée de ces métabolites dans cette famille [115]. Le site de biosynthèse des grayanotoxines n'est pas encore connu, mais l'initiation de la synthèse des diterpènes a lieu principalement dans les chloroplastes [97].

Après leur synthèse, les grayanotoxines sont transportées par la sève élaborée dans toutes les parties de la plante, dans les feuilles, les racines et en particulier dans les zones

de croissance comme les jeunes pousses et les bourgeons [94], [96]. Les grains de pollen peuvent également renfermer des grayanotoxines [96], [94].

## II. Rôle des grayanotoxines dans l'interaction entre les insectes et les plantes

Comme un grand nombre de dérivés terpéniques, les grayanotoxines vont entraîner chez certains mammifères et certains insectes un effet répulsif et anti-appétant. Ces métabolites secondaires ont été isolés dans des zones sensibles de la plante comme les feuilles, les jeunes pousses. Par exemple des concentrations en grayanotoxine III allant jusqu'à 88mg/g sont mesurées dans les bourgeons floraux chez *Rhododendron ponticum* [94].

Dans les régions du sud de la Chine pousse une espèce de rhododendron (*Rhododendron molle* G. Don *Ericaceae*) dont les fleurs et les fruits présentent des propriétés insecticides. Trois principales grayanoides, la rhodojaponine III, la grayanotoxine III et le kalmanol, ont été identifiés et testés sur deux espèces d'insectes (*Leptinotarsa decemlineata* (coléoptère) et *Spodoptera frugiperda* (lépidoptère)). Il est constaté que ces métabolites présentent bien un pouvoir anti-appétant, avec un effet bien plus marqué pour la rhodojaponine III [117]. Les essais avec d'autres espèces de rhododendron ne synthétisant pas de rhodojaponine n'ont pas présenté de propriétés répulsives pour ces insectes. Il en a été déduit que les grayananes portant un groupement époxyde en C2-C3 entraînent un effet répulsif alors que la présence d'un acétyle en C14 n'entraînait pas d'effet anti-appétant pour ces deux exemples d'insectes [117]. Cet effet anti-appétant de la rhodojaponine III n'a en revanche pas été observé sur la *Tetranychus pacificus* (Acariens parasite des plantes) [117].

Une autre étude sur le pouvoir répulsif a été réalisée cette fois-ci sur des bourdons (*Bombus terrestris*, *Apidae*) avec les grayanotoxines I et III extraites de *Rhododendron ponticum*. Ces métabolites ont été dilués dans une solution de saccharose pour des concentrations allant de 0,01 à 0,1 mmol/L, la concentration de ces métabolites ayant été évaluée à 0,07 mmol/L dans le nectar. Il est constaté que la présence de grayanotoxine entraîne une diminution de la quantité consommée de la solution sucrée même pour les faibles concentrations. En revanche, les grayanotoxines I et III retrouvées dans *Rhododendron ponticum* ne semblent pas avoir d'effet répulsif sur les bourdons [118].

Ces deux études montrent que les effets des grayanotoxines sur les insectes dépendent de la forme du métabolite mais aussi de l'insecte exposé.

Les données concernant les effets des grayanotoxines sur les abeilles *apis mellifera* sont rares. Selon certaines observations les abeilles consommant le miel toxique sont affaiblies. Leur vol est désorienté et certaines d'entre elles restent au sol. Au niveau de la colonie, il est observé une augmentation de la mortalité des abeilles et des malformations

chez les nymphes. Les effets du nectar riche en grayanotoxine sur ces abeilles sont bien moins marqués. Cela peut être dû à la différence de concentration de ces métabolites qui sont dilués dans le nectar et concentrés dans le miel après l'évaporation de l'eau [102]. En revanche, il n'est pas fait mention dans ces observations du type de grayanotoxine présente dans le miel ni de l'origine du nectar.

On peut donc supposer que certaines formes de grayanotoxines peuvent également avoir des effets répulsifs et anti-appétant chez les abeilles mellifères limitant ainsi le risque de contamination des miels. Quelques miels peuvent tout de même contenir naturellement ces toxines.

### III. Le miel

Les intoxications aux grayanotoxines ont été dans une grande proportion décrites à la suite de la consommation de miel provenant principalement du nectar de *Rhododendron ponticum*, *R. luteum*, de *Kalmia latifolia* et *K. angustifolia*, et plus rarement de *Agauria saliciflora*. Les miels dérivant du nectar des *Ericaceae* ne sont pas tous toxiques. Le miel de rhododendron produit dans les régions montagneuses des Pyrénées ou des Alpes à partir de *Rhododendron hirsutum* et *Rhododendron ferrugineux* n'est pas toxique et est très apprécié des consommateurs avertis [109]. Ce miel peut être confondu avec le miel d'acacia en raison de sa couleur d'un jaune blanc limpide après la récolte et cristallisant après 3 à 6 mois de conservation, de son odeur et de son goût peu prononcé.



Photo 12 : Miel de Rhododendron non cristallisé et cristallisé [119]

Les apiculteurs des régions côtières de la Mer Noire savent que le miel produit à partir de *R. ponticum* et *R. luteum* entraîne des effets toxiques chez l'homme. Il est couramment appelé dans ces régions le « miel fou » ou le « miel amer » [95]. En effet, la population locale reconnaît le miel fou par la sensation de brûlure qu'il entraîne dans la gorge lorsqu'il est consommé en petite quantité. Le « piquant » et le goût prononcé de ce miel fait qu'il est généralement peu apprécié des consommateurs non avertis [105]. Cependant en Turquie comme dans la région du Népal, ces miels sont recherchés et utilisés comme remède contre les douleurs gastriques, les troubles de l'intestin et dans les cas d'hypertension. Il est également considéré comme un stimulant sexuel et comme un antidiabétique [95]. Des apiculteurs au Népal et en Turquie produisent en connaissance de cause ces miels fous afin de les commercialiser [100]. Entre 2003 et 2004, près de 8048 kg de

miel ont été importé du Népal vers la Corée, qui en 2005 en a interdit la commercialisation. Malgré cette interdiction, plusieurs cas d'intoxication ont été signalés jusqu'en 2012 [120].

Les études sur le miel fou sont peu nombreuses. En 2014, Kurtoglu et son équipe ont publié une étude effectuée sur 178 échantillons de miel de *Rhododendron ponticum* récoltés sur une période de trois ans en provenance des régions côtières de la Mer Noire en Turquie [112]. Cette étude fournit les premières données quantitatives des principales grayanotoxines, la grayanotoxine I et la grayanotoxine III [94], retrouvées dans le miel de *Rhododendron ponticum* analysé par LC-MS/MS [112]. La teneur en grayanotoxine I dans ces miels est de l'ordre de 10mg/kg (8,20 +/- 1.93 mg/kg) et pour les grayanotoxines III, elle est de l'ordre de 20 mg/kg (20,4 +/- 1.69 mg/kg) [112]. La période de récolte et les conditions climatiques semblent avoir un impact sur la concentration des toxines dans la plante et dans le miel. Les apiculteurs de ces régions savent que les miels récoltés au printemps sont plus toxiques que ceux récoltés en été [102]. Cette étude précise que la diminution de la teneur en grayanotoxine n'est pas significative après 6 mois de conservation [112].

En 1959, White et son équipe ont analysé deux échantillons de miels toxiques provenant du Tennessee aux Etats-Unis contenant une grande proportion de pollen de *Kalmia latifolia*. Les teneurs en grayanotoxine dans ces échantillons ont été évaluées à près de 100 ppm (100 mg/kg) [103]. Par la suite, Scott et son équipe ont analysé en 1971 trois miels toxiques en provenance des montagnes de Colombie Britannique. L'origine botanique de ces miels n'a pas été précisée. Les teneurs en grayanotoxines II et III ont été déterminées à 3 ppm et à 7 ppm respectivement [121]. Ces valeurs doivent être considérées avec prudence car elles ont été déterminées par chromatographie sur couche mince.

Les études de la composition des miels fous n'ont permis à ce jour de mettre en évidence que la présence de 3 grayanotoxines, la I, la II et la III. Ces toxines seraient donc à l'origine des effets observés chez les personnes en raison de leur exposition.

#### **IV. Toxicité des grayanotoxines chez l'homme**

L'existence de miel toxique et les effets qu'ils produisent ont depuis longtemps été décrits dans des textes anciens (récit de Xénophon dans l'Anabase lors de l'expédition de Cyrus et la retraite des dix mille, 401 ans avant J.C.) [122]. De nos jours, bien que les cas d'intoxications soient peu nombreux à l'échelle de la planète, ils sont tout de même non négligeables dans certaines régions du monde. Les connaissances sur la toxicité des grayanotoxines sont nécessaires dans ces pays pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Dans les autres pays moins touchés par ces intoxications, il est tout de même utile de connaître les effets de ces toxines. En effet, à l'heure de la mondialisation, ces miels particuliers peuvent être retrouvés sur nos marchés.

## A. Cas d'intoxication aux grayanotoxines

Bien que le miel soit une source importante d'intoxication par les grayanotoxines, d'autres sources peuvent être citées, ainsi l'ingestion de tisanes ou d'infusions à base de feuilles et de fleurs de plantes à grayanotoxines. Ces cas sont généralement rares et surviennent pour l'essentiel mais pas exclusivement dans les pays asiatiques. Ils sont dûs à certaines idées reçues concernant les propriétés de certains rhododendrons, comme le *Rhododendron simsii*, qui a été administré avec du lait à un nourrisson pour des problèmes respiratoires. Celui-ci a présenté une détresse respiratoire sévère, une bradycardie et de l'hypotension. Des cas similaires sont retrouvés chez des adultes en Corée, après administration d'une préparation à base de *Rhododendron brachycarpum*, mais aussi vers Madagascar avec des tisanes de *Agauria salicifolia*. Les symptômes décrits sont des troubles cardiaques, une hypotension... [100]. Ces intoxications ont également été décrites à la suite de l'ingestion accidentelle par des enfants de plantes à grayanotoxines. Ces événements exceptionnels ont été signalés aux Etats-Unis avec des feuilles de *Pieris japonica*, en Corée avec des feuilles de *Rhododendron schlippenbachii* chez un enfant de 9 ans. Là encore les symptômes de l'intoxication aux grayanotoxines ont été retrouvés.

Le miel demeure la principale cause d'intoxication aux grayanotoxines. Des événements ont été signalés et décrits dans des publications dans plusieurs régions du monde mais il est probable qu'un nombre important de cas n'aient pas été signalés en raison de l'ignorance de l'existence de ces miels toxiques. Le tableau représenté en ANNEXE 3 reprend 17 cas d'intoxications au miel, décrites dans différentes régions du monde.

### 1. Régions touchées et origine du miel :

D'un point de vue historique, la Turquie et plus particulièrement les régions côtières de la Mer Noire sont les régions où l'on retrouve un nombre important de cas d'intoxications. Jusqu'en 2007, près de 120 cas ont été recensés en Turquie [123]. Les populations locales connaissent les propriétés de ces miels et l'utilisent comme remède. Le manque de connaissances sur ces miels entraîne tout de même des accidents [124], [125], [126].

Des miels fous sont également produits dans les régions montagneuses du Népal. Ils sont commercialisés dans les pays asiatiques. En Corée, ils ont été commercialisés et utilisés comme remède mais en 2005, l'importation de ces miels en provenance de l'Himalaya a été interdite [120]. 15 cas ont tout de même été signalés jusqu'en 2012 [120], [127].

Ces pays ne sont pas les seuls à avoir été touchés par ces cas d'intoxications. Des cas isolés sont décrits en Autriche [123], [128], aux États-Unis [105], sur l'île de la Réunion [111], à Hong-Kong [109]. Ces événements restent rares et peu connus du public. Les miels à l'origine des intoxications proviennent pour la plupart de particuliers. Dans les quelques cas

signalés en Europe, les miels incriminés proviennent exclusivement de Turquie [105]. Les intoxications dans les pays asiatiques sont provoquées par du miel provenant de l'Himalaya.

## 2. Origine botanique du miel

L'origine botanique des miels est rarement identifiée. Quelques études ont tout de même permis de mettre en évidence des grains de pollen dans le miel fou provenant de *Rhododendron ponticum* [126], [129]. Un miel contenant 83% de pollen de châtaignier et seulement 10% de rhododendron a également été décrit comme étant la cause d'une intoxication en Turquie [130]. Les publications précisant la nature des grayanotoxines sont peu fréquentes. Des grayanotoxines I, II et III ont été signalées dans du miel provenant de l'Himalaya et consommé par un patient à Hong-Kong [131].

## 3. Mode de consommation

Deux cas de figures sont retrouvés pour expliquer les raisons de l'exposition au miel. Tout d'abord, certains patients ont été exposés involontairement à ces miels. Ce sont principalement des événements observés dans les pays non producteurs habituels de miel toxique comme les Etats-Unis, les pays de l'Union Européenne... Sur l'île de la Réunion, 6 personnes ont été intoxiquées en mangeant des gaufres au miel provenant d'un apiculteur de l'île [111].

Ces miels sont également recherchés dans certains pays comme la Corée, la Turquie, car les populations locales lui ont attribué des propriétés thérapeutiques. Il est utilisé notamment en traitement pour les ulcères gastro duodénaux, l'arthrite, le diabète ou l'hypertension. Ces miels seraient également aphrodisiaques [100]. Un cas a été décrit chez un patient de Hong-Kong avec du miel en provenance du Népal. Cette personne a pris ce miel comme remède à raison de 3 à 5 ml pendant trois jours sans présenter de troubles. Le jour de son hospitalisation, il aurait ingéré près de 30 ml de miel [131]. En Turquie, un couple a été hospitalisé après la prise de miel de *Rhododendron ponticum* sur plusieurs jours. Ce miel leur avait été décrit comme un stimulant sexuel [126].

## 4. Age et sexe

En regardant le profil des patients hospitalisés, les hommes sont majoritairement touchés par ces intoxications. Sur 17 cas [Annexe 3], 83% sont des hommes. Cette remarque a également été faite dans la publication de Sohn et son équipe mais aucune explication n'a encore été apportée [120]. Toutes les tranches d'âges semblent concernées par les intoxications. Dans les données relevées, les patients ont entre 22 et 70 ans avec une

moyenne d'âge se rapprochant de 47 ans [132] mais d'autres études ont signalé des personnes allant de 10 à 93 ans [133]. Là encore, aucun lien n'a été fait entre l'âge des patients et les risques d'intoxication ni la gravité des symptômes.

## 5. Quantité de miel ingéré

Dans ces différents évènements signalés, bien que la quantité de miel soit généralement connue, la quantité exacte de grayanotoxines ingérées n'a pas pu être renseignée. En revanche il apparaît régulièrement que la gravité des symptômes est dose dépendante [120] et que les symptômes apparaissent pour des quantités de miel toxique ingérées de l'ordre 5 à 30g selon Gunduz et son équipe [105], et entre 20 et 200 g selon l'étude de Jansen et son équipe [100], mais ces quantités peuvent varier selon la concentration et le type de grayanotoxines retrouvés dans les miels ingérés.

Chez deux patients prenant le même miel pour ses effets aphrodisiaques, la prise d'une cuillère à café de miel a entraîné des sensations de vertige et une céphalée. Lorsqu'ils sont passés à une cuillère à soupe, les symptômes (bradycardie, hypotension...) se sont aggravés nécessitant leur hospitalisation [126].

Une observation similaire peut être faite sur un cas d'empoisonnement accidentel de 6 personnes sur l'île de la Réunion après avoir mangé des gaufres au miel. Les symptômes des personnes ayant mangé entre 5 et 15 g de miel étaient moins importants que chez les personnes en ayant consommé 30 g [100].

## B. Les symptômes d'une intoxication

### 1. Intoxications aiguës

La physiopathologie, les signes cliniques et l'évolution des empoisonnements aigus aux grayanotoxines sont bien documentés dans la littérature. Certains symptômes sont retrouvés dans pratiquement tous les cas alors que d'autres ne le sont que chez certains patients. Parmi les évènements les plus fréquents on retrouve :

- L'hypotension (pression artérielle systolique inférieure à 90mmHg) est retrouvée dans la très grande majorité des cas. Sur une étude de 66 patients, 100% des patients étaient en hypotension avec une pression systolique moyenne de 70mmHg [105].
- La bradycardie sinusale est fréquente chez les patients intoxiqués mais non constante. Sur 66 patients, 95% étaient en bradycardie avec un rythme cardiaque inférieur à 60 bat/min [105]. Les personnes ayant été moins exposées à la toxine ont un rythme cardiaque moins perturbé [100].

- Un bloc auriculo-ventriculaire du premier ou second degré,
- Syncope et étourdissement sont parfois la raison de la consultation des patients aux Urgences [130]. Ces troubles sont fréquents lors des intoxications. Elles peuvent être une manifestation clinique de la bradycardie sinusale.
- Autres symptômes : nausée, vomissement, hypersalivation et trouble de la vision, céphalées, fourmillements des extrémités, faiblesse musculaire et évanouissements, sueurs...

Certains patients ont présenté des troubles moins fréquents comme une dépression respiratoire [125] ou un infarctus du myocarde en raison du ralentissement de la circulation, et nécessitant l'implantation d'un stent [129]. Un cas de fibrillation auriculaire a été signalé chez un homme de 36 ans en Turquie [124].

Il est apparu dans une étude sur des souris que l'administration de miel contenant des grayanotoxines entraîne une diminution de la glycémie et des lipides [95].

## 2. Intoxications chroniques

Les résultats d'études sur les cas d'intoxication chronique aux miels à grayanotoxines sont plus rares. Il semblerait cependant selon l'étude menée par Aliyev et al. en 2009 que les personnes consommant du miel de ces régions sur une période d'au moins 3 mois présentent des troubles de conduction auriculo-ventriculaire avec des complexes QRS étroits sur l'électrocardiogramme. Après l'arrêt de la consommation de ce miel, la symptomatologie et les résultats de l'électrocardiogramme se sont rapidement améliorés. Après 1 et 3 mois de suivi, des analyses par un Holter sur 24h ne révèlent aucune anomalie [134]. Dans les cas de consommation chronique de miel fou, il semble y avoir un phénomène de désensibilisation limitant les symptômes observés lors des intoxications aiguës. En revanche, la plupart des patients se plaignent de faiblesse généralisée [134].

### C. Temps d'apparition des premiers symptômes

Les premiers symptômes apparaissent entre 10 minutes et 3h après la l'exposition au miel toxique [132], et parfois même 8 heures après [130]. Les données de la littérature ne permettent pas de faire un lien entre la quantité de miel ingéré et le temps d'apparition des premiers symptômes. Ces études ne nous indiquent pas la quantité ni la nature des grayanotoxines présentes dans les miels.

## D. Diagnostic et prise en charge clinique

Le tableau clinique et l'élimination des autres causes pouvant entraîner les troubles cardiaques et l'hypotension chez un patient permettent généralement de donner le diagnostic d'une intoxication aux grayanotoxines [131]. Celui-ci peut être confirmé par un questionnement du patient sur l'apport de miel dans les heures qui ont précédé les premiers symptômes. Dans certains cas, la présence de pollen des plantes incriminées peut être confirmée par étude palynologique des échantillons de miel [130].

La prise en charge d'une forme légère d'intoxication (étourdissement, transpiration, hyper salivation, nausées, vomissement...) ne nécessite généralement qu'un suivi de l'évolution du patient.

Les formes sévères, avec complication cardiaque, bloc auriculo-ventriculaire complet, impliquent une prise en charge rapide et un traitement par administration par voie intraveineuse de sulfate d'atropine de 0,5 à 2 mg et d'une solution saline par perfusion de 100 ml/h. L'électrocardiogramme permet de suivre l'évolution du rythme cardiaque. En cas d'asystolie ou de bloc auriculo ventriculaire complet, une stimulation cardiaque temporaire peut être nécessaire.

En l'absence de traitement adapté, l'intoxication au miel fou peut être mortelle, mais au 20<sup>ème</sup> siècle, aucun cas mortel n'a été rapporté dans la littérature [105].

La disparition des symptômes est généralement rapide, entre 24 et 48 heures après le début de l'intoxication. En revanche la récupération totale peut prendre plusieurs jours [105].

## E. Mécanisme de la toxicité

Le mécanisme d'action des grayanotoxines chez l'homme n'est pas encore totalement élucidé mais des éléments permettent de mieux comprendre certains événements.

Une partie de ces effets sont induits par le système nerveux parasympathique à la suite de la stimulation des récepteurs M2 muscariniques [133]. La stimulation du système nerveux parasympathique agit entre autres sur la diminution du rythme cardiaque. Il a été montré chez des souris que l'injection d'une petite dose intracérébrale de grayanotoxine avait le même effet bradycardisant que l'injection d'une dose plus importante en intrapéritonéal. Cette étude a permis de mettre en évidence la participation du système nerveux parasympathique dans la toxicité de ces toxines [105]. Selon une étude de Onat et son équipe en 1991, les effets sur la fréquence cardiaque d'un antagoniste des récepteurs muscariniques M2 sélectifs (l'AF-DX 116) sont inhibés par les grayanotoxines chez la souris [135]. De même, l'efficacité de l'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques) dans la

prise en charge des intoxications confirme l'effet agoniste des grayanotoxines sur les récepteurs muscariniques M2 [134].

Il a également été montré chez le rat que la stimulation des récepteurs M2 muscariniques après l'administration par voie orale de miel toxique a entraîné une augmentation de la sécrétion de l'insuline par les cellules alpha des îlots de Langerhans du pancréas [133]. Cet effet hypoglycémiant n'a toutefois pas été observé chez l'homme lors d'une étude sur 46 patients hospitalisés pour une intoxication aux grayanotoxines. La glycémie moyenne chez ces patients était de 116,7 mg/dl (+ ou - 49.9). La glycémie était normale pour 28 cas soit 60% et élevée pour 18 cas soit 39% des cas. Aucun patient en hypoglycémie n'a été signalé [133].

Outre leur action sur les récepteurs muscariniques, les grayanotoxines ciblent les canaux sodiques voltage dépendants des cellules excitables et en particulier les cardiomyocytes. [100]. L'interaction entre les grayanotoxines et les canaux sodiques se déroule en trois étapes. Dans un premier temps, la toxine se fixe sur les canaux sodiques voltage dépendants dans son état ouvert. Cette interaction permet en second temps de garder le canal sodique sous sa forme ouverte, ce qui entraîne ensuite le maintien du potentiel d'action jusqu'à l'hyperpolarisation de la cellule excitable [105]. Cet effet sur les canaux sodiques voltage dépendants des cardiomyocytes pourrait expliquer les troubles du rythme et en particulier les blocs auriculo-ventriculaires constatés chez certains patients mais cela reste encore à démontrer [100]. Aliyev et son équipe précisent dans la publication que les effets au niveau des cellules cardiaques dépendaient du type de grayanotoxine considéré. Les grayanotoxines II affectent principalement le nœud sinusal alors que les grayanotoxines I agissent à la fois sur le nœud sinusal et sur la conduction auriculo-ventriculaire [134].

## F. Relation structure / activité

Plusieurs groupes de recherche ont étudié les relations entre les structures des grayanoides et leur activité sur des animaux mais aussi sur des organes. Certaines fonctions semblent indispensables pour entraîner des effets toxiques alors que la présence ou l'absence d'autres groupements diminuent la toxicité.

Masutani et son équipe ont étudié l'activité de 34 grayanoides en se basant sur la génération d'un potentiel d'action et le maintien d'une hyperpolarisation après l'action de la toxine sur le muscle squelettique de grenouille [136]. L'activité biologique des grayanoides s'est révélée être en grande partie dépendante de la stéréochimie et du pouvoir hydrophobe de la molécule. Parmi les groupements essentiels de la molécule, on retrouve :

- Un groupement hydroxyle en configuration  $\beta$  sur le carbone 3, ou une fonction  $2\beta$ - $3\beta$  époxyde,

- Un groupement hydroxyle en configuration  $\beta$  sur le carbone 5,
- Un groupement hydroxyle en configuration  $\beta$  sur le carbone 6,
- Un groupement méthyle en configuration  $\beta$  sur le carbone 10.

Dans cette même étude, les auteurs précisent que l'activité biologique optimale est atteinte avec 5 groupements hydroxyles sur la molécule [136].

D'autres travaux effectués sur les axones géants de calamar à partir de 54 grayanoides ont permis de définir des facteurs influençant l'activité de la cellule excitable. Ces facteurs correspondent à la capacité de former des interactions électrostatiques avec le récepteur et de former des liaisons hydrogène entre les groupements du noyau D de la grayanoïde et certains sites des canaux sodiques. L'équilibre entre les groupements hydrophobes et hydrophiles a également une influence sur l'activité de la toxine [137]. 23 autres grayanoides ont été testés sur les axones de calamar. Cette étude s'est basée sur l'effet des groupements positionnés sur le cycle D du noyau grayanane. Ils ont constaté que la présence d'un  $\beta$  ou d'un  $\alpha$  hydroxyle, ou d'un groupement carbonyle sur les carbones 15 ou 16 diminue la toxicité des grayanoides. Les auteurs de cette étude en ont déduit que les domaines du canal sodique positionnés au niveau des carbones 15 et 16 portent une charge positive [138].

Hikino et son équipe ont étudié la relation entre la toxicité aiguë de 36 grayanoides et leurs structures. Ils ont ainsi défini pour ces toxines une dose létale (DL50) après injection intrapéritonéale chez des souris [107]. Dans cette étude, les auteurs ont pris comme toxine de référence la grayanotoxine III car elle possède la structure de base des grayananes. Chez la souris, la grayanotoxine III a une DL50 de 0,84 mg/kg. Seuls 6 autres grayanotoxines dans cette étude ont une DL 50 inférieure à la grayanotoxine III et présentent donc une toxicité plus grande.

Cette étude donne les mêmes résultats concernant les groupements contribuant à la toxicité des grayanotoxines que dans l'étude publiée par Masutani et son équipe. Les groupements  $\beta$ 3-OH ou 2 $\beta$ -3 $\beta$ époxyde, le 5  $\beta$ -OH et le 6 $\beta$ -OH interviennent dans la toxicité aiguë de la molécule.

Actuellement, seules les grayanotoxines I, II et III ont été identifiées dans le miel responsable des intoxications [94], [121]. Les grayanotoxines I et III font partie des 10 grayananes les plus toxiques dans cette étude avec une DL50 de 1,31 mg/kg et de 0,84 mg/kg respectivement. La grayanotoxine II est moins toxique sur les souris avec une DL50 de 26,2 mg/kg [107]. Les différences entre ces trois structures sont :

- une insaturation entre carbone 10 et 20 sur la grayanotoxine II,
- une estérification par un acide acétique sur le carbone 14 pour la grayanotoxine I.

Les grayanotoxines I et III disposent donc des éléments nécessaires pour induire une toxicité aiguë chez la souris en agissant sur les domaines spécifiques des canaux sodiques entraînant leur hyperactivation.

## **V. Conclusion**

Les miels provenant du nectar d'un nombre limité de plantes de la famille des *Ericaceae* renferment des grayanotoxines. Ces métabolites sont responsables des symptômes observés lors des intoxications après une consommation de 15g de miel (pour les valeurs les plus basses données dans la littérature). Actuellement, seules les grayanotoxines I, II et III sont identifiées dans ces miels mais aucune donnée quantitative de ces toxines n'a été apportée dans les différents cas.

Ces miels restent rares et sont essentiellement produits dans les régions côtières de la Mer Noire en Turquie ou dans les montagnes de l'Himalaya. Les risques de retrouver ces miels dans les commerces sont limités. Quelques cas sont tout de même retrouvés hors de ces pays. Il est donc intéressant de connaître l'existence de ces « miels fous » pour améliorer la prise en charge du patient.

# Conclusion générale

---

Le miel est un produit très apprécié des hommes mais aussi une source intéressante de remèdes. Ses propriétés dépendent en partie des métabolites secondaires biosynthétisés par les plantes d'où provient le nectar.

Si les miels peuvent contenir des substances naturelles bénéfiques pour l'homme, elles peuvent également renfermer des substances toxiques. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les grayanotoxines en sont deux exemples. Ces deux toxines, bien que présentes dans quelques miels, sont bien différentes l'une de l'autre.

- D'une part par leur origine botanique et leur distribution géographique :

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont retrouvés dans plusieurs grandes familles botaniques. Ces plantes représentent près de 6000 espèces réparties sur pratiquement tous les territoires. Les miels dérivant de ces plantes sont également retrouvés dans de nombreuses régions du monde.

Les grayanotoxines sont quant à elles retrouvées dans certaines espèces de la famille des Ericaceae. Seules cinq espèces sont identifiées comme étant une source de miel toxique, et les principales origines de ces miels sont localisées dans deux régions, la Turquie et l'Himalaya.

- D'autre part sur le mode d'exposition

Le miel n'est pas la principale cause des intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. Les doses retrouvées dans les miels du commerce (**1 µg/kg de miel**) sont inférieures aux doses toxiques (**15 µg/kg/jour**) pouvant entraîner une HVOD. En revanche, les informations sont encore insuffisantes pour déterminer s'il existe un réel risque concernant la génotoxicité. Ces miels peuvent se trouver dans le commerce mais les concentrations mesurées dans les études sont suffisamment faibles pour ne pas dépasser le seuil de **0,007 µg/kg/jour** défini par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA).

Le miel est en revanche la principale cause d'exposition et d'intoxication aux grayanotoxines. Le mode de consommation est différent car ces miels sont

utilisés comme remède bien que leur toxicité soit connue. Quelques cas d'intoxications accidentelles sont à signaler. Le risque d'être exposé à ces miels pour la population est très faible car ils sont essentiellement produits dans des zones restreintes et en faible quantité. Ces miels sont également interdits à l'importation dans certains pays.

- Et enfin sur leur toxicité.

Les effets toxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques se manifestent principalement par des troubles hépatiques avec le syndrome véno-occlusif du foie. Les premiers symptômes n'apparaissent généralement que quelques semaines à plusieurs mois après le début de l'exposition. En revanche, aucun évènement indésirable n'a été signalé à la suite de la consommation de miel.

Les signes d'une intoxication aux grayanotoxines apparaissent dans les heures qui suivent l'exposition. Elles se caractérisent le plus fréquemment par une bradycardie sinusale et de l'hypotension. L'administration de 0,5 à 2 mg d'atropine permet de rétablir l'état du patient dans les 48h après le début de l'intoxication. Au 20<sup>ème</sup> siècle, aucun décès n'a été déclaré.

Ces deux métabolites secondaires sont tous les deux toxiques pour l'homme mais les risques restent limités pour les consommateurs d'une part parce que les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel sont faibles, et d'autre part parce que les miels de grayanotoxine sont rares et non commercialisés sur le marché. Des études à long terme sont nécessaires pour évaluer les effets génotoxiques des alcaloïdes sur l'homme et une meilleure sensibilisation des populations locales sur les miels fous permettrait de limiter les risques d'intoxication.

## Bibliographie

- [1] P. Marchenay, L. Bérard - *L'homme, l'abeille et le miel* – de Borée, 2007
- [2] Laurent Olivier - *Les bienfaits du miel* - Paris, Editions de Vecchi S.A., 2005
- [3] Claude Lévis-Strauss, - *Mythologiques, Du miel aux cendres* - Paris, Librairie Plon, 1962
- [4] Recherche web « *coran, et guérison* » novembre 2013 ,  
[http://quran-m.com/firas/france/index.php?option=com\\_content&view=article&id=191:le-miel-entre-le-coran-et-la-science&catid=43:en-medecine&Itemid=95](http://quran-m.com/firas/france/index.php?option=com_content&view=article&id=191:le-miel-entre-le-coran-et-la-science&catid=43:en-medecine&Itemid=95)
- [5] Larousse Encyclopédique en couleurs ; Miel, 1979 ; 14, 6110-6111
- [6] Eon Nolwenn – *De la fleur à l'abeille, de l'abeille au miel, du miel à l'homme*- Thèse de docteur en Pharmacie, Université de Nantes, 2011
- [7] Tautz Jurgen - *l'étonnante Abeille* - De Boeck & Larcier s.a., 2009
- [8] Armin Spürgin - *Guide de l'abeille* - Paris, Delachaux et Niestlé S.A., 2010
- [9] Vannier Paul, - *L'ABCdaire du Miel* – Editions Flammarion, 1998
- [10] Fournier Robert – *L'ABCdaire de l'Apithérapie* – Edition Grancher, Paris , 2009
- [11] V. Andrieux - *Apis mellifera, Données actuelles sur les risques phytosanitaires et biologiques* - Thèse de docteur en pharmacie, Faculté de Chatenay-Malabry, 2009
- [13] Recherche web « *anatomie et biologie générale de l'abeille* » novembre 2013  
<http://st-ambroise.be/Consultation/anatomie.pdf>
- [14] Jean Louveaux - *Recherche sur la récolte du pollen par les abeilles (Apis mellifica L.)*- thèse de science, faculté des sciences de l'Université de Paris, 1958
- [15] Bogdanov S. Jurendic T., Sieber R., Gallmann P. – *Honey for Nutrition and Health : A review.* – J Am Coll Nutr., 2008, 27 :677-689
- [16] Blanc M., - *Propriétés et usage médicale des produits de la ruche* - Thèse de docteur en Pharmacie à l'université de Limoge, 2010
- [17] Seeley T.D., - *Honeybee Ecology* – Princeton University Press. 1985, pp202
- [18] Heil Martin, - *Nectar : generation, regulation, and ecological functions* – Review, Cell press, vol. 16, 2011
- [19] Nepi M., Aderkas P., Wagner R., - *Nectar and pollination drops: how different are they?* – Annals of botany 104: 205-219, 2009

- [20] Zha H.G., Flowers V.L, Yang M., - *Acidic  $\alpha$ -galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*)* – *Annals of Botany* 2012, 109: 735-745
- [21] Dumas C., - *La fleur : données physiologiques et rappels morphologiques concernant la fleur et l'inflorescence – Pollinisation et productions végétales* – ouvrage collectif ; INRA Paris, 1984
- [22] Zandonella Pierre, Dumas C., Gaude T., - *Sécrétions et biologie florale* – *Apidologie*, 1981, 12 ,383-396
- [23] Nicolson Susan W., Thornburg Robert W. - *Nectaries and Nectar* – *Srpinger*, 2007, 215-263
- [24] Baker H.G – *Non sugar chemical constituents of nectar* – *Apidologie*, 8, 349-356, 1977
- [25] Seo P.J., Wielsch N., Kessler D., - Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuate* accessions – *BMC Plant Biology*, 2013, 13:101
- [26] Masters, A.R. - *Dual role of pyrrolizidine alkaloids in nectar* - *Journal of Chemical Ecology*, 1991, 17, 195–205
- [27] Cousin N. – *Les trésors de la ruche : miel, gelé royale, pollen...*– France, Rustica : 2009
- [28] Goudarzi R., - *Mielicament, la place du miel dans l'arsenal thérapeutique* - Thèse de docteur en pharmacie, faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry ; 2011
- [29] Jerkovic I., Hegic G., Marijanovic Z., - Organic Extractives from *Mentha* spp. Honey and the bee-stomach: methyl syringate, vomifoliol, terpenediol I, hotrienol and other compounds – *Molecules* 2010, 15, 2911-2924
- [30] Grembecka M., Szefer P., - Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques – *Environ Monit Assess*, 2013, 185:4033-4047
- [31] Fallico B., Arena E., Zappla M., Vezera A.- *Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys* - *Food Chem.* 2004, 85 :305-313
- [32] Kowalski S., Lukasiewicz M., Duda-Chodak A., - *5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) Heat induced formation, occurrence in food and biotransformation, a review* – *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2013 Vol 63, No 4 – 207-225
- [33] Page web : Décret n°2003-587 du 30 juin 2003 pris pour l'application de l'article L.214-1 du code de la consommation en ce qui concerne le miel, consulté le 8 octobre 2013, <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/Etiquetage-du-miel>

- [34] Ruoff K., Luginbuhl W., - *Authentication of botanical origine of honey by near-infrared spectroscopy* – J. Agric. Food Chem., 2006, 23, 273-276
- [35] Commission du Codex Alimentarius, - *Codex Norme pour le Miel* – Codex Stan 12-1981, revise en 2001
- [36] Directive 2001/110/CE du conseil du 20 décembre 2001 relative au miel, Journal Officiel des Communautés européennes, consulté de 10 Octobre 2013, [http://europa.eu/legislation\\_summaries/consumers/product\\_labelling\\_and\\_packaging/l21124a\\_fr.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/l21124a_fr.htm)
- [37] Food and Agriculture Organisation of the United Nations FAO, World health Organization WHO – Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on contaminants in foods – CF/7 INF/1 March 2013
- [38] European Food Safety Authority EFSA – *Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed* – EFSA journal 2011; 9(11):2406.
- [39] CARI, L'apiculture wallonne et bruxelloise – *Normes internationales* – site internet consulté le 4/01/2014, <http://www.ari.be/article/normes-internationales/>
- [40] National Honey Board – *honey technical information* – consulté en octobre 2013, : <http://www.honey.com/foodservice/honey-in-foods-beverages-technical-data/honeys-functional-properties/>
- [41] Antony S., Rieck L.R., Acton J.C., - *Effect of dry Honey on the shelf life of packaged Turkey Slices* – Poultry Science, 2006, 85:1811-1820
- [42] Descottes B., - Miel, plaie et cicatrisation - consulté en octobre 2013, site web : <http://www.francoistournay.fr/index.php/huiles-essentielles/item/167-miel-plaie-et-cicatrisation/>
- [43] Noori S.A, Khelod S., Ahmad A.A., - Honey for wound healing, ulcers, and burns, data supporting its use in clinical practice – The Scientific World Journal, 2011, 11, 766-787
- [44] Adjibola A., Chamunorwa J.P., Erlwanger K., - Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth – Nutrition&Metabolism, 2012
- [45] Moniruzzaman M., Khalil I., Sulaiman S.A., - *Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by Apis cerana, Apis dorsata and Apis mellifera* – Complementary & Aternative Medicine, 2013, 13:43
- [46] FranceAgriMer, Etablissement National des Produits de l'Agriculture et de la Mer - Filières apicole – consulté en novembre 2013, site web : <http://www.franceagrimer.fr/Autres-filieres/Apiculture>

- [47] Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt - Plan de développement durable de l'apiculture – les chiffres clés de l'apiculture – Consulté en novembre 2013, site web <http://agriculture.gouv.fr/Les-chiffres-cles-de-l-apiculture>
- [48] Page web : recherche peinture rupestre Bicorp, Septembre 2014 [http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.la-ruche-sauvage.com%2Fapi%2Fhist-arana.jpeg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.la-ruche-sauvage.com%2Fapi%2Fapihist.php&h=282&w=187&tbnid=uCiX2w-r3H\\_9JM%3A&zoom=1&docid=qTF-t8zIA24ZDM&ei=x](http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.la-ruche-sauvage.com%2Fapi%2Fhist-arana.jpeg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.la-ruche-sauvage.com%2Fapi%2Fapihist.php&h=282&w=187&tbnid=uCiX2w-r3H_9JM%3A&zoom=1&docid=qTF-t8zIA24ZDM&ei=x)
- [49] Fu P. P., Yang Y.C, Xia Q. - *Pyrrrolizidine Alkaloids, Tumorigenic compoments in Chinese herbal medicines and dietary supplements* – Journal of food Drug Analysis, Vol. 10 No 4, 2002 ; 198-211
- [50] Bruneton J., - *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* - 3<sup>ème</sup> édition (2008)
- [51] EFSA European Food Safety Authority - *Scientific Opinion on Pyrrrolizidinique alkaloides in food and feed* - Journal 2011; 9(11) :2406
- [52] BfR – *Pyrrrolizidine alkaloids in herbal teas and teas* – BfR Opinion No. 018/2013
- [53] Kempf M., - *Entwcklung und Anwendung von Methoden zur Erfassung von Pyrrrolizidinalkaloiden in Honig und Pollen* – Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Juluis-Maximilians-Universitat Würzburg; 2009
- [54] Wiedenfeld H. – *Plants containing Pyrrrolizidine Alkaloids – toxicity and Problems* – Food Additives and Contaminants 2011 ; 282-292
- [55] Boppré M., - *The ecological context of pyrrrolizidine alkaloids in food, feed and forage : an overview.* – Food Additives and Contaminants, 2011, vol.28, 260-281
- [56] Anke S., Niemüller D., Moll S., Hansch R., - *Polyphyletic origin of pyrrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase.* – Plant Physiology, 2004, Vol. 136, 4037-4047
- [57] Reem J. Abdualmjid, Consolato S., - *Hepatotoxic Botanicals, An evidence-based systematic reviw* – J.Pharm Pharmaceut. Sci. 2013, 13 ; 379-404
- [58] Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires Comité du Codex sur les cotaminants dans les aliments – *Document de travail sur les Alcaloïdes de Pyrrrolizidine* – 5<sup>ème</sup> session, 2011, CX/CF 11/5/14
- [59] Dr Werner Von der Ohe – *Pyrrrolidin-Alkaloide : Honig, Pollen, Bienen* – Laves, Insitut für Bienenkunde Celle, 2012
- [60] Michel R., Raezke K.-P., - *Pyrrrolizidine Alkaloids in honey, brief overview regarding the occurrence* – Intertek Food Services GmbH, 2009

- [61] Dreger M., Stanislawski M., Krajewska-Patan A., - *Pyrrolizidine alkaloids, chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage* – Herba Polonica, vol.55 No 4 ; 2009
- [62] Hartmann T., Toppel G. - *Senecionine N-Oxyde, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of senecio vulgaris* - Phytochemistry; 1986; Vol. 26, N°6, 1639-1643
- [63] Roeder E., - *Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids* – Pharmazeutisches 1995, 50: 83-98
- [64] Hartmann T., Ehmke A., Eilert U., Borstel K., - *Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in Senecio vulgaris L.* – Planta 1989, 177 : 98-107
- [65] Anke S., Niemüller D., Moll S., Hansch R., - *Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase.* – Plant Physiology, 2004, Vol. 136, 4037-4047
- [66] Cheng D., Kirk H., Mulder P.P.J., Vrieling K., - *Pyrrolizidine alkaloid variation in shoots and roots of segregating hybrids between Jacobaea vulgaris and Jacobaea aquatica* – New Phytologist 2011, 192: 1010-1023
- [67] Joosten L., Cheng D., Mulder Patrick P.J., Vrieling K., - *The genotype dependent presence of pyrrolizidine alkaloids as tertiary amine in Jacobaea vulgaris* – Phytochemistry, 2011, 72:214-222
- [68] Hol W. H. G., - *The effect of nutrients on pyrrolizidine alkaloids in Senecio plants and their interactions with herbivores and pathogens* – Phytochem Rev 2011, 10 : 119-126
- [69] Masters A. R., - *Dual role of Pyrrolizidine alkaloids in nectar* – Journal of Chemical Ecology ; 1991, Vol.17 N°1
- [70] Macel M., Vrieling K., - *Pyrrolizidine alkaloids as oviposition stimulants for the Cinnabar Moth, Tytia jacobaea* – Journal of Chemical Ecology, 2003, Vol 29, N°6
- [71] Ibanez S., Gallet C., - *Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks* – Toxins 2012, 4, 228-243
- [72] Reinhard A., Janker M., Von der Ohe W., Kempf M., Theuring C., Hartmann T., - *Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (Apis mellifera)* – J. Chem. Ecol. 2009, 35:1086-95
- [73] Biller A., Boppré M., Witte L., Hartmann T., - *Pyrrolizidine alkaloids in Chromolaena odorata ; Chemical and chemoecological aspects* – Phytochemistry, 1994, vol. 35, 615-619

- [74] Kempf M., Heil S., - *Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products* – Molecular Nutrition & Food Research, 2010, vol. 54, 292-300
- [75] Kempf M., Wittig M., Reinhard A., Von der Ohe K., - *Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods* – Food Additives and Contaminants, 2011, vol 28; 332-347
- [76] Deinzer M.L., Thomson P.A., - *Pyrrolizidine Alkaloids: their occurrence in honey from Tansy Ragwort ( Senecio jacobaea L.)* – Science, 1977, vol 195
- [77] Kemps M., Beuerle T., Bühringer M., Denner M., Trost D., - *Pyrrolizidine alkaloids in honey : risk analysis by gas chromatography mass spectrometry* – Mol. Nutri. Food Res. 2008, 52, 1193-1200
- [78] Culvenor C.C.J., Edgar J.A., - *Pyrrolizidine alkaloids in honey from Echium plantagineum L.* – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29, 958
- [79] Roeder E., Wiedenfeld H., - *Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the Traditional Indian Medicine, Including Ayurveda* – Pharmazie 2013, 68: 83-92
- [80] Roeder E., - *Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids* – Pharmazie 2000,
- [81] Roeder E., Wiedenfeld H., - *Pyrrolizidine alkaloids in plants used in the traditional medicine of Madagascar and the Mascarene islands* – Pharmazie 2011, 66: 637-347
- [82] Chauvin P., Dillon J-C., Moren A. – *Epidémie d'intoxication alimentaire à l'héliotrope, Tadjikistan, novembre 1992 – mars 1993.* – Cahiers Santé 1994 ; 4 :263-8
- [83] Fu P.P., Xia Q., Lin G., Chou M.W., - *Pyrrolizidine Alkaloids, Gentotoxicity, metabolism, enzymes, metabolic activation, and mechanisms.* – Durg metabolism reviews, vol. 36, No. 1. 2004
- [84] Chen T., Mei N., Fu, P.P., - *Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids* – Journal of Applied Toxicology, 2010, 30:183-196
- [85] Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E.B., Seawright A.A., - *Pyrrolizidine alkaloids in humain diet* – Mutation Research 1999, 53-67
- [86] Kakar F., Akbarian Z., Leslie T., Mustafa M.L., Waston J., - *An outbreak of hepatic Venooclusive Disease in western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with Pyrrolizidine Alkaloids.* – Journal of toxicology, 2010
- [87] Kuhnowski F., Camps S., Terris B., Sogni P., - *Syndrome d'obstruction sinusoidale (maladie veino-occlusive)* – Réanimation, 2007, 16, 626-631
- [88] Mattocks, A.R. - *Chemisty and toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids* - Academic Press, London(1986)

[89] European Medicines Agency – Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids – EMA/HMPC/893108/2011.

[90] Zuckerman M., Steenkamp V., Stewart M.J., - *Hepatic veno-occlusive disease as a result of a traditional remedy: confirmation of toxic pyrrolizidine alkaloids as the cause, using an in vitro technique* – J.Clin. Pathol. 2002, 55:676-679

[91] European Medicines Agency – Résumé de l'EPAR à l'intention du public : Defitelio, defibrotide – EMA/473987/ 2013 Page web : [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002393/WC500153153.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR__Summary_for_the_public/human/002393/WC500153153.pdf)

[92] Xia Q., Zhao Y., Von Tungeln L.S., Doerge D.R., Lin G., Cai L., Fu P.P., - *Pyrrolizidine alkaloid derived DNA adducts as a common biological biomarker of pyrrolizidine induced tumorigenicity* – Chemical Research in Toxicology, 2013, 26, 1384-1396

[93] Commission du Codex Alimentarius – Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Comité du Codex sur les contaminants dans les aliments - Document de travail sur les Alcaloïdes pyrrolizidiniques – CX/CF 11/5/14 ; 2011

[94] Wong J., Youde E., Dickinson B., Hale M., - Report of the rhododendron feasibility study – School of Agricultural and Forest Sciences, University of Wales, 2002

[95] Koca I., Koca A. F., - *Poisoning by mad honey: a brief review* – Food and toxicology 2007, 1315-1318

[96] Gschweidl B., - *Vergleichend phytochemische Analysen der Exsudate ausgewählter Ericaceae mit besonderer Berücksichtigung von Rhododendron ferrugineum L.* - Magistra der Naturwissenschaften, Vienne, 2010

[97] Poupon Erwan – *Biosynthèse et synthèse biomimétiques, Diversité des substances naturelles* – Cour Magistral Université Paris Sud, 2012-2013, chap. 4, 35-53

[98] Li Y., Liu Y.B., Yu S.S., - *Grayanoids from the Ericaceae family : structures, bibliogical activities and mechanism of action* – Phytochem Rev, 2013, 12 :305-325

[99] Terai T., Osakabe K., Katai M., Sakaguchi K.I., Narama I., - *Preparation of 9-hydroxy Grayanotoxin Derivatives and their acute toxicity in mice* – Chem. Pharm. Bull. 2003, 51(3) 351-353

[100] Jansen S.A., Kleerekooper I., - *Grayanotoxin poisoning : Mad honey disease and beyond* – Cardiovasc Toxicol, 2012 ; 12 :208-215

[101] Kinghorn A. D., Jawad F. H., Doorenbos N. J. – *Structure activity relationship of grayanotoxin derivatices using a tetrodotoxin-antagonized spasmodic response of brine shrimp larvae* – Toxicon 1978, vol 16; 227-234

- [102] Burrows G. E., Tyrl R. J., - *Toxic Plants of North America* – Wiley-Blackwell, Second Edition ; page web le 02/08/2014 : <http://books.google.fr/books?id=dnemIU6mj-EC&pg=PA437&lpg=PA437&dq=grayanotoxin+chemical+structure&source=bl&ots=VJcX6zlnUw&sig=8zlwMmHK026PqBzK41zcCOREsx8&hl=fr&sa=X&ei=-V7uU9LaB-Sh0QXx0gE&ved=0CEsQ6AEwBA#v=onepage&q=grayanotoxin%20chemical%20structure&f=false>
- [103] White J. W., Riethof M. L. – *The composition of honey III. Detection of acetylandromedol in toxic honeys* – Archives of biochemistry and biophysics, 1959, 79; 165-167
- [104] Genier G., - *Le pollen des Ericaceae dans les miels Français* – Ann. Abeille, 1966, 9 :271-321
- [105] Gunduz A., Turedi S., Russell R.M., Ayaz F. A., - Clinical review of grayanotoxine mad honey poisoning past and present – Clinical Toxicology, 2008, 46; 437-442
- [106] Katai M., Terai T., Katakawa J. – *Stereochemistry and full assignments of <sup>1</sup>H-and <sup>13</sup>C-NMR spectra of 1,5-seco-grayanotoxin* – Memoirs of the Osaka Insitute of Technology, 2006, N°1, 1-6
- [107] Hikino H., Ohta T., Ogura M., Ohizumi Y., - *Structure-Activity relationship of Ericaceous Toxins on Acute Toxicity in Mice* – Toxicology and applied pharmacology, 1976, 35, 303-310
- [108] Zhang H.P., Wang L.Q., Qin G.W., - *Grayanane diterpenoids from the leaves of Craiobiodendron yunnanense* – Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13, 5289-5298
- [109] Chen S.N., Bao G.H., Wang L.Q., Qin G.W., - *Two new compounds from the flowers of Rhododendron molle* – Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(5): 0525-0527
- [110] Alder L. S., -*The ecological significance of toxic nectar* – Oikos, 2000, 91 : 409-420
- [111] EPIREM – bulletin épidémiologique de la Réunion et Mayotte – «3 Juillet 2008
- [112] Kurtoglu A.B., Yavuz R., Evrendilek G. A., - *Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from Rhododendron ponticum nectar* – Food Chemistry, 2014 ; 47-52
- [113] Muller S., - *Plantes invasives en France – Patrimoines naturels*, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, 2004
- [114] Popescu R., Kopp B., -*The genus Rhododendron : An ethnopharmacological and toxicological review* – Journal of Ethnopharmacology , 2013, 147; 42-62
- [115] Birch Arthur J. – *Biosynthetic pathways in chemical phylogeny* – Pure and Applied Chemistry, 1973, 33(1): 17-38

- [116] Li Y., Liu Y.B., Yu S.S., - *Grayanoids from the Ericaceae family : structures, bibliogical activities and mechanism of action* – Phytochem Rev, 2013, 12 :305-325
- [117] Klocke J. A., Hu M. Y., Chiu S.F., Kubo I., - *Grayanotoxine diterpene insect antifeedants and insecticides from Rhododendron molle* – Phytochemistry, 1991; vol 30. N° 6, 1797-1800
- [118] Tiedeken E.J. , Stout J. S., Stevenson P. C., Wright G. A., - *Bumblebees are not deterred by ecologically relevant concentrations of nectar toxins* – The journal of Experimental Biology 2014, 217; 1620-1625
- [119] Bogdanov S., Bieri K., Kilchenmann V., Gallmann P., Dillier F. X., - *Le miel de Rhododendron, une spécialité rare de nos montagnes* – Centre Suisse de Recherche apicoles ALP, CH-3003 Berne, 2006
- [120] Sohn C.H., Seo D.W., Ryoo S.M., Lee J. H., - *Clinical characteristics and outcomes of patients with grayanotoxine poisoning after the ingestion of mad honey from Nepal* – Intern Energ. Med. 2014, 9:207-211
- [121] Scott P.M., Coldwell B.B., Wiberg G.S., - *Grayanotoxins, occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice* – Fd Cosmet. Toxicol. , 1971, vol.9 : 179-184
- [122] Xenophon – Expedition de Cyrus et retraite des dix mille – Traduction française, Eugène Talbot ; site internet : visité le 18/08/2014 <http://remacle.org/bloodwolf/historiens/xenophon/retraite4.htm>
- [123] Weiss T.W., Smetana P., Nurnberg M., Huber K. , - *The Honey man, Second degree heart block after honey intoxication* – International Journal of Cardiology, 2010, 142 : 6-7
- [124] Bayral N.A., Keles T., Durmaz T., Dogan S., Bozkurt E., - *A rare cause of atrial fibrillation: mad honey intoxication* - The Journal of Emergency Medicine, 2012, Vol. 43, 6:389-391
- [125] Oguzturk O.H.,Citci O., Turtay M.G., Yumrutepe S., -*Complete atrioventricular block caused by mad honey intoxication* - European Review for Medical and Pharmacological Siences, 2012, 16:1748-1750
- [126] Yarlioglues M., Akpek M., Ardic I., Elcik D., Sahin O., - *Mad honey sexual activity and acute inferior myocardial infarctions in a Married couple* - Texas hear Institute Journal 2011, 3:577-580
- [127] Choo Y.K., Kang H.Y., Lim S.H., - *Cardiac problems in Mad honey intoxication* - Circulation Journal 2008, vol 72: 1210-1211
- [128] Eller P., Hohegger K., Tancevski I., - *Sweet heart block* - Circulation, 2008, 118-319
- [129] Sumerkan M.C., Agirbasli M., Altundag E., Bulur S., - *Mad Honey intoxication confirmed by pollen analysis* – Clinical Toxicology 2011, 49 ; 872-873

- [130] Cagli K.E., Tufekcioglu O., Sen N., Aras D., - *Atrioventricular block induced by Mad-honey intoxication, confirmation of diagnosis by pollen analysis* - Texas Heart Institute Journal, 2009, vol. 36:342-344
- [131] Chen S.PL., Lam YH., Ng V., Lau FL., - *Mad honey poisoning mimicking acute myocardial infarction* – Hong Kong medical journal, 2013, 19:354-356
- [132] Yilmaz O., Eser M., Sahiner A., Altintop L., - Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning - Resuscitation, 2006, 68:405-408
- [133] Uzun H., Narci H., Tayfur I., Karabulut K.U., - Mad honey intoxication : What is wrong with the blood glucose? A study on 46 patients - European review for medical and Pharmacological Sciences, 2013, 17:2728-2731
- [134] Aliyev F., Turkoglu C., Celiker C., Firatli I., -Chronic mad honey intoxication syndrome : a new form of an old disease – Europace, 2009, 11, 954-956
- [135] Gunduz A., Turedi S., Uzun H., Topbas M., - Mad honey poisoning – American Journal of Emergency Medicine, 2006, 24, 595-598
- [136] Masutani T., Seyama I., Narahashi T., Iwasa J., - Structure-activity relationship for grayanotoxin derivatives in frog skeletal muscle – The journal of pharmacology and Experimental Therapeutics, 1981, vol.217 : 812-819
- [137] Tsuji K., Kawanishi T., Handa S., Kamano H., Iwasa J., - Effect of structural modification of several groups on the D-ring of grayanotoxin on its depolarization potency in squid giant axon - The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1991, vol.257, 788-794
- [138] Yakehiro M., Yamamoto S., Baba N., Nakajima S., Iwasa J., - Structure activity relationship for D-ring derivatives of grayanotoxin in the squid giant axon - The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1993, vol 265, 1328-1332

## Annexe 1

Norme concernant les critères de qualité du miel selon la directive Européenne 2001/110/CE et le décret n°2003-587 du 30 juin 2003 pris pour l'application de l'article L.214-1 du code de la consommation en ce qui concerne le miel. [52], [49]:

Critères	valeurs
<b>Teneur fructose et glucose</b>	
- miel de fleurs	- Au moins 60g/100g de miel
- miel de miellat	- Au moins 45g/100g de miel
<b>Teneur en saccharose</b>	
- généralement	- Au moins 5g/100g de miel
- faux acacia ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ), luzerne ( <i>Medicago sativa</i> ), banksie de Menzies ( <i>Banksia menziesii</i> ), hédysaron ( <i>Hedysarum</i> ), eucalyptus rouge ( <i>Eucalyptus camadulensis</i> ), <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , agrumes spp.,	- Pas plus de 10g/100g de miel
- lavande ( <i>Lavandula spp.</i> ), bourrache ( <i>Borago officinalis</i> )	- Pas plus de 15g/100g de miel
<b>Teneur en eau</b>	- Au plus 20%
<b>Teneur en matières soluble dans l'eau</b>	
- Généralement	- Au plus 0,1g/100g de miel
- Miels pressés	- Au plus 0,5g/100g de miel
<b>Conduction électrique</b>	
- Généralement	- Pas plus de 0,8mS/cm
- miel de miellat et miel de châtaignier et mélanges de ces miels	- Pas moins de 0,8mS /cm
<b>acides libres</b>	
- Généralement	- Moins de 50 milli-équivalents d'acides /kg
- miel destiné à l'industrie	- Pas plus de 80 milli-équivalents d'acides /kg
<b>Indice diastasique (échelle de Schade)</b>	- plus de 8
<b>Teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF)</b>	
- Généralement	- Moins de 40mg/kg de miel
- Sauf miel des régions tropicales	- pas plus de 80 mg/kg de miel

## Annexe 2

« Les Grecs, arrivés en haut, cantonnent dans plusieurs villages pourvus de vivres abondants. Il n'y eut là rien qui parut extraordinaire si ce n'est qu'il se trouva beaucoup de ruches, que tous les soldats qui en mangèrent eurent le délire, des vomissements, un dérangement de corps, et que pas un ne put se tenir sur ses jambes. Ceux qui en avaient peu mangé ressemblaient à des gens tout à fait ivres : ceux qui en avaient pris beaucoup, à des furieux ou à des mourants. Beaucoup gisaient à terre, comme après une défaite ; il y avait un grand découragement. Cependant le lendemain il n'y eut personne de mort, et le délire cessa vers la même heure où il avait pris la veille. Le troisième et le quatrième, chacun se leva, comme après une purgation. »

[122]

### ANNEXE 3 : Cas d'intoxications au miel, symptômes, prise en charge et évolution

Pays	Origine du miel	quantité de miel	sexe	Age	Troubles cardiaques	Pression artérielle	Symptômes associés	Temps d'apparition	traitement	évolution	Mode de consommation	références
Turquie	Turquie	20 à 30g	H	60	75 bat/min, BRS soudaine. Asystolie	160/60mmHg	Etourdissement, syncope. Perte de connaissance pendant asystolie.	Non renseigné	Atropine 0,5 mg en IV	Pression et rythme normal après atropine.	accidentel	Gunduz 2007
Île de la Réunion	miel de <i>Agave saliciflora</i> , Île de la Réunion	5 à 10 g	F	45	94 bat/min	142/84 mmHg	asymptomatique	Non renseigné	Non applicable	Non applicable	Accidentel (gaufre)	[111]
		15g	H	32	64 bat/min	115/73 mmHg	nausées, vomissement.	1h	Non applicable	1h	Accidentel (gaufre)	
		15g	H	51	81 bat/min	142/87 mmHg	nausées, vomissement.	15min	Non applicable	2h	Accidentel (gaufre)	
		15g	H	22	59 bat/min	141/87 mmHg	paresthésies, sensation de vertiges	15min	Non applicable	hospitalisation, arrêt des troubles 20 min	Accidentel (gaufre)	
		15g	H	43	45 bat/min	60/30 mmHg	nausées, vomissement, sueurs, oppression thoracique, asthénie intense.	15min	atropine + perfusion + antiémétique	hospitalisation, arrêt des troubles 3 h	Accidentel (gaufre)	
		30g	H	34	35 bat/min	70/40 mmHg	nausées, vomissement, mydriase réactive, bouffées de chaleur.	15min	perfusion + atropine	hospitalisation, arrêt des troubles 12h	Accidentel (gaufre)	
		30g	H	56	28 bat/min	imprenable	nausées, vomissements, diarrhée, sueurs, mydriase réactive, trouble de la conscience	10 min	Perfusion (hospitalisation réanimatoire)	12h	Accidentel (gaufre)	

### ANNEXE 3 : Cas d'intoxications au miel, symptômes, prise en charge et évolution

Pays	Origine du miel	quantité de miel	sexe	Age	Troubles cardiaques	Pression artérielle	Symptômes associés	Temps d'apparition	traitement	évolution	Mode de consommation	références
Hong Kong	Miel de l'Himalaya. Trace de grayanotoxine I, II et III dans miel	30g	H	48	BRS 37 bat/min	74/36 mmHg	vertige, oppression thoracique, transpiration, vomissement, vision floue.	1 h	Atropine 0,6 mg en IV + 300 mg aspirine orale + perfusion	Evolution positive rapide. Trace de grayanotoxine III dans urines.	Remède (3 à 5 jours, puis 30 jours avant hospitalisation)	[131]
Turquie	Mer Noire	2 à 3 cuillères à café	H	36	BRS 56 bat/min + fibrillation auriculaire	110/55 mmHg, hypotension épisodique	vertige puis étourdissements puis fatigue puis syncope	4 à 5 h après	Perfusion solution saline + Amiodarone	Hospitalisation 2 jours	Accidentel	[124]
Turquie	R. <i>ponticum</i> , Est de la Mer Noire	2 à 3 cuillères à soupe	F	45	Bloc AV complet + 44 bat/min	70/50 mmHg	étourdissement, sueurs, nausées, vertiges, asthénie, malaise	2 h	1mg atropine bolus + perfusion sérum physio.	Sortie après 24h	Accidentel	[125]
Turquie	miel de R. <i>ponticum</i>	1 cc le matin pendant une semaine, puis 1 cc à soupe le jour de l'hospitalisation.	H	50	Bloc AV complet + 35 bat/min	70/40 mmHg	Pour 1 cc, maux de tête étourdissements légers.	3 h	Atropine 1 mg	Evolution positive 5 minutes après atropine.	Remède (aphrodisiaque)	[126]
			F	42	45 bat/min	85/55 mmHg	Pour 1 cc, maux de tête étourdissements légers.	3h	Atropine 1 mg	Evolution positive 5 minutes après atropine.	Remède (aphrodisiaque)	

ANNEXE 3 : Cas d'intoxications au miel, symptômes, prise en charge et évolution

Pays	Origine du miel	quantité de miel	sexe	Age	Troubles cardiaques	Pression artérielle	Symptômes associés	Temps d'apparition	traitement	évolution	Mode de consommation	références
Turquie	ouest de la mer Noire en Turquie. Étude pollinique : 83% de pollen de Castanea sativa et 10% de Rhododendron	100 ml	M	48	33 bzt/min + bloc AV complet	80/60 mmHg	syncope, vertige,	8 h	Atropine 1 mg + solution saline	Pression et rythme normal 2 heures après	Non renseigné	[130]
Corée	Miel de rhododendron	20 g	M	67	Choque cardiaque + 45 bat/min	70/50 mmHg	Faiblesse générale, vertiges. Arrivé T° corporelle de 35,5°C, conscient, douleur thoraciques étourdissements	2 h	Atropine 1 mg + solution saline	Evolution positive 15 min après traitement.	Accidentel (alimentation)	[127]
Autriche	Miel de Turquie <i>Rhododendron ponticum</i> et <i>luteum</i>	Non renseigné	M	70	34 bat/min + bloc AV	110/60 mmHg	nausées vomissements, troubles de la vision, syncope	Non renseigné	Atropine	Moins de 24 h après prise en charge	Remède	[123]
Autriche	miel et rayon en provenance de Turquie	Non renseigné	M	56	37 bat/min + bloc AV complet	65/35 mmHg	nausées, sueurs, syncope, vomissement,	1 h	atropine 0,5 mg IV + 0,5 mg 45 minute après.	Non renseignée	Accidentel (alimentation)	[128]

## Résumé

**Le miel** est un produit naturel obtenu par la maturation du nectar prélevé par les abeilles sur les fleurs. Le miel est depuis longtemps utilisé par les hommes comme aliment, mais aussi comme remède. Cette solution, composée à près de 80% de sucre et de 15 à 20% d'eau, renferme des métabolites secondaires synthétisés par les plantes. Ces substances sont en partie responsables des propriétés antibactériennes, cicatrisantes et anti-inflammatoires attribuées au miel. Si les miels peuvent contenir des substances naturelles bénéfiques pour l'homme, ils peuvent également renfermer des substances toxiques comme les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les grayanotoxines.

**Les alcaloïdes pyrrolizidiniques** sont des métabolites secondaires biosynthétisés principalement par les plantes de la famille des *Asteraceae*, des *Boraginaceae* et des *Fabaceae*. Ces métabolites sont à l'origine des effets toxiques chez l'homme retrouvés à la suite de la consommation de tisane et ou de salade mais également de produits dérivant d'animaux comme le lait, les œufs ou le miel. Les effets toxiques se manifestent principalement par des troubles hépatiques caractérisés par le syndrome veino-occlusif du foie qui peuvent apparaître pour une exposition de 15µg/kg de masse corporelle et par jour. Des études ont mis en évidence la présence de ces toxines dans certains miels du commerce, pour des concentrations proches de 1 µg/kg. En se basant sur la consommation moyenne européenne de miel, la dose d'alcaloïdes pyrrolizidiniques absorbée serait de  $3,9 \cdot 10^{-3}$  µg/j. Ces teneurs restent suffisamment faibles pour ne pas dépasser la dose tolérable de 0,007 µg/kg/jour (soit 0,49 µg/j chez un adulte) définie par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Les données restent cependant insuffisantes pour évaluer les effets génotoxiques de ces miels.

**Les Grayanotoxines** sont des dérivés diterpénique synthétisés par certaines plantes de la famille des *Ericaceae*. Cinq plantes de cette famille sont à l'origine du « miel fou ». Seules les grayanotoxines I, II et III ont été identifiées dans ces miels, qui proviennent principalement des régions côtières de la Mer Noire en Turquie et des montagnes de l'Himalaya. Ces miels traditionnellement utilisés comme remèdes, sont à l'origine d'intoxications caractérisées par une bradycardie sinusale et de l'hypotension. Ces symptômes apparaissent généralement dans les heures qui suivent la consommation de quelques dizaines de gramme de « miel fou ». La prise en charge par 0,5 à 2 mg d'atropine permet généralement un rétablissement du patient dans les 48h après le début des premiers symptômes.

Ces deux métabolites secondaires sont tous les deux toxiques pour l'homme mais les risques restent limités pour les consommateurs d'une part parce que les concentrations en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le miel sont faibles, et d'autre part parce que les miels de grayanotoxine sont rares et non commercialisés sur le marché.

**Mots clés** : Miel toxique, Alcaloïde Pyrrolizidinique, Syndrome Veino-occlusif Hépatique, Grayanotoxines, Ericaceae, Miel fou.

## **SERMENT DE GALIEN**

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De ne jamais oublier** ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En aucun cas**, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent** leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé** de mes confrères si je manque à mes engagements.

