

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2015

THESE n°24

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 19 Mars 2015

par

Melle Cindy MERMOZ

Née le 31 mai 1989

A Lyon 4^{ème} (69)

**INTOXICATION AU MIEL FOU :
ÉTAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES ACTUELLES**

JURY

Mme Isabelle KERZAON, Maître de Conférences

Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Professeur

Mr Jean-Marc DIDIER, Pharmacien d'officine

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|------------------------|
| • Président de l'Université | M. François-Noël GILLY |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil Scientifique | M. Germain GILLET |
| • Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe LALLE |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Jérôme ETIENNE |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis BOURGEOIS |
| • Institut des Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves MATILLON |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE MARCHI |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal FOURNIER |
| • I.U.T. LYON 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| • ESPE | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH -)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU - HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU - PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU - PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU – PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr - PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU – PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU - PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU - PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU - HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU – PH - HDR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
 Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
 Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
 Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
 Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
 Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
 Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
 Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
 Madame Angélique MULARONI (MCU)
 Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
 Madame Emilie BLOND
 Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
 Madame Sophie ASSANT 85^{ème} section
 Monsieur Benoit BESTGEN 85^{ème} section
 Madame Marine CROZE 86^{ème} section
 Madame Mylène HONORAT MEYER 85^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

A Madame Dijoux-Franca Marie-Geneviève,

Après avoir eu le privilège de recevoir votre enseignement à la faculté, vous me faites l'honneur d'assurer la présidence de ce jury. Je vous présente mes sincères remerciements.

A Madame Kerzaon Isabelle,

Merci de m'avoir encadré dans ce travail, pour votre investissement, pour votre disponibilité et vos conseils. Merci de me faire l'honneur d'être dans mon jury.

A Monsieur Didier Jean-Marc,

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et surtout un grand merci pour votre accompagnement à la Pharmacie Nouvelle des Plantées pendant mes stages et pour votre investissement dans ma formation.

A mes parents et à toute ma famille...

Merci de m'avoir soutenu, entouré et épaulé pendant toutes ces années. Merci pour avoir cru en moi, je ne vous remercierai jamais assez. Chacun à votre manière, avez contribué à ma réussite.

A mes amies, Cia, Cindy et Célin

Je vous remercie pour cette belle amitié : du collège jusqu'à aujourd'hui en passant par le « Manoir », quelle aventure. Merci pour tous ses beaux moments partagés, pour votre soutien et surtout pour votre folie. On s'aime.

A Delphine et Jérôme

Si je n'étais pas venu te voir pour te demander « comment se passait la pharma ? » ce fameux septembre 2007, je ne serais pas là aujourd'hui, Delphine. Merci pour TOUT ce que nous avons partagé que ce soit en cours, en révisions ou tout simplement dans nos vies. Merci à vous 2 d'avoir été là dans les bons comme les mauvais moments et encore merci de m'avoir fait l'honneur d'être le témoin du plus beau jour de vos vies.

A Benoît, Kevin et PJ

Merci d'être tout simplement là. Dédicace à la « Kas...l » qui a su égayer quelques unes de nos soirées. C'est cool de vous avoir les copains enfin... les amis. Merci également à Sophie et Alizée pour cette complicité que nous avons su développer.

A Ariane, Claire, Julie et Sophie

Merci pour tous ces moments très sympas que nous avons pu vivre à la fac et en dehors, ça y est la page fac se tourne mais j'espère continuer à partager plein d'autres moments avec vous.

A toute l'équipe de la Pharmacie Nouvelle des Plantées,

Je vous remercie pour votre accueil, votre gentillesse et votre bonne humeur au quotidien. C'est trop cool de bosser avec vous. Encore un Grand merci à Jean-Marc et Olivier de m'avoir permis de me libérer du temps pour réaliser ce travail et pour les valeurs que vous transmettez quant à l'exercice du métier officinal.

A mon équipe de Basket de Montluel

Merci pour toutes ces belles années à jouer avec vous. Notre équipe et le basket ont été primordiaux pendant toutes mes années études. Des teams comme la notre y'en a pas d'autres et c'est pour ça qu'on est aussi soudé. GO GO GO RCM !!!!

Et à tous les autres, Alex, Antho et Marilyne, Choukette, JB, Mélanie, Pauline et Romain, Pierrot, Sylvain...

Merci pour votre soutien, vos encouragements, tous ces délires, ces soirées, tous ces supers moments partagés...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION	9
PARTIE I : L'INTOXICATION AU « MIEL FOU »	11
1. Miel fou.....	12
1.1. Définition	12
1.2. Historique	12
1.3. Formes.....	14
1.4. Récolte du miel.....	15
1.4.1. Etapes de fabrication d'un miel	15
1.4.2. Récolte du miel fou	17
1.5. Composition	18
1.6. Paramètres physico-chimiques	18
1.6.1. Les oligo-éléments	22
1.6.2. Les toxines	23
1.7. Utilisation	24
1.8. Circonstances d'intoxications.....	25
1.9. Comparaison des intoxications au miel fou entre l'île de la Réunion et la Turquie.....	25
2. Epidémiologie.....	26
2.1. Localisation des cas rapportés.....	26
2.2. Pourquoi la plupart des intoxications ont-elles lieu aujourd'hui en Turquie ?	27
2.3. Caractéristiques démographiques de la population intoxiquée	28
2.4. Saisons	30
2.5. Cas des intoxications sur l'île de la Réunion	31
3. Etude clinique de l'intoxication chez l'homme	32
3.1. Symptômes	32
3.2. Dose toxique et durée de l'intoxication	39
3.2.1. Dose toxique	39
3.2.2. Durée de l'intoxication	41
3.3. Mortalité.....	41
3.4. Diagnostic	42
3.4.1. Clinique et interrogatoire.....	42

3.4.2.	Diagnostic différentiel	42
3.4.3.	Détection du pollen dans le miel.....	43
3.5.	Prise en charge et pronostic.....	44
4.	L'intoxication au miel fou est-elle un toxidrome cholinergique ?	45
5.	Mesures mises en place et prévention.....	46
5.1.	Mesures mises en place.....	46
5.2.	Prévention	46
6.	Coût pour le système de santé en Turquie	47
PARTIE II : PLANTES INCRIMINEES		48
1.	Contexte.....	49
2.	La famille des Ericacées.....	51
2.1.	Position systématique selon APG III (Angiosperm Phylogeny Group)	52
2.1.1.	Sous-classe des Astéridées	53
2.1.2.	Ordre des Ericales	54
2.1.3.	Classification infra-familiale des Ericacées.....	55
2.2.	Caractéristiques botaniques des Ericacées	56
2.2.1.	Appareil végétatif.....	56
2.2.2.	Appareil reproducteur.....	56
2.2.3.	Habitat	58
2.3.	Utilisations traditionnelles des Ericacées.....	59
2.3.1.	Plantes ornementales	59
2.3.2.	Plantes médicinales	59
2.3.3.	Alimentation	60
2.3.4.	Autres utilisations.....	60
2.3.5.	Toxicité.....	60
2.4.	Principaux métabolites secondaires	60
2.4.1.	Tanins	61
2.4.2.	Flavonoïdes	61
2.4.3.	Autres dérivés phénols et hétérosides phénoliques	61
2.4.4.	Huiles essentielles	61
2.4.5.	Diterpènes	62
2.4.6.	Triterpènes	62
3.	Le genre <i>Rhododendron</i>	63
3.1.	<i>Rhododendron ponticum</i> L.....	66
3.1.1.	Dénomination.....	66
3.1.2.	Description.....	66
3.1.3.	Habitat	67

3.1.4.	Composition.....	67
3.1.5.	Utilisation	68
3.1.6.	Intoxication	68
3.2.	<i>Rhododendron luteum</i> Sweet ou <i>Rhododendron flavum</i> G. Don	69
3.2.1.	Dénomination.....	69
3.2.2.	Habitat	69
3.2.3.	Composition.....	69
3.2.4.	Utilisation	70
3.2.5.	Intoxication	70
3.3.	<i>Rhododendron simsii</i> Planch.	71
3.3.1.	Dénomination.....	71
3.3.2.	Description.....	71
3.3.3.	Habitat	72
3.3.4.	Composition.....	72
3.3.5.	Utilisation	73
3.3.6.	Intoxication	73
4.	Le genre <i>Agauria</i>	74
4.1.	Position systématique	74
4.2.	<i>Agauria salicifolia</i> Hook f. ex Oliver	74
4.2.1.	Dénomination.....	75
4.2.2.	Description.....	75
4.2.3.	Habitat	75
4.2.4.	Composition.....	76
4.2.5.	Utilisation	76
4.2.6.	Intoxication	77

PARTIE III : MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'INTOXICATION : LES GRAYANOTOXINES.....78

1.	Qu'est-ce que les grayanotoxines ?.....	79
1.1.	Historique et origine	79
1.2.	Structure	82
1.3.	Toxicité	86
1.4.	Classification.....	86
1.5.	Relation structure-activité	87
1.6.	Comment les grayanotoxines se retrouvent-elles dans le miel ?.....	88
2.	Le rôle du système nerveux central, du système nerveux parasympathique et du nerf vague dans l'intoxication aux grayanotoxines.....	89
2.1.	Rôle du système nerveux central.....	89
2.2.	Rôle du système nerveux parasympathique et du nerf vague	90

3. Effets des grayanotoxines au niveau cellulaire	91
3.1. Le canal sodique	91
3.1.1. Structure.....	92
3.1.2. Nomenclature et classification	94
3.1.3. Pharmacologie moléculaire du canal sodique	95
3.2. L'action des grayanotoxines au niveau du canal.....	97
3.2.1. Mécanisme d'action	97
3.2.2. Site de liaison des grayanotoxines	97
3.2.3. Accès au site de liaison.....	102
4. Le cas des intoxications aux grayanotoxines chez les animaux	103
4.1. Les cas d'intoxications.....	103
4.2. Les expérimentations	105
5. Détection des grayanotoxines.....	106
5.1. Identification	106
5.2. Extraction des grayanotoxines à partir de différents échantillons	109
5.3. Récapitulatif des différents seuils de détection des grayanotoxines dans divers échantillons	113
5.4. Perspectives.....	113
CONCLUSIONS	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES	128

Liste des tableaux

TABEAU 1 : PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE DIFFERENTS ECHANTILLONS DE MIEL FOU.....	19
TABEAU 2 : TAUX EN OLIGO-ELEMENTS DE MIEL PRODUIT A PARTIR DE <i>R. PONTICUM</i> ET A PARTIR DE DIFFERENTES ESPECES DE <i>RHODODENDRON SP.</i>	22
TABEAU 3 : COMPARAISON DES INTOXICATIONS SURVENUES SUR L'ILE DE LA REUNION ET EN TURQUIE	25
TABEAU 4 : SYNTHESE DES CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES DES CAS D'INTOXICATION PAR DU MIEL FOU.....	28
TABEAU 5 : SYNTHESE DES DIFFERENTS TROUBLES CARDIAQUES RENCONTRES CHEZ 393 PATIENTS INTOXIQUES PAR DU MIEL FOU ...	34
TABEAU 6 : RECAPITULATIF DE LA QUANTITE DE MIEL FOU CONSOMMEE RESPONSABLE DE L'INTOXICATION, DU TEMPS DE RECUPERATION APRES L'INTOXICATION ET DU DELAI D'APPARITION DES SYMPTOMES APRES L'INGESTION DE MIEL FOU.....	40
TABEAU 7 : ORIGINE GEOGRAPHIQUE DE MIELS FOUS IMPLIQUES DANS DES INTOXICATIONS	49
TABEAU 8 : ESPECES VEGETALES CONTENANT DES GRAYANOTOXINES	50
TABEAU 9 : CLASSIFICATION DES ERICACEES SELON L'APG III	53
TABEAU 10 : PROPRIETES DE CERTAINES ESPECES APPARTENANT AUX ERICACEES.....	59
TABEAU 11 : MOLECULES TOXIQUES DETECTEES DANS DES ERICACEES	79
TABEAU 12 : CAS D'INTOXICATION AUX GRAYANOTOXINES (NON DUE AU MIEL FOU) AYANT NECESSITE UNE HOSPITALISATION.....	81
TABEAU 13 : CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES GTX I, II, III ET IV	84
TABEAU 14 : LES DIFFERENTS SITES RECEPTEURS DES CANAUX SODIQUES ET LEURS LIGANDS	95
TABEAU 15 : LES ACIDES AMINES DES SEGMENTS S6 DES DOMAINES I ET IV DE L'ISOFORME $Na_v1.4$ INTERAGISSANT AVEC LES TOXINES DU SITE 2.....	99
TABEAU 16 : LES NOUVEAUX ACIDES AMINES DES SEGMENTS S6 DES DOMAINES II ET III INTERAGISSANT AVEC LES TOXINES DU SITE 2.	100
TABEAU 17 : INTOXICATIONS D'ANIMAUX PAR DES ESPECES APPARTENANT AU GENRE <i>RHODODENDRON</i>	103
TABEAU 18 : SEUILS DE DETECTION DES GRAYANOTOXINES SUIVANT LA TECHNIQUE D'ANALYSE ET LE TYPE D'ECHANTILLON ANALYSE	113

Liste des figures

FIGURE 1 : « MIEL EN GAUFRE »	14
FIGURE 2 : MIEL FOU EN POT	14
FIGURE 3 : ABEILLES RETOURNANT A LA RUCHE	15
FIGURE 4 : ALVEOLES OPERCULEES.....	16
FIGURE 5 : PAYS OU DES CAS D'INTOXICATIONS AU MIEL FOU ONT ETE RAPPORTES	26
FIGURE 6 : REPARTITION MONDIALE DES PLANTES CONTENANT DES GRAYANOTOXINES	28
FIGURE 7 : DISTRIBUTION DES CAS D'INTOXICATION AU MIEL FOU AU COURS D'UNE ANNEE	30
FIGURE 8 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DU FOIE D'UN RAT.	33
FIGURE 9 : PROPORTION DE CHAQUE TROUBLE DU RYTHME CARDIAQUE LORS D'UNE INTOXICATION AU MIEL FOU	37
FIGURE 10 : ECG LORS DE L'ADMISSION D'UN PATIENT INTOXIQUE PAR DU MIEL FOU, PRESENTANT UNE BRADYCARDIE SINUSALE A 43 BATTLEMENTS / MINUTE.....	38
FIGURE 11 : ECG D'UN PATIENT INTOXIQUE PAR DU MIEL FOU, PRESENTANT UNE FIBRILLATION AURICULAIRE.....	38
FIGURE 12 : ECG APRES LA RECUPERATION DU MEME PATIENT, PRESENTANT UN RYTHME SINUSAL NORMAL DE 90 BATTLEMENTS / MINUTE.....	39
FIGURE 13 : MICROPHOTOGRAPHIES DE POLLEN D'ESPECES APPARTENANT AU GENRE <i>RHODODENDRON</i> RETROUVE DANS DU MIEL, DE DIFFERENTS POINTS DE VUE	43
FIGURE 14 : ARBRE PHYLOGENETIQUE SELON L'APG III SUPERPOSEE AVEC UNE CLASSIFICATION PROPOSEE PAR REVEAL ET CHASE ...	52
FIGURE 15 : POSITION SYSTEMATIQUE DES ERICACEES DANS L'ORDRE DES ERICALES SELON L'APG III.....	54
FIGURE 16: ORGANISATION SYSTEMATIQUE ET CLASSIFICATION INFRA-FAMILIALE DES ERICACEES SELON L'APG III	55
FIGURE 17 : ABEILLE EN TRAIN DE BUTINER UNE FLEUR DE <i>R. PONTICUM</i>	57
FIGURE 18 : REPARTITION MONDIALE DES ERICACEES SELON STEVENS	58
FIGURE 19 : DIFFERENTES ESPECES APPARTENANT AU GENRE <i>RHODODENDRON</i>	63
FIGURE 20: FLEURS DE <i>R. PONTICUM</i>	66
FIGURE 21 : STRUCTURE CHIMIQUE DE QUELQUES MOLECULES ISOLEES A PARTIR DE <i>R. PONTICUM</i>	68
FIGURE 22 : FLEURS ET FEUILLES DE <i>R. LUTEUM</i>	69
FIGURE 23 : STRUCTURE CHIMIQUE DU MONOTROPEINE, MOLECULE ISOLEE DE <i>R. LUTEUM</i>	70
FIGURE 24 : BOUTONS FLORAUX DE <i>R. SIMSII</i>	71
FIGURE 25 : FLEURS ET FEUILLES DE <i>R. SIMSII</i>	71
FIGURE 26 : STRUCTURE CHIMIQUE DE QUATRE MOLECULES ISOLEES A PARTIR DE <i>R. SIMSII</i>	72
FIGURE 27 : FLEURS ET FEUILLES D'<i>A. SALICIFOLIA</i>	75
FIGURE 28 : STRUCTURE CHIMIQUE DE QUATRE MOLECULES ISOLEES A PARTIR D' <i>A. SALICIFOLIA</i>	76
FIGURE 29 : STRUCTURE CHIMIQUE DU COMPOSE <i>ENT-KAURANE</i>	82
FIGURE 30 : STRUCTURE COMMUNE DES GTX I, II, III ET IV	83
FIGURE 31 : STRUCTURE DE GTX I POUR COMPRENDRE L'ACTIVITE DES GTX	87

FIGURE 32 : REPRESENTATION DES CONFORMATIONS DES CANAUX SODIQUES ET POTASSIQUES SUIVANT LA PHASE DU POTENTIEL D’ACTION.....	92
FIGURE 33 : ORGANISATION DU CANAL SODIQUE	94
FIGURE 34 : SCHEMA DES DIFFERENTS SITES DE LIAISON DES NEUROTOXINES CONNUES SUR LA SOUS-UNITE A DU CANAL SODIQUE.	96
FIGURE 35 : SITES DE LIAISON DES GTX SUR L’ISOFORME NAV1.4	98
FIGURE 36 : RESIDUS D’ACIDES AMINES IMPLIQUES DANS L’ACTION DES GTX SUR LA BOUCLE INTRACELLULAIRE ENTRE S4 ET S5 DES DOMAINES I ET IV	101
FIGURE 37 : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE REPRESENTANT LES GTX I (1), II (2) ET III (3)	107
FIGURE 38 : CHROMATOGRAMME DE MASSE DE GTX I ET III OBTENU PAR LC-MS/MS	109

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
AChE	Acétylcholinestérase
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ARS OI	Agence de Santé Océan Indien
av. J.-C.	Avant Jésus-Christ
AV	Auriculo-ventriculaire
BJR	Réflexe de Bezold-Jarisch
BChE	Pseudocholinestérase (ou Butyrylcholinesterase)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung ou Institut Fédéral d'évaluation des risques allemands
BTX	Batrachotoxine
Canal Na ⁺ VD	Canal Sodique voltage-dépendant
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
ECG	Electrocardiogramme
ESI	Ionisation par électronébulisation
GC	Chromatographie en Phase Gazeuse
GGPP	Géranylgéranyl pyrophosphate
GTX	Grayanotoxines
GTX I, II, III ou IV	Grayanotoxine I, II, III ou IV
H & E.	Hématoxyline et éosine
HMF	Hydroxyméthylfurfural
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HVM	Hypothalamus ventro-médian
LC-MS /MS	Chromatographie liquide couplée avec une détection par une spectrométrie de masse en tandem
OH	Hydroxyle
PA	Potentiel d'Action
SNA	Système Nerveux Autonome
SNC	Système Nerveux Central
SPE	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)
SWPW	Syndrome de Wolff Parkinson White
TFC	Turkish Food Codex (Codex Alimentaire Turc)
TL	Livre turque (unité monétaire turque)

Introduction

Le miel est une substance sucrée de couleur blonde produite naturellement par les abeilles mellifères (*Apis mellifera*) à partir du nectar des fleurs. Il est stocké dans les rayons de la ruche pour servir de nourriture aux abeilles et à leurs larves tout au long de l'année.

Depuis des siècles, le miel est reconnu et apprécié des Hommes comme substance sucrante dans leur alimentation, pour son goût et ses apports nutritifs, mais aussi pour ses multiples propriétés thérapeutiques (antibactérien, cicatrisant..). Il est perçu comme un aliment naturel, non pollué et bénéfique pour la santé.

Pourtant, en janvier 2013, à l'île de la Réunion plusieurs cas d'intoxication ont été signalés à l'Agence de santé Océan Indien (ARS OI), suite à la consommation de miel (1).

Cette forme inhabituelle d'intoxication alimentaire à partir de miel, dit « miel fou », rappelle le potentiel toxique de certains produits dits « naturels » qui suscitent un regain d'intérêt à l'heure où la médecine moderne se trouve confrontée à divers problèmes. Ces produits naturels bénéficient souvent d'une image positive et leur utilisation est souvent considérée sans risque par les consommateurs.

Le miel, produit naturel par excellence n'est donc pas toujours inoffensif.

Ces cas intrigants d'intoxication au miel rapportés dans plusieurs articles en 2013 (2–4) furent le point de départ de ce travail de thèse. Qu'est-ce que le miel fou ? Quels sont les symptômes pour identifier ce type d'intoxication et la conduite à tenir ? Quelles pourraient être les mesures à prendre pour éviter ce type d'intoxication ? Quelles sont les plantes incriminées ? Quelles sont les toxines impliquées ? Comment agissent-elles ?... autant de questions soulevées à la lecture de ces faits d'actualités.

Très vite la littérature, nous apprend que ce type d'intoxication au miel est principalement décrit en Turquie, sur la côte Est de la mer Noire et ce, depuis l'antiquité (5).

L'objectif de ce travail a donc été de faire par une recherche bibliographique un état des lieux des connaissances actuelles concernant ces intoxications dues à une consommation de miel. Cette recherche a été réalisée en consultant des bases de données scientifiques telles que PubMed Medline, SciFinder, ScienceDirect et Google Scholar en utilisant premièrement comme mots-clés « mad honey poisoning », puis après les premiers résultats obtenus d'autres mots clés tels que les noms d'espèces végétales ou les noms de molécules par exemple. Des

informations retrouvées sur des sites plus généralistes notamment sur des revus réunionnaises en ligne, LINFO.re ou Imaz Press Réunion, ont également permis d'enrichir ce travail.

Ce manuscrit correspond à la synthèse de cette recherche bibliographique.

La première partie présentera l'intoxication au miel fou. Elle permettra de décrire ce qu'est ce miel et de faire un parallèle entre les intoxications survenues à la Réunion et en Turquie. Elle conduira à faire l'analyse épidémiologique de cette intoxication et à réaliser une étude clinique de celle-ci chez l'homme.

La seconde partie détaillera les plantes incriminées avec notamment une description de la famille à laquelle elles appartiennent et une synthèse des caractéristiques botaniques et chimiques des 4 principales espèces rapportées comme étant responsables de certaines intoxications au miel fou.

La troisième partie passera en revue les toxines responsables de cette intoxication. Cette dernière permettra de décrire leur structure, leur mécanisme d'action, leur détection et leur implication dans d'autres types d'intoxication.

Partie I : L'intoxication au « miel fou »

1. Miel fou

1.1. Définition

Le terme de « miel fou » désigne un miel contenant des molécules toxiques et qui a entraîné des intoxications chez l'Homme. Il est produit à partir d'un nectar contenant ces molécules, récolté sur les fleurs de certaines espèces appartenant toutes à la famille des Éricacées. Ces molécules ont été identifiées comme étant des grayanotoxines (GTX). Elles seront détaillées plus largement dans la partie 3 de ce manuscrit. Ces GTX sont inoffensives pour les abeilles qui les butinent, mais ce sont ces neurotoxines naturelles qui sont responsables de la toxicité de ce miel (5,6).

Le « miel fou » est également connu sous le nom de « mad honey » (7) ou « black beehive honey » (8), en anglais ou bien encore « deli bal » en turc (9).

1.2. Historique

L'intoxication au miel fou a été décrite pour la première fois en 401 avant Jésus-Christ (av. J.-C.) par Xénophon (430-355 av. J.-C.), historien et chef militaire de la Grèce antique, dans l'Anabase (son œuvre la plus célèbre) (10). Il raconte ainsi l'intoxication de ses soldats au miel fou, dans la province de Trabzon, située à l'Est de la Turquie le long de la mer Noire (11).

Ainsi dans le livre IV, chapitre VIII il écrit : « Les Grecs étant montés, trouvèrent beaucoup de villages abondamment remplis de vivres, et y cantonnèrent ; ils n'y rencontrèrent rien qui les étonnât, si ce n'est qu'il y avait beaucoup de ruches, et que tous les soldats qui mangèrent des gâteaux de miel, eurent le transport au cerveau, vomirent, furent purgés, et qu'aucun d'eux ne pouvait se tenir sur ses jambes. Ceux qui n'en avaient que goûté, avaient l'air de gens plongés dans l'ivresse ; ceux qui en avaient pris davantage ressemblaient, les uns à des furieux, les autres à des mourants. On voyait plus de soldats étendus sur la terre que si l'armée eût perdu une bataille, et la même consternation y régnait. Le lendemain personne ne mourut ; le transport cessait à peu près à la même heure où il avait pris la veille. Le troisième et le quatrième jour, les empoisonnés se levèrent, las et fatigués ; comme on l'est après l'effet d'un remède violent » (12).

Xénophon fut donc le premier à décrire en détails les symptômes de cette intoxication (10) mais il ne rapporta aucun cas mortel.

Trois cent ans plus tard, en 97 av. J.-C., le miel fou a été utilisé comme une arme par le roi Mithridate IV¹ contre les soldats du général Pompée. Ses hommes ont été délibérément empoisonnés, ainsi 1440 soldats romains ont été tués alors qu'ils étaient affaiblis par l'intoxication (13,14). Un incident similaire impliquant du miel a également été rapporté en Russie. Lorsque la reine russe Olga libéra la ville de Kiev en 968, elle accepta plusieurs tonnes de liqueur de miel de la part de ses alliés. L'implication d'un miel fou n'a jamais été clairement démontrée mais 5000 Russes ont été abattus alors qu'ils se trouvaient intoxiqués (15).

Au lieu d'être un simple produit alimentaire comme aujourd'hui, le miel fut parfois utilisé autrefois comme une arme de guerre (15).

Un célèbre naturaliste Pline l'Ancien (79-23 av. J.-C.) a fourni des informations sur le miel fou dans son œuvre « Histoire Naturelle » (« *Historia Naturalis* »). Il déclare que sur la côte de la mer Noire en Turquie, il existe un miel responsable de folie appelé « maenomenon » qui serait issu de la fleur de *Rhododendron* sp.(16). Dioscoride (médecin grec, 20-90), Diodore de Sicile (historien grec, 1^{er} siècle av. J.-C.) et Aristote (philosophe grec, 384-322 av. J.-C.) font référence également aux effets toxiques de certains miels issus d'espèces de *Rhododendron* sp. à l'Héraclée du Pont²(16). Plus tard, Joseph Pitton de Tournefort, botaniste français (1656-1708), décrit un miel toxique issu d'*Azalea pontica* (probablement le *Rhododendron luteum* d'aujourd'hui) et rapporte que « celui qui mange de ce miel sera intoxiqué » (16).

En 1802, aux Etats Unis, Barton, botaniste, fut le premier américain à publier les effets de l'intoxication au miel fou. En 1853, Coleman a travaillé également sur deux séries de patients intoxiqués au miel, la première dans le New Jersey et la deuxième à Branchville en Caroline du Sud où respectivement 1 et 3 cas mortels furent rapportés (15). Enfin, lors de la réunion annuelle de l'Union des pharmaciens américains en 1896, Kebler, pharmacien et chimiste américain, a fait référence à l'intoxication au miel fou aux Etats Unis, à la suite de huit cas survenus à Princeton (17). Plus récemment, en Turquie, en 1949, au cours de ses recherches, Pulewka a observé les effets d'un miel toxique sur des animaux de laboratoire. Il a également comparé les effets d'un miel ordinaire à ceux provenant de *Rhododendron ponticum* ou de *R. luteum* (9).

¹ Roi du royaume du Pont, royaume antique sur la côte méridionale de la mer Noire, correspondant actuellement à une région située en Turquie.

² Ancienne ville grecque qui fait place à l'actuelle ville de Karadeniz Ereğli située dans la province de Zonguldak en Turquie située sur la côte de la mer Noire, à l'Ouest.

1.3. Formes

Le miel fou responsable des intoxications rapportées sur l'île de la Réunion est du miel vendu à l'état brut dans ses alvéoles de cire originelles. Il est appelé « miel en gaufre » ou « miel en rayons » (Figure 1) (6).



Figure 1 : « Miel en gaufre ».

En revanche, la forme du miel responsable des intoxications en Turquie n'a jamais été clairement précisée dans la littérature. Mais d'après son mode de consommation, l'hypothèse est que ce miel serait récolté et conditionné en pot. Ce miel toxique est de couleur brune (16) (Figure 2) et sent comme la fleur de tilleul (18).



Figure 2 : Miel fou en pot, d'après (19).

1.4. Récolte du miel

Cette partie vise à rappeler comment est réalisée la production du miel, qu'il soit « fou » ou non.

1.4.1. Etapes de fabrication d'un miel

La fabrication d'un miel se divise en 2 étapes, une réalisée par les abeilles et la seconde réalisée par l'apiculteur.

➤ Le travail des abeilles

L'abeille butine le nectar des fleurs pour en utiliser le sucre. L'autre source de sucre est le miellat, qui provient des excréments laissées sur les végétaux par des insectes.

Les abeilles butinent de fleurs en fleurs en remplissant leur jabot, dans lequel des enzymes hydrolysent les sucres (20).



Figure 3 : Abeilles retournant à la ruche, d'après (21).

De retour à la ruche (Figure 3), les butineuses transmettent leur récolte à d'autres abeilles, les magasinieres, qui vont la mêler à la salive et à de nombreuses substances, modifiant ainsi sa composition en sucres. Les sucres complexes du nectar vont être dégradés en sucres simples (glucose et lévulose). Cette récolte va ensuite être stockée dans les alvéoles de la ruche. Dans cette dernière, une évaporation forcée élimine l'eau du nectar pour qu'il se transforme en miel après une maturation de 3 à 4 jours (humidité de 20%) (22). L'alvéole une fois pleine de miel, est recouverte de cire pour la protéger. L'alvéole est dite operculée (Figure 4), et le miel, ainsi protégé, constitue une réserve pour l'hiver (20,21).



Figure 4 : Alvéoles operculées, d'après (21).

➤ Le travail de l'apiculteur

1^{ère} étape : la récolte du miel

La récolte a lieu à la fin de la floraison de la plante qui caractérisera le miel, lorsque les $\frac{3}{4}$ des alvéoles sont operculées. Si le miel est polyfloral (provenant de fleurs différentes), la récolte sera réalisée après les floraisons les plus tardives.

La récolte se divise, elle-même en plusieurs étapes :

- enfumage pour neutraliser les abeilles de la ruche
- décollage et brossage des cadres
- désoperculation des alvéoles

2^{ème} étape : l'extraction du miel

Cette extraction va être réalisée à l'aide d'un extracteur ou d'une centrifugeuse qui projette le miel sur les parois de la machine.

3^{ème} étape : filtrage du miel

A sa sortie, le miel contient des impuretés (cire, pollen, morceaux d'abeilles). C'est pourquoi il est recueilli sur des filtres à diamètre décroissant pour les retirer.

4^{ème} étape : maturation du miel

Une fois filtré, le miel doit encore reposer 1 à 5 jours à une température de 20°C minimum pour faire remonter à la surface l'ensemble des dernières impuretés, moins denses que le miel. Cette écume est ensuite enlevée avant l'étape suivante.

5^{ème} étape : conditionnement du miel

Enfin, le miel est conditionné dans un récipient hermétique. Le pot doit comporter une étiquette avec toutes les mentions légales (dénomination de vente, date de durabilité...).

Le miel n'est pas un produit stérile, il contient toujours des germes inhibés comme des bactéries ou des levures. Pour éliminer ces agents pathogènes, une méthode pour stabiliser le miel est parfois employée, c'est la **pasteurisation**. Elle consiste à porter le miel à une température de 70-80°C en quelques minutes avant de le refroidir rapidement à 25°C. Une telle température détruit alors les enzymes, les sucres et les vitamines (20,21).

1.4.2. Récolte du miel fou

Sur l'île de la Réunion, le miel fou est produit à partir du nectar d'*Agauria salicifolia*, plante toxique riche en GTX (6). L'hypothèse retenue est que ce miel toxique est produit en période de sécheresse lorsque les abeilles n'ont plus la possibilité de butiner leur plantes habituelles, exemple en 2008, où la plante habituellement butinée, *Syzygium jambos*, présentait un retard de floraison (6). Ainsi, le miel fou peut être produit par accident lorsque des plantes toxiques riches en GTX sont retrouvées dans le périmètre voisin de la ruche.

Le miel fou est également produit dans la région orientale de la mer Noire à partir du nectar de *Rhododendron* sp., mais cette fois volontairement par des apiculteurs individuels pour ses prétendues vertus thérapeutiques (23). Ce miel, produit par une méthode traditionnelle, est la plupart du temps dit monofloral car il provient d'une seule variété de fleurs. En effet, cette méthode utilise des abeilles caucasiennes autochtones, *Apis mellifera caucasica*, qui volent dans une zone de seulement 5 km² autour de leur ruche (24,25). Ainsi, le miel final est issu d'un secteur limité voire d'une seule ruche et peut contenir une forte concentration en GTX (5). Ce miel est un produit naturel qui est consommé sans traitement préalable (18). Il semblerait qu'il soit récolté dans les ruches et conditionné directement en pot sans transformation.

1.5. Composition

La composition d'un miel varie en fonction de : l'origine végétale, l'origine géographique, la nature du sol, les conditions météorologiques (pression, ensoleillement, humidité), la saison et les méthodes de production (20,22). Il s'agit d'un produit naturel très complexe qui est composé principalement de sucres simples (environ 80%), notamment de fructose et glucose (22), et d'eau (environ 20%). On retrouve également, en plus faibles proportions, des protides, des acides organiques, des lactones, des substances minérales, des vitamines, des oligoéléments... (20).

1.6. Paramètres physico-chimiques

En 2014, une étude (23) a permis de mesurer les paramètres physico-chimiques d'échantillons de miel fou provenant de Turquie, produit à partir de *Rhododendron ponticum*, recueillis sur trois années consécutives par les mêmes producteurs. Ces paramètres sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques de différents échantillons de miel fou, d'après (23).

Caractéristiques mesurées	Année de production			Valeurs normales selon le codex alimentaire turc (TFC)	Moyenne des 3 années
	2010	2011	2012		
Humidité (en %)	15,3	16,5	21,5	< 20	17,8
Acidité (en mEq/kg)	30,3	39,1	55,5	< 50	41,6
Conductivité (en mS / cm)	0,64	0,66	0,67	< 0,8	0,66
Taux de proline (en mg/kg)	68,4	52,2	79,0	< 300	66,5
HMF (en mg/kg)	14,3	4,96	Non renseigné	< 40	9,63
Indice diastasique	13,9	18,4	18,5	> 8	16,9
Maltose (en g/100g)	3,42	2,45	1,93	-	2,6
Fructose (F) (en g/100g)	38,0	37,3	36,4	-	37,2
Glucose (G) (en g/100g)	27,6	26,4	25,3	-	26,4
F + G	65,6	63,7	61,7	> 60	63,7
F/G	1,37	1,41	1,44	0,9 – 1,4	1,4
Taux de composé phénoliques totaux (en mg/kg)	131	87,7	108	-	108,9
Activité anti- radicalaire (en %)	84,3	76,3	91,0	-	83,9
GTX I (en mg/kg)*	16,6	25,7	22,4	-	21,7
GTX III (en mg/kg)*	3,6	11,9	11,6	-	9,0

*Moyenne calculées à partir de l'Annexe 1.

Cette étude a ainsi permis de décrire les paramètres physico-chimiques du miel fou et d'avoir un ordre d'idées des valeurs rencontrées. Elle s'est intéressée à l'humidité, l'acidité, la conductivité, la teneur en proline ou en hydroxyméthylfurfural (HMF = composé issu de la déshydratation de certains sucres), et aux teneurs en maltose, fructose (F), glucose (G) et composés phénoliques totaux.

Afin de mieux comprendre le tableau, les différents paramètres sont passés en revue individuellement.

L'humidité, une des caractéristiques les plus importantes du miel, dépend de la nature de la plante butinée, de la durée de la période de croissance et de l'atmosphère environnante. Cette humidité joue un rôle primordial dans sa qualité. Elle intervient dans la viscosité, la cristallisation, la saveur et la fermentation du miel. Une humidité élevée ($> 20\%$) ouvre la voie à sa fermentation et lui donne une odeur caractéristique, un goût désagréable d'alcool et une texture particulière. A l'inverse, lorsque l'humidité est faible ($< 16,5\%$), le miel ne libère plus ses arômes de façon optimale. Une humidité comprise entre 16,5 et 18% garantit une conservation idéale du miel (23,26). Ainsi, le miel de 2012 aurait fermenté et celui de 2010 serait trop sec.

Tous les miels sont acides. Cette acidité est due à la présence d'acides organiques, principalement les acides : gluconique, pyruvique, malique et citrique. L'acidité du miel, critère de qualité important, est exprimée en « milliéquivalents par kilogramme de miel » ou meq/kg. Au-delà de la concentration en acide maximum de 50 meq/kg, le miel a certainement subi une fermentation. La haute teneur en acide retrouvé dans le miel de 2012 confirme sa fermentation.

La conductivité électrique est liée à l'acidité et au contenu en sels minéraux, protéines et polyols dans le miel. Sa mesure sert d'indicateur pour connaître l'origine botanique et permet notamment de différencier les miels de fleurs des miels de miellat. En général, ce dernier a une conductivité plus élevée ($> 0,8 \text{ mS/cm}$) qu'un miel de nectar ($0,15 - 0,3 \text{ mS/cm}$) (26). Les valeurs retrouvées valident le fait que le miel fou est bien un miel obtenu à partir du nectar de plantes.

Le taux de proline, un acide aminé présent dans le miel, peut varier en fonction de l'origine du miel. Il peut être utilisé pour déterminer sa maturité et la dénaturation éventuelle du sucre.

L'HMF est un composé chimique issu de la dégradation du fructose. Sa concentration, nulle au départ, va augmenter au cours de sa conservation et lors d'une hausse de température.

La teneur en HMF reflète l'âge et le passé thermique du miel. Un miel naturel, récolté sans chauffage particulier, ne contient pas plus de 5 mg d'HMF par kg (miel de 2011). Son dosage permet de vérifier la qualité du miel. Une haute teneur en HMF limite sa durée de conservation (miel de 2010).

L'indice diastasique correspond à l'activité d'une enzyme, la diastase. Elle est très sensible au stockage et au chauffage du miel et donne une information précise sur les chocs thermiques subis par le miel. Généralement, un miel non dégradé a un indice diastasique supérieur à 8 (miels de 2010, 2011 et 2012).

La teneur en sucres des échantillons a été évaluée à partir de l'analyse de la conductivité. Comme décrit précédemment, le miel est principalement constitué de sucres, qui sont responsables de sa viscosité, de son hygroscopicité et de sa cristallisation. Le glucose et le fructose sont les deux sucres principaux retrouvés dans le miel. Le fructose est responsable de l'hygroscopicité du miel tandis que le glucose est responsable de sa cristallisation. Le rapport entre le fructose et le glucose détermine la vitesse de cristallisation du miel et sa stabilité. Si ce rapport n'est pas équilibré ($F/G > 1,4$) (miel 2011 et 2012), la cristallisation pourra être plus grossière et une double phase risque d'apparaître en cas de hausse de la température. De plus, la répartition entre les différents sucres donnera des renseignements sur l'origine du miel. Le miel de miellat est moins riche en monosaccharides que le miel de nectar.

En résumé, cette étude (23) a permis de confirmer que le miel fou est un miel de nectar. Bien qu'en apparence ces miels présentent des propriétés similaires, l'analyse du tableau a permis de mettre en évidence des différences qui semblent dépendre de l'année de production. Enfin, cette étude a fourni des valeurs qui pourront être comparées dans des études ultérieures.

1.6.1. Les oligo-éléments

Le miel contient de nombreux oligo-éléments dont certains jouent un rôle important dans l'équilibre ionique et les réactions enzymatiques des cellules. Pratiquement l'ensemble des oligo-éléments indispensables à l'homme vont être retrouvés dans le miel. Cependant, leur teneur varie d'un miel à l'autre, dépendant des espèces butinées ainsi que de la nature du sol sur lequel elles poussent. Deux études (23,27) se sont ainsi intéressées aux oligo-éléments présents dans le miel fou. Dans cette seconde étude (27), le miel est issu de divers *Rhododendron* sp. Les taux de 16 oligoéléments sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Taux en oligo-éléments de miel produit à partir de *R. ponticum* et à partir de différentes espèces de *Rhododendron* sp., d'après (23) et (27).

Oligo-éléments	Taux moyen en oligoéléments de miel (en µg/g)			
	Issu de <i>Rhododendron</i> sp.*	Issu de <i>R. ponticum</i> *		
	2007	2010	2011	2012
Ca	50,2	-	-	-
Cd	1,0	2,0	-	1,3
Co	7,9	-	-	-
Cr	28,0	3,1	2,0	3,0
Cu	17,2	0,7	0,5	0,7
Fe	2,9	24,0	28,3	24,5
K	2932,0	1286,0	1557,0	1648,0
Li	-	0,5	-	-
Mg	38,8	34,4	40,2	48,6
Mn	5,8	2,1	1,7	1,9
Na	-	341,0	399,0	402,0
Ni	28,0	-	-	-
Pb	19,5	-	-	-
Se	113,4	17,2	-	-
Sr	-	0,4	0,3	0,2
Zn	23,06	7,3	8,3	8,6

*Contrairement aux données de 2010, 2011 et 2012 directement issu de (23), les valeurs de 2007 sont des moyennes calculées d'après 12 échantillons de miel issus de divers *Rhododendrons* sp. (27).

L'oligo-élément majeur présent dans ce miel fou est le potassium (K). Il est suivi par le sodium (Na) et le magnésium (Mg) (23,27). On constate que certaines concentrations comme celles du chrome (Cr), du cuivre (Cu), du fer (Fe), du sélénium (Se) ou du zinc (Zn) ne sont pas du même ordre de grandeur entre les échantillons de miel provenant de *R. ponticum* et ceux issus de miel de *Rhododendron* sp. Ces différences viennent du fait que l'origine botanique du miel n'est pas la même.

1.6.2. Les toxines

Bien que les paramètres physico-chimiques du miel fou varie annuellement, les concentrations calculées en grayanotoxine I (GTX I) et grayanotoxine III (GTX III) ont été respectivement, en moyenne de 21,7 mg/kg et de 9,0 mg/kg sur les 3 années (Tableau 1) (les concentrations estimées dans (23) étaient de $20,4 \pm 1,69$ mg/kg pour GTX I et $8,20 \pm 1,93$ mg/kg pour GTX III). Ces concentrations se sont révélées être suffisamment élevées pour provoquer une intoxication au miel fou. Jusque là, aucune autre étude rapportant les concentrations en GTX dans du miel n'avaient été réalisées rendant la comparaison des valeurs impossible. Mais, en juin 2014, une nouvelle étude (28) sur des miels provenant de la région de la mer Noire a été réalisée. Il a été rapporté des concentrations en GTX I variant de 0,2 à 39,3 mg/kg et des concentrations en GTX III variant de 0,1 à 35,1 mg/kg. Cependant, aucune information n'avait été rapportée quant à leur possible implication dans des cas d'intoxication. Ainsi, nous pouvons juste constater que les moyennes des concentrations décrites en ce début de paragraphe, sont comprises dans ces intervalles, sous entendant qu'elles sont du même ordre de grandeur. Mais, nous ne pouvons affirmer que les miels fous responsables d'intoxication peuvent contenir des teneurs en toxines comprises dans ces intervalles.

Dans (15), l'auteur émet l'hypothèse que le stockage à long terme et l'exposition à la lumière (du jour ou industrielle) réduisent la toxicité du miel. D'ailleurs, certains producteurs commercialisent leur miel après quelques mois de conservation dans l'idée que la concentration en GTX aura diminuée. Un rapport (23) a permis de montrer au contraire que les concentrations en GTX, dans le miel, ne diminuaient pas significativement après 6 mois de stockage. Cependant, 6 mois n'est pas une période assez longue pour généraliser cette conclusion. Des études complémentaires sont nécessaires. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier également l'influence de la lumière sur la composition en GTX dans le miel fou.

1.7. Utilisation

Le miel fou est principalement consommé en Turquie, sur la côte Est de la mer Noire mais également à travers le monde. Il est utilisé dans de divers domaines en automédication, sans comprendre le mécanisme exact expliquant ses effets (5), pour traiter :

- les troubles gastro-intestinaux (29) : gastrite (10), ulcère gastroduodéal (10), douleurs gastriques (30,31) et dyspepsies (32)
- l'hypertension (29)
- les coronaropathies (29)
- les rhumes et diverses infections virales (10)
- la douleur (33)
- l'arthrite (13)
- l'impuissance sexuelle (10,29,33)
- l'insuffisance cardiaque (18)
- l'ulcération buccale (31)

De plus, après une étude menée chez le rat, il a longtemps été recommandé chez les sujets diabétiques pour son activité hypoglycémiante (24,34). Cependant, une récente étude menée chez l'homme en 2013, a prouvé que le miel fou ne diminuait pas de manière significative la glycémie (35). Ainsi, son utilisation chez les diabétiques ne semble pas justifiée.

Il est souvent consommé pendant le petit déjeuner, en petites quantités (31), à raison d'une cuillère à café jusqu'à deux cuillères à soupe seules ou parfois bouilli dans du lait (9). Il n'est pas tartiné comme le serait un miel ordinaire. Les consommateurs habitués le distinguent facilement des autres miels, sans doute à cause de la sensation de brûlure qu'il provoque dans la gorge ; il est appelé ainsi « miel amer » (36).

1.8. Circonstances d'intoxications

Les intoxications survenues sur l'île de la Réunion, sont accidentelles. Les personnes s'intoxiquent en consommant du miel contaminé par des GTX, en pensant qu'il s'agit d'un miel ordinaire (6).

En Turquie, ces intoxications font suite à une ingestion « intentionnelle ». En effet, dans cette région, les personnes s'intoxiquent en le consommant pour ses prétendues vertus thérapeutiques (23), tout en étant conscient de sa potentielle toxicité. Ces intoxications surviennent soit parce que le miel est consommé en excès soit parce qu'il contient une trop forte concentration en GTX (15,17).

1.9. Comparaison des intoxications au miel fou entre l'île de la Réunion et la Turquie

Les intoxications survenues sur l'île de la Réunion et celles survenues en Turquie sont comparées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des intoxications survenues sur l'île de la Réunion et en Turquie.

	Réunion	Turquie
Forme de miel responsable d'intoxication	Miel en gaufre	Miel en pot
Production	Accidentelle à partir d' <i>A. salicifolia</i>	Traditionnelle et volontaire à partir de <i>Rhododendron</i> sp.
Utilisation	-	Pour ses prétendues vertus thérapeutiques
Circonstances d'intoxication	Accidentelles par consommation d'un miel ordinaire contaminé	Miel consommé en excès ou GTX en trop grande quantité dans le miel consommé

2. Epidémiologie

La littérature médicale du XIXème siècle a rapporté un certain nombre d'intoxications en Europe et en Amérique du Nord. Cependant, la littérature médicale moderne fait référence, presque exclusivement, à des intoxications par du miel originaire de Turquie (17).

2.1. Localisation des cas rapportés

La grande majorité des cas d'intoxication au miel fou décrits à ce jour, ont eu lieu en Turquie, plus particulièrement, sur la côte Est de la mer Noire (17). Plus rarement, des cas ont également été rapportés dans ce pays, mais cette fois à l'Ouest dans la province de Zonguldak (37,38). Les autres cas ont été signalés en Allemagne (1 cas) (5,39), en Autriche (2 cas) (40,41), en Suisse (5), au Népal (9 cas) (5,14,33,42,43), sur de l'île de la Réunion (16 cas) (6), en Chine (1 cas) (44) et en Corée (5cas) (5,45). Ce dernier pays a importé des quantités considérables de miel toxique, mais cette importation est maintenant interdite depuis 2005. Des intoxications au Japon (29), en Nouvelle-Zélande (44), au Canada (46) et aux Etats-Unis (46) ainsi qu'au Brésil (29,46) ont été citées dans la littérature.

La répartition des intoxications au miel fou dans le monde est représentée sur la Figure 5.

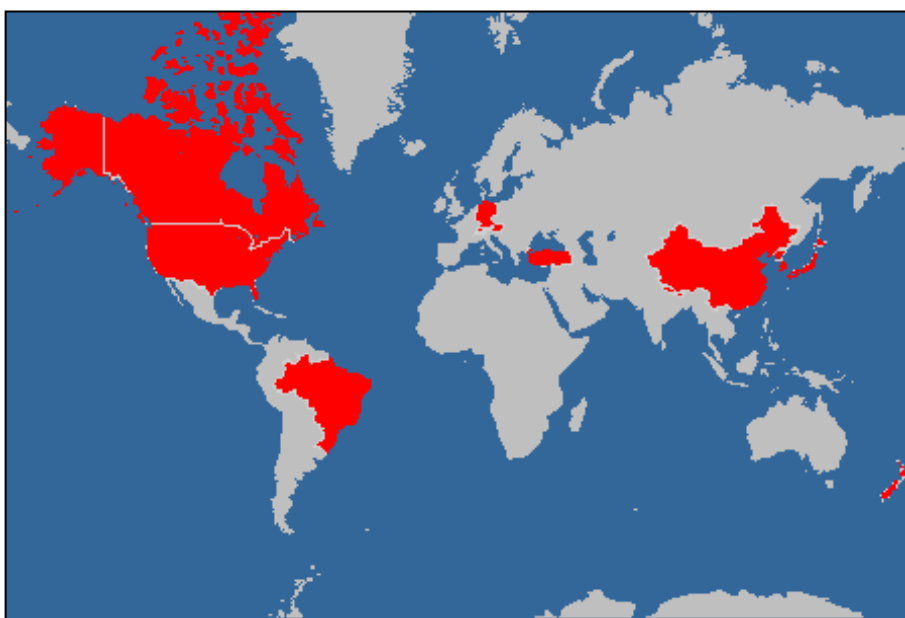


Figure 5 : Pays où des cas d'intoxications au miel fou ont été rapportés, indiqués en rouge.

Cette répartition des cas d'intoxications à travers le monde semble impliquer majoritairement un miel produit en Turquie. C'est le transport et l'exportation du miel fou turc, ainsi que l'extension de la population turque, qui semblent ainsi être responsables de cette répartition (5), même si nous pouvons émettre l'hypothèse que certains cas rapportés impliquent certainement des productions provenant d'autres régions du monde. D'ailleurs, les cas de l'île de la Réunion (1,6) et certains au Népal (14,44) illustrent cette idée. En effet, le miel responsable a été produit directement dans ces régions. Ainsi ces derniers cas soulignent l'apparition d'intoxication à un miel fou produit en dehors de la Turquie.

D'autre part, il est apparemment peu probable que cette répartition puisse s'expliquer par une différence entre les abeilles turques et celles du reste du monde. En effet, historiquement, les abeilles d'Europe et d'Amérique du Nord ont également été capables de produire du miel fou ((47,48) cités dans (17)).

Actuellement, plusieurs centaines de cas d'intoxication au miel fou ont été rapportés contre seulement 120 cas en 2007 (7,36). Toutefois, 4,5 millions de migrants turcs vivent actuellement dans l'Union européenne, et plus de 26 millions de touristes visitent chaque année la Turquie. Il semblerait que de nouveaux cas d'intoxication soient à attendre dans le futur (39).

2.2. Pourquoi la plupart des intoxications ont-elles lieu aujourd'hui en Turquie ?

Tout d'abord, d'un point de vue culturel, les apiculteurs turcs récoltent ce miel pour ses prétendues vertus thérapeutiques. Ainsi, ils le produisent volontairement pour satisfaire les consommateurs.

La technique de production du miel dans ce pays constitue la deuxième raison. Bien qu'il existe, comme en Europe ou en Amérique, des techniques industrielles de production en Turquie, du miel est encore largement produit et vendu par des apiculteurs individuels sur des marchés locaux dans le Nord-est du pays. Pour rappel, ce miel est monofloral et non traité. A l'échelle industrielle, le miel obtenu provient de milliers de ruches, ainsi si la toxine est présente dans l'une d'elles, elle sera diluée et le miel ne sera pas toxique (17).

Enfin, même si les plantes riches en GTX responsables de l'intoxication, ne sont pas propres à la Turquie et sont également présentes dans le Nord de l'Amérique, en Europe et en Asie (Figure 6), il semblerait qu'elles ne soient pas suffisamment présentes en termes de densité sur ces continents pour produire du miel toxique. En Turquie, le nombre de

Rhododendron sp. est considérable et ces espèces, menacent même les autres espèces végétales (15,17,39,49).

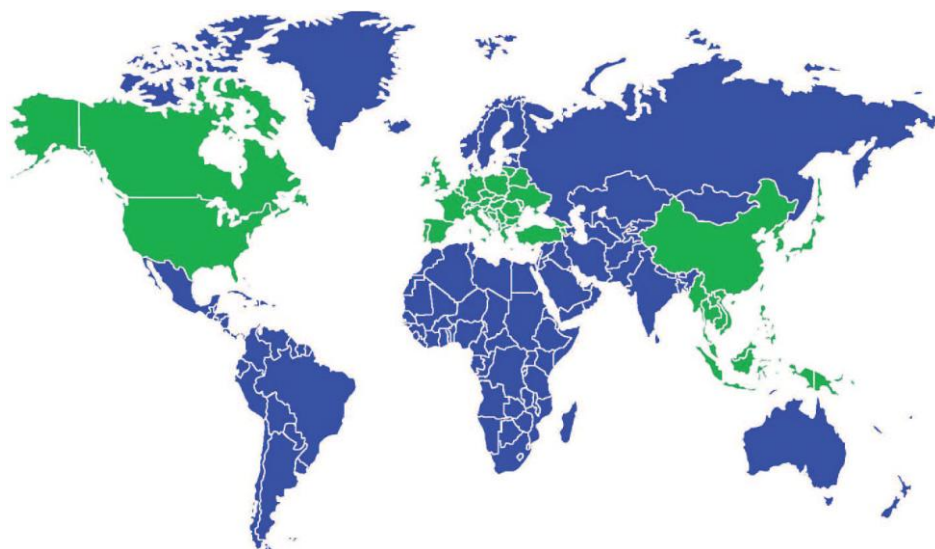


Figure 6 : Répartition mondiale des plantes contenant des grayanotoxines, indiquées par les zones en vert, d'après (39).

2.3. Caractéristiques démographiques de la population intoxiquée

L'intoxication au miel fou peut affecter les deux sexes avec une nette prédominance pour le sexe masculin (79,1%) et tous les âges, principalement les adultes jusqu'à 93 ans sauf 2 cas, un nourrisson de 7 mois (50) et un garçon de 8 ans (51). Les caractéristiques démographiques des cas d'intoxication au miel fou rapportés sont synthétisées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Synthèse des caractéristiques démographiques des cas d'intoxication par du miel fou, d'après la littérature.

Nombre de cas d'intoxication	Proportion H* et F*	Pourcentage d'H* (en %)	Age moyen et tranche d'âge	Références
21	18 H, 3 F	85,7	55 (41 à 86 ans)	(13)
66	53 H, 13 F	80,3	52 (18 à 85 ans)	(11)
23	21 H, 2 F	91,3	- (7 mois à 61 ans)	(50)
19	12 H, 7 F	63,2	43 (22 à 61 ans)	(52)
16	14 H, 2 F	87,5	41	(53) cité dans (13)
11	11 H	100	(36 à 58 ans)	(9)

Nombre de cas d'intoxication	Proportion H* et F*	Pourcentage d'H* (en %)	Age moyen et tranche d'âge	Références
8	2 H, 6 F	25	59 (35 à 75 ans)	(7)
2	2H	100	-	(54) cité dans (13)
1	1H	100	8	(51)
1	1H	100	56	(55)
1	1H	100	49	(56) cité dans (13)
1	1H	100	60	(36)
1	1H	100	66	(57)
1	1H	100	50	(58)
246	188 H, 58 F	76,4	54	(59)
1	1H	100	48	(37)
1	1H	100	56	(42)
42	33 H, 9 F	78,6	49 (32 à 73 ans)	(18)
1	1 H	100	70	(40)
21	13 H, 8 F	61,9	55 (45 à 72 ans)	(60)
1	1H	100	36	(32)
2	1 H, 1 F	50	46 (42 à 50 ans)	(61)
1	1H	100	54	(29)
1	1H	100	53	(30)
1	1H	100	76	(10)
1	1H	100	69	(39)
33	30 H, 3 F	91	52 (42 à 68 ans)	(8)
7	6 H, 1 F	85,7	40 (22 à 56 ans)	(6)
47	40 H, 7 F	85	56 (19 à 79 ans)	(62)
1	1F	100	87	(63)
1	1H	100	48	(44)
1	1H	100	67	(45)
1	1H	100	56	(41)
1	1H	100	25	(33)
46	36 H, 10 F	78,3	52 (10 à 93 ans)	(35)
16	10 H, 6 F	62,5	59 (41 à 79 ans)	(64)
1	1H	100	48	(65)
1	1H	100	46	(66)
7	7 H	100	- (22 à 25 ans)	(14)
Total : 654	517 H, 137 F	79,1	53 (7 mois à 93 ans)	

*H : homme et F : femme.

Ainsi, la majorité des intoxications au miel touchent en moyenne les hommes, âgés d'une cinquantaine d'année, ce qui s'explique par l'utilisation traditionnelle qui en est faite, comme stimulant sexuel (13,50,64).

2.4. Saisons

D'après une étude menée en 2011 en Turquie (67), il semble que la majorité des intoxications au miel surviennent en hiver et au printemps, plus particulièrement de janvier à mai (Figure 7).

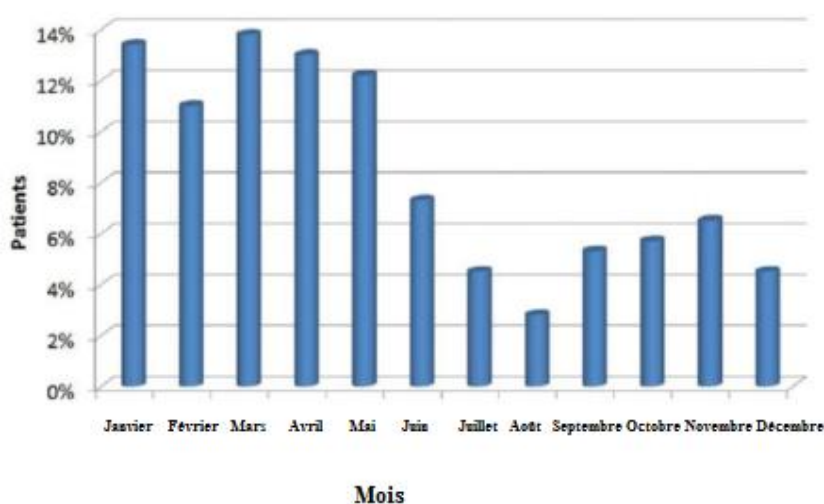


Figure 7 : Distribution des cas d'intoxication au miel fou au cours d'une année, d'après (67).

En Turquie, le miel fou est produit entre les mois de mai et juin. En effet, la floraison des *Rhododendron* sp. a lieu pendant cette période. Il est parfois nécessaire que les apiculteurs montent leurs ruches en altitude, où ces fleurs sont plus abondantes (62). Le miel produit au printemps est plus toxique et contient des concentrations plus élevées en GTX, par rapport à celui produit pendant les autres saisons (7). De plus, lorsqu'il y a de fortes précipitations pendant cette saison, les intoxications au miel fou sont plus rares car le miel contient alors moins de GTX (62). Les intoxications sur l'île de la Réunion ont toutes eu lieu en janvier (1,6).

2.5. Cas des intoxications sur l'île de la Réunion

Les cas d'intoxication sur l'île de la Réunion sont finalement assez anecdotiques. En ajoutant aux 7 cas de 2008, les 7 cas de 2013 et les 2 de 2007 dont les données démographiques n'étaient pas renseignées dans le Tableau 4, les cas d'intoxications sur l'île de la Réunion représentent seulement 2% des cas d'intoxication au miel fou rapportés.

En janvier 2013, 7 cas ont été signalés à l'ARS OI, suite à la consommation de miel en gaufre, acheté au festival « Miel vert » à la Plaine des Cafres (1). Cette intoxication au miel sur l'île de la Réunion n'était pas la première en date. En 2008, la filière apicole réunionnaise avait déjà dû faire face à un événement sanitaire similaire, consécutif là aussi à la consommation de miel en gaufre. Dans ce cas, une famille de 6 personnes et le producteur ont été intoxiqués (6). L'apiculteur mis en cause à l'époque serait d'ailleurs le même à être suspecté aujourd'hui (68). Un arrêté préfectoral (Annexe 2) fait référence également à des intoxications signalées en 2007, où 2 personnes auraient été intoxiquées (6), mais aucun article ne décrit ces cas.

3. Etude clinique de l'intoxication chez l'homme

L'intoxication au miel fou est généralement bénigne et ne dure pas plus de 24 heures (il est à noter que c'est ce qui était déjà suggéré dans les premiers écrits sur des intoxications au miel, dans l'ouvrage de Xénophon : « le transport cessait à peu près à la même heure où il avait pris la veille » ; cf. partie 1.2). Les symptômes d'intoxication sont liés à la présence de GTX dans le miel et sont essentiellement neurologiques et cardiaques.

3.1. Symptômes

Les données cliniques concernant les intoxications mettent en évidence un effet stimulant du miel sur le système parasympathique. Elles soulignent son activité anti-hypertensive par une diminution de la fréquence cardiaque (48 battements/min en moyenne) et de la pression artérielle (70 mmHg en moyenne) (5,17,49). Une intoxication au miel fou se compose en générale, de troubles gastro-intestinaux, d'arythmies cardiaques et de symptômes neurologiques (5,64).

Ainsi, un certain nombre de signes cliniques sont associés à cette intoxication, les principaux sont : l'hypotension artérielle (100% des cas), la bradycardie (95%), les nausées et/ou les vomissements (91%), l'hyperhidrose (74%), les vertiges (74%) et les pertes de conscience (67%). Plus rarement sont décrits des troubles de la vision ou diplopie (32%), des syncopes (30%) et une hypersialorrhée. Ces pourcentages sont issus d'une étude réalisée entre 1983 et 1986 (5,17,24,50). Plus récemment lors d'une étude menée entre avril et juin 2010, la symptomatologie observée comprenait vertiges (100%), asthénie (100%), hyperhidrose (85%), nausées et/ou vomissements (85%), hypotension (66%), présyncope (57%) et syncope (23%) (60).

Il est rapporté également des paresthésies faciales, plus précisément autour de la bouche (18), ou aux extrémités, des troubles de la coordination associée à une intense faiblesse musculaire, des démangeaisons dans la bouche et le nez (64), des rougeurs au niveau de la peau et des yeux (64), des céphalées, des douleurs abdominales (crampes) et une lipothymie (8,46). Dans de rares cas, convulsions, coma et sécheresse cutanée ont été mentionnés (5,9,51).

De plus, l'exposition aux GTX a été étudiée sur les fonctions hépatiques et rénales chez le rat. Une exposition chronique ou aiguë à GTX I provoque une hépatotoxicité et une

néphrotoxicité. L'exposition aiguë à GTX I (69), à faible dose, conduit à une néphrotoxicité qui est caractérisée par une hématurie et une protéinurie, avec réduction des protéines totales plasmatiques, mais sans changement histologiques dans le parenchyme rénal. L'hépatotoxicité a lieu à des doses plus élevées et est caractérisée par de significatives modifications histologiques (Figure 8.B) : dilatation de la veine hépatique centrale, congestion hépatique (anomalie circulatoire du foie), nécroses et infiltration de cellules inflammatoires dans l'espace porte et le parenchyme hépatique (69). Bien que rapportées dans les études animales, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité n'ont ni été citées, ni particulièrement été étudiées chez l'homme (15).

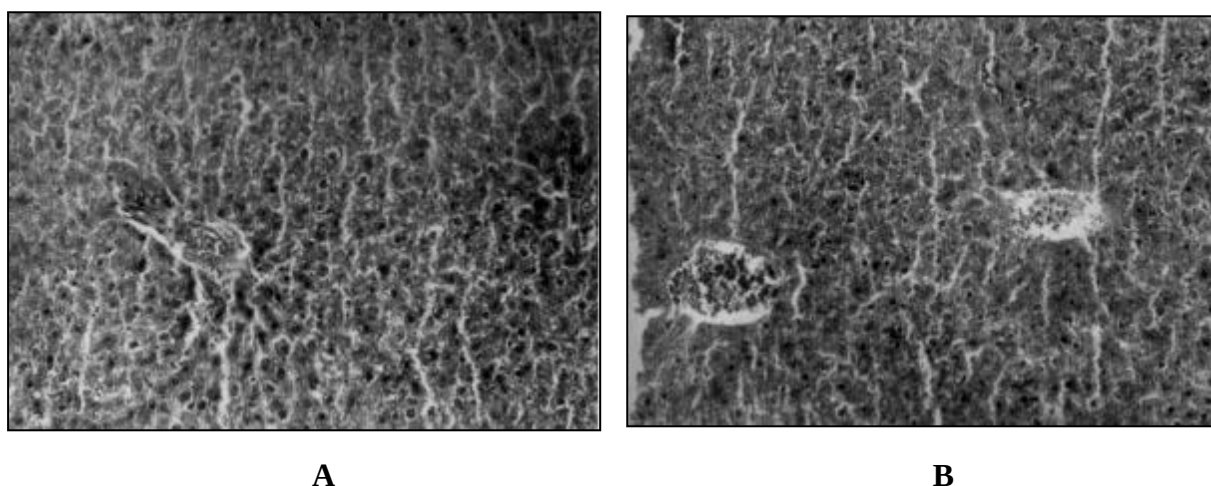


Figure 8 : Observation microscopique du foie d'un rat.

A- Ne présentant aucune lésion significative ; B- Présentant une dilatation veineuse centrale, une congestion et une nécrose (Coloration H & E. x 40), d'après (69).

L'intoxication au miel fou peut être responsable de symptômes graves mais sans aucun troubles hématologiques et biochimiques (64).

Enfin, les troubles du rythme cardiaque sont fréquents lors d'une intoxication. Ils seraient liés aux perturbations des flux sodiques au niveau du nœud sinusal. Particulièrement, l'augmentation du courant entrant et la diminution du courant sortant au niveau de la membrane du nœud sinusal affaiblissent le potentiel d'action (PA). Un PA diminué semble causer le dysfonctionnement de ce nœud (32,42). Les patients sous bêta-bloquants ou sous traitements antihypertenseurs semblent plus sensibles à ces troubles cardiaques (18). Divers troubles ont été rapportés dans la littérature et sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Synthèse des différents troubles cardiaques rencontrés chez 393 patients intoxiqués par du miel fou, d'après la littérature.

Nombre de cas	Troubles du rythme							Références
	Bradycardie sinusale	Fibrillation auriculaire	Rythme nodal	Bloc de branche du faisceau gauche	Bloc auriculo-ventriculaire complet	Rythme sinusal normal	Autres	
21	17	1	2	1	0	0	-	(13)
66	66	0	0	0	0	0	-	(11)
23	14	0	7	0	2	0	-	(50)
19	15	0	0	0	4	0	-	(52)
16	12	0	3	0	1	0	-	(53) cité dans (13)
11	11	0	0	0	0	0	-	(9)
8	4	0	3	0	1	0	-	(7)
2	0	0	0	0	0	0	2 Bradyarythmie	(54) cité dans (17)
1	1	0	0	0	0	0	-	(51)
1	0	0	0	0	1	0	-	(55)
1	1	0	0	0	0	0	-	(56) cité dans (13)
1	0	0	0	0	0	0	1 Asystolie	(36)
1	1	0	0	0	0	0	-	(57)
1	0	0	1	0	0	0	-	(58)
1	0	0	0	0	1	0	-	(37)
1	1	0	0	0	0	0	-	(42)

Tableau 5 (suite)

Nombre de cas	Bradycardie sinusale	Fibrillation auriculaire	Rythme nodal	Bloc de branche du faisceau gauche	Bloc auriculo-ventriculaire complet	Rythme sinusal normal	Autres	Références
42	18	0	9	0	15	0	-	(18)
1	0	0	0	0	0	0	1 Bloc AV du 2 ^{ème} degré type Wenckebach	(40)
21	7	1	3	0	0	10	-	(60)
1	0	1	0	0	0	0	-	(32)
2	0	0	1	0	1	0	-	(61)
1	0	1	0	0	0	0	-	(29)
1	0	1	0	0	0	0	-	(30)
1	0	0	0	1	0	0	-	(10)
1	0	0	0	0	0	0	1 Arrêt sinusal	(39)
33	30	0	0	0	0	3	-	(8)
47	37	0	6	0	1	3	-	(62)
1	1	0	0	0	0	0	Avec Bloc de branche du faisceau gauche et très long intervalle QT	(63)
1	1	0	0	0	0	0	-	(44)
1	0	0	1	0	0	0	-	(45)
1	0	0	0	0	1	0	-	(41)
46	45	0	0	0	1	0	-	(35)
16	9	2	3	0	0	0	2 Bloc AV du 1 ^{er} degré	(64)

Tableau 5 (Suite et fin)

Nombre de cas	Bradycardie sinusale	Fibrillation auriculaire	Rythme nodal	Bloc de branche du faisceau gauche	Bloc auriculo-ventriculaire complet	Rythme sinusal normal	Autres	Références
1	0	0	0	0	0	0	1 Infarctus du myocarde de la paroi antérieure	(65)
1	0	1	0	0	0	0	Avec SWPW	(66)
2	2	0	0	0	0	0	-	(70)
1	0	0	0	0	1	0	-	(71)
1	0	0	1	0	0	0	-	(72)
1	0	0	0	0	1	0	-	(15)
Total : 398	293	8	40	2	31	16	8	

Les proportions de chaque trouble du rythme sont présentées dans le diagramme suivant (Figure 9).

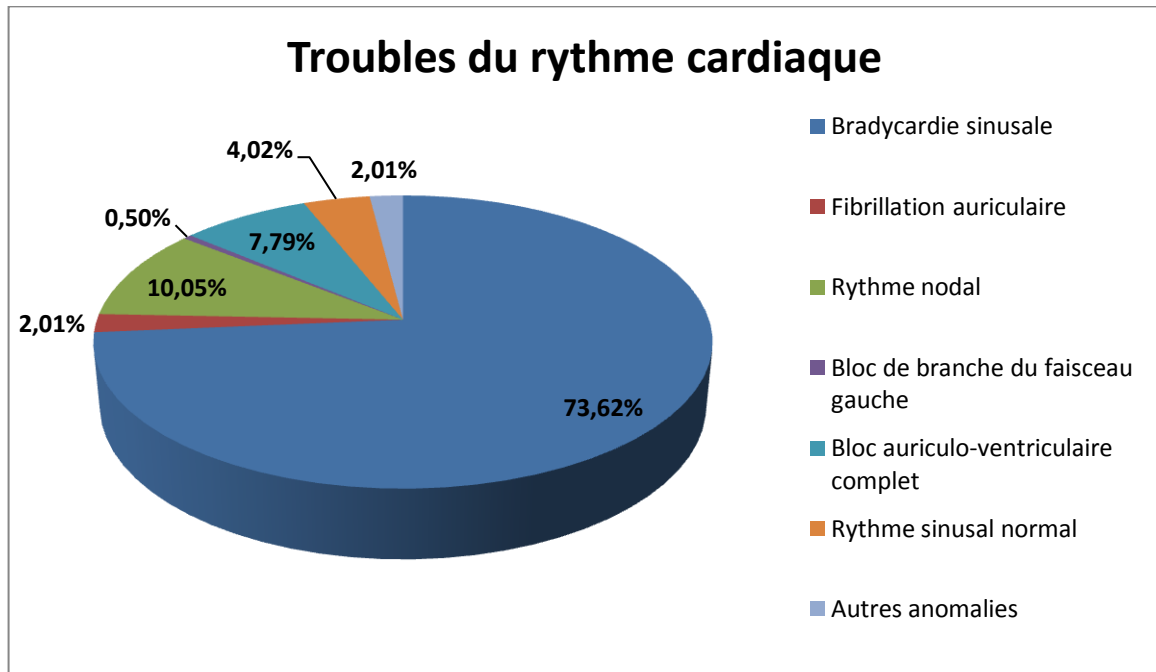


Figure 9 : Proportion de chaque trouble du rythme cardiaque lors d'une intoxication au miel fou, d'après la littérature.

La bradycardie sinusale (ondes électriques normales bien que ralenties) est le trouble du rythme le plus fréquent (73,62%). L'électrocardiogramme (ECG) permet de mettre en évidence cette bradycardie (Figure 10), mais également d'autres troubles du rythme et de la conduction cardiaque :

- Rythme nodal (10,05%) : QRS normaux et absence d'onde P (Annexe 5).
- Bloc auriculo-ventriculaire (AV) complet (7,79%) : trouble de la conduction entre le nœud AV et le myocarde ventriculaire. Le nombre d'onde P est supérieur au nombre de complexe QRS (Annexe 6).
- Fibrillation auriculaire (2,01%) (Figure 11).
- Bloc de branche du faisceau gauche (0,50%).
- D'autres anomalies (2,01%) : asystolie, bloc AV de degrés divers, syndrome de Wolff-Parkinson-White (SWPW), bradyarythmie (rythme cardiaque lent et irrégulier) et infarctus du myocarde (65,73).

Cependant, le rythme sinusal peut également être normal (Annexe 4 et Figure 12), lors de ce type d'intoxication (4,02%).

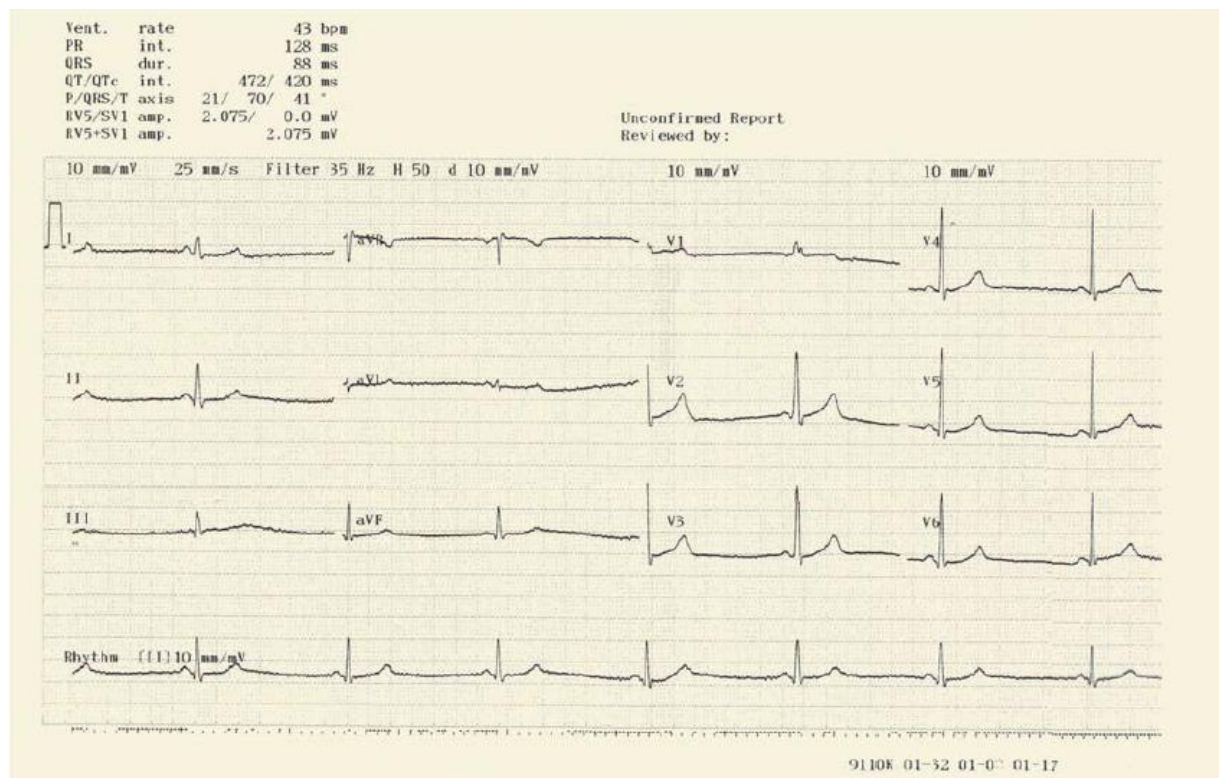


Figure 10 : ECG lors de l'admission d'un patient intoxiqué par du miel fou, présentant une bradycardie sinusale à 43 battements / minute, d'après (42).

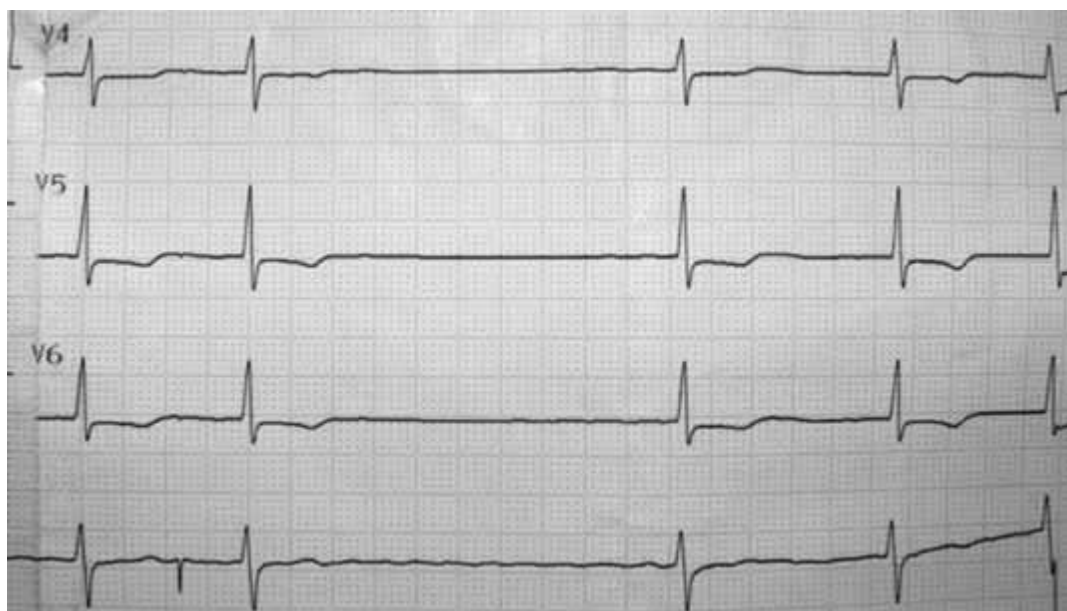


Figure 11 : ECG d'un patient intoxiqué par du miel fou, présentant une fibrillation auriculaire, d'après (30).

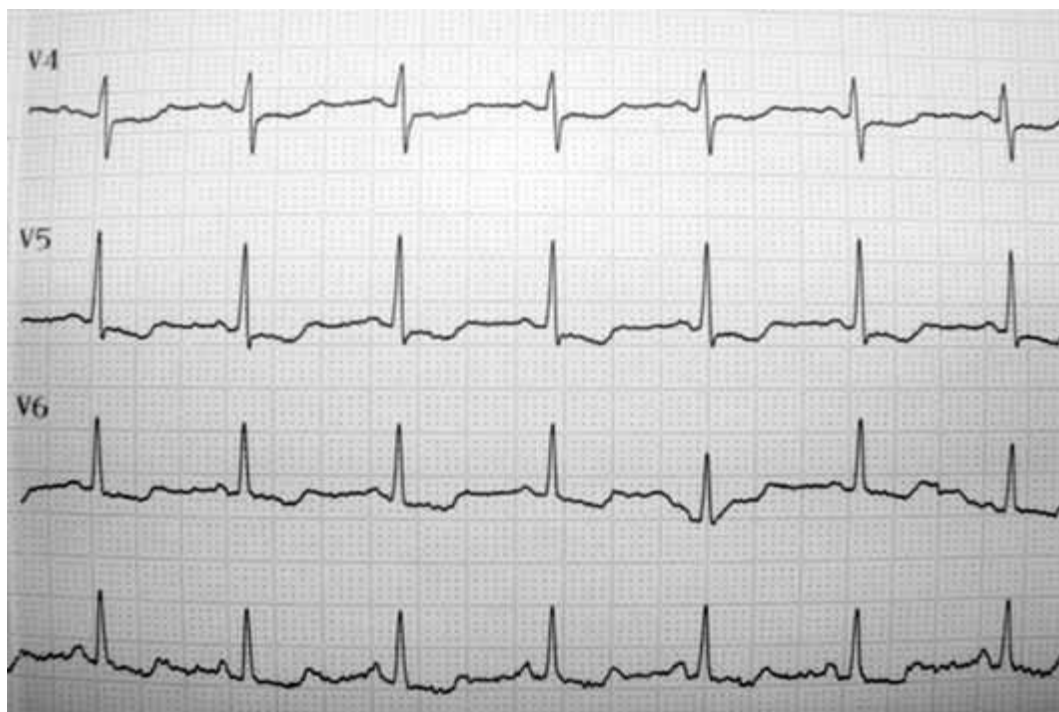


Figure 12 : ECG après la récupération du même patient, présentant un rythme sinusal normal de 90 battements / minute, d'après (30).

3.2. Dose toxique et durée de l'intoxication

3.2.1. Dose toxique

La quantité exacte de miel fou responsable d'une intoxication n'est pas décrite avec précision, mais semble être relativement faible. Dans certains cas, une cuillère à café (5 g) suffit pour déclencher l'intoxication. D'après la littérature, les patients s'intoxiquent en consommant des quantités variables de miel : 5 à 300 g (Tableau 6). Les formes et les compositions des miels sont différentes, ainsi la dose toxique ingérée varie. En général, la sévérité de l'intoxication dépend de la quantité de miel fou ingérée et particulièrement de la concentration en GTX contenue dans celui-ci (5,8,49). L'amalgame est souvent fait entre la quantité de miel fou consommée et la sévérité des symptômes. C'est souvent lors de l'augmentation de la quantité de miel fou consommée que les effets toxiques apparaissent. Toutefois, les GTX n'ont pas une distribution homogène à l'intérieur du miel. Ainsi, la quantité ingérée ne devrait pas être utilisée comme un critère de sévérité de l'intoxication (74). A terme, il faudrait déterminer une concentration limite en GTX qui fixerait le seuil de toxicité du miel plutôt que d'avoir comme référence une quantité de miel consommée.

Tableau 6 : Récapitulatif de la quantité de miel fou consommée responsable de l'intoxication, du temps de récupération après l'intoxication et du délai d'apparition des symptômes après l'ingestion de miel fou, d'après la littérature.

Quantité de miel fou consommée responsable de l'intoxication	Temps de récupération après l'intoxication en heures (h)	Délai d'apparition des symptômes après l'ingestion de miel fou en heures (h)	Références
de 50 à 300 g	23	1,0 (de 0,5 à 2,5)	(13)
13,5 g (de 5 à 30 g)	24	1,2 (de 0,5 à 3)	(11)
de 10 à 25 g	24 à 48	de 0, 5 à 2	(50)
55 g (de 30 à 180 g)	24	-	(52)
50 g	24	-	(53) cité dans (13)
de 5 à 100 g	24 à 120	de 0, 5 à 2	(9)
de 20 à 150 g	19 (de 2 à 72)	-	(7)
-	24	-	(54) cité dans (13)
3 cuillères à sorbets	24	1,0	(51)
-	24	-	(55)
-	24	-	(56) cité dans (13)
quelques cuillérées	96	-	(36)
2 bols	-	-	(58)
100 mL	-	-	(37)
30 mL	24	1,0	(42)
de 20 à 200 g	12 à 36	de 0,2 à 4	(18)
-	15 (6,3 à 14,7)	3,4	(60)
de 10 à 15 g	48	4 à 5	(32)
-	120	-	(61)
30 g	48	1	(29)
quelques cuillères	48	2	(30)
15 g	-	-	(10)
43,9 g	3 à 8	1,6 (de 1 à 3)	(8)
1 à plus de 4 cuillérées	10	3	(62)
15 g	-	-	(63)
30 mL	48	1	(44)
20 mL	-	2	(45)
-	-	1	(41)
43,5 g	28	1,6	(64)

Quantité de miel fou consommée responsable de l'intoxication	Temps de récupération après l'intoxication (h)	Début des symptômes après l'ingestion de miel fou (h)	Références
15 g (soit 1 cuillère à soupe)	-	2	(65)
quelques cuillerées	-	-	(66)
Résumé : 5 à 300 g	37 (2 à 120)	0,2 à 5	

3.2.2. Durée de l'intoxication

Les symptômes débutent quelques minutes (10 à 20 minutes) jusqu'à 5 heures après l'ingestion de miel fou, d'après la littérature (Tableau 6). Le délai exact est inconnu et semble dose-dépendant (8,24).

Même dans les intoxications graves, les symptômes persistent en moyenne 37 heures (Tableau 6). Il a été rapporté des temps de récupération après l'intoxication compris entre 2 et 120 heures (7,9). Cette période est plus ou moins longue selon la sévérité des symptômes observés chez les patients (64). Ce temps de récupération correspond au temps nécessaire à la disparition des symptômes et à la normalisation des signes vitaux (13).

3.3. Mortalité

Dans les années 1800, lorsque l'atropine et les perfusions salines n'étaient pas disponibles, le taux de mortalité était significatif : 1/14 (7%) dans une série et 3/23 (13%) dans une autre. Depuis la définition médicale de l'intoxication au miel fou en 1983, aucun cas mortel n'a été décrit (7,17).

3.4. Diagnostic

Le diagnostic d'une intoxication au miel fou en Europe ou en Amérique du Nord devrait faire l'objet d'une déclaration obligatoire à l'avenir (17). Celle-ci permettrait d'alerter les services de santé publique qui pourraient décider des mesures de traitement et de prévention à mettre en place, et de recueillir des données qui établiraient le nombre exact de cas observés. Le but à terme serait ainsi de sensibiliser la population au risque encouru en consommant ce type de miel, de dissuader certains apiculteurs qui le produisent et d'alerter les autres producteurs quant au potentiel toxique de ce miel.

3.4.1. Clinique et interrogatoire

Une possible intoxication au miel fou doit être envisagée chez un patient en bonne santé, admis au service des urgences avec une hypotension inexpliquée, une bradycardie ou une anomalie du rythme et des troubles neurologiques. Très souvent, nausées, vomissements, hyperhidrose et vertiges sont présents. Lors d'une suspicion d'intoxication à ce miel, le praticien doit obtenir une anamnèse alimentaire détaillée. La consommation d'un miel non transformé produit et vendu par un apiculteur dans une zone où la concentration en Ericacées toxiques est élevée sert de confirmation au diagnostic (7,8,44).

Les cliniciens d'Amérique du Nord et d'Europe sont très rarement amenés à diagnostiquer cette intoxication. Ils doivent alors être attentifs à ces signes et s'interroger sur un éventuel séjour en Turquie ou sur une ingestion de miel provenant de ce pays lorsque qu'un patient présente ce tableau clinique.

Le diagnostic repose également sur le caractère collectif et sur les circonstances de survenue de cette intoxication (6).

3.4.2. Diagnostic différentiel

L'intoxication au miel fou peut être confondue avec d'autres intoxications responsables également de bradycardie et d'hypotension pouvant être causées par les bêta-bloquants, la clonidine, les glycosides cardiaques ou bien les bloqueurs des canaux calciques.

L'interrogatoire étroit du patient est alors indispensable pour établir le diagnostic d'intoxication au miel fou.

En 2013, à Hong Kong, un diagnostic d'intoxication a été établi après l'identification de GTX dans l'urine du patient et dans les échantillons de miel consommé grâce à une chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (44).

La mise en évidence des GTX dans le sang des patients permettrait de poser avec certitude le diagnostic, mais ces dosages ne sont pas encore disponibles chez l'homme (6,75).

3.4.3. Détection du pollen dans le miel

L'intoxication au miel fou est, le plus souvent, diagnostiquée d'après l'interrogatoire du patient. Cependant, dans certains cas difficiles, il peut être confirmé par une identification microscopique du pollen (pollen en tétrades de *R. ponticum*) et/ou par mise en évidence de la toxine par chromatographie dans l'échantillon de miel présumé toxique (7,37,61).

L'identification microscopique du pollen a déjà permis de confirmer des intoxications par la mise en évidence du pollen de *Rhododendron* sp. dans du miel suspect (Figure 13) (37,65).

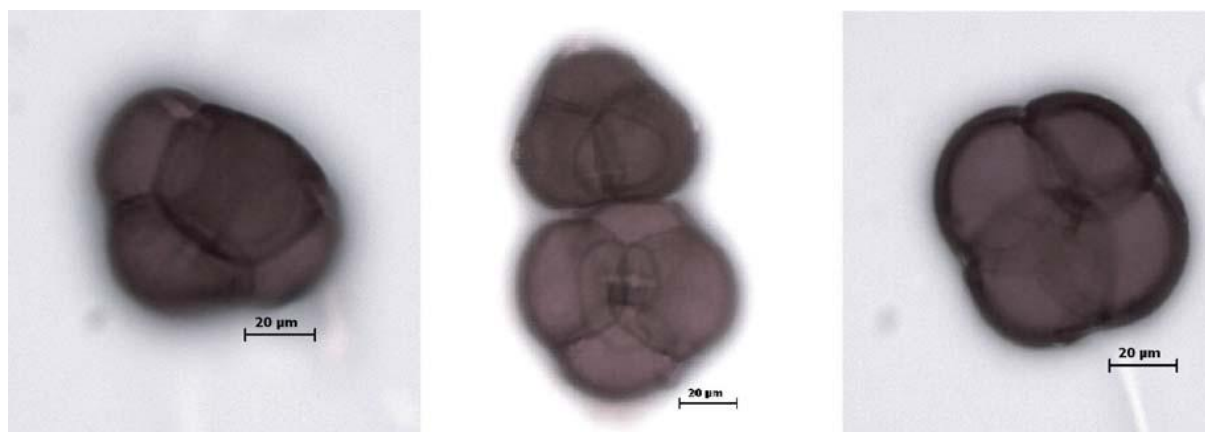


Figure 13 : Microphotographies de pollen d'espèces appartenant au genre *Rhododendron* retrouvé dans du miel, de différents points de vue, d'après (65).

3.5. Prise en charge et pronostic

L'intoxication au miel fou a un bon pronostic. Depuis que des traitements sont disponibles, plus aucun cas mortel n'a été rapporté dans la littérature. Les signes cliniques sont temporaires et facilement pris en charge. Étant donné qu'aucun antidote n'est connu pour les GTX, seules des mesures symptomatiques peuvent être recommandées (76).

Bien que les symptômes puissent être alarmants, l'évolution est souvent caractérisée par une amélioration rapide et une guérison complète sans séquelle, permettant un retour à domicile dans les 24 heures après l'ingestion. De fait, la prise en charge se limite, la plupart du temps (à faible dose, cas bénins), à une surveillance médicale étroite (contrôle des signes vitaux et de l'état mental, et surveillance cardiaque continue par ECG) pendant 3 à 6 heures après l'intoxication associée à des traitements symptomatiques (antiémétiques par exemple) (6,8,46).

Dans les cas graves pris en charge aux urgences, le traitement comprend de l'atropine pour la bradycardie sinusale (0,5 mg une à deux fois, voire jusqu'à 2 mg en cas de non réponse) et un remplissage vasculaire par une perfusion de solution saline (100 mL/h) pour l'hypotension. Il serait judicieux, lorsque les patients ne présentent pas de dépression respiratoire, d'avoir recours à l'AF-DX116 (molécule comparée à l'atropine dans une étude (5)) dans le traitement de la bradycardie, étant donné qu'il présente moins d'effets secondaires que l'atropine (5). Certains auteurs ont également rapporté l'utilisation d'isoprénaline, d'amiodarone (32), d'acide acétylsalicylique (10) ou d'énoxaparine (10), la mise en place temporaire d'un stimulateur cardiaque externe, l'administration de perfusions de glucose et d'électrolytes et dans des cas graves, l'utilisation d'agents anti-hypotenseurs comme l'aramine (métaraminol = n-hydroxynorephedrine) et novadral (norfénéfrine HCl). Des protocoles de l'Advanced Cardiac Life Support sont à considérer pour traiter les bradyarythmies dans les rares cas où l'atropine et la solution saline seraient insuffisants (5,9,17,46,49).

Il n'est pas nécessaire d'effectuer une stimulation électrique en cas d'intoxication, même si le recours à la cardioversion a déjà été rapporté (32) ; l'atropine constitue, en effet, un traitement suffisant (41).

Cette évolution favorable en seulement quelques heures (3 à 8 heures) s'explique par la métabolisation et l'excrétion rapide de l'organisme des GTX. De même, la fréquence cardiaque et la pression artérielle reviennent à la normale après 2 à 9 heures (8).

4. L'intoxication au miel fou est-elle un toxidrome cholinergique ?

Les symptômes étant relativement similaires entre un toxidrome cholinergique (ou syndrome toxique) et une intoxication au miel fou, la question pouvait se poser quant à un mécanisme biochimique commun. Une étude a ainsi été réalisée entre septembre 2008 et 2009 pour répondre à cette question (77).

Un toxidrome cholinergique se caractérise par une diminution du taux de cholinestérase. En effet, l'inactivation de la dégradation est responsable d'une accumulation d'acétylcholine dans les synapses nerveuses et dans les jonctions neuromusculaires. Il existe deux cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la pseudocholinestérase (BChE). Bien qu'il soit plus utile de mesurer le taux d'AChE, il est plus fonctionnel et moins coûteux de mesurer le taux de BChE en pratique.

Un toxidrome cholinergique est mis en évidence par une diminution du taux de BChE chez les patients. Le mécanisme de base de ce toxidrome est l'inactivation de l'AChE conduisant à une accumulation d'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire. De cette manière, en plus des régions nicotiques de la jonction neuromusculaire, les régions nicotiques des ganglions sympathique et parasympathique ainsi que les régions muscariniques dans le système nerveux périphérique et central sont touchées.

L'intoxication au miel fou ne touche que les récepteurs muscariniques (inhibition) alors que dans le toxidrome cholinergique se sont à la fois les récepteurs muscariniques et nicotiques qui sont atteints. Les résultats (taux faible de BChE chez 10% des patients) montrent que l'intoxication au miel fou n'affecte que le système nerveux périphérique tandis que l'intoxication cholinergique affecte à la fois le périphérique et le central.

Bien que les symptômes d'une intoxication au miel fou ressemblent à ceux d'un toxidrome cholinergique, cette étude a permis de prouver qu'ils ne partagent pas le même mécanisme biochimique. L'intoxication au miel fou n'est pas un toxidrome cholinergique.

5. Mesures mises en place et prévention

5.1. Mesures mises en place

Face à ce constat et conscients du potentiel toxique de ce miel, certains pays ont pris des mesures pour éviter de nouveaux incidents. La Corée a interdit l'importation de ce miel en 2005 (45). Plus récemment, en 2010, en Allemagne, l'Institut Fédéral d'évaluation des risques allemands (BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung) (78) a recommandé à sa population de ne plus consommer de miel de *Rhododendron* sp. provenant de la région de la mer Noire en Turquie. Cet institut a ouvert le questionnement sur la présence éventuelle d'autres composés toxiques à la structure proche des GTX dans ce miel, la possible instabilité à la chaleur des GTX ou bien encore la détermination de seuil de toxicité pour ces toxines. Enfin, en 2013, sur l'île de la Réunion, un arrêté préfectoral (Annexe 2) a été pris afin d'interdire la vente de miel en gaufre du 1^{er} novembre au 31 mars, période de floraison des plantes réputées toxiques. Cette interdiction ne concerne que le miel en gaufre ; en effet, le procédé de production du miel en pot sur cette île garantit l'absence de risque pour le consommateur d'après un communiqué de presse (Annexe 3). Celui-ci « est extrait de plusieurs cadres, donc les toxines sont trop diluées pour représenter un risque pour la santé », indique Mr Patrick Garcia de la DAAF (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt) (79), tandis que les alvéoles du miel en gaufre « peuvent être très concentrés en pollen toxique » d'après le Dr Renault de l'ARS (Agence Régionale de Santé). La date de production doit être mentionnée sur l'étiquetage pour permettre aux consommateurs de la contrôler au moment de l'achat.

5.2. Prévention

L'intoxication au miel fou peut devenir un réel problème de santé publique. Ainsi, il n'est pas recommandé de le consommer même pour ses prétendues vertus thérapeutiques. Actuellement, peu d'informations sur la prévention de l'intoxication aux GTX sont disponibles. Il n'existe aucune détection rapide, fiable et simple des GTX dans le miel (utilisable par les consommateurs), ni de méthode afin de diminuer leur concentration. Des mesures de sécurisation de la filière de fabrication devraient alors être instaurées. Compte tenu de son pouvoir toxique, il serait intéressant qu'une étiquette de danger soit présente sur les pots de miel fou (51).

Par principe de précaution, il serait judicieux de mettre en place, comme à la Réunion, un arrêté afin d'interdire la vente de miel pendant les saisons endémiques. Ainsi, des mesures

visant à éviter de nouvelles intoxications devraient être prises. Elle consiste en l'éloignement des ruches des zones riches en Ericacées, la recherche du taux en GTX des miels vendus dans les zones à risque et le mélange des miels afin d'éviter la consommation d'un miel monofloral (6).

6. Coût pour le système de santé en Turquie

Cette intoxication a un bon pronostic. En effet, les patients sortent, en général, après une courte période d'observation. Par conséquent, les médecins et les patients ignorent l'impact socio-économique de l'intoxication au miel fou.

Une étude menée sur l'année 2011 (59) a permis d'évaluer l'impact économique de cette intoxication sur le système de santé en Turquie. Il en ressort un coût moyen pour un patient de 81,8 Livres Turques (TL) soit 29,60 € environ ; les coûts s'étendent de 33,63 à 1697,35 TL soit de 12,16 à 613,54 €. Le coût total des 246 patients intoxiqués par du miel fou s'élève à 27303,21 TL soit 9869,29 €. Il est important de noter également que cet empoisonnement au miel fou en Turquie, se produit beaucoup plus fréquemment que ne le rapporte la littérature. Par comparaison, cette intoxication coûte 10 000 fois moins chère qu'une épidémie de grippe en France (80) mais constitue quand même à petite échelle un coût pour le système de santé.

Jusqu'à présent, la prise en charge des patients s'effectuait en général aux soins intensifs. Mais par la connaissance de ce diagnostic, les patients pourront dès lors, être pris en charge directement au service des urgences engendrant ainsi moins de frais (7).

Partie II : Plantes incriminées

1. Contexte

Nous l'avons évoqué dans le précédent chapitre, certains *Rhododendrons* sp. en Turquie et *A. salicifolia* sur l'île de la Réunion sont impliqués dans des cas d'intoxication. Parmi les 5 espèces de *Rhododendron* sp. retrouvées en Turquie (7,50,81), *R. ponticum* et *R. luteum* constituent les principales sources d'intoxication au miel (36,46). D'ailleurs, le miel produit à partir de ces espèces est réputé pour contenir une forte concentration en GTX (29). Des cas d'intoxication décrits au Népal impliquant un miel produit dans ce pays mettent en cause une autre espèce de *Rhododendron* sp. : *R. simsii* (14).

Il est rare que l'origine botanique exacte des miels responsables d'intoxication soit rapportée dans la littérature. C'est le plus souvent l'origine géographique, où le miel a été produit, qui est citée. L'origine géographique de différents miels fous, impliqués dans des cas d'intoxication rapportés dans la littérature, est présentée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Origine géographique de miels fous impliqués dans des intoxications, d'après la littérature.

Origine du miel fou	Références
Miel turc	(56) et (54) cités dans (7)
Est de la mer Noire en Turquie	(53) cité dans (7), (51), (55), (7), (36) et (70)
Région centrale le long de la mer Noire en Turquie	(50)
Région de la mer Noire en Turquie	(9), (29) et (32)
Ouest de la mer Noire en Turquie	(52)
Népal	(14) et (44)
La Réunion	(6) et (1)
Canada	(82)

Ce tableau permet de confirmer qu'effectivement la plupart des cas d'intoxication signalés impliquent des miels fous produits en Turquie (35). La flore de ce pays, plus particulièrement les montagnes le long des côtes de la mer Noire à l'Est (16), constitue le réservoir principal des plantes impliquées dans ces intoxications. Le Népal et l'île de la Réunion constituent deux réservoirs mineurs. D'autre part, la présence de GTX a également été signalée dans deux échantillons de miel nord-américain, l'un provenant des Etats-Unis probablement produit à partir de *Kalmia latifolia* (83) et l'autre du Canada (82). Le premier

miel a été analysé dans le cadre d’une vaste enquête sur la composition des miels américains (83) et aucune information ne nous permet d’affirmer qu’il a été impliqué dans des cas d’intoxication. Le second miel a été étudié car il a provoqué l’intoxication de trois personnes à la suite de sa consommation (82). L’espèce végétale responsable n’a pas été identifiée par analyse pollinique mais il proviendrait apparemment du Canada (Grouse Mountain en Colombie britannique).

Les GTX étant les toxines responsables, il est important de connaître les plantes dont elles sont issues. Présentes dans plusieurs régions du monde (Figure 6) : Turquie, Japon, Népal, certaines régions d’Europe, Amérique du Nord (Colombie britannique) et Brésil ; les plantes sources de GTX sont listées dans le Tableau 8 (11,18).

Tableau 8 : Espèces végétales contenant des grayanotoxines, d’après (14,15) , annexe 2 et 7.

Espèces	Niveau de présence des GTX*
<i>Agauria</i> sp.	
<i>A. salicifolia</i>	NR
<i>Pieris</i> sp.	
<i>P. japonica</i>	+++
<i>P. floribunda</i>	+++
<i>P. formosa</i>	+++
<i>Rhododendron</i> sp.	
<i>R. luteum</i>	++
<i>R. simsii</i>	NR
<i>R. ponticum</i>	++
<i>R. occidentale</i>	+
<i>R. macrophyllum</i>	+
<i>R. albiflorum</i>	+
<i>R. maximum</i>	++
<i>R. japonicum</i>	+
<i>R. catawbiense</i>	+++
<i>R. decorum</i>	++
<i>R. mucronulatum</i>	++
<i>Kalmia</i> sp.	
<i>K. latifolia</i>	+
<i>K. angustifolia</i>	+++
<i>K. polifolia</i>	+++
<i>Pernettya</i> sp.	
<i>P. coriaceae</i>	++

*+ : faible, ++ : moyen, +++ : élevé et NR : non renseigné. Les cases bleues indiquent les 4 espèces impliquées dans des intoxications.

Ainsi, 5 genres (*Agauria*, *Pieris*, *Rhododendron*, *Kalmia* et *Pernettya*) appartenant tous à la famille des Ericacées sont sources de GTX. Ces espèces constituent un danger

potentiel dans une région, dès lors qu'elles en dominent la végétation. *R. mucronulatum* en Corée ; *R. decorum* en Chine ; *R. occidentale*, *R. macrophyllum* et *R. albiflorum* à l'Ouest des Etats-Unis ; *Kalmia latifolia* et *K. angustifolia* à l'Est de l'Amérique du Nord (15,17) sont des sources bien connues de GTX. Néanmoins, ces espèces n'ont jamais été citées dans la littérature comme étant responsables d'intoxication au miel fou.

Sur les 19 espèces décrites comme contenant des GTX seulement 4 ont été rapportées dans la littérature comme impliquées dans des cas d'intoxication au miel fou. Ce tableau montre également que les plantes les plus riches en toxines ne sont pas forcément celles ayant été impliquées dans les intoxications.

Même si nous n'écartons pas l'éventualité que d'autres espèces peuvent être impliquées, ce sont ces 4 espèces appartenant toutes à la famille des Ericacées : *R. luteum*, *R. ponticum*, *R. simsii* et *A. salicifolia* que nous détaillerons par la suite.

Pour une meilleure compréhension des sous-parties 2. à 4., certains termes botaniques sont définis en Annexe 8.

2. La famille des Ericacées

Les espèces tenues pour responsable de l'intoxication au miel fou appartiennent toutes à la famille des Ericacées. Cette famille compte près de 3000 espèces de plantes réparties en 120 genres, dont *Rhododendron* et *Agauria* (84). Les plantes de cette famille possèdent les caractéristiques suivantes (84) :

- plantes sans laticifères non carnivores
- pétales libres
- anthères oscillantes
- poils non étoilés
- fleurs pendantes ou dressées
- graine à tégument
- pollen en tétrades

2.1. Position systématique selon APG III (Angiosperm Phylogeny Group)

Datant de 2009, l'APG III est la troisième version de la classification botanique des Angiospermes basée sur des analyses de phylogénie moléculaire (Figure 14).

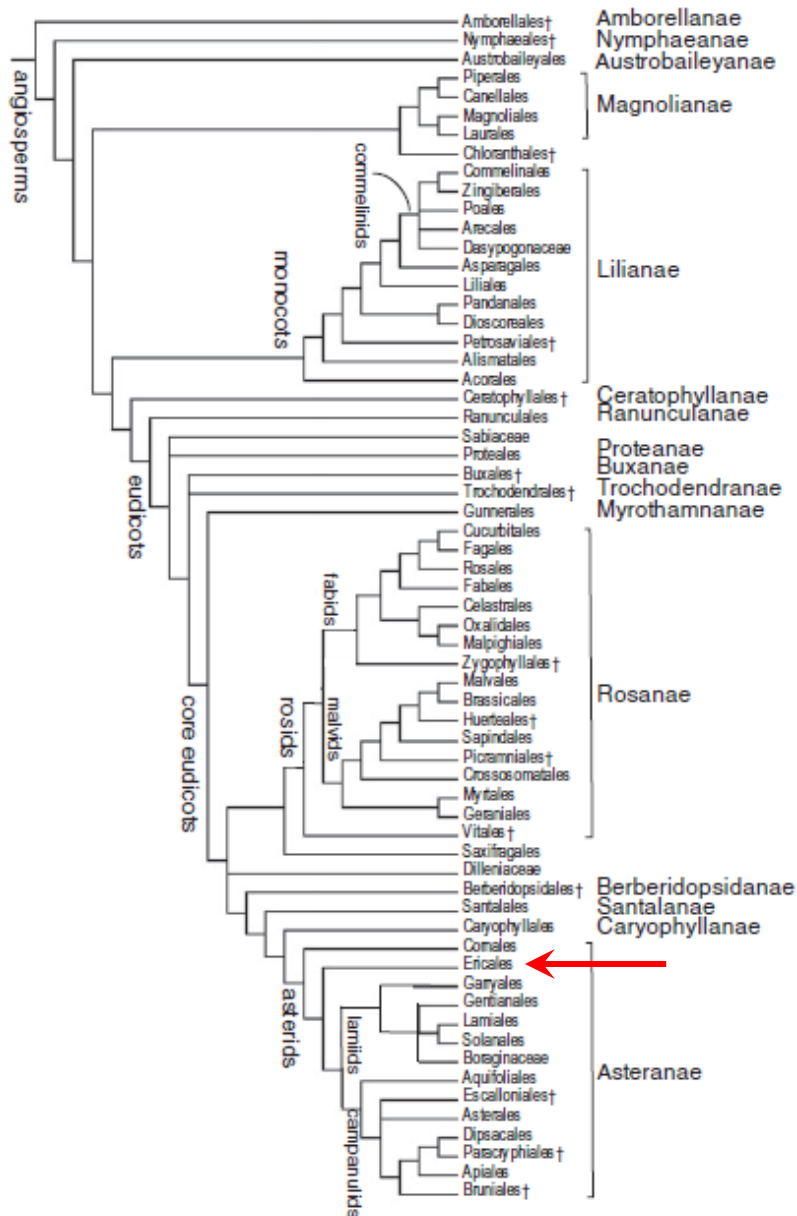


Figure 14 : Arbre phylogénétique selon l'APG III superposée avec une classification proposée par Reveal et Chase, d'après (85). La flèche rouge indique le positionnement de l'Ordre contenant les Ericacées.

La classification de la famille des Ericacées est rappelée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Classification des Ericacées selon l'APG III.

Classification	APG III
Superclasse	Eudicotylédones
Classe	Eudicotylédones supérieurs
Sous-classe	Astéridées
Ordre	Ericales
Famille	Ericacées

2.1.1. Sous-classe des Astéridées

Les Astéridées sont des Eudicotylédones supérieurs réunissant 91 800 espèces réparties en 10 ordres et 99 familles (86). Ce sont les Triporées à pétales et carpelles soudés. Cette soudure s'accompagne souvent d'une soudure des étamines à la corolle. Les inflorescences sont de plus en plus serrées à fleurs gamopétales (rarement dialypétales). La gamopétalie assure une meilleure protection des organes reproducteurs et s'adapte plus facilement à un type déterminé d'insecte pollinisateur. Par simplification évolutive, ils comprennent un tissu nucellaire peu développé et un seul tégument (84,86,87). Ils possèdent un ovaire supère et un androcée polystémone ou obdiplostémone. Ils se divisent en 2 : les Protoastéridées (Ordre des Cornales et Ericales) et les Euastéridées (86). L'ordre des Cornales possède des feuilles souvent opposées et un ovaire infère tandis que l'ordre des Ericales possède des feuilles alternes et un ovaire souvent supère (84).

2.1.2. Ordre des Ericales

Les Ericales forment un ordre transitoire de végétaux entre les dialypétales et les gamopétales. En effet, parmi les Ericales, seules quelques familles possèdent encore des fleurs dialypétales ((88) cité par (87)). Cette ordre se divise en 26 familles (Figure 15), dont celle des Ericacées englobant environ 9 450 espèces (84). Dans cet ordre les fleurs sont souvent pentacycliques et comprennent deux verticilles d'étamines. Par ailleurs, certaines familles possèdent encore des ovules bitégumentés (84). La figure ci-dessous représente la division de l'ordre des Ericales (Figure 15).

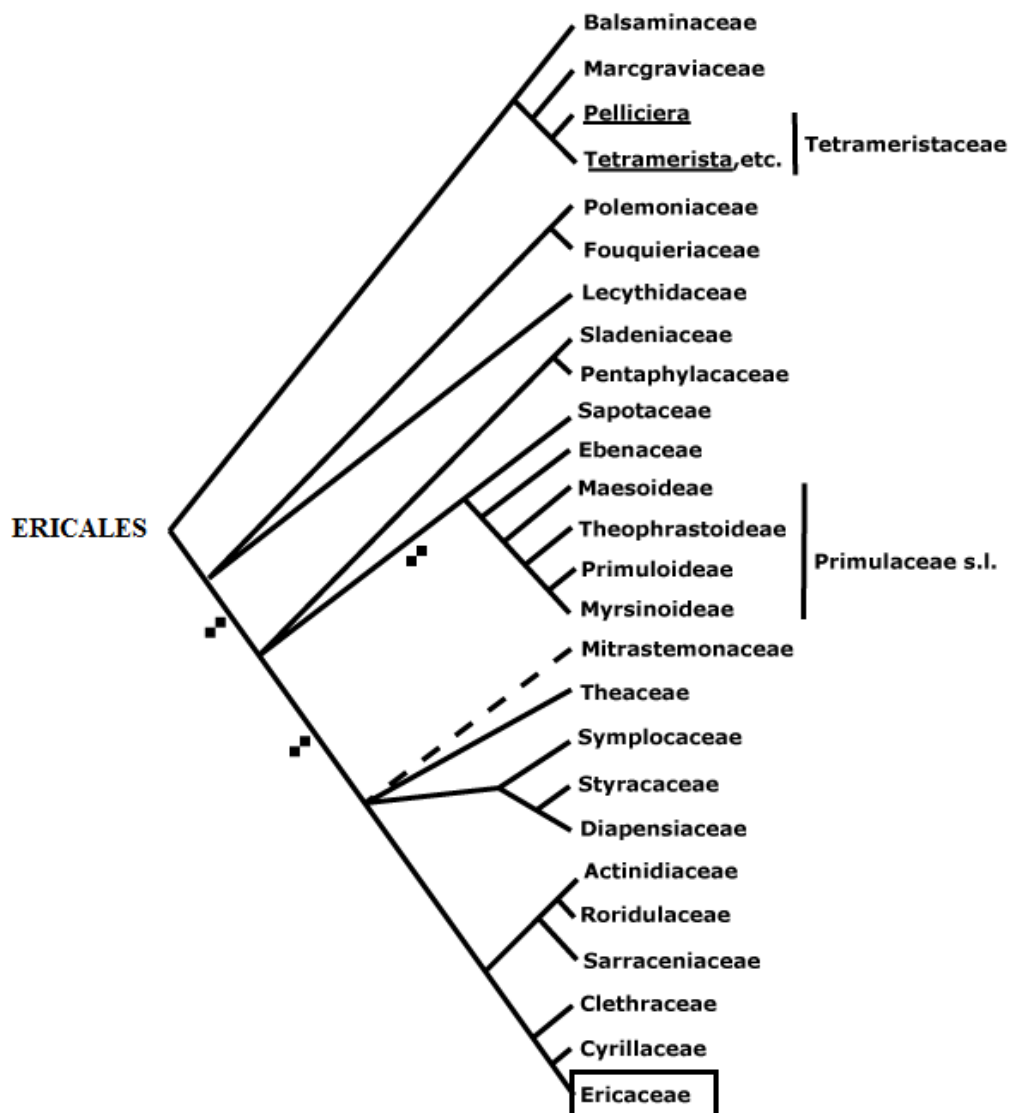


Figure 15 : Position systématique des Ericacées dans l'ordre des Ericales selon l'APG III, d'après (89).

2.1.3. Classification infra-familiale des Ericacées

D'après l'APG III, les Ericacées se partagent en 8 sous-familles, elles-mêmes subdivisées en tribus (Figure 16). Les sous-familles *Ericoideae* et *Vaccinioideae* sont celles auxquelles appartiennent les 4 espèces détaillées par la suite.

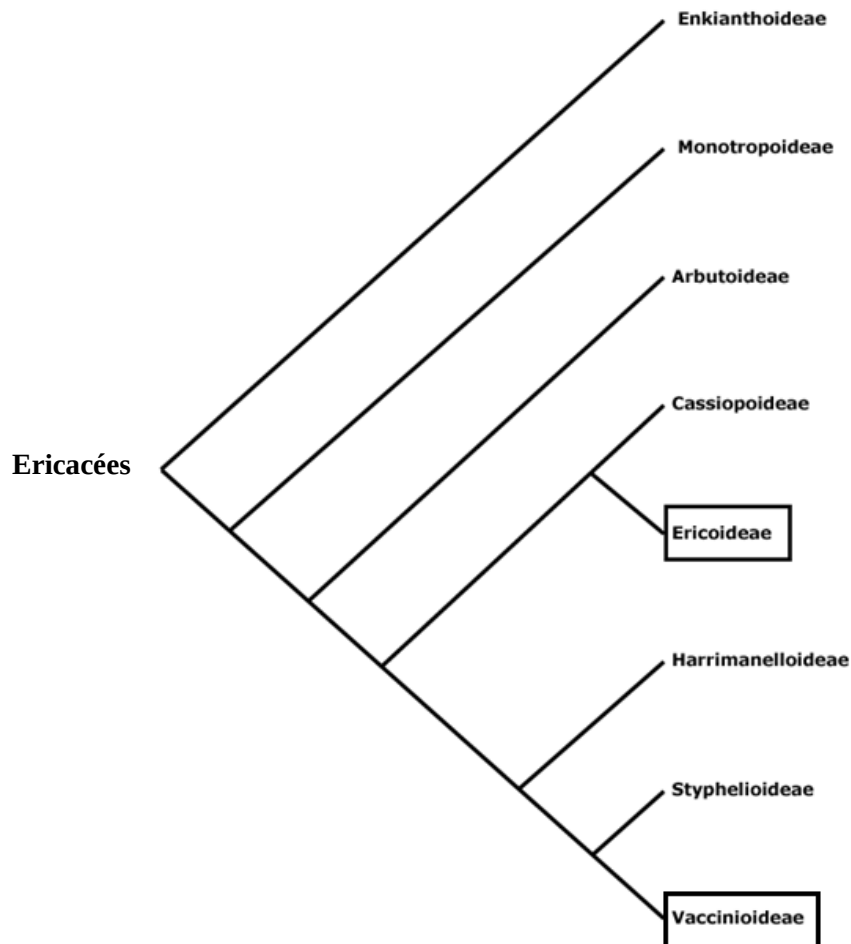


Figure 16: Organisation systématique et classification infra-familiale des Ericacées selon l'APG III (89).

Les principaux genres et espèces de cette famille des Ericacées sont les suivants (84) :

- *Rhododendron* sp. (incluant *Ledum* sp.) : 850 espèces dont 650 en Chine et 155 endémiques de Nouvelle Guinée.
- *Erica* sp. : 700 espèces de vaste répartition (Afrique du Sud, montagnes d'Afrique tropicale, Madagascar, pourtour méditerranéen, Europe et Macaronésie (ensemble d'îles composé des archipels des Açores, de Madère, des îles Canaries et des îles du Cap-Vert)).
- *Vaccinium* sp. : 400 espèces.
- *Gaultheria* sp. : 140 espèces de Malaisie et d'Australie.

- *Cavendishia* sp. : 100 espèces d'Amérique tropicale.
- *Arctostaphylos* sp. : 50 espèces pour la plupart de l'Ouest de l'Amérique du Nord.

2.2. Caractéristiques botaniques des Ericacées

2.2.1. Appareil végétatif

Les Ericacées sont des plantes ligneuses (76,87) sempervirentes ou caduques ((90) cité dans (87)) : ce sont des arbustes, parfois très petits ou subherbacés, des arbres ou des lianes, étroitement associés à des endomycorhizes ou rarement saprophytes non chlorophylliens, parfois épiphytes ((90) cité dans (87)).

Un certain nombre d'espèces possèdent un port « éricoïde » particulier, à tiges très contournées portant des feuilles linéaires étroites. Celles-ci sont simples, coriaces, souvent persistantes et pourvues de poils tecteurs abondants ; parfois ramifiés, glanduleux, ou à écailles peltées, mais jamais étoilés. Les feuilles sont alternes, parfois opposées ou verticillées, entières à dentées ou souvent en aiguilles appelées « éricoïdes », à nervation pennée plus ou moins parallèle à palmée (84,87). Ces feuilles, dépourvues de stipule, sont parfois enroulées sur les bords, protégeant ainsi leur face inférieure qui porte les stomates (84,87).

2.2.2. Appareil reproducteur

2.2.2.1. Fleur

L'inflorescence est très variable. En effet, elle peut être terminale ou axillaire, souvent racémeuse ou paniculée voire parfois réduite à une fleur solitaire. Les fleurs sont de type 4 ou 5, petites, plus ou moins pendantes, régulières à légèrement zygomorphes et hermaphrodites ou unisexuées.

➤ le périanthe

Il comporte un calice possédant 4 ou 5 sépales, plus ou moins soudés à la base, parfois réduit à un anneau. Le périanthe peut être persistant et plus ou moins accrescent. Il comporte également 4 ou 5 pétales, soudés en une corolle souvent urcéolée ou cylindrique. Cette dernière peut être aussi campanulée ou infundibuliforme, aux lobes généralement petits et distincts (84,87).

➤ l'androcée

L'androcée, à 8 ou 10 étamines libres (parfois 2-3 étamines lorsque le périanthe est réduit), est obdiplostémone par avortement. Les filets sont libres ou soudés au réceptacle (corolle). Les anthères à déhiscence poricide possèdent 1 à 2 loges et sont munies de deux appendices dressés ou en forme de corne, d'où le nom de « Bicornes » donné autrefois à l'ordre. Le pollen est généralement en tétrades (84,87).

➤ la pollinisation

La pollinisation est entomophile (présence de glandes nectarifère autour de l'ovaire) c'est-à-dire que des insectes participent au transport du pollen jusqu'au stigmate du pistil. Pour rappel, la pollinisation est l'étape précédant la fécondation. Les insectes butineurs les plus aptes à assurer la pollinisation des plantes à fleurs appartiennent à l'ordre des hyménoptères, ce sont notamment les abeilles (Figure 17) (84,87).



Figure 17 : Abeille en train de butiner une fleur de *R. ponticum*.

➤ le gynécée

Il est formé de 2 à 10 carpelles soudés en un ovaire pluriloculaire supère (infère chez la Myrtille). La placentation est généralement axile. Le style est unique, creux à l'intérieur, et surmonté d'un stigmate capité ou légèrement lobé. Un ou plusieurs ovules unitégumentés sont retrouvés par loge (84,87).

➤ la formule florale (84)

(4-5) S + (4-5) P + (4-10) E + (2-10) C

2.2.2.2. Fruit

Le fruit peut être une capsule sèche à déhiscence septicide ou loculicide quelquefois enfermée dans une corolle persistante. Il peut être parfois une petite baie charnue et indéhiscente. Il peut enfin s'agir d'une drupe à plusieurs noyaux. La graine est très petite souvent ailée à albumen charnu (84,87).

2.2.3. Habitat

Cette famille plus ou moins cosmopolite prédomine dans les régions froides (Arctique) ou tempérées à basse altitude, jusqu'aux montagnes tropicales et extratropicales, dans l'Est de l'Amérique du Nord et en Asie orientale, avec une forte concentration dans l'Himalaya, en Nouvelle-Guinée et dans les Andes. En général, c'est sous les climats méditerranéens notamment en Australie et en Afrique du Sud que la plus grande densité et la plus grande diversité des Ericacées sont retrouvées. Par ailleurs, les Ericacées sont absents des zones désertiques (84,87). La répartition mondiale des Ericacées est représentée sur la figure ci-dessous (Figure 18).



Figure 18 : Répartition mondiale des Ericacées selon Stevens, d'après (89).

Ce sont des plantes à mycorhizes préférant les sols pauvres et acides. Leur habitat se caractérise par une faible disponibilité en nutriments et en matières organiques. Certains d'entre eux résistent au période de sécheresse (87), comme *A. salicifolia*.

2.3. Utilisations traditionnelles des Ericacées

2.3.1. Plantes ornementales

De nombreuses espèces et genres sont cultivés comme plantes ornementales : « Bruyères » (*Erica* sp. et *Calluna* sp.) *Rhododendron* sp., *Kalmia* sp., *Pieris* sp., *Arbutus* sp. ... (84,91).

2.3.2. Plantes médicinales

Un certain nombre d'espèces de cette famille possèdent des propriétés rendant leur utilisation intéressante. Les propriétés de certaines d'entre elles sont décrites dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Propriétés de certaines espèces appartenant aux Ericacées, d'après (84,92).

Espèces	Propriétés
<i>Arbutus unedo</i> L. (Arbousier)	➤ anti-diarrhéique ➤ anti-inflammatoire
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng (Busserole ou Raisin d'Ours)	➤ antiseptique urinaire (citée dans la Pharmacopée européenne pour le traitement des infections urinaires) ➤ diurétique ➤ éclaircissant
<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull (Callune) <i>Erica cinerea</i> L. (Bruyère cendrée)	➤ antiseptique des voies urinaires
<i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton (Canneberge à gros fruits, Cranberry)	➤ prévention et soulagement des infections urinaires
<i>Gaultheria procumbens</i> L. (Gaulthérie)	➤ feuilles utilisées pour élaborer l'«essence de wintergreen» entrant dans la formulation de produits d'hygiène buccale et de cosmétiques. Elle constitue une source naturelle de salicylate de méthyle
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Myrtille)	➤ utilisé dans le cas de fragilité capillaire, d'insuffisance veineuse, de crises hémorroïdaires, dans certaines affections oculaires et intestinales, et utilisé pour ses propriétés hypoglycémiantes

2.3.3. Alimentation

Certaines espèces de cette famille comme la myrtille (*Vaccinium myrtillus* L.), l'airelle des marais (*V. uliginosum* L.), la canneberge (*V. oxycoccos* L.), l'airelle rouge (*V. vitis-idaea* L.) ou l'arboise (*A. unedo* L.) peuvent être cultivées pour leurs baies comestibles (84,92).

2.3.4. Autres utilisations

Il existe par ailleurs, de nombreuses utilisations mineures d'espèces d'Ericacées, par exemple le bois contourné des grandes Bruyères, comme *Erica arborea* L., est utilisé traditionnellement dans la fabrication de pipes (84). D'autre part, la « terre de bruyère », formée par la litière de ces plantes et par leurs excréments racinaires, constitue un compost indispensable aux plantes exigeant un substrat acide (92).

2.3.5. Toxicité

De nombreux représentants de cette famille sont néanmoins toxiques pour l'homme et l'animal. Les genres et les espèces particulièrement concernés sont (84) :

- *Rhododendron* sp : intoxication aux GTX (miel fou ou partie de plante).
- *Gaultheria* sp. : allergie au salicylate de méthyle et son ingestion peut provoquer un déséquilibre acido-basique, une perturbation du métabolisme du glucose et une intoxication du système nerveux central (SNC). Propriétés hallucinogènes.
- *V. myrtillus* L. : car il arrive qu'elle soit contaminée par les œufs d'un ténia, *Echinococcus multilocularis*, provoquant une grave parasitose : l'échinococcose alvéolaire.

2.4. Principaux métabolites secondaires

Les Ericacées sont des plantes à polyphénols caractéristiques, présentes en forte concentration sous forme de tanins mais aussi sous forme de composés de type flavonoïde ou d'hétérosides phénoliques. En revanche, chez certaines espèces, des diterpènes sont toxiques et conduisent régulièrement à des intoxications. Enfin, de nombreuses Ericacées sont caractérisées sur le plan anatomique par la présence de poils sécréteurs d'huiles essentielles (76).

2.4.1. Tanins

Les tanins sont des substances abondamment retrouvées chez les Ericacées. Des tanins galliques, ellagiques et condensés sont produits essentiellement dans les feuilles. Le plus répandu est l'acide gallique ((93,94) cité par (92)).

2.4.2. Flavonoïdes

Les composés de type flavonoïdes sont largement retrouvés dans les feuilles et les fleurs des Ericacées. Il s'agit principalement des flavonols, dérivés *O*-glycosylés de quercétine mais aussi de kaempférol et de myricétine. Les genres *Pieris* sp. et *Kalmia* sp. produisent des flavanones et des dihydrochalcones au lieu des flavonols. Les pigments rouges et bleus des fleurs et des fruits d'Ericacées sont des anthocyanes et des flavanones. Deux flavones sont caractéristiques et ont été principalement étudiés dans le genre *Rhododendron* : l'azaléine et la 5'-hydroxyazaléine ((93) cité par (92)).

2.4.3. Autres dérivés phénols et hétérosides phénoliques

Certains hétérosides phénoliques sont caractéristiques des Ericacées. Les dérivés de diphénols représentés par l'arbutine et ses dérivés, notamment l'homoarbutine, peuvent être cités. Les genres *Chimaphila* et *Rhododendron* sont connus pour produire, en plus de l'arbutine, des composés caractéristiques : la pyrolatine et la chimaphiline. Le genre *Rhododendron* produit des dérivés phénoliques qui sont le plus souvent monoglycosylés, comme le rhododendrol glycosylé en rhododendrine ((94) cité par (92)).

2.4.4. Huiles essentielles

Le genre *Ledum* est le genre le plus étudié des Ericacées pour son huile essentielle. Il a pour substances principales le pinène, le bornéol, l' α -phellandrène, l' α -caryophyllène et le carvacrol ((93) cité par (92)).

2.4.5. Diterpènes

De nombreux diterpènes ont été mis en évidence dans certains genres comme *Agauria*, *Pieris*, *Rhododendron*, *Kalmia* et *Pernettya*. Les GTX sont bien évidemment retrouvées ainsi que leucothol A, piéristoxine G et rhodomoside entre autres ((93,94) cité par (92)).

2.4.6. Triterpènes

Les triterpènes les plus fréquemment cités dans la littérature sont : l'acide ursolique, le taraxérol, le β -amyrine, le β -sitostérol, la friedéline et le lupéol ((93) cité par (92)).

3. Le genre *Rhododendron*

Le genre *Rhododendron* appartient à la sous-famille des *Ericoideae* et à la tribu des *Rhodoreae*. Ce genre de plantes à fleurs se divise en huit sous-genres (15,37,49).

Il comporte entre 800 et 850 espèces et est retrouvé sur 4 continents à travers le monde (sauf l'Afrique) (35). C'est un genre de l'hémisphère Nord avant tout, s'étendant d'Amérique du Nord jusqu'au Japon, en passant par l'Europe et l'Asie, et de l'extrême Nord jusqu'à l'équateur (15). Environ 700 espèces différentes sont retrouvées dans une zone comprenant la Chine, le Tibet, la Birmanie, l'Assam et le Népal. Près de 300 espèces sont présentes en Nouvelle-Guinée, beaucoup au Japon, d'autres en Asie tropicale (d'Indochine jusqu'à l'Indonésie et aux Philippines), quelques espèces en Europe et en Amérique du Nord (25) et seulement 2 espèces dans le Nord-est de l'Australie (49). Ils poussent abondamment dans certaines vallées et dans certaines régions montagneuses notamment celles de la mer Noire en Turquie orientale (36,42).

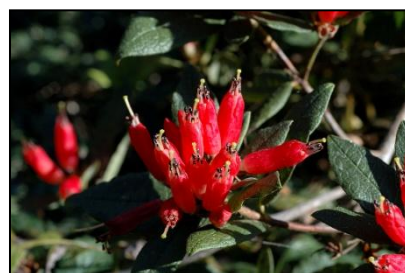
Le nom *Rhododendron* vient du grec « rhodo », rose (la coloration rose des fleurs est à l'origine de leur dénomination (76)) et « dendron », arbre. Toutes les espèces sont des arbustes ou des arbres, de petite taille la plupart du temps. La plus petite espèce atteint les 10 à 100 cm de longueur tandis que la plus grande, *Rhododendron giganteum* avoisine les 30 m (15). Les feuilles sont alternes, spiralées, linéaires à orbiculaires et persistantes ou caduques avec des marges entières (49). Leurs tailles varient de 1 à 2 cm jusqu'à plus de 50 cm de long (100 cm exceptionnellement chez *Rhododendron sinogrande* (Figure 19)). Chez certaines espèces, la face inférieure des feuilles est recouverte d'écailles ou de poils. Les fleurs sont généralement regroupées en grappe ou corymbe, l'inflorescence est rarement axillaire et la forme de la corolle varie de légèrement lobée à polypétale. Les fleurs possèdent entre 5 et 20 étamines (49) et celles regroupées en grappes sont caractéristiques de certaines espèces connues (15). Le fruit est une capsule et les graines sont aplaties ou fusiformes à ellipsoïdes (49).



R. sinogrande



R. ferrugineum



R. spinuliferum

Figure 19 : Différentes espèces appartenant au genre *Rhododendron*.

Des centaines de métabolites secondaires ont été isolés à partir de ce genre. Dans leur étude, Qiang et ses co-auteurs ont établi la liste de 208 composés isolés à partir de différentes espèces de *Rhododendron* sp. Il s'agissait principalement de flavonoïdes et de diterpénoïdes (74). Plus de 65 flavonoïdes ont été obtenu à partir d'espèces de ce genre. Dans les feuilles de 166 rhododendrons ont été retrouvés, les composés suivants (49) : kaempférol, quercétine, quercitrine, hypéroside, farrerol et polystachoside. Les fleurs contiennent des anthocyanidines et flavonols tels que la cyanidine, péonidine et azaléatine (49). Les autres flavonoïdes sont de type chromone, flavonol, flavan-3-ol et dihydrochalcone. Les diterpénoïdes représentent la deuxième classe chimique la plus répandue du genre avec plus de 30 composés isolés. La majorité sont des diterpénoïdes de type grayane et sont responsables de la toxicité des plantes qui en contiennent. Les diterpénoïdes sont suivis de près par les triterpénoïdes principalement de type oléanane et ursane (49,74). Le genre renferme également des iridoïdes (glycosides) et des sesquiterpénoïdes de type megastigmane et leurs glucosides (49). L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles, des fleurs ou des fruits contient principalement les composés suivants (49) : α -pinène, β - pinène, le limonène, le bornéol, le myrcène et le p-cymène. D'autres composés ont été isolés à partir du genre : des dérivés phénoliques, un lignane, un β -carotène... Ce genre présente ainsi une diversité d'activités : anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobien, anti-protozoaire, antiviral, immunomodulateur, antioxydant, antidiabétique, cytotoxique, spasmolytique, inhibiteur de la tyrosinase et de l'acétylcholinestérase, hépatoprotecteur, cardioprotecteur, sédatif, anti-appétant et insecticide (49).

Des espèces sont utilisées comme plantes ornementales et d'autres pour leurs propriétés depuis des années. Certaines seraient utilisées pour traiter les rhumes et les œdèmes et d'autres comme analgésiques pour les douleurs rhumatismales ou dentaires (95). Par exemple, les tiges, les feuilles et les fleurs séchées de *Rhododendron spinuliferum* (Figure 19) étaient utilisées pour soulager la toux et l'asthme. Les feuilles séchées de *Rhododendron dauricum* étaient utilisées pour traiter la bronchite. Les fleurs et les fruits de *Rhododendron molle* étaient enregistrés dans les monographies comme analgésiques. Enfin, d'autres espèces comme *Rhododendron ponticum*, *R. chrysanthum*, *R. ferrugineum* (Figure 19), *R. molle*, *R. cinnabarium* et *R. collettianum* ont été utilisées comme antidouleur et anti-inflammatoire (74).

Les études relatives à la toxicité des *Rhododendron* sp. ne sont publiées que depuis quelques décennies. En 1954, leur toxicité a été mise en évidence par l'isolement de composés toxiques dans *R. ponticum*, *R. aureum* et *R. maximale*.

Les fleurs, les fruits, les feuilles, le nectar et les axes caulinaires de certaines espèces accumulent des GTX (76). Cependant, tous les membres de ce genre n'en contiennent pas (32).

Ainsi certains *Rhododendron* spp. sont impliqués dans des intoxications animales et humaines et ce, à cause des GTX qu'ils contiennent. Les intoxications chez l'homme se produisent par le biais de l'ingestion directe de la plante ou par le miel produit à partir de ces plantes.

Dans certaines intoxications au miel fou, l'analyse pollinique du miel suspect a permis de mettre en évidence la présence de pollen d'espèces du genre *Rhododendron* sp. (36,37,61,65). *R. ponticum* et *R. luteum* sont les principales espèces suspectées lors d'une intoxication au miel fou. En effet, ils contiennent des GTX et sont très largement répandus dans les montagnes le long des côtes de la mer Noire en Turquie ; région dans laquelle les apiculteurs locaux produisent ce miel pour ses propriétés (25).

Les deux espèces les plus décrites dans la littérature comme responsables des intoxications au miel fou sont : *R. ponticum* et *R. luteum*. (62) mais *R. simsii* a également été cité (14). Ces trois espèces seront donc plus particulièrement décrites dans les paragraphes suivants.

3.1. *Rhododendron ponticum* L.

R. ponticum (Figure 20) est responsable de la plupart des cas d'intoxication au miel fou signalés (58). Il existe 2 sous-espèces : *R. ponticum* ssp. *baeticum* et *R. ponticum* ssp. *ponticum* (96). Il est difficile de savoir laquelle des 2 sous-espèces est impliquée dans les intoxications d'après la littérature. Mais, il semble que la seconde soit le plus probablement responsable.



Figure 20: Fleurs de *R. ponticum* d'après (17).

3.1.1. Dénomination

R. ponticum est appelé « Rhododendron des parcs », « Rhododendron pontique », « Rhododendron de la mer Noire » ou « Common Rhododendron » en anglais et plus communément « Poison noir » (25,36,97).

3.1.2. Description

Il s'agit d'un arbuste à feuilles simples et persistantes, pouvant atteindre 8 m de hauteur. Il possède des fleurs de couleur violacé pouvant atteindre 5 cm de diamètre (24,96). Sa floraison se produit la plupart du temps entre avril et août dans la région de la mer Noire, bien qu'elle puisse s'étendre jusqu'en septembre à l'Ouest de cette région (98). La pollinisation se fait par entomogamie, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'insectes. Le buisson possède une inflorescence étonnamment colorée qui attire les insectes. Lorsque ces derniers s'approchent pour rechercher de la nourriture, le pollen peut se coller sur le corps de l'insecte, par l'intermédiaire d'un filament gluant bordant le pollen (98).

3.1.3. Habitat

R. ponticum vit dans les forêts, les landes, essentiellement dans les milieux acides et humides (98), et résiste à des températures variant entre -17°C et 26°C. Il est très largement retrouvé dans le monde ; particulièrement au Royaume-Uni, en Irlande, et en Turquie (région de la mer Noire) mais aussi en Bulgarie, des Balkans jusqu'à la région du Caucase du Sud (Géorgie, Arménie, Azerbaïdjan et région de Kars (Turquie)), et au Liban. Il est retrouvé également dans le Sud-est de l'Espagne, au Portugal, en Belgique et en France (15,98). Il est très abondant dans les îles britanniques où il constitue une réelle menace pour la biodiversité (24,96). En France, il constitue une espèce invasive avérée en Basse-Normandie. Il pousse très largement à travers la région de la mer Noire en Turquie, et ce, jusqu'à des altitudes de 2100 m sur les montagnes du Nord de l'Anatolie (15,45,98).

3.1.4. Composition

Il contient une forte teneur en GTX (15) qui sont retrouvées dans toutes les parties de la plante, y compris le nectar (24,74). GTX I et GTX II ont notamment été mises en évidence dans les feuilles et les fleurs de cette espèce (5). Il renferme également plusieurs flavonoïdes responsables de son activité (49,74). Ces flavonoïdes sont les suivants (Figure 21) :

- isoquercitrine **(1)** (quercetin-3-yl β -D-glucopyranoside) isolé à partir des feuilles, a montré une activité anti-nociceptive puissante et une activité anti-inflammatoire.
- quercitrine **(2)** (quercitroside; Quercetin-3-yl α -L-rhamnopyranoside) isolé à partir des feuilles présente une activité plus faible que le composé ci-dessus.
- hypéroside **(3)** (hyperin $\frac{1}{4}$ quercetin-3-yl β -D-galactopyranoside) possède des propriétés anti-inflammatoire et analgésique.
- hémiphloïne **(4)** (6-C-Glucosylnaringenin).

De plus, une étude (99) a permis d'isoler les composés volatils présents dans les fleurs et les feuilles de cette espèce. L'extrait à l'hexane a permis d'isoler 14 composés volatils dont les principaux sont : 5,15 – rosadiène (42,8%), 2 – éthyl – hexanol (13,3%) et styrène (10,0%). Seulement 8 composés ont pu être identifiés à partir de l'extrait au dichlorométhane des feuilles dont les principaux sont : 1-butanol (17,0%), γ -butyrolactone (13,5%), styrène (11,8%), alcool benzylique (11,7%) et (Z) -3-hexénol (10,0%). D'autre part, les fleurs de *R. ponticum* ont une couleur violacée attrayante avec un léger parfum. Toutefois, le 1-méthyl-2-pyrrolidone, composé volatil à l'odeur désagréable, a été isolé à partir des fleurs (absent dans

les feuilles) comme étant le plus abondant (79,7%) des composés volatils. Cela permet de démontrer que les composés volatils mineurs ont une forte influence sur le parfum naturel des fleurs.

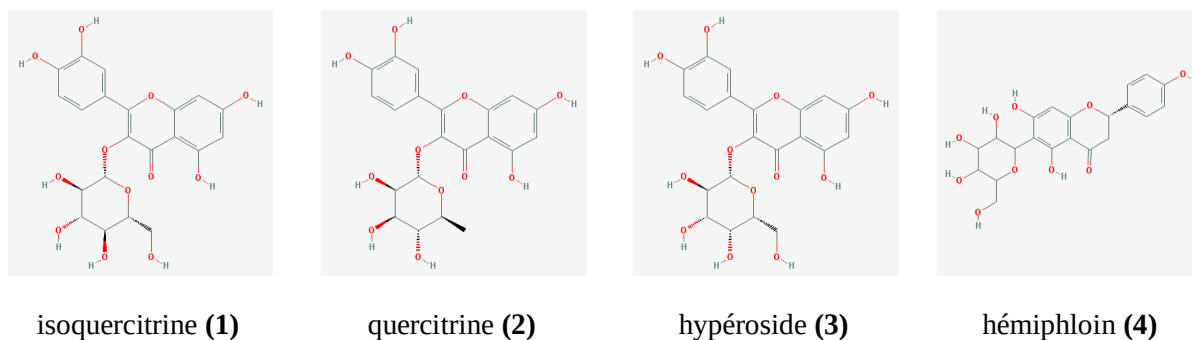


Figure 21 : Structure chimique de quelques molécules isolées à partir de *R. ponticum* (structures d'après PubMed).

3.1.5. Utilisation

En Turquie, les feuilles et les tiges sont utilisées traditionnellement comme diurétique, antifongique pour traiter par voie externe les infections du pied, anti-inflammatoire et anti-nociceptif pour les douleurs rhumatismales ou dentaires (la sève extraite des tiges fraîches est administré directement dans la dent pour lutter contre la douleur), narcotique, traitement du rhume et anti-œdémateux (œdème interne ou externe). Les feuilles ont une activité antibactérienne, anti-protozoaire et inhibent l'acétylcholinestérase (24,28,49,74).

3.1.6. Intoxication

Des intoxications par du miel fou issu de cette plante ont été largement rapportées. Son pollen en tétrades a même été mis en évidence dans un miel responsable d'intoxication par analyse microscopique (100,101). D'autres intoxications mais cette fois par l'ingestion directe de ses feuilles ou ses fleurs ont également été documentées (11).

3.2. *Rhododendron luteum* Sweet ou *Rhododendron flavum* G. Don

R. luteum Sweet ou *R. flavum* G. Don aux fleurs jaunes (36) est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 22).



Figure 22 : Fleurs et feuilles de *R. luteum*, d'après (17).

3.2.1. Dénomination

R. luteum ou *R. flavum* est appelé le « Rhododendron aux fleurs jaunes » (36) et plus communément le « poison jaune » (25).

3.2.2. Habitat

R. luteum est très répandu dans les forêts sur les côtes Est de la mer Noire en Turquie (39,62). L'aire de répartition de cette espèce est nettement inférieure à celle de *R. ponticum* (98). Il peut résister à la sécheresse et s'étend au Sud de la région montagneuse anatolienne dans la région orientale de la mer Noire (98).

3.2.3. Composition

Des GTX ont été isolées dans son nectar et son pollen (8,74). Les GTX I et GTX II ont notamment été mises en évidence dans les feuilles et les fleurs de cette espèce (5). Le monotropéine (Figure 23) a été isolé en 1991 à partir de cette espèce (74). L'huile essentielle obtenue à partir de ses fleurs est active. Elle possède une activité antibactérienne modérée contre *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (49).

De plus, l'étude précédemment décrite pour *R. ponticum* a permis d'isoler également les composés volatils présents dans les fleurs et les feuilles de cette espèce (99). L'extrait à

l'hexane a permis d'isoler des composés volatils dont les principaux sont : acétate d'éthyle (13,3%), 6- méthyl-5-heptène-2-one (11,1%), le 2-éthyl-hexanol (7,1%) et α -terpinéol (6,6%). L'extrait au dichlorométhane a permis d'isoler les composés suivants : 1-butanol (58,7%), alcool benzylique (17,1%) et alcool phényléthylique (6,7%).

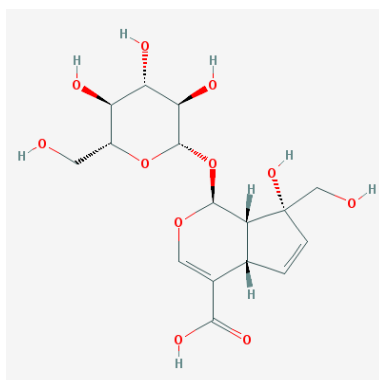


Figure 23 : Structure chimique du monotropéine, molécule isolée de *R. luteum* (structures d'après PubMed).

3.2.4. Utilisation

En Turquie, ces feuilles sont utilisées traditionnellement comme diurétique, analgésique dans les douleurs rhumatismales et antifongique pour traiter les infections fongiques du pied. Les feuilles et les fleurs ont une activité antibactérienne, anti-protozoaire et inhibent l'acétylcholinestérase (49).

3.2.5. Intoxication

Seules des intoxications par du miel fou issu de son nectar ont été rapportées (39).

3.3. *Rhododendron simsii* Planch.

R. simsii est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 24).



Figure 24 : Boutons floraux de *R. simsii*, d'après (97).

3.3.1. Dénomination

R. simsii a pour synonyme *R. indicum* hort. et est appelé plus communément « Azalée des Indes ».

3.3.2. Description

R. simsii est un arbuste à feuilles persistantes fleurissant au printemps (de mars à avril). Ses branches et ses feuilles sont couvertes de poils raides rouillés. Les feuilles sont généralement lancéolées avec une marge entière (Figure 25). Les fleurs sont en forme d'entonnoir, de couleur vive rouge profond, et le pétale supérieur est repéré avec des taches rouge-violet (Figure 25). Le fruit est une capsule en forme d'œuf avec des poils épais (102).



Figure 25 : Fleurs et feuilles de *R. simsii*.

3.3.3. Habitat

R. simsii est un petit arbre à feuilles persistantes distribué en Chine, à Taiwan, dans l'archipel d'Ogasawara et au Japon (103).

3.3.4. Composition

La GTX I a été isolée de cette espèce (5) mais elle renferme également d'autres composés (Figure 26) :

- des triterpènes : notamment un triterpène de type ursane : l'acide 19,24-dihydroxyurs-12-en-3-one-28-oïque (5) (74,103).
- des flavonoïdes : notamment un glycoside de flavanone : 7-*O*- β -D-apiofuransyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl matteucinol (6) mais également le kaempférol, la quercétine et l'hypéroside (3) (74,103).
- d'autres composés : notamment l'acide protocatéchique : l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (7) et l'ester méthylique de l'acide protocatéchique: le 3,4-dihydroxybenzoate de méthyle (8) (74,103).

Les flavonoïdes et les dérivés de l'acide benzoïque sont les constituants actifs (49). Seuls les composés (7) et (8), isolés à partir des feuilles, ont une activité antioxydante (74,103).

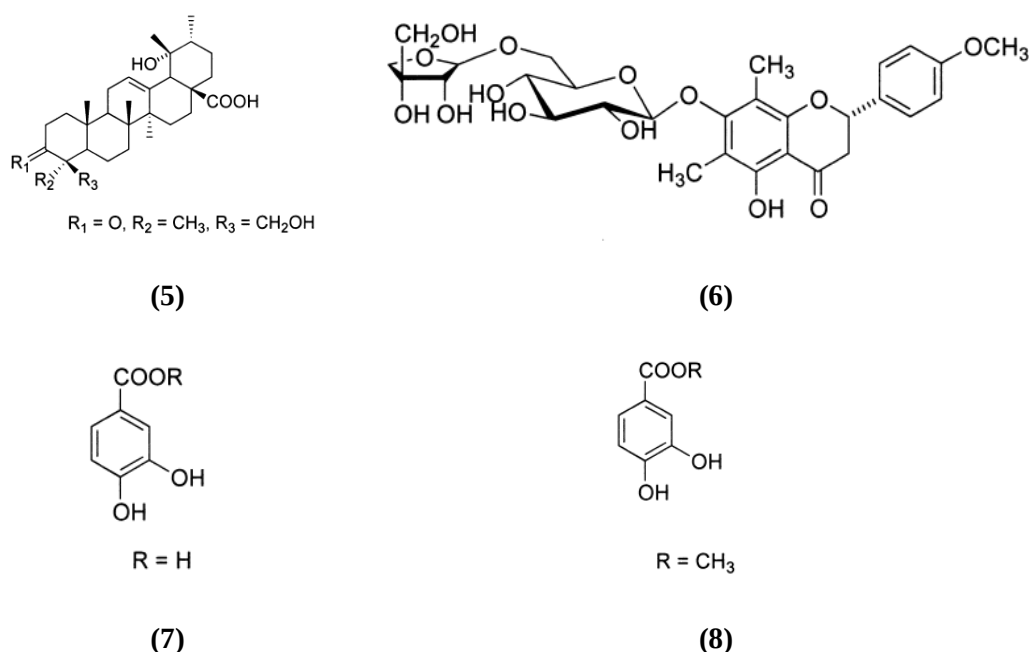


Figure 26 : Structure chimique de quatre molécules isolées à partir de *R. simsii* (structures d'après (103)). [(5) acide 19,24-dihydroxyurs-12-en-3-one-28-oïque ; (6) 7-*O*- β -D-apiofuransyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl matteucinol ; (7) acide protocatéchique ; (8) ester méthylique de l'acide protocatéchique].

3.3.5. Utilisation

En Chine, il serait utilisé traditionnellement dans des remèdes pour traiter la bronchite, la toux et l'aménorrhée. Les feuilles ont une activité antivirale, antioxydante et expectorante (49,102).

3.3.6. Intoxication

Il a été rapporté une série de cas d'intoxication au miel fou impliquant les fleurs de *R. simsii* (14) au Népal en 2009. Par ailleurs, un enfant a été intoxiqué par du lait préparé à base de cette plante dans le but de soulager ses problèmes respiratoires (5).

4. Le genre *Agauria*

4.1. Position systématique

Le genre *Agauria* appartient à la sous-famille des *Vaccinioideae*, la plus grande sous-famille des Ericacées, et à la tribu des *Lyoniae*. *Agauria* sp. est un genre d'Afrique tropicale très décrit à Madagascar et aux Mascareignes (104,105) cités par (92).

Les espèces de ce genre ont été incluses dans le genre *Agarista* en raison d'importante similitudes de caractères morphologiques et anatomiques. Le genre *Agarista* est retrouvé dans les régions tropicales du continent Sud-américain et en particulier à l'Est du Brésil. *Agauria* et *Agarista* aiment les zones de montagnes tropicales. En 1997, Kron et Judd, dans une étude sur la cladistique de certains genres des *Vaccinoideae*, concluent que les groupes d'espèces américaines et africaines forment une unité phylogénétique et doivent ainsi être considérés comme un seul genre : *Agarista*. Les espèces américaines d'*Agarista* sont classées dans la section *Agarista* et les espèces africaines dans la section *Agauria* ((106,107) cités par (92) .

Dans ce manuscrit ne seront détaillés que les cas réunionnais impliquant cette espèce végétale encore très couramment citée dans la littérature sous le nom d'espèce *Agauria salicifolia*. En attendant un éclaircissement de la systématique de cette espèce, au lieu de la nommée *Agarista salicifolia* sect. *Agauria*, nous avons fait le choix de conserver pour ce manuscrit l'appellation : *Agauria salicifolia*.

Le genre *Agauria* se reconnaît à ses feuilles généralement entières souvent glauques sur leur face inférieure et à son inflorescence en grappe portant des fleurs quelques peu charnus, blanches à roses ou rouges (92).

4.2. *Agauria salicifolia* Hook f. ex Oliver

A. salicifolia (Figure 27) est une espèce proche des *Rhododendron* sp. Décrite dans la flore des Mascareignes, cette espèce est retrouvée notamment à l'île Maurice et à la Réunion. De très nombreux botanistes comme H. Perrier de la Bâthie à Madagascar, Baker à l'île Maurice ou J. de Cordemoy à la Réunion ont souligné le très grand polymorphisme de cette espèce.



Figure 27 : Fleurs et feuilles d'*A. salicifolia*, d'après (91).

4.2.1. Dénomination

Sur l'île de la Réunion, cette espèce a pour noms vernaculaires, « Bois de rempart », « Bois de gale », « Mapou », « Bois de mapou », « Mapou des Hauts », « Mapou à petites feuilles », « Angavodiana », « Avogandia », « Ankavodiana », « Angavodianandrano », « Aavodiana », « Kavodia ». Sur l'île Maurice, elle porte le nom de « Bois cabris » (92,108).

4.2.2. Description

Il s'agit d'un arbuste ou d'un arbre (le plus souvent un petit arbre tortueux) d'environ 10 à 20 m de haut à tiges ramifiées et à bourgeons foliaires de couleur rougeâtre. L'écorce est grisâtre et très crevassée chez les vieux spécimens. Le bois a une teinte rousse à rougeâtre. Les feuilles sont à nervure principale saillante, très denses au sommet des rameaux et rougeâtres lorsqu'elles sont jeunes. Le limbe est coriace elliptique ou lancéolé, acuminé au sommet et tomenteux à l'état jeune. La marge foliaire est repliée vers le dessous. L'inflorescence est en grappe de fleurs en clochettes roses crème à rouges. Le fruit est une capsule noire loculicide d'environ 8 mm de diamètre. Les graines allongées et légères sont dispersées facilement par le vent (92,109).

4.2.3. Habitat

A. salicifolia est une espèce endémique de la zone Sud-ouest de l'océan Indien (6), retrouvée à Madagascar, en Afrique tropicale, sur l'île de la Réunion et l'île Maurice. Elle est très répandue dans les forêts de basse altitude (46) et dans les prairies des hauts plateaux (1300 – 3000 m d'altitude). Cette plante est également retrouvée sur les coulées de laves.

4.2.4. Composition

Cette espèce contient plusieurs types de principes actifs : des diterpènes (GTX), des triterpènes, des tanins et des alcaloïdes (0,04 %)(108). Les GTX sont les composés les plus nombreux et sont responsables de la toxicité de cette plante. D'ailleurs, des données expérimentales ont confirmé la présence de GTX dans ses extraits (6,46,110).

D'après une étude de 1951, les feuilles et l'écorce d'*A. salicifolia* contiennent d'abondantes quantités de tannins catéchiques (92,108).

De plus, à partir de son écorce 8 substances triterpéniques ont été isolés (Figure 28) : agaurol A-D, agaurol α et β , agaurilol et acide morolique (9). Un peu plus tard en 1959, il a été mis en évidence à partir de cette espèce l'acide acétylmorolique, les agauriols et agaurols précédemment isolés ainsi que l'acide agaurique. En 1977 (111), des triterpènes ont été isolés à partir de ses écorces sèches: l'acide acétyl-3-morolique, le β -sitostérol (10), l'acétyl-3-moradiol, le taraxérol (11), l'agauriastérone, la taraxérone (12) et l'acétyl-3-moraldéhyde (92,108).

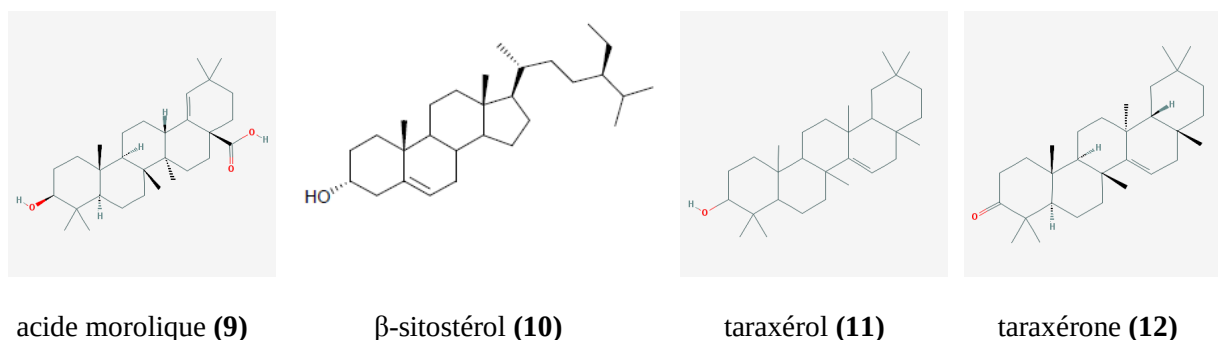


Figure 28 : Structure chimique de quatre molécules isolées à partir d'*A. salicifolia*, (structures d'après (92) et PubMed).

4.2.5. Utilisation

Autrefois, *A. salicifolia* était utilisée pour traiter les maladies vénériennes, comme la syphilis. Elle était reconnue pour ses propriétés dépurative, antipsorique et antirhumatisme (108).

Aujourd'hui, elle est très utilisée dans la médecine traditionnelle insulaire de la Réunion et de Maurice, bien qu'elle soit considérée localement comme très toxique par ingestion (46). Ses feuilles sont largement utilisées par voie externe dans la phytothérapie locale, sous forme de cataplasmes, pour traiter diverses lésions cutanées : eczéma, plaies ulcéreuses ou causées

par des scarifications (46,109). D'ailleurs, à Madagascar, la plante grillée est réduite en poudre et appliquée sur les plaies ulcéreuses. D'autre part, ses feuilles ont des propriétés analgésiques utiles pour traiter les névralgies ou les rhumatismes (109), les hémorroïdes et pour lutter contre les démangeaisons (108). En Afrique centrale, la sève des feuilles coupées est appliquée sur les plaies causées par les scarifications. Au Kenya, les Massaï l'utilisent par voie interne pour faciliter la digestion ; ils broient son écorce et la mélangent à de l'eau fraîche (92).

Enfin, son nom « Bois de Gale » vient du fait, qu'en usage externe, les feuilles peuvent être utilisées pour traiter la gale (92,108). Les usages traditionnels décrivent que pour cela, il faut brûler les feuilles, délayer leurs cendres dans l'eau avant de laver les plaies (108).

4.2.6. Intoxication

Les intoxications à *A. salicifolia* ont toutes été rapportées sur l'île de la Réunion (110). Tout d'abord, des intoxications mortelles sont survenues chez des animaux après consommation de cette plante (6).

Les autres ont été décrites chez l'homme mais aucune n'a été mortelle. En 2005, l'intoxication d'une femme ayant consommé par erreur une infusion de feuilles de cette plante a été rapportée dans la littérature (46). Comme vu précédemment, en 2007, en janvier 2008 et 2013, plusieurs personnes se sont intoxiquées en consommant du miel en gaufre contaminé par cette plante. Pour les apiculteurs locaux, ces intoxications par le bois de rempart ne concerneraient que les ruches situées sur les hauteurs de l'île. D'après eux, sur le littoral, le risque est bien moindre puisque la plante ne pousserait qu'au-delà de 1500 m d'altitude (112).

Partie III : Molécules impliquées dans l'intoxication : les grayanotoxines

1. Qu'est-ce que les grayanotoxines ?

Les GTX sont les toxines tenues pour responsables des symptômes survenant lors d'une intoxication au miel fou. Elles constituent une famille de neurotoxines liposolubles interagissant avec les canaux sodiques voltage-dépendants (Canal Na⁺ VD). Les symptômes observés lors d'une intoxication sont la conséquence de cette interaction.

1.1. Historique et origine

En 1891, aux Etats-Unis, Plugge et de Zaayer ont isolé pour la première fois l'andromédotoxine à partir de plantes appartenant à la famille des Ericacées (15). Plus tard, en Turquie, les premières études sur du miel toxique ont été menées par Bucak et Ungan en 1938 et 1941. Tous deux ont identifié au microscope un pollen de *Rhododendron* sp. dans le miel et ont également mis en évidence par des analyses avec des réactifs colorés la présence de cette toxine ((113) et (114) cités dans (9)).

En parallèle et de façon indépendante dans différents laboratoires, des études phytochimiques ont été menées sur des plantes de cette famille des Ericacées en raison de leur toxicité. Différents composés toxiques ont été isolés et nommés sans être totalement caractérisés à l'époque. Un article de 1957 (115) rapportent ces travaux qui sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Molécules toxiques détectées dans des Ericacées, d'après (115).

Nom de molécule	Plante étudiée	Références ^a
Andromédotoxine	<i>Rhododendron</i> sp. non identifié	(116)
Rhodotoxine	<i>Rhododendron hymenanthos</i>	(117)
Acétylandromédol	<i>Rhododendron maximum</i> et <i>Kalmia angustifolia</i>	(118)
Grayanotoxine I	<i>Leucothoe grayana</i>	(119)

^a Références citées par Tallent *et al.* dans (115).

Tallent et ses co-auteurs (115) rapportent leurs travaux sur le développement d'une méthode de détection de l'acétylandromédol dans des extraits végétaux par une méthode d'électrophorèse sur papier et des réactifs colorants, ainsi que leurs avancées dans la structure chimique de ce composé. L'application de cette méthode de détection à des extraits de

différentes espèces d'Ericacées a permis de mettre en évidence la présence de cette toxine dans certains d'entre eux. Ils mettent alors en parallèle leurs résultats avec ceux des précédentes études et des collaborations s'établissent entre certains chercheurs de ces études. Et ils finissent par établir qu'en fait ces quatre molécules (Tableau 11) sont identiques et sont un seul et même composé de formule brute $C_{22}H_{36}O_7$: l'acétylandromédol (115). Depuis, cette molécule a été renommée grayanotoxine I, sa structure a été complètement élucidée et d'autres molécules de la même série ont été identifiées.

Les GTX forment un groupe de substances chimiques retrouvées naturellement dans des espèces appartenant toutes aux Ericacées, particulièrement celles du genre *Rhododendron*, mais également celles des genres *Agauria*, *Kalmia*, *Pieris* et *Pernettya* (Tableau 8), comme évoqué dans la partie précédente. Ces toxines sont couramment retrouvées dans les rameaux (5), le nectar, le pollen (17), les fleurs et les feuilles de ces plantes (15).

La teneur en GTX varie selon les espèces et les genres (15). Il est important de noter que les espèces du genre *Rhododendron* ne contiennent pas toutes des GTX (7,5) et que celles retrouvées dans chaque espèce ne seront pas toujours les mêmes (24).

Par voie de conséquence, ces toxines sont retrouvées dans un certain nombre de produits issus de plantes de cette famille, comme dans le miel, les cigarettes, le thé ou les décoctions utilisées en médecine alternative (23).

Chez l'homme, l'intoxication aux GTX survient la plupart du temps à la suite de la consommation de miel fou, produit à partir de nectar qui contient la(es) toxine(s), mais peut faire suite à la consommation de feuilles, de fleurs ou de préparations à base de plantes. Ces cas sont très rares et surviennent principalement mais pas exclusivement, en Asie. Ils sont résumés dans le Tableau 12 (5,46,102,120).

Tableau 12 : Cas d'intoxication aux grayanotoxines (non due au miel fou) ayant nécessité une hospitalisation, d'après (5).

Age	Sexe*	Pays	Intoxication	But
0	M	Chine (Hong Kong)	Lait contaminé par <i>R. simsii</i>	Pour soulager des problèmes respiratoires
71	M	Corée du Sud	Ingestion de fleurs de <i>Rhododendron</i> sp.	-
70	M	Corée du Sud	Vin contaminé par <i>Azalea</i> sp.	-
61	F	Corée du Sud	Jus de fleurs de <i>Rhododendron</i> sp.	-
59	M	Corée du Sud	Ingestion d'une bouillie de <i>R. brachycarpum</i>	Pour traiter l'hypertension
9	M	Corée du Sud	Ingestion de 10 fleurs de <i>R. schlippenbachii</i>	-
1	F	USA	Ingestion de <i>Pieris japonica</i>	-
76	M	USA	Thé à partir de <i>P. japonica</i>	-
76	M	Corée du Sud	Ingestion de 10 fleurs de <i>R. mucronulatum</i>	-
58	M	Corée du Sud	Ingestion de 50 fleurs de <i>R. schlippenbachii</i>	Pour soulager la soif
28	F	Région d'outre-mer française (île de la Réunion)	Thé à partir d' <i>A. salicifolia</i>	Erreur

*H : homme et F : femme.

L'ingestion de plantes par les enfants constitue un risque d'intoxication aux GTX. Chez les adultes, un manque de connaissances ou une mauvaise évaluation des risques peuvent être une raison à cette intoxication (5). Les GTX ne sont pas mortelles chez l'homme à des doses normales bien qu'elles puissent l'être chez les animaux, surtout chez le bétail. De nombreux cas ont déjà été signalés à la suite de l'ingestion d'une partie de ces plantes (5,121).

1.2. Structure

Les GTX sont des diterpènes non volatils, composés de 4 unités isoprène dérivant du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) issu de la voie du mévalonate (17,122). Il s'agit d'un hydrocarbure cyclique polyhydroxylé avec une structure à 4 cycles (5/7/6/5) ne contenant pas d'azote. Le squelette carboné tétracyclique est appelé andromédane : squelette *A-nor- B – homo-ent-* kaurane (123). Aucune preuve expérimentale concernant les voies de biosynthèse des GTX n'a été validée mais d'après le nom de leur squelette, elles semblent dériver du composé *ent*-kaurane (Figure 29).

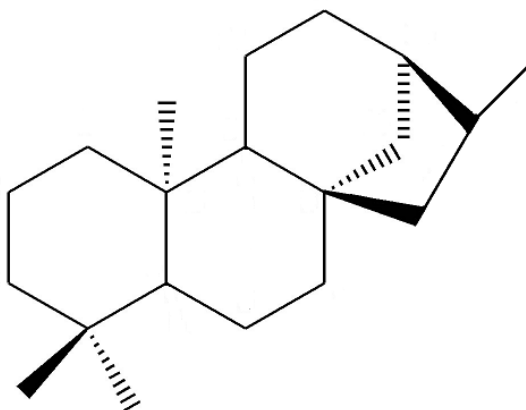


Figure 29 : Structure chimique du composé *ent*-kaurane, d'après (124).

Elles proviendraient de la cyclisation acido-catalysée du GGPP similaire à celle qui intervient dans l'élaboration des triterpènes, mais sans époxydation préalable : il se forme alors un décahydronaphtalène substitué. « *ent* » prouve que la cyclisation a abouti à la série énantiomère car la fusion des cycles A et B a été différente de celle des stéroïdes. Tous les composés tétracycliques, ce qui est le cas des GTX, sont issus de la cyclisation du cation *ent*-pimarényl. Dans notre cas, cette cyclisation a abouti à *ent*-kaurane (124). La synthèse du composé (-) – GTX III à partir de (R) – 2 – (benzyloxy) propionaldéhyde a été réalisée avec succès par Kan et ses collaborateurs, en 1994 (125).

Il y a plus de 60 composés apparentés aux GTX (GTX, 1,5-seco- GTX et leurs glucosides) qui ont été décrits (15,28). A ce jour, plus de 25 isoformes de GTX ont été isolées à partir du genre *Rhododendron* (5,17) et 18 isoformes de GTX ont été retrouvées dans le miel fou (95). Seules les GTX I à IV sont toxiques (95) et 3 d'entre elles sont particulièrement impliquées dans les cas d'intoxications. Il s'agit des GTX I, II et III (5,15,17).

La structure commune des GTX I, II, III et IV est représentée ci-dessous (Figure 30) et leurs caractéristiques sont reportées dans le Tableau 13.

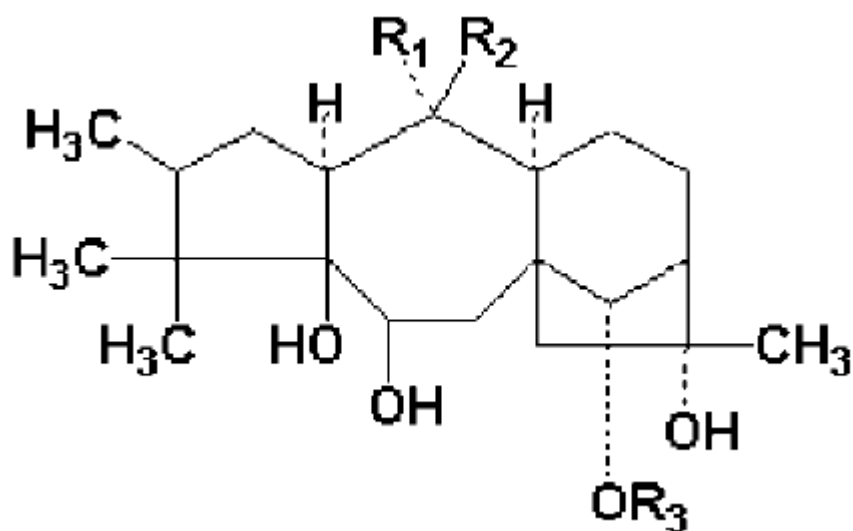
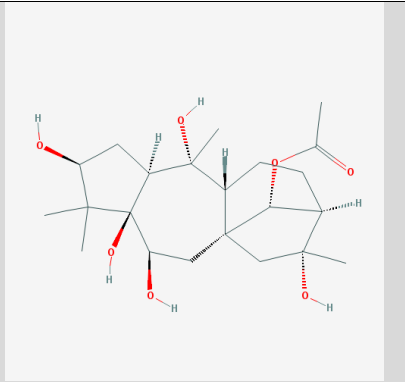
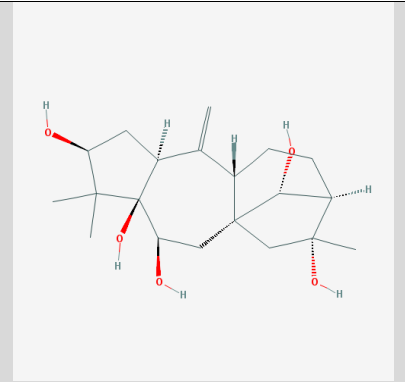
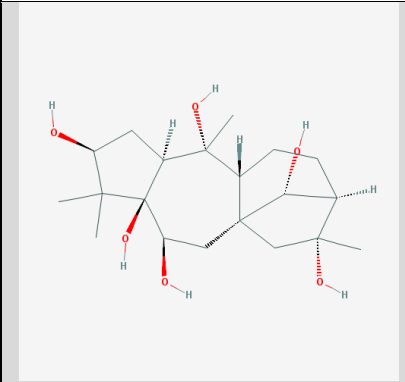
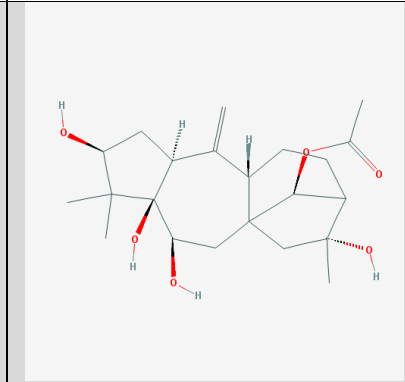
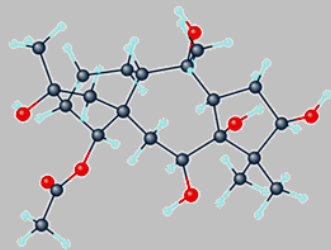
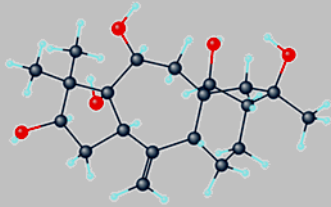
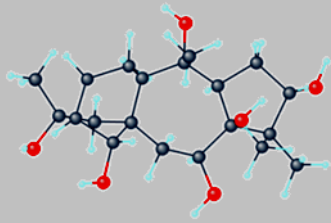
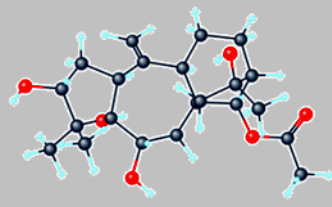


Figure 30 : Structure commune des GTX I, II, III et IV, d'après (17).

Tableau 13 : Caractéristiques chimiques des GTX I, II, III et IV, en relation avec la figure 28, d'après (17), PubMed et SciFinder.

	GTX I	GTXII	GTX III	GTX IV
R1	OH	-	OH	-
R2	CH ₃	-	CH ₃	-
R1R2	-	= CH ₂	-	= CH ₂
R3	COCH ₃ = Ac	H	H	COCH ₃ = Ac
Masse moléculaire (g/mol)	412,52	352,47	370,48	394,50
Masse exacte (g/mol)	412,246103	352,224974	370,235539	394,235539
Formule brute	C ₂₂ H ₃₆ O ₇	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	C ₂₂ H ₃₄ O ₆
Formule 2D				

Formule 3D*				
Synonymes	▪ Acétylandromédol ▪ Andromédotoxine ▪ Rhodotoxine	▪ $\Delta^{10(18)}$-Andromédénol	▪ Andromédol ▪ 10-epi-grayanotoxine III ▪ Déacétylandromédotoxine ▪ Déacylasebotoxine I	▪ Acétylandroméd-10(18)-énol ▪ $\Delta^{10(18)}$Acétylandromédénol ▪ $\Delta^{10(18)}$-Andromédénol, acétate (7CI)

*Pour les formules en 3D, les atomes d'hydrogène apparaissent en bleu, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes de carbone en gris.

1.3. Toxicité

Les GTX I, II et III sont les principales GTX impliquées dans les intoxications. D'autres GTX sont également présentes dans certaines espèces de *Rhododendron* sp., mais aucun rapport d'intoxication n'a été signalé (GTX IV dans *R. decorum* et *R. ovedoxa*) (74).

Actuellement, GTX I et GTX III sont considérées pour être les plus toxiques, avec une DL₅₀ (dose létale conduisant à la mort de 50% d'un groupe d'animaux) respectivement de 1,31 mg/kg et 0,84 mg/kg chez la souris (126). GTX I et GTX III, les principaux isomères toxiques, sont aussi toxiques l'une que l'autre tandis que GTX II est la moins toxique des 3 (DL₅₀ de 26,10 mg/kg) (24,126).

Il est important de noter que les différents types de GTX peuvent agir à différents niveaux. GTX I est la principale toxine responsable des manifestations cardiaques (31). En effet, elle affecte à la fois le nœud sinusal et la conduction auriculo-ventriculaire. Elle augmente l'afflux d'ions sodium dans le cerveau et le cœur (127). Il s'agit d'un agent hypotenseur puissant (82). GTX II a la capacité de supprimer le battement spontané du nœud sinusal. Cet effet est attribué à la dépolarisation provoquée par cette toxine (31). Quant à GTX III, elle provoque une dépolarisation prolongée dans les muscles squelettiques (127). Tous ces effets ont été étudiés chez les animaux.

Chez les *Rhododendron* spp., le principal isomère toxique retrouvé est GTX III bien que GTX I et GTX II soient également présentes mais en quantités inférieures (24).

Suivant les cas d'intoxication, les GTX retrouvées varient : GTX I et II ont été mises en évidence dans le miel, les feuilles et les fleurs de *R. ponticum* dans plusieurs cas d'intoxication dans la région orientale de la mer Noire, GTX I a été identifiée dans l'urine d'un enfant intoxiqué par une préparation à base de *R. simsii* à Hong Kong tandis qu'au Canada seules les GTX II et GTX III avaient été retrouvées dans un miel toxique (5). Par ailleurs, les analyses toxicologiques du miel suspecté des intoxications de 2013 à la Réunion ont mis en évidence GTX III (Annexe 2). Pour les autres intoxications, le type de GTX n'est pas toujours rapporté.

1.4. Classification

Les GTX sont des neurotoxines appartenant à une famille de toxines liposolubles agissant sur le site 2 des canaux Na⁺VD (128).

1.5. Relation structure-activité

Des analyses concernant la relation structure-activité des GTX ont permis de montrer que des éléments importants de leur structure, étaient essentiels à leur interaction avec le canal sodique. L'activité biologique des GTX dépend ainsi du type de groupements ainsi que de leurs positions (129).

Tout d'abord, l'hydrophobie de la face α des GTX (correspondant aux groupements situés à l'arrière de la molécule), dont le C14 est le point critique, contribue fortement à leur activité (Figure 31) (130). En effet, une modification de cette surface, par addition d'un groupement amine hydrophile, réduit considérablement l'activité des GTX. De plus, les groupements hydroxyle (OH) présents sur cette surface, en C10 et C16, augmentent l'activité mais l'addition de groupements OH supplémentaires la diminue (126). En effet, il a été démontré que la transformation de GTX II ou GTX III, par addition d'un groupement OH en C9, réduit la toxicité de ces composés (131). L'un des intermédiaires clé, pour transformer GTX I et GTX III dans leur isomère respectif au niveau du C10, est le composé 10,20-époxy-GTX II (129). Cependant, aucune information concernant la toxicité de ce dérivé n'est disponible (15).

D'autre part, le groupement méthyle de la surface β en C10 (correspondant aux groupements situés à l'avant de la molécule) et les groupements OH en C3, C5 et C6 contribuent grandement à la toxicité aiguë induite par ces toxines (Figure 31) (130).

Contrairement à GTX II, les GTX I et III ont une structure idéale pour bloquer les canaux sodiques, expliquant sans doute leur toxicité supérieure (121).

Enfin, l'action des GTX dépend également de la conformation du canal. Elles se lient uniquement au canal lorsqu'il est ouvert mais se dissocient lorsqu'il est fermé (130,132).

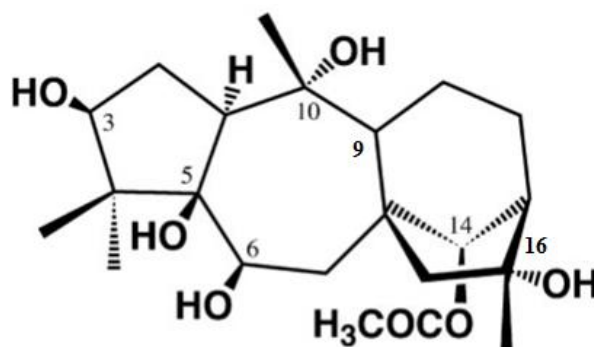


Figure 31 : Structure de GTX I pour comprendre l'activité des GTX, d'après (130).

1.6. Comment les grayanotoxines se retrouvent-elles dans le miel ?

Présentes dans le nectar et le pollen de certaines espèces, les GTX se retrouvent dans le miel, soit parce que le nectar est directement butiné par l'abeille, soit parce que le pollen se colle à celle-ci lorsqu'elle est à proximité. Lorsque l'abeille butine du nectar contenant la toxine, elle aspire cette toxine qui se retrouve mélangée aux autres composés.

Les GTX non toxiques pour les abeilles (17,77) sont ainsi ramenées à la ruche. A l'intérieur de celle-ci, étant non volatiles, elles résistent à l'évaporation forcée et se retrouvent finalement, dans les alvéoles operculées. A ce stade, le miel est brut et naturel, tel sorti de la ruche. C'est par la consommation de ce miel en rayon que les intoxications sur l'île de la Réunion sont survenues.

Avant leur conditionnement, les miels industriels sont généralement traités pour détruire les spores de levure par pasteurisation. Même s'il est difficile de connaître la stabilité des GTX à la chaleur, il semblerait qu'elles soient thermolabiles (15,133) et ainsi détruites par cette méthode. La température exacte n'est pas connue (17) mais semble inférieure à 80°C. Les miels impliqués dans les intoxications sont des miels produits de manière traditionnelle qui ne sont pas traités, c'est pourquoi les GTX demeurent présentes.

D'autre part, les miels commercialisés sont souvent des mélanges de miels de différentes origines ce qui diminue la concentration d'éventuelle GTX dans le miel final obtenu.

2. Le rôle du système nerveux central, du système nerveux parasympathique et du nerf vague dans l'intoxication aux grayanotoxines

Les symptômes semblent avoir plusieurs explications (5,95,134) mais tous semblent avoir en commun le fait qu'ils sont liés aux effets membranaires qui seront décrits par la suite. Ces effets sont observés dans les muscles squelettiques et cardiaques, ainsi que dans les cellules nerveuses périphériques et centrales (95). Il est difficile de mettre en relation les différents mécanismes étudiés dans la littérature, c'est pourquoi chaque protagoniste sera décrit séparément.

2.1. Rôle du système nerveux central

Les canaux sodiques des neurones sont vraisemblablement la cible des GTX (5). Une étude réalisée chez le rat (100), à propos de la physiopathologie des GTX, a mis en évidence le rôle important du SNC par rapport au système nerveux périphérique. En effet, de faibles doses (50 mg de miel) administrées par voie intra-cérébro-ventriculaire ont donné les mêmes effets physiologiques (bradycardie et dépression respiratoire) que des doses plus élevées (1 et 5 g/kg) administrées par voie intrapéritonéale. Ce résultat indique que le(s) site(s) d'action des GTX est/sont situé(s) au sein du SNC (100). D'ailleurs cette action centrale pourrait expliquer les convulsions parfois rencontrées lors d'une intoxication (51).

D'autre part, les neurones de l'hypothalamus ventro-médian (VMH) du SNC contrôlent l'activité du système nerveux autonome (SNA). Ils reçoivent à la fois une innervation GABAergique et glutaminergique qui régulent leur activité. L'activation de ces neurones chez le rat est responsable d'une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. D'ailleurs, il est reconnu que les symptômes d'une intoxication au miel fou sont étroitement liés à un dysfonctionnement du SNA. Une étude (95) a permis d'examiner les effets de GTX III sur la libération d'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de glutamate. En résumé, il a été démontré que GTX III est responsable d'une libération accrue de GABA et de glutamate au niveau des terminaisons nerveuses de l'HVM, secondaire à son action au niveau des canaux Na^+VD (*cf.* 4.2.1). Cette libération pourrait expliquer certains symptômes rencontrés lors d'une intoxication aux GTX tels que l'hyperhidrose, l'hypersialorrhée, les vomissements et la bradycardie (95).

2.2. Rôle du système nerveux parasympathique et du nerf vague

Les données cliniques concernant l'intoxication aux GTX soulignent un dysfonctionnement au sein du SNA (voie motrice du système nerveux périphérique) et plus particulièrement un effet stimulant sur le système parasympathique (49,95). C'est l'incapacité à inactiver les canaux Na^+VD qui serait responsable de cette stimulation et par conséquent des symptômes (5). Cette hypertonie vagale serait responsable de la vasodilatation, du dysfonctionnement du nœud sinusal et des réflexes gastro-intestinaux (18).

Les symptômes cardiovasculaires (hypotension et bradycardie) seraient liés à une stimulation périphérique du nerf vague. Une étude (100) a permis de prouver que la stimulation du nerf vague à la périphérie jouait un rôle dans la bradycardie induite par les GTX. En effet, chez des rats ayant subi une vagotomie bilatérale, cette bradycardie n'a pas eu lieu après l'administration de GTX.

De plus, il semblerait que les GTX déclenchent un réflexe cardio-inhibiteur appelé le réflexe de Bezold-Jarish (BJR), par l'intermédiaire du nerf vague, responsable d'une bradycardie, d'une hypotension et d'une vasodilatation périphérique (134). La description de ce réflexe a été réalisée pour la première fois en 1867 par Bezold et Hirt, en utilisant de la vératridine qui se lie au même site et qui a la même action que les GTX sur les canaux sodiques (18). Aujourd'hui, le BJR correspond au réflexe décrit par Dawes au milieu du XXème siècle : bradycardie, vasodilatation et hypotension résultent de la stimulation de récepteurs cardiaques, situés dans la paroi des ventricules. La stimulation de ces récepteurs est réalisée par l'intermédiaire du nerf vague, plus particulièrement par des fibres amyéliniques de type C. L'activation de ce réflexe est responsable d'une inhibition des centres vasomoteurs, d'une diminution du flux orthosympathique et d'une diminution de la résistance vasculaire périphérique conduisant aux symptômes décrits ci-dessus (43). La reconnaissance de ce réflexe est importante pour la gestion des patients. Dans les intoxications au miel fou, la bradycardie et le bloc AV sont pharmacologiquement induits et ne sont pas les symptômes d'une cardiopathie structurale. Par conséquent, ce réflexe de BJR répond rapidement à l'atropine quelque soit la toxine (GTX ou vératridine) (134).

Enfin, comme les récepteurs qui assurent la médiation dans la stimulation vagale du myocarde sont des récepteurs muscariniques M2, les effets du sulfate d'atropine (antagoniste muscarinique non spécifique bloquant à la fois le centre et la périphérie) et ceux de l'AF-DX116 (antagoniste sélectif des récepteurs M2) ont été comparés dans une étude (70). Il a été

observé que le sulfate d'atropine supprime à la fois la bradycardie et la dépression respiratoire, induites par les GTX tandis que l'AF-DX116 supprime seulement la bradycardie (aucun effet sur la dépression respiratoire). Ces résultats permettent de mettre en évidence que les récepteurs muscariniques M2 sont impliqués dans la cardiotoxicité des GTX.

3. Effets des grayanotoxines au niveau cellulaire

Les GTX agissent au niveau des canaux Na^+VD . Ce chapitre sera l'occasion de faire un rappel sur le canal sodique et de décrire l'action des toxines sur celui-ci.

3.1. Le canal sodique

Les canaux Na^+VD sont des protéines transmembranaires responsables de l'augmentation voltage dépendante de la perméabilité aux ions sodium, déclenchant un potentiel d'action (PA). Lorsqu'ils détectent un changement de potentiel dans la membrane, ils sont activés et produisent par conséquent un afflux massif d'ions sodium. Immédiatement après, les canaux vont commencer à s'inactiver et le courant va diminuer. Dans l'état inactivé, le canal reste réfractaire à de nouveaux stimuli. Ils doivent retourner à l'état fermé pour être sensible à une nouvelle dépolarisation (135). Le cycle de fonctionnement du canal est le suivant : fermé – ouvert – inactivé – fermé (Figure 30). Ces 3 états sont décrits ci-dessous :

- ouvert : le canal est perméable aux ions. Une stimulation à provoquer l'ouverture de ces canaux. Les ions sodiques les traversent passivement et pénètrent dans la cellule. La phase externe de la membrane devient électronégative et la face interne électropositive. C'est la phase de dépolarisation du PA (en rouge Figure 32).
- inactivé : c'est l'étape située entre les conformations ouverte et fermée. Le canal vient d'être obturé, il est imperméable aux ions mais ne peut pas être ouvert immédiatement. Il s'agit d'une période réfractaire durant laquelle le canal ne peut pas s'ouvrir. Les canaux sodiques sont inactivés, donc le sodium ne rentre plus. Les canaux potassiques s'ouvrent : les ions potassiques sortent pour compenser l'entrée des ions sodiques. La phase externe de la membrane devient électropositive et la face interne électronégative. La membrane est à nouveau polarisée. C'est la phase de repolarisation du PA (en bleu Figure 32). Mais les canaux potassiques restent ouverts et les ions continuent de sortir. La phase

externe de la membrane devient hyper positive et la face interne hyper négative. C'est la phase d'hyperpolarisation du PA (en vert Figure 32).

- fermé : le canal est imperméable aux ions et peut être activé immédiatement.

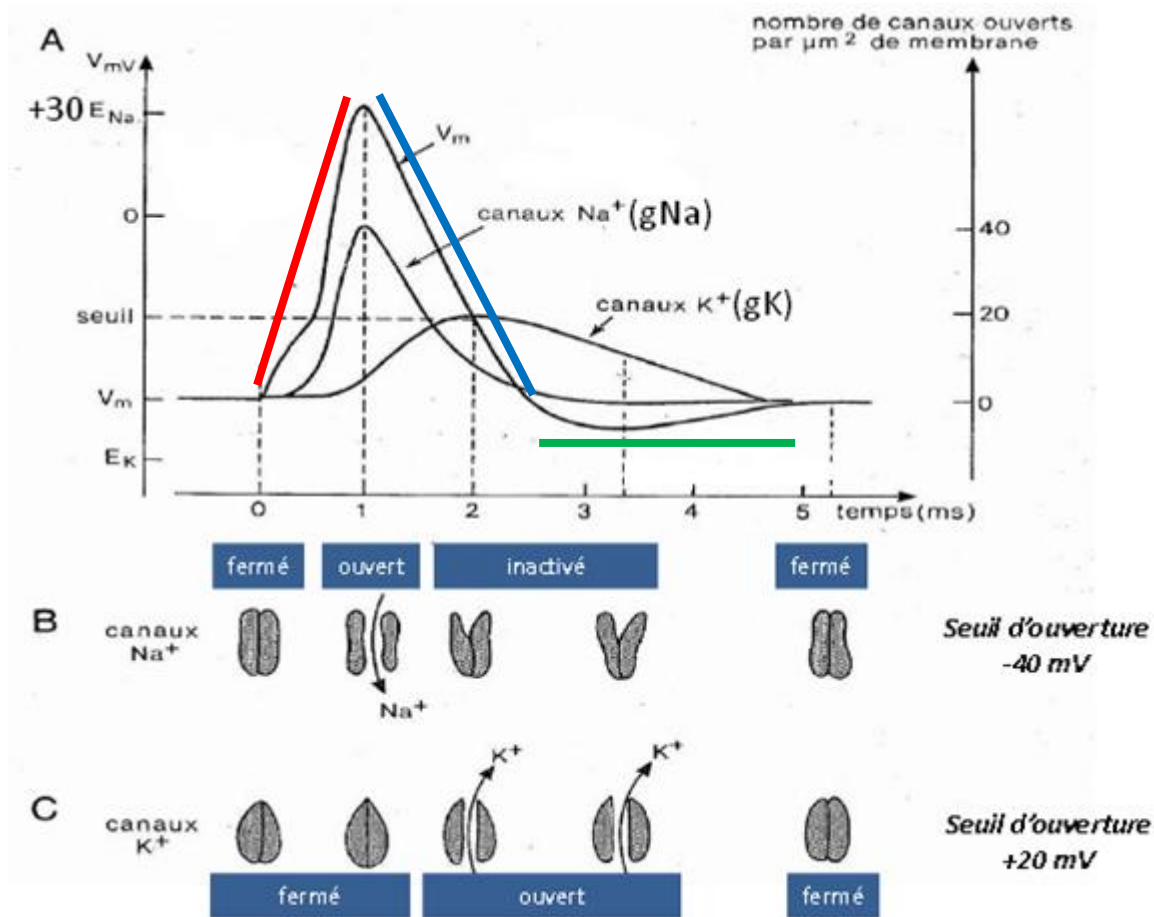


Figure 32 : Représentation des conformations des canaux sodiques et potassiques suivant la phase du potentiel d'action.

3.1.1. Structure

Comme beaucoup d'autres canaux ioniques voltage-dépendants, les canaux Na^+ VD sont des complexes transmembranaires constitués d'une grande protéine de base, la sous-unité α (220 à 260 kDa, ≈ 2000 acides aminés), associée à une ou plusieurs sous-unités β régulatrices, plus petites (22 à 36 kDa). La sous-unité α contient un pore aqueux sélectivement perméable aux ions sodium (136).

Seule la sous-unité α est indispensable à l'activité électrique tandis que les sous-unités β stabilisent le canal. En effet, d'un point de vue fonctionnel, la sous-unité α est suffisante mais la cinétique et la tension du canal sont modifiées par les sous-unités β (128). Au moins cinq

sous-unités β ($\beta 1$ à $\beta 4$ et $\beta 1A$) ont été identifiées à ce jour provenant de 4 gènes différents (SNC1B-4B), avec $\beta 1A$ comme variant d'épissage de la sous-unité $\beta 1$. Les sous-unités β peuvent être liées soit de manière non covalente (sous-unités $\beta 1$ et $\beta 4$) ou de manière covalente (sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$) pour former un hétéromère avec la sous-unité α . Les canaux sodiques du SNC et du cœur contiennent les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 4$ tandis que ceux des muscles squelettiques ne contiennent que la sous-unité $\beta 1$ (128).

La sous-unité α se compose de 4 domaines homologues (I-IV), chacun contenant 6 segments transmembranaires (S1-S6) (128) (Figure 33). Les 4 domaines sont reliés par 3 boucles de liaisons cytoplasmiques de taille différente. Cet ensemble forme une protéine en forme de cloche. Chaque domaine est constitué de deux modules ; le premier étant le module de détection du voltage formé par les segments S1, S2, S3 et S4, le second étant le module pore, formé par S5, S6 et par la boucle de connexion extracellulaire. Cette boucle se situe entre les segments S5 et S6 des 4 domaines et plonge dans la membrane créant ainsi, un filtre de sélectivité ionique à l'extrémité externe du pore (SS1-SS2).

Le module de détection du voltage peut ouvrir le canal grâce au segment S4, appelé senseur de potentiel. Il possède, tous les 3 résidus, des charges positives portées par des résidus lysine ou arginine (128). Lors de la dépolarisation, le potentiel de membrane s'élève et les segments S4 se déplacent vers l'extérieur, ce qui provoque un changement de conformation qui ouvre les pores et déclenche l'activation du canal. La charge ainsi que la structure du segment S4 sont déterminantes à la fonction de senseur de potentiel. En effet, la neutralisation de la charge positive de ces segments modifie l'activation du canal (132).

Quelques millisecondes après l'ouverture du canal, l'inactivation rapide commence. La partie du canal responsable de cette inactivation est situé dans la liaison intracellulaire reliant les domaines III et IV (Isoleucine, Phénylalanine et Méthionine) (5,128,130,135,136).

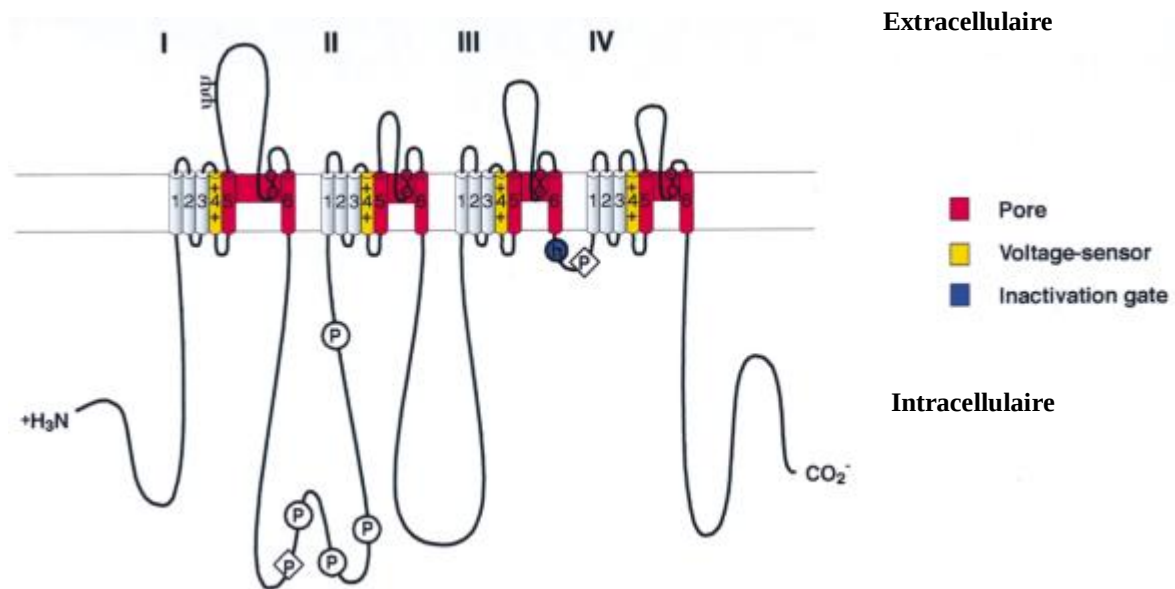


Figure 33 : Organisation du canal sodique, d'après (136).

Les cylindres numérotés représentent les segments d'hélice α . Les lignes en gras représentent les chaînes polypeptidiques de chaque sous-unité, avec une longueur à peu près proportionnel au nombre de résidus d'acides aminés. P sont les sites de phosphorylation des protéines par la protéine kinase A (cercles) ou par la protéine kinase C (losanges), la zone en rouge représente la paroi du pore des segments S5-P-S6, S4 ++ sont les senseurs de potentiel, h à l'intérieur d'un cercle bleu est le lieu d'inactivation des particules dans la boucle.

3.1.2. Nomenclature et classification

Les canaux sodiques appartiennent à la superfamille des canaux ioniques comprenant les canaux potassiques et calciques voltage-dépendants. Cependant, à la différence des autres canaux, les propriétés fonctionnelles des canaux sodiques connues sont relativement similaires. Une nomenclature normalisée a été développée. Cette nomenclature est basée sur celle des canaux potassiques voltage-dépendants. Elle utilise un système numérique pour définir des sous-familles et des sous-types sur la base de similitudes entre les séquences d'acides aminés des chaînes. Dans ce système de nomenclature, le nom du canal est constitué du symbole chimique du principal ion imprégné (Na) avec le principal régulateur physiologique (tension) indiqué en indice (V). Le nombre qui suit l'indice indique la sous-famille de gènes (actuellement seulement Na_V1) et le nombre d'après identifie l'isoforme spécifique du canal (par exemple, $\text{Na}_V1.1$). Ce dernier numéro a été attribué dans l'ordre approximatif dans lequel chaque gène a été identifié. Les variants d'épissage de chaque membre de la famille sont identifiés par des lettres minuscules après les chiffres (par exemple, $\text{Na}_V1.1a$) (128).

Dans les cellules de mammifères, 9 isoformes de sous-unités α (Na_v1.1 - Na_v1.9) ont été caractérisés à ce jour. Les isoformes sont distribués de manière différentielle dans l'ensemble des cellules excitables du corps, en corrélation avec les différentes propriétés fonctionnelles des tissus correspondants. Na_v1.1, 1.2, 1.3 et 1.6 sont principalement exprimés dans le SNC. Na_v1.7, 1.8 et 1.9, au contraire, sont fortement exprimés dans le système nerveux périphérique. Enfin, Na_v1.4 et 1.5 sont les isoformes présents respectivement dans le muscle squelettique adulte et dans le muscle cardiaque (135).

3.1.3. Pharmacologie moléculaire du canal sodique

Les canaux sodiques sont la cible moléculaire de plusieurs groupes de neurotoxines qui altèrent fortement la fonction du canal en se liant à des récepteurs spécifiques, tous situés sur les sous-unités α (128). Au moins 6 récepteurs distincts pour les neurotoxines et 1 récepteur pour les anesthésiques locaux et les médicaments apparentés ont été identifiés et sont résumés dans le Tableau 14 (128).

Tableau 14 : Les différents sites récepteurs des canaux sodiques et leurs ligands, d'après (128).

Site de fixation	Toxines	Domaines
Site 1	Tétradotoxine (poison du Fugu) Saxitoxine μ - Conotoxine	IS2-S6, IIS2-S6 IIIS2-S6, IVS2-S6
Site 2	Vératridine Aconitine Batrachotoxines Grayanotoxines	IS6, IVS6
Site 3	Toxines α de scorpions Toxines d'anémones de mer	IS5-IS6, IVS3-S4, IVS5-S6
Site 4	Toxines β de scorpions	IIS1-S2, IIS3-S4
Site 5	Brevetoxines Ciguatoxines	IS6, IVS5
Site 6	δ -Conotoxines	IVS3-S4
Site des anesthésiques	Anesthésiques locaux Antiarythmiques Antiépileptiques	IS6, IIIS6, IVS6

Les sites sur lesquels les neurotoxines agissent sont couplés allostériquement. Ainsi, un changement de conformation de l'un d'entre eux modifie la conformation du canal (ouvert/fermé/ inactivé) mais modifie aussi la conformation des autres sites et l'affinité des toxines pour leurs sites. Les neurotoxines peuvent être classées en 3 groupes : les toxines bloquant les pores, les toxines affectant la transmission sélective des pores à partir de récepteurs intramembranaires et les toxines affectant la transmission sélective à partir de récepteurs extracellulaires (136).

Les GTX appartiennent à la famille des neurotoxines se liant au site 2, comprenant également les batrachotoxines (BTX) (à partir de la peau de la grenouille colombienne *Phyllobates aurotaenia*), l'aconitine (à partir d'*Aconitum napellus*) et la vératridine (alcaloïde extrait d'une Mélanthiacées, la cévadille *Schoenocaulon officinale* A. Gray). Ces neurotoxines modifient le déclenchement du PA par liaison à des récepteurs intramembranaires. Le site 2 correspond au segment S6 des domaines I et IV de la sous-unité α , en violet sur la figure ci-dessous (Figure 34) (136).

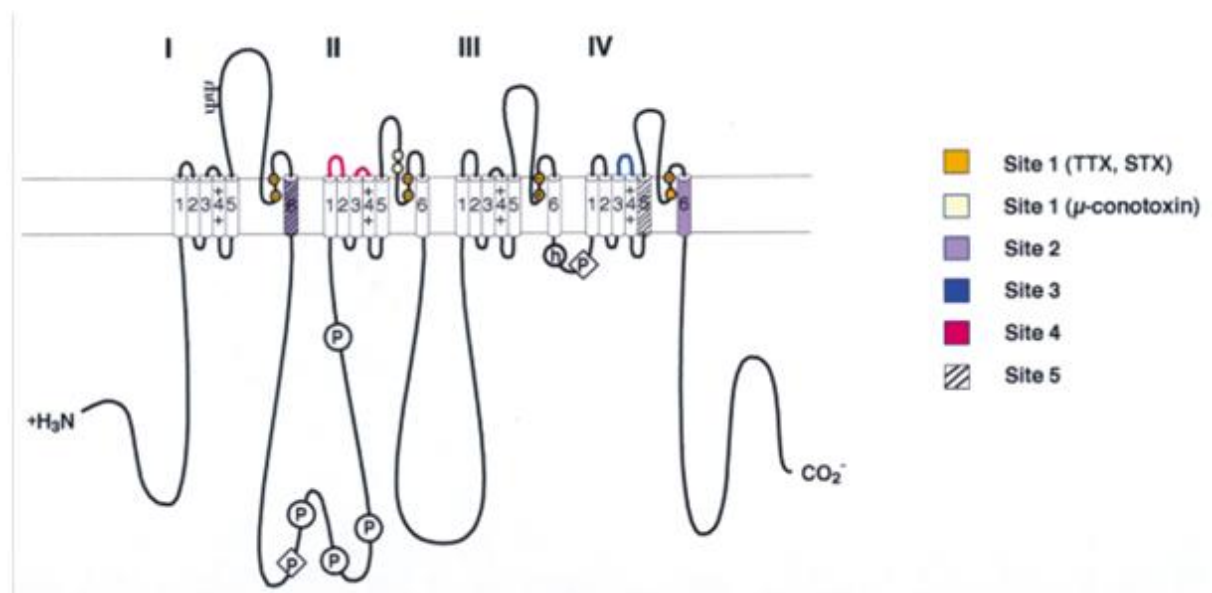


Figure 34 : Schéma des différents sites de liaison des neurotoxines connues sur la sous-unité α du canal sodique, d'après (136).

3.2. L'action des grayanotoxines au niveau du canal

3.2.1. Mécanisme d'action

Les effets toxiques des GTX sont la conséquence de leur liaison aux canaux Na^+VD , présents dans la membrane des cellules excitables (musculaires et nerveuses) (95). Elles sont responsables de l'activation persistante de ces canaux et interfèrent avec la transmission du PA (75,95). Un certain nombre d'études a permis de clarifier le mécanisme d'action des GTX sur ces canaux (95,130).

Les GTX se lient uniquement lorsque le canal est ouvert et le maintiennent dans cette conformation par changement de sa configuration (5). Ce changement est responsable du blocage de l'inactivation rapide du canal et favorise son activation à des valeurs de potentiel plus négatives (déplacement du potentiel d'activation vers l'hyperpolarisation) : le canal reste ouvert plus longtemps. Etant ouvert, la perméabilité aux ions sodium est augmentée au niveau des membranes stimulées, inhibant ainsi la repolarisation (75,77). Les ions traversent passivement le canal et pénètrent dans la cellule. Cela provoquerait un effet chronotrope et inotrope négatifs (77).

Par conséquent, les cellules excitables sont maintenues dans un état de dépolarisation (état activé), au cours duquel l'entrée de calcium est facilitée (18). Ainsi, le temps de dépolarisation est allongé. GTX III est capable, à la jonction neuromusculaire, de dépolariser à la fois les membranes pré- et post-synaptiques (95). Cette augmentation de l'influx d'ions calcium dans les terminaisons synaptiques nerveuses excitatrices et inhibitrices des neurones de l'HVM serait responsable de la libération de GABA et de glutamate à partir de ces terminaisons.

L'effet des GTX peut se résumer en 3 étapes (130) :

1. Liaison au canal lorsqu'il est ouvert
2. Modification de configuration du canal empêchant son inactivation
3. Potentiel d'activation du canal modifié et déplacé vers l'hyperpolarisation

3.2.2. Site de liaison des grayanotoxines

Les GTX ont pour cible le site 2 du canal Na^+VD , indiqué en violet dans la Figure 34. Rappelons que ce site est également la cible de certains alcaloïdes (vératridine, aconitine) et des BTX. Des résidus spécifiques d'acides aminés (AA) présents à l'intérieur des segments

S6 des 4 domaines sont indispensables à l'action des toxines sur le site 2. D'autres sites participent également à cette liaison. Ces sites sont représentés sur la figure ci-dessous (Figure 35).

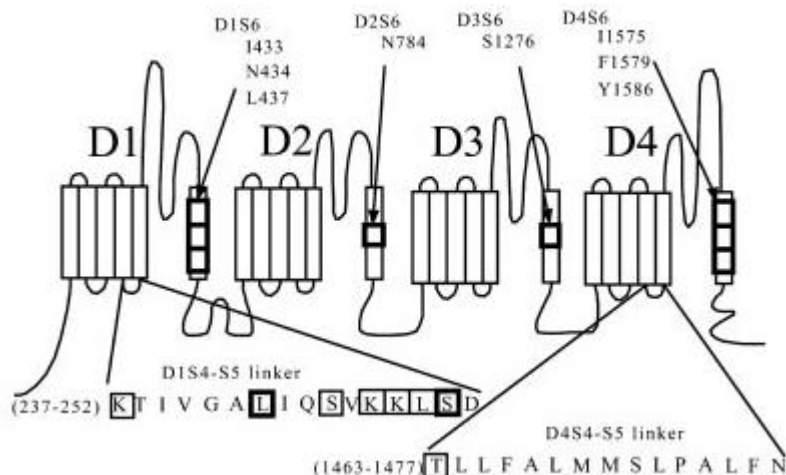


Figure 35 : Sites de liaison des GTX sur l'isoforme NaV1.4 d'après (130).

Les mutations indiquées par un carré causent une suppression modérée de l'activité des GTX. Celles indiquées par un carré avec une bordure en gras sont responsables d'une suppression marquée de l'activité. Les séquences d'AA de la boucle entre les segments 4 et 5 des domaines I et IV sont décrites. Les sites de liaison sur les segments S6 des 4 domaines sont représentés.

➤ Les segments S6 des domaines I et IV

Ces segments ont longtemps été considérés comme les seuls segments nécessaires à la liaison des GTX sur le canal Na⁺VD. Au sein de ces domaines, un certain nombre de résidus d'AA hydrophobes interagissent avec la face α des GTX. Cette interaction hydrophobe joue un rôle important dans la liaison des GTX à leur site (130). Rappelons que son activité a lieu dans un environnement hydrophobe.

Les AA interagissant avec les toxines du site 2 sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Les acides aminés des segments S6 des domaines I et IV de l'isoforme Na_v1.4 interagissant avec les toxines du site 2.

Acides aminés	Position	Segments	Domaines	Toxines cibles
Isoleucine (Ile)	433	6	I	GTX, BTX et vétratridine
Asparagine (Asn)	434	6	I	GTX, BTX et vétratridine
Leucine (Leu)	437	6	I	GTX, BTX et vétratridine
Isoleucine (Ile)	1575	6	IV	GTX, BTX et vétratridine
Phénylalanine (Phe)	1579	6	IV	GTX, BTX et vétratridine
Tyrosine (Tyr)	1586	6	IV	GTX

Les GTX partagent des résidus d'AA communs avec les BTX et la vétratridine. L'affinité de liaison de ces toxines à leurs sites est ainsi réduite par les mutations de ces résidus sur les canaux sodiques des muscles squelettiques. Il en est de même pour les résidus correspondants sur les canaux sodiques cardiaques (130).

Le résidu **Tyr-1586** constitue un site de liaison spécifique aux GTX, excluant ainsi les BTX et la vétratridine. La spécificité de ce site Tyr-1586 pourrait expliquer la différence de cinétique de liaison entre les GTX et les BTX. Les BTX se dissocient du canal lorsqu'il est ouvert tandis que les GTX se dissocient exclusivement lorsqu'il est fermé. Ce résidu Tyr - 1586 contrôle la liaison des GTX à leur récepteur : piégeage quand le canal est ouvert et libération quand le canal est fermé. D'autre part, un milieu hydrophobe autour du site de liaison semble important pour l'action des GTX. Ainsi, la chaîne latérale aromatique hydrophobe de ce résidu est nécessaire pour préserver la sensibilité des GTX. Une interaction directe entre la face α de GTX et le résidu Tyr-1586 est nécessaire à l'activité normale de la toxine. Ce résidu a un rôle déterminant dans l'action des GTX (130).

Le résidu **Phe-1579** contrôle l'accès des GTX à leur récepteur. Ce résidu a plutôt une fonction de régulation (130).

Le résidu **Ile-433** pourrait faire l'objet de recherche dans le futur. Il pourrait être l'un des sites les plus prometteurs, car les mutations de ce site affectent la liaison non seulement des

GTX et d'autres toxines du site 2 mais également des pyréthriinoïdes. Il est intéressant de noter les effets similaires des GTX et des pyréthriinoïdes sur la cinétique des canaux sodiques, les deux prolongent le temps durant lequel le canal est ouvert et suppriment ou ralentissent le temps durant lequel le canal est inactivé (130).

➤ **Les segments S6 des domaines II et III**

Plus récemment, de nouveaux sites de liaison ont été découverts sur le segment S6 des domaines II et III par mutagenèse. Les AA sont présentés dans le Tableau 16 (130).

Tableau 16 : Les nouveaux acides aminés des segments S6 des domaines II et III interagissant avec les toxines du site 2.

Acides aminés	Position	Segments	Domaines	Toxines cibles
Asparagine (Asn)	784	6	II	GTX, BTX et vétratridine
Sérine (Ser)	1276	6	III	GTX, BTX et vétratridine

Deux sites s'ajoutent ainsi à la liste des sites de liaison communs aux toxines du site 2 : **Asn-784** et **Ser-1276**.

➤ **La boucle de liaison intracellulaire entre les segments S4 et S5 des domaines I et IV**

De nouveaux sites de liaison ont été découverts sur la boucle de liaison intracellulaire entre S4 et S5 des domaines I et IV et sont représentés sur la Figure 36 (137).

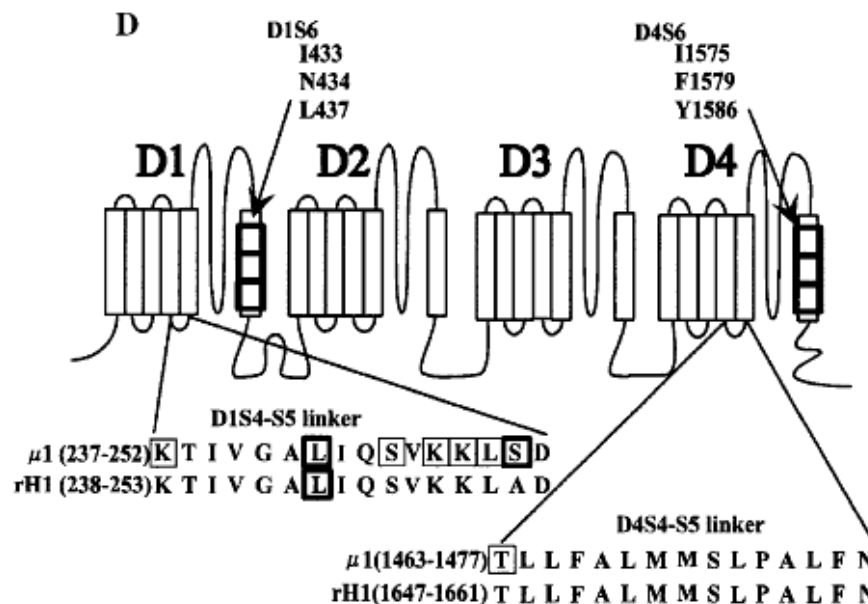


Figure 36 : Résidus d'acides aminés impliqués dans l'action des GTX sur la boucle intracellulaire entre S4 et S5 des domaines I et IV, d'après (137).

μ1 correspond à l'isoforme NaV1.5 (muscle cardiaque) et rH1 correspond à l'isoforme NaV1.4 (muscle squelettique). Les carrés bordés d'une ligne en gras mettent en évidence les mutations responsables de la suppression d'action de GTX sur les 2 isoformes. Les carrés bordés d'une ligne mince mettent en évidence les mutations responsables de la suppression modérée de l'action de GTX sur l'isoforme cardiaque uniquement. On retrouve également les sites d'actions des GTX sur les segments S6 des domaines I et IV.

Le résidu **Leu-243** de l'isoforme NaV1.5 et le résidu **Leu-244** de l'isoforme NaV1.4 présents sur la boucle intracellulaire entre les segments S4 et S5 du domaine I sont nécessaires à l'action des GTX. Un autre résidu présent sur cette boucle constitue un élément de liaison important pour les GTX sur l'isoforme NaV1.5 : il s'agit du résidu **Ser-251** (132). Ce résidu permet de différencier les 2 isoformes car il est présent uniquement sur l'isoforme NaV1.5. Le groupement OH sur ce résidu stabilise la liaison des GTX à leur site par formation de liaison hydrogène avec les groupements OH de la face β des GTX (132).

➤ **Relation structure-activité**

Ces toxines sont des modulateurs allostériques de la fonction du canal. En effet, elles favorisent l'ouverture du canal de façon indirecte par interactions allostériques (136). Lorsqu'elles se lient, ces toxines modifient les interactions des segments à l'intérieur des domaines et modifient également les interactions entre les domaines. Elles provoquent une activation persistante des canaux Na^+VD . Il a été suggéré que le blocage de l'inactivation rapide serait lié à l'interaction avec le segment S6 du domaine IV et que le changement allostérique perturberait le fonctionnement du segment S4 du domaine IV altérant alors la dépendance du voltage (132). En effet, cela modifierait le voltage perçu par le senseur de potentiel, et ainsi affecterait à la fois l'activation seule et le couplage activation-inactivation (128,130,132,136,137).

3.2.3. Accès au site de liaison

Le site 2 est localisé dans la membrane sur les segments transmembranaires des sous-unités α . Concernant l'accès des GTX au site 2, différents modèles sont discutés à ce jour, mais il reste encore peu compris.

Un modèle proposait, en premier lieu, une fixation des toxines sur des résidus lipophiles exposés vers l'extérieur avant l'entrée dans la membrane. Mais, il s'est avéré qu'il n'y a pas de récepteur aux GTX sur la surface externe (5).

Un modèle plus récent pose l'hypothèse de l'entrée des GTX par diffusion simple à travers la membrane. En examinant la structure des GTX, il est raisonnable de supposer que la voie empruntée à travers la membrane serait la phase lipidique (138).

Enfin, selon un dernier modèle, les toxines rentreraient via le pore en interagissant avec les résidus du segment S6 du domaine IV. Ce mécanisme pourrait expliquer d'une part la diminution de la conductance sodique (le flux est ralenti par la présence de la toxine dans le pore), mais également la diminution de la sélectivité aux ions. De plus, ces toxines se lient plus facilement au site lorsque le canal est activé, ce qui va encore dans le sens de ce dernier modèle ; le pore est ouvert et plus apte à accueillir les neurotoxines (135).

4. Le cas des intoxications aux grayanotoxines chez les animaux

4.1. Les cas d'intoxications

L'intoxication aux GTX est également fréquente chez les animaux. Elle touche essentiellement les bovins particulièrement sensibles, les moutons, les chèvres (5,75) et plus rarement les ânes, les chiens, les chats et les kangourous (76,139). Les plantes tenues pour responsables d'intoxication chez les animaux sont les *Rhododendron* sp., les *Pieris* sp. et les lauriers du genre *Kalmia*. Les espèces du genre *Rhododendron* semblent plus toxiques que celles du genre *Kalmia*. En effet, leurs doses toxiques représentent respectivement 0,2% et 0,4% du poids corporel chez les bovins (5). L'intoxication par les *Rhododendron* sp. a lieu principalement en hiver et au début du printemps, saisons durant lesquelles leurs feuilles restent vivaces, tandis que la nourriture se trouve limitée par les rigueurs du climat (76). Certains cas d'intoxications aux *Rhododendrons* sp. chez les animaux sont renseignés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Intoxications d'animaux par des espèces appartenant au genre *Rhododendron*, d'après (49).

Années	Animaux intoxiqués (nombre)	Espèce végétale responsable
1983	Chèvres	-
1983	Moutons (65)	<i>R. ponticum</i>
1985-1986	Moutons et agneaux	-
1989	Chèvres et moutons	<i>R. macrophyllum</i>
1997	Kangourous	-
2001	Chèvres (3)	<i>R. simsii</i>
2011	Bovins et moutons	<i>R. campanulatum</i>

Même si la nature des molécules impliquée dans les intoxications, décrites dans le Tableau 17, n'a pas toujours été renseignée, ces intoxications impliquent très probablement les GTX.

En général, les animaux victimes d'une intoxication aux GTX, présentent des troubles cardiaques, des tremblements, une hypersialorrhée et des troubles gastro-intestinaux avec vomissements violents (76). Plus rarement, des convulsions, une dyspnée, de l'atonie peuvent survenir, voire une pneumonie par aspiration. Actuellement, aucun antidote n'est connu (76).

Les symptômes d'intoxication chez le bétail surviennent le plus souvent dans les 3 à 14 heures après l'ingestion et demeurent présents pendant 2 jours. L'animal peut survivre mais contrairement à la plupart des cas chez l'homme, l'intoxication est souvent mortelle. Outre l'instabilité cardiovasculaire, la pneumonie par aspiration est une cause fréquente de décès (5).

En général, les animaux ne consomment pas les plantes de la famille des Ericacées et les éleveurs sont conscients des effets toxiques de celles-ci. Ainsi, ils nourrissent leurs animaux avec beaucoup de précautions. Mais, des intoxications peuvent survenir lorsque les plantes habituellement consommées manquent, lorsque les animaux changent d'habitat ou lorsque des plantes contaminées leur sont proposés (127). Ce dernier cas de figure s'est produit dans deux séries d'intoxication. Dans la première, un troupeau de chèvre a été intoxiqué par un voisin qui avait jeté dans le pâturage de celui-ci, des copeaux de *P. japonica*, après la taille de son bosquet (127). Dans la seconde, des chèvres nubienues du parc zoologique Riverbanks, en Caroline du Sud, ont développé une intoxication aux GTX suite à la consommation d'une branche de *R. simsii* donnée par un visiteur. Les chèvres présentaient les symptômes suivants : ballonnements, régurgitations abondantes, dépression et tremblements musculaires dans les membres postérieurs. Une analyse de l'urine et des selles des chèvres a confirmé le diagnostic (5,49).

Les animaux domestiques, tels que les chats et les chiens, peuvent également être exposés aux GTX généralement par l'ingestion de *Rhododendron* sp. retrouvés dans le jardin ou dans la maison. L'Animal Poison Control Center (APCC) a reçu 188 cas d'intoxication à ce genre à travers l'Amérique entre janvier et décembre 2003 chez le chat et le chien. Les symptômes les plus fréquents étaient les suivants : vomissements (28%), dépression (10%), diarrhée et anorexie (5%) (5,140).

Le traitement initial lors d'une intoxication à des espèces du genre *Rhododendron* consiste à provoquer des vomissements s'ils n'ont pas eu lieu. On peut les déclencher avec 1,5 mL/kg de peroxyde d'hydrogène à 3% per os chez le chien et le chat ou avec 0,02 à 0,04 mg/kg d'apomorphine par voie conjonctivale ou IV chez le chien. Les vomissements doivent être suivis par l'administration de charbon activé. Le rythme cardiaque doit être surveillé par un ECG et les contrôles de pression artérielle doivent être effectués à intervalles réguliers. L'atropine doit être administrée (0,02 à 0,04 mg/kg par voie IV) si l'animal présente une bradycardie. L'hypotension peut être corrigée par l'administration de fluides isotoniques. Des catécholamines, comme la dopamine ou la noradrénaline, peuvent être nécessaires si la

tension artérielle n'est pas normalisée par les fluides (140). Il est proposé également d'administrer des laxatifs et de réaliser des injections d'ions calciques et d'antibiotiques afin d'éviter qu'une pneumonie consécutive ne se déclare (76).

4.2. Les expérimentations

Pour comprendre l'intoxication au miel fou, des études chez le rat et la souris ont été réalisées. Ainsi, après administration de miel fou chez le rat, les 3 principaux effets toxiques étaient la dépression respiratoire, l'hypotension et la bradycardie sinusale ; bradycardie et hypotension étant des effets caractéristiques des GTX chez l'homme. La dépression respiratoire chez le rat a été sévère (fréquence respiratoire de 10,05/min). Cet effet a été rapporté également chez le chien, la souris et le cobaye. Chez l'homme, elle ne se produit que rarement. La gravité de cette dépression respiratoire peut ainsi dépendre de la quantité ingérée ou bien de l'espèce intoxiquée (70). De plus, après l'injection de GTX par voie intrapéritonéale chez la souris (82), leurs DL₅₀ ont été de 1.28 mg/kg pour GTX I et 0.908 mg/kg pour GTX III (valeurs quasi identiques à celles retrouvées dans (126) décrites dans le paragraphe 1.3 de ce chapitre qui étaient de 1,31 mg/kg et 0,84 mg/kg). Aucun effet toxique n'a été noté pour GTX II pour une dose maximale de 4 mg/kg. Alors que, deux autres études (126,131), toujours chez la souris ont prouvé que les injections de 10 ou de 100 mg/kg de GTX II pour l'une et de 26,10 mg/kg de GTX II pour l'autre étaient mortelles. Aucune étude concernant la toxicité aiguë des GTX chez le bétail n'a été réalisée.

5. Détection des grayanotoxines

Récemment, et de plus en plus, des préoccupations concernant l’empoisonnement par les GTX contenu dans le miel fou sont soulevées à travers le monde. C’est notamment le cas en Allemagne, où le BfR a appelé à un contrôle plus systématique des miels produit en Turquie. Ainsi, le développement de méthodes d’analyse rapide et fiable permettant la détection des GTX dans le miel constitue un réel besoin. Dans la littérature scientifique, très peu d’études ont été publiées pour caractériser ces toxines dans le miel fou (28).

5.1. Identification

Plusieurs techniques d’identification des GTX à partir de divers échantillons ont été rapportées.

Tout d’abord, les toxines ont pu être identifiées par **électrophorèse sur papier** (24). Moins volatiles que les sesquiterpènes, elles nécessitent l’utilisation de certaines techniques chromatographiques pour être identifiées (17). La **chromatographie sur couche mince** (CCM) (Figure 37) et des **méthodes de spectrométrie directes** ont été utilisées pour analyser la composition en GTX dans des extraits de végétaux et de miel (28). La CCM comprend une plaque de Silicagel G (0,250 mm), comme phase stationnaire, et un mélange toluène-acétate d’éthyle-acide formique (5:4:1, v/v), comme phase mobile. L’échantillon est ajouté au mélange chloroforme-acétone (9:1, v/v) avant d’être déposé sur la plaque (15,82).

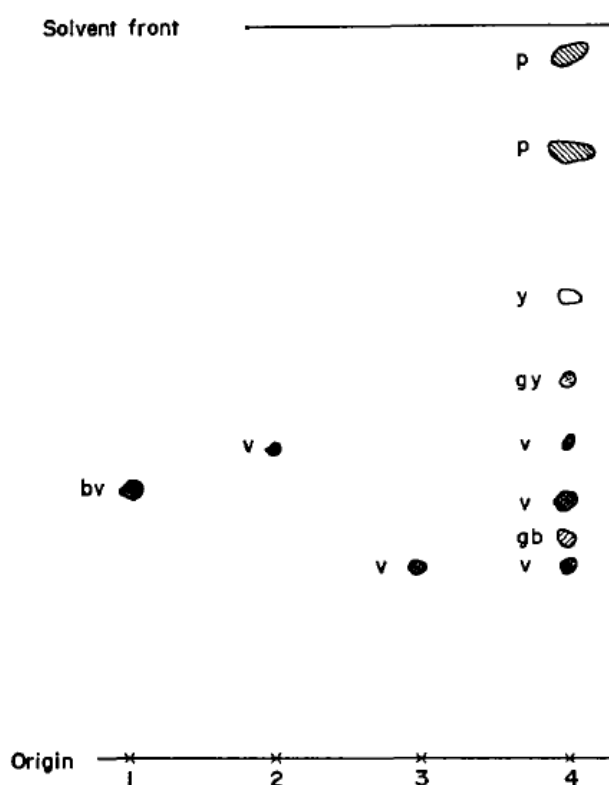


Figure 37 : Chromatogramme sur couche mince représentant les GTX I (1), II (2) et III (3) à partir d'un extrait de miel toxique en utilisant la solution réactive de Godin, d'après (82).

La solution réactive de Godin est préparée en mélangeant une solution de vanilline éthanolique (1% poids/ volume) avec un volume égal d'une solution d'acide perchlorique aqueux (3% p/v). Ce réactif prend une couleur violette au contact des GTX (141).

Une **CCM à deux dimensions** a été utilisée chez les animaux, pour faire l'analyse qualitative en GTX à partir de matières végétales avec une détection à 1 µg/g, et également à partir de contenu gastro-intestinaux et de selles avec une détection à 0,2 µg/g d'extraits. Cependant, cette méthode était qualitative et l'identification basée sur une réaction colorimétrique non spécifique (142).

La mise en évidence des GTX dans le miel a été réalisée également, par **chromatographie en phase gazeuse** (GC) avec des colonnes capillaires en acier inoxydable, après dérivation avec le groupement triméthylsilyl ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) (28). En effet, ces molécules n'étant pas suffisamment volatiles, cette étape de dérivation est nécessaire avant l'analyse par GC (24).

L'identification est en grande partie basée sur la **résonnance magnétique nucléaire**, l'**infrarouge** et la **spectrométrie de masse** (17).

D'ailleurs, les toxines peuvent être mises en évidence par **chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem** (LC-MS/MS). Récemment, la LC-MS/MS est devenue l'outil analytique de choix pour mettre en évidence de façon précise et fiable les différents résidus et contaminants, en raison de sa forte spécificité, sélectivité et sensibilité (28). Cette méthode permet de fournir une analyse quantitative rapide, ce qui constitue une amélioration par rapport à la CCM. Ce tandem a permis d'analyser les contenus gastro-intestinaux, les selles et l'urine en GTX I, II et III d'animaux (123). Les limites de détection de la méthode étaient de 0,2 µg/g dans le contenu gastro-intestinal et dans les selles et de 0,05 µg/g dans l'urine. Une ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode positif a été utilisée pour vaporiser les molécules et les ioniser. Le piège ionique quadripolaire constituait l'analyseur permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La séparation chromatographique a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse en utilisant un gradient eau-méthanol avec de l'acide acétique à 1%.

La LC-MS/MS, à triple quadripôle et ESI, a permis également de mettre en évidence simultanément les GTX I et III dans du miel (28) (Figure 38). La séparation chromatographique a été réalisée de la même façon que ci-dessus.

Enfin, récemment et pour la première fois, cette technique a permis d'effectuer une analyse en GTX dans le sang chez le rat (75). La limite de détection des GTX était de 1 ng/mL. Cette sensibilité a été suffisante pour mettre en évidence des GTX dans du sang suspect. Cette étude est la première rapportant les paramètres toxicocinétiques des GTX I et III dans le sang chez le rat.

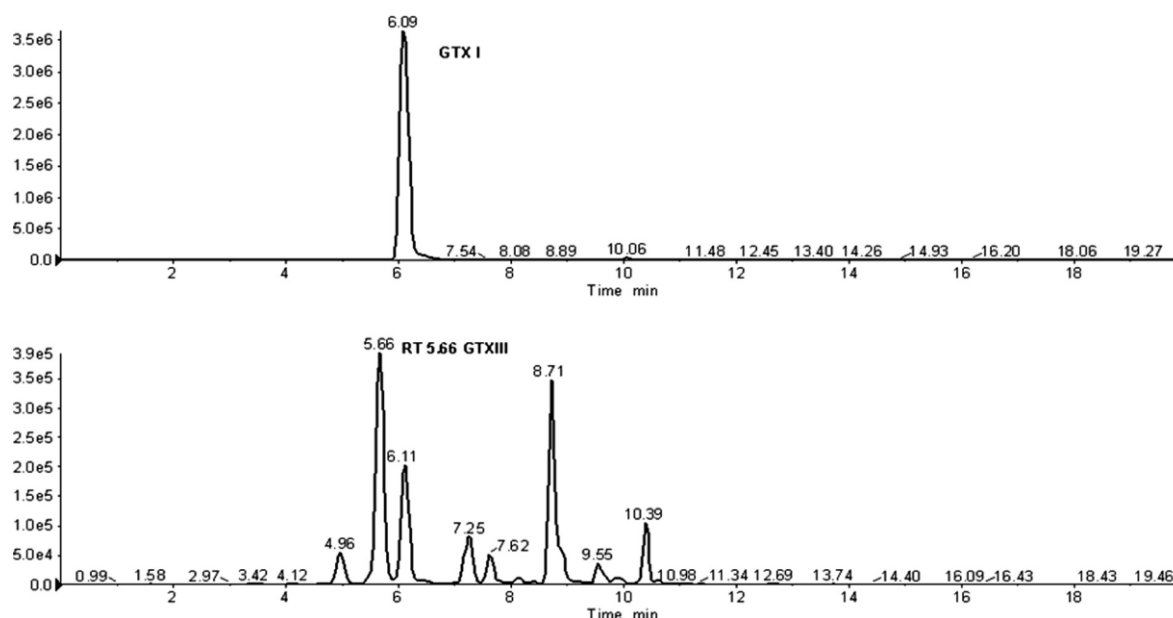


Figure 38 : Chromatogramme de masse de GTX I et III obtenu par LC-MS/MS, d'après (23).

Des échantillons de sol contenant des résidus de *R. ponticum* ont été analysés en utilisant la **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-TOF-MS)** (121). Cette technique a permis de mettre en évidence les GTX I, II et III.

Enfin dans une étude récente, la **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution** a été utilisée pour analyser les toxines végétales dont GTX III (143).

Les techniques et méthodes d'analyses sont de plus en plus perfectionnées et sensibles. Ces évolutions devraient permettre un meilleur suivi de la présence de GTX dans le miel, l'urine ou le sang de personnes intoxiquées pour améliorer les méthodes diagnostics.

5.2. Extraction des grayanotoxines à partir de différents échantillons

Les GTX ont souvent été extraites à partir d'échantillons suspects par des méthodes d'extraction classiques, valables pour les terpènes naturels, utilisant le méthanol ou le dichlorométhane (142).

En ce qui concerne l'extraction des GTX à partir du miel fou, la méthode décrite par Scott (82) a été souvent adoptée par divers groupes de recherche avec de légères modifications (9,70,100). Dans ce procédé, l'équivalent de 50 g de miel est, homogénéisé avec 10 ou 100 mL d'un mélange eau-méthanol (3:1 ou 1:1, v/v), puis ajusté à un pH de 6,5

avec l'addition de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N et enfin extrait avec un volume variant de 5 x 30 et 3 x 100 mL de chloroforme. Les phases organiques sont combinées et exposées à une évaporation soit sous vide en utilisant un évaporateur rotatif, soit par décantation à 50°C.

Pour l'extraction de GTX à partir d'échantillons de feuilles, Karakaya (9) et Constantine (9) ont adhéré à la méthode de Scott (82), avec de légères modifications.

Dans la première méthode (Karakaya 1977), 5 g de feuilles séchées de *R. ponticum* ont été pulvérisés et extraits dans un appareil Soxhlet avec du méthanol pendant 40 h. L'homogénat a été évaporé à sec sous vide. Le résidu a ensuite été dissout dans un mélange eau-méthanol (eau-méthanol, 3:1, v/v), ajusté à un pH de 6,5 et filtré. Le filtrat a été extrait avec 5 x 30 mL de chloroforme. Les phases organiques ont enfin été combinées et évaporées à sec. Dans la deuxième méthode (Constantine 1977), 10 g de feuilles séchées de *R. ponticum* ont été pulvérisés et extraits dans un appareil Soxhlet avec 150 mL d'éther de pétrole et ensuite 200 mL d'éthanol. L'extrait éthanolique a été réduit à 50 mL sous vide. Après dilution avec un volume égal d'eau, une extraction avec 100 mL de chloroforme a été effectuée. L'extrait chloroformique a enfin été séché avec du sulfate de sodium anhydre et évaporé à sec sous vide (9).

Le problème est que ces solvants extraient d'autres substances en même temps que les GTX. L'efficacité de l'ionisation des GTX est alors affectée par ces autres substances, surtout lorsque les analyses se font ensuite avec un spectromètre de masse avec une source ESI. Par conséquent, pour obtenir une méthode d'analyse par LC-MS/MS solide, il est impératif d'éliminer ou de minimiser la présence de ces impuretés avant l'analyse des extraits. Ainsi, plusieurs méthodes ont été décrites (28).

La première consiste à mélanger les échantillons à analyser (miel, selles, urine ou contenu gastro-intestinal) avec du méthanol (121). L'extrait obtenu est dilué avec de l'eau et purifié des composés indésirables par extraction en phase solide (SPE) inverse. Le filtrat obtenu est ensuite analysé par LC-MS/MS (28,123). Cependant, cette méthode s'avère être relativement coûteuse et chronophage à cause de cette étape de SPE. De plus, cette dernière est compliquée et constitue ainsi, une source d'erreurs potentielle lors de la préparation des échantillons.

Voici l'exemple d'une méthode de préparation d'un échantillon de miel avant l'analyse par LC–MS/MS puis son analyse, d'après (23) :

- *Ajouter 5 mL d'eau au 5 g du mélange contenant les échantillons de miel*
- *Passer le mélange au vortex pendant 60 secondes*
- *Centrifuger pendant 5 minutes à 3000 rpm*
- *Filtrer la couche supérieure*
- *Réaliser ce même procédé d'extraction 2 fois avec 25 mL d'éthanol à chaque fois*
- *Réaliser une SPE des composés indésirables en utilisant l'adsorbant Oasis HLB (phase polymérique à base de divinylbenzène et N-vinylpyrrolidone) comme phase solide et en utilisant le mélange, 2 x 5 mL d'éthanol et 2 x 5 mL d'eau, comme phase liquide*
- *Passer à travers la cartouche le mélange : échantillon de miel filtré, 5 mL d'eau et 5 mL du mélange acétone/ eau (20/80)*
- *Isoler les échantillons avec 5 mL de méthanol et sécher les sous azote à $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$*
- *Ajouter 1 mL d'éthanol à l'extrait sec*
- *Placer le mélange dans un bain d'eau à ultrasons pendant 1 min*
- *Centrifuger les échantillons à 3000 rpm pendant 1 min*
- *Éliminer la couche supérieure par filtration avec des filtres de $0,45\ \mu\text{m}$*
- *Analyser les extraits par LC-MS / MS en GTX I et GTX III en utilisant une colonne (symétrie C18 $5\ \mu\text{m}$ $2,1 \times 150\ \text{mm}$) avec une phase mobile A (eau + 0,1% d'acide acétique) et une autre B (méthanol + 0,1% d'acide acétique), 10 μL de volume d'injection, une température de 40°C et un débit de 0,3 mL / min. Gradient de débit de la phase mobile B : 10% la 1ère minute, 80% pendant 10 min, 80% pendant 30 min, 10% pendant 31 minutes et de 10% pendant 41 min.*

Elle constituait la seule méthode décrite pour mettre en évidence les GTX dans le miel. Par conséquent, il y avait un réel besoin de développer des techniques à plus faible coût, simples et à haute résolution pour effectuer une analyse quantitative rapide en GTX à partir d'un miel suspect (28).

Une nouvelle méthode rapide et robuste a été décrite (28). Il s'agit d'une méthode qui utilise l'approche dite « dilute – and – shoot » pour préparer les échantillons. L'échantillon a ainsi été dilué 10 fois avant l'analyse dans un mélange méthanol – eau (1:4, v/v) contenant 0,1% d'acide acétique (extraction méthanol – eau pour préparer l'échantillon). Afin de maximiser la robustesse de la procédure, la quantité de miel injectée pour l'analyse a été réduite au minimum. Une dilution du miel au 1:10 avec 10 μL de volume d'injection sont les paramètres retenus pour d'une part, réduire le cycle de purification et d'autre part, répondre à

la sensibilité requise. Ainsi, elle permet de mettre en évidence les GTX après dilution des échantillons, à des concentrations très faibles. Cette méthode est pleinement validée pour analyser la composition en GTX d'un miel et le fait de s'affranchir de l'étape de SPE avant la chromatographie simplifie le prétraitement de l'échantillon et réduit les coûts. Le temps de l'analyse globale est ainsi réduit par rapport à la méthode précédente. Cette nouvelle méthode est simple, économique, sensible, à haut débit et adaptée à une utilisation en routine en laboratoire (28).

Enfin, une nouvelle méthode d'analyse sensible à la détection des GTX dans le sang a été décrite chez le rat pour la première fois (75). Comme il a été dit précédemment, la préparation des échantillons est une étape critique pour que l'analyse de LC-MS/MS soit exacte et fiable (répétabilité). Dans cette étude, l'extraction liquide-liquide par divers solvants organiques n'a pas été suffisante. Une étape de SPE a été utilisée pour extraire les GTX du sang. La surface de styrène-divinylbenzène de la cartouche a permis d'éliminer efficacement les composés polaires endogènes et ainsi d'avoir un rendement élevé pour les GTX. La cartouche a été lavée avec de l'eau et de l'hexane, pour éliminer les composés polaires et les substances lipidiques endogènes qui auraient pu interférer lors de l'analyse, et a été éluée avec du méthanol, solvant d'élution le plus efficace. La méthode proposée permet d'extraire les GTX des échantillons de sang avec un rendement élevé et une bonne résolution des chromatogrammes. Cette méthode de prétraitement des échantillons est fiable et simple mais utilise l'étape de SPE.

5.3. Récapitulatif des différents seuils de détection des grayanotoxines dans divers échantillons

Les différents seuils de détection des GTX sont résumés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Seuils de détection des grayanotoxines suivant la technique d'analyse et le type d'échantillon analysé, d'après (28,75,123).

Technique	Echantillon	Seuil de détection des GTX
CCM à deux dimensions	Matières végétales	1 µg/g dans les matières végétales
	Contenu gastro-intestinal Selles	0,2 µg/g dans le contenu gastro-intestinal et les selles
LC-MS/MS	Contenu gastro-intestinal Selles	0,2 µg/g dans le contenu gastro-intestinal et dans les selles
	Urine	0,05 µg/g dans l'urine
LC-MS/MS	Miel	17 µg/kg pour GTX I 13 µg/kg pour GTX III
LC-MS/MS	Sang	1 ng/mL

Pour rappel, un miel contenant 21,7 mg/kg de GTX I et/ ou 9,0 mg/kg de GTX III peut être responsable d'intoxication chez l'homme (23). Ainsi, la technique développée dans l'étude de juin 2014 (28) est capable de détecter ces concentrations dans le miel. Dans les autres types d'échantillons, ces concentrations seuils, vis-à-vis de l'intoxication, sont inconnues. Ainsi, il est difficile de mettre en relation ces différents seuils de détection avec les doses toxiques des GTX chez l'homme. Cependant, chez la souris, ces différentes techniques permettraient de détecter les DL₅₀ des GTX I et GTX III, respectivement de 1,31 mg/kg et 0,84 mg/kg (126).

5.4. Perspectives

Dans le futur, il serait pertinent de développer la méthode utilisant l'approche dite « dilute – and – shoot » sur du sang chez l'homme avec peut être des étapes simples de filtrations ou centrifugations pour éliminer les particules (cellules, protéines, ...etc) pouvant gêner les analyses. Ceci pour améliorer/aider le diagnostic des intoxications.

L'établissement de méthode d'analyse simple, précise et rapide, serait intéressant pour réaliser en routine des analyses sur des miels suspectés contenir des GTX (miel provenant de Turquie). Ceci permettrait de contrôler ces produits avant leur mise sur le marché et ainsi

d'éviter des problèmes d'intoxication. Il serait également intéressant de pouvoir fixer des valeurs seuils de quantité de GTX à partir desquelles le miel serait considéré comme potentiellement nocif et donc impropre à la consommation.

De plus, en amont, le développement de méthodes pour réduire la quantité de GTX présente dans le miel fou serait une avancée car elles n'existent pas encore.

Conclusions

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Melle Cindy MERMOZ

En janvier 2013, plusieurs cas d'intoxication ont été signalés à l'Agence de Santé Océan indien, suite à la consommation de miel, vendu à l'état brut dans ses alvéoles de cire, à la Réunion. Le miel, produit naturel par excellence et apprécié du grand public, n'est donc pas toujours inoffensif.

Ces articles d'actualité parus en 2013, rapportant ces cas intrigants d'intoxication au miel furent le point de départ de ce travail de thèse. Quelle en est la ou les causes ? Quels sont les symptômes pour identifier ce type d'intoxication et la conduite à tenir ? Quelles pourraient être les mesures à prendre pour éviter ce type d'intoxications ? ... autant de questions soulevées à la lecture de ces faits d'actualités.

L'objectif de mon travail a donc été de faire par une recherche bibliographique un état des lieux des connaissances actuelles concernant ces intoxications dues à la consommation de ce miel, appelé communément « miel fou ».

A la Réunion, ce miel est produit accidentellement en période de sécheresse à partir d'*Agauria salicifolia*, espèce proche des *Rhododendron* sp. En 2008, la filière apicole réunionnaise avait déjà dû faire face à un évènement sanitaire similaire. Cette synthèse bibliographique nous a permis de constater que ces intoxications ne sont pas propres à la Réunion. En effet, la majorité des cas ont été rapportée sur la côte Est de la mer Noire en Turquie, et ce depuis l'Antiquité. En général, dans cette région, il est volontairement produit à partir de *Rhododendron* sp. et consommé pour ses prétendues vertus thérapeutiques. Des cas d'intoxications ont également été rapportés dans d'autres régions du monde, mais le miel responsable semble être importé de Turquie.

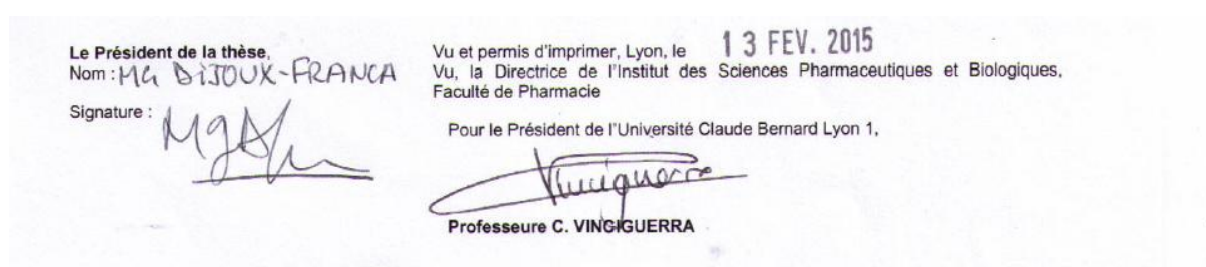
D'après la littérature, les premiers symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion et le tableau clinique associe une hypotension, une bradycardie et des troubles neurologiques. Cet empoisonnement peut être grave mais la guérison est le plus souvent rapide et sans séquelle. De fait, la prise en charge se limite à une surveillance médicale associée à des traitements symptomatiques. Le diagnostic d'une telle intoxication en Europe ou en Amérique du Nord doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire. La clinique et l'interrogatoire étroit du patient sont généralement suffisants pour établir le diagnostic. Mais dans les cas difficiles, l'identification microscopique du pollen ou la mise en évidence de la toxine dans l'échantillon

présupposé peut confirmer le diagnostic. La détection des toxines dans le sang des patients permettrait de poser avec certitude le diagnostic, mais ces dosages, étudiés chez le rat, ne sont pas encore disponibles chez l'homme.

Les toxines végétales mises en cause sont les grayanotoxines, des diterpènes liposolubles interagissant avec le site 2 des canaux sodiques voltage-dépendants. Les symptômes semblent liés à ces effets membranaires. La toxicité des nectars est très variable et dépend de la nature moléculaire des grayanotoxines ainsi que de leur concentration. Les plantes incriminées dans les cas décrits ne sont pas les seules à produire des grayanotoxines. Sur les 19 espèces décrites comme produisant des grayanotoxines et appartenant toutes à la famille des Ericacées, seulement 4 d'entre elles sont impliquées dans des cas d'intoxication au miel : *Rhododendron ponticum*, *R. luteum* et *R. simsii* et *A. salicifolia*. La cause principale d'intoxication aux grayanotoxines est la consommation de ces miels mais des intoxications peuvent avoir lieu par l'ingestion directe d'une partie de ces plantes.

Face à ce constat et conscient du potentiel toxique de ce miel certains pays ont pris des mesures pour éviter de nouveaux incidents ; l'île de la Réunion a notamment mis en place un arrêté préfectoral afin d'interdire la vente de miel du 1er novembre au 31 mars, période de floraison des plantes réputées toxiques. Mais en Turquie, où l'intoxication au miel continue de représenter un problème de santé publique, aucune mesure n'a été mise en place. Il serait intéressant d'employer la nouvelle méthode utilisant l'approche dite « dilute – and – shoot » pour analyser systématiquement la composition en grayanotoxines des miels produits dans des zones géographiques riches en Rhododendrons, avant leurs mises sur le marché. Cependant, avant toutes choses, il est impératif de définir des valeurs seuils de concentration en grayanotoxines, au-dessous de laquelle il n'y aurait aucun risque d'intoxication pour le consommateur.

Cette forme inhabituelle d'intoxication alimentaire à partir de miel rappelle le potentiel toxique de certains produits dits « naturels » qui bénéficient souvent d'une image positive et dont l'utilisation est souvent considérée sans risque par les consommateurs.



Références bibliographiques

1. Agence de Santé Océan Indien. Intoxication suite à la consommation de miel en gaufre à la Plaine des Cafres. http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/fileadmin/OceanIndien/Internet/Alertes_sanitaires/press_2013-01-15_Intoxication_suite_consommation_miel_en_gaufre.pdf (consulté le 12.11.2014).
2. Ipreunion. Sept cas d'intoxication par du miel en gaufre : trois personnes en réanimation. <http://www.ipreunion.com/evenements/reportage/2013/01/15/miel-vert-intoxication-par-du-miel-en-gaufre-3-personnes-en-reanimation,18746.html> (consulté le 12.11.2014).
3. L'info.re. Les dangers du miel. <http://www.linfo.re/la-reunion/societe/les-dangers-du-miel> (consulté le 03.12.2014).
4. Jim.fr. Haroche A. Trop de plantes toxiques encore en vente libre à la Réunion. http://www.jim.fr/medecin/actualites/pro_societe/e-docs/trop_de_plantes_toxiques_encore_en_vente_libre_a_la_reunion__137102/document_actu_pro.phtml (consulté le 21.05.2013).
5. Jansen SA, Kleerekooper I, Hofman ZLM, Kappen IFPM, Stary-Weinzinger A, van der Heyden MAG. Grayanotoxin poisoning : « mad honey disease » and beyond. *Cardiovasc Toxicol.* 2012;12(3):208-15.
6. Weber M, Cadivel A, Chappel V, Abinaber F, Le Gallo A, Ragonneau S, et al. Intoxication collective par « miel fou » à l'île de la Réunion (océan Indien). *Bull Soc Pathol Exot.* 2009;102:7-8.
7. Gunduz A, Turedi S, Uzun H, Topbas M. Mad honey poisoning. *Am J Emerg Med.* 2006;24(5):595-8.
8. Bostan M, Bostan H, Kaya AO, Bilir O, Satioglu O, Kazdal H, et al. Clinical events in mad honey poisoning : a single centre experience. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;84(1):19-22.
9. Sütülpinar N, Mat A, Satganoğlu Y. Poisoning by toxic honey in Turkey. *Arch Toxicol.* 1993;67(2):148-50.
10. Sayin MR, Karabag T, Dogan SM, Akpınar I, Aydın M. Transient ST segment elevation and left bundle branch block caused by mad-honey poisoning. *Wien Klin Wochenschr.* 2012;124(7-8):278-81.
11. Yilmaz O, Eser M, Sahiner A, Altıntop L, Yesildag O. Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning. *Resuscitation.* 2006;68(3):405-8.
12. Fordham university. Ancient History Sourcebook : Xenophon : Anabasis, or March Up Country. www.fordham.edu/halsall/ancient/xenophon-anabasis.asp (consulté le 05.06.2014).

13. Demircan A, Keleş A, Bildik F, Aygencel G, Doğan NO, Gómez HF. Mad honey sex: therapeutic misadventures from an ancient biological weapon. *Ann Emerg Med.* 2009;54(6):824-9.
14. Jauhari AC, Johorey AC, Banerjee I, Shrestha P, Singhal KC. Nearly fatal wild honey intoxication: A case report of seven cases. *J Clin Diagn Res.* 2009;3:1685-9.
15. Gunduz A, Ayaz FA. Mad Honey : the reality. In : *Honey in Traditional and Modern Medicine.* Boukraâ L ; 2013. p. 359-79.
16. Gunduz A, Turedi S, Oksuz H. The honey, the poison, the weapon. *Wilderness Environ Med.* 2011;22(2):182-4.
17. Gunduz A, Turedi S, Russell RM, Ayaz FA. Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present. *Clin Toxicol Phila Pa.* 2008;46(5):437-42.
18. Okuyan E, Uslu A, Ozan Levent M. Cardiac effects of « mad honey » : a case series. *Clin Toxicol Phila Pa.* 2010;48(6):528-32.
19. Metronews. En Turquie, ce miel rend fou. <http://www.metronews.fr/info/en-turquie-ce-miel-rend-fou/mnjc!pky3dF9Able6/> (consulté le 17.01.2015).
20. Capobianco M. L'abeille, les produits de la ruche et les menaces. Thèse d'exercice : Pharmacie : Lyon 1; 2012.
21. Au-miel.fr. La fabrication du miel ... <http://www.au-miel.fr/fabrication-du-miel.html> (consulté le 10.01.2015).
22. Bittmann S, Luchter E, Thiel M, Kameda G, Hanano R, Längler A. Does honey have a role in paediatric wound management ? *Br J Nurs.* 2010;19(15):19-24.
23. Kurtoglu AB, Yavuz R, Evrendilek GA. Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar. *Food Chem.* 2014;161:47-52.
24. Koca I, Koca AF. Poisoning by mad honey : a brief review. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2007;45(8):1315-8.
25. Gunduz A, Bostan H, Turedi S, Nuhoğlu İ, Patan T. Wild Flowers and Mad Honey. *Wilderness Environ Med.* 2007;18(1):69-71.
26. L'apiculture. Les paramètres physico-chimiques. <http://www.cari.be/article/les-parametres-physico-chimiques/> (consulté le 15.12.2014).
27. Silici S, Uluozlu OD, Tuzen M, Soylak M. Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region, Turkey. *J Hazard Mater.* 2008;156(1-3):612-8.
28. Kaplan M, Olgun EO, Karaoglu O. Determination of grayanotoxins in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using dilute-and-shoot sample preparation approach. *J Agric Food Chem.* 2014;62(24):5485-91.

29. Osken A, Yaylacı S, Aydın E, Kocayigit I, Cakar MA, Tamer A, et al. Slow ventricular response atrial fibrillation related to mad honey poisoning. *J Cardiovasc Dis Res*. 2012;3(3):245-7.
30. Kalkan A, Gökçe M, Memetoğlu ME. An unusual clinical state: atrial fibrillation due to mad-honey intoxication. *Anadolu Kardiyol Derg AKD Anatol J Cardiol*. 2012;12(4):365-6.
31. Aliyev F, Türkoglu C, Celiker C, Firatli I, Alici G, Uzunhasan I. Chronic mad honey intoxication syndrome: a new form of an old disease ? *Europace*. 2009;11(7):954-6.
32. Bayram NA, Keles T, Durmaz T, Dogan S, Bozkurt E. A rare cause of atrial fibrillation : mad honey intoxication. *J Emerg Med*. 2012;43(6):389-91.
33. Kurdziel M, Sutherland T. Wild Honey Intoxication in the Remote Himalaya. *Wilderness Environ Med*. 2013.
34. Oztasan N, Altinkaynak K, Akcay F, Göçer F, Dane S. Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Vet Anim Sci*. 2005;29:1093-6.
35. Uzun H, Narci H, Tayfur I, Karabulut KU, Karcioğlu O. Mad honey intoxication : what is wrong with the blood glucose? a study on 46 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(20):2728-31.
36. Gunduz A, Durmus I, Turedi S, Nuhoglu I, Ozturk S. Mad honey poisoning-related asystole. *Emerg Med J EMJ*. 2007;24(8):592-3.
37. Cagli KE, Tufekcioglu O, Sen N, Aras D, Topaloglu S, Basar N, et al. Atrioventricular block induced by mad-honey intoxication: confirmation of diagnosis by pollen analysis. *Tex Heart Inst J*. 2009;36(4):342-4.
38. Volkan H, Serhat B, Nihat K, Sami A, Serhan Y, Işıl ÖT. Mad Honey Poisoning in Zonguldak Province : Analysis of 72 cases. *J Turk Anaesth Int Care*. 2010;38:278-84.
39. Lennerz C, Jilek C, Semmler V, Deisenhofer I, Kolb C. Sinus arrest from mad honey disease. *Ann Intern Med*. 2012;157(10):755-6.
40. Weiss TW, Smetana P, Nurnberg M, Huber K. The honey man - second degree heart block after honey intoxication. *Int J Cardiol*. 2010;142(1):6-7.
41. Eller P, Hochegger K, Tancevski I, Pechlaner C, Patsch JR. Sweet heart block. *Circulation*. 2008;118(3):319.
42. Dubey L, Maskey A, Regmi S. Bradycardia and severe hypotension caused by wild honey poisoning. *Hellenic J Cardiol*. 2009;50(5):426-8.
43. Campagna JA, Carter C. Clinical relevance of the Bezold-Jarisch reflex. *Anesthesiology*. 2003;98(5):1250-60.

44. Chen SPL, Lam YH, Ng VCH, Lau FL, Sze YC, Chan WT, et al. Mad honey poisoning mimicking acute myocardial infarction. *Hong Kong Med J*. 2013;19(4):354-6.
45. Choo Y-K, Kang HY, Lim S-H. Cardiac problems in mad-honey intoxication. *Circ J*. 2008;72(7):1210-1.
46. Martinet O, Pommier P, Sclossmacher P, Develay A, de Haro L. Intoxication par bois de gale (*Agauria salicifolia*). *Presse Med*. 2005;34(11):797-8.
47. Kebler LF. Poisonous honey. *Am Pharm Assoc Proc*. 1896;44:167-74.
48. ABC of Complementary medicine : Herbal medicine. One Hundred years ago-Honey poisoning (bmj 1899; ii: 674). *BMJ* 1999; 319:1422.
49. Popescu R, Kopp B. The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review. *J Ethnopharmacol*. 2013;147(1):42-62.
50. Yavuz H, Ozel A, Akkus I, Erkul I. Honey poisoning in Turkey. *Lancet*. 1991;337(8744):789-90.
51. Dilber E, Kalyoncu M, Yaris N, Ökten A. A case of mad honey poisoning presenting with convulsion: intoxication instead of alternative therapy. *Turk J Med Sci*. 2002;32:361-2.
52. Ozhan H, Akdemir R, Yazici M, Gündüz H, Duran S, Uyan C. Cardiac emergencies caused by honey ingestion: a single centre experience. *Emerg Med J EMJ*. 2004;21(6):742-4.
53. Biberoglu S, Biberoglu K, Komsuoglu B. Mad honey. *JAMA*. 1988; 259:1943.
54. Gossinger H, Hruby K, Pohl A, Davogg S, Sutterlutti G, Mathis G. Poisoning with andromedotoxin-containing honey. *Dtsch Med Wochenschr*. 1983; 108:1555-8.
55. Ergun K, Tufekcioglu O, Aras D, Korkmaz S, Pehlivan S. A rare cause of atrioventricular block: Mad Honey intoxication. *Int J Cardiol*. 2005;99(2):347-8.
56. Von Malottki K, Wiechmann HW. Acute life-threatening bradycardia: food poisoning by Turkish wild honey. *Dtsch Med Wochenschr*. 1996; 121:936-8.
57. Akinci S, Arslan U, Karakurt K, Cengel A. An unusual presentation of mad honey poisoning: acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2008;129(2):56-8.
58. Yorgun H, Ülgen A, Aytemir K. A rare cause of junctional rhythm causing syncope; mad honey intoxication. *J Emerg Med*. 2010;39(5):656-8.
59. Sumerkan MC, Simsek EE, Mayda AS, Baltaci D. Mad-honey intoxication: an economic evaluation. *Int J Cardiol*. 2013;163(3):S24.
60. Demir H, Denizbasi A, Onur O. Mad honey intoxication: a case series of 21 patients. *ISRN Toxicol*. 2011;2011.

61. Yarlioglues M, Akpek M, Ardic I, Elcik D, Sahin O, Kaya MG. Mad-honey sexual activity and acute inferior myocardial infarctions in a married couple. *Tex Heart Inst J*. 2011;38(5):577-80.
62. Gunduz A, Meriçé ES, Baydin A, Topbaş M, Uzun H, Türedi S, et al. Does mad honey poisoning require hospital admission? *Am J Emerg Med*. 2009;27(4):424-7.
63. Sayin MR, Dogan SM, Aydin M, Karabag T. Extreme QT interval prolongation caused by mad honey consumption. *Can J Cardiol*. 2011;27(6):17-9.
64. Yaylaci S, Kocayigit I, Aydin E, Osken A, Genc AB, Cakar MA, et al. Clinical and laboratory findings in mad honey poisoning: A single center experience. *Niger J Clin Pract*. 2014;17(5):589-93.
65. Sumerkan MC, Agirbasli M, Altundag E, Bulur S. Mad-honey intoxication confirmed by pollen analysis. *Clin Toxicol Phila Pa*. 2011;49(9):872-3.
66. Cakar MA, Can Y, Vatan MB, Demirtas S, Gunduz H, Akdemir R. Atrial fibrillation induced by mad honey intoxication in a patient with Wolf-Parkinson-White syndrome. *Clin Toxicol Phila Pa*. 2011;49(5):438-9.
67. Sumerkan MC, Simsek EE, Mayda AS, Agirbasli MA. Epidemiological evaluation of mad-honey intoxication. *Int J Cardiol*. 2013;163(3):S32-3.
68. Revue de presse Santé de l'Océan Indien. Sept personnes intoxiquées par du « miel fou » à Miel Vert. http://www.reseausega-coi.org/system/files/RPOI_150_janvier2013.pdf (Consulté le 20.01.2015).
69. Aşcioğlu M, Özesmi C, Doğan P, Öztürk F. Effects of acute grayanotoxin-I administration on hepatic and renal functions in rats. *Turk J Med Sci*. 2000;30(1):23-7.
70. Onat FY, Yegen BC, Lawrence R, Oktay A, Oktay S. Mad honey poisoning in man and rat. *Rev Environ Health*. 1991;9(1):3-9.
71. Dursunoglu D, Gur S, Semiz E. A case with complete atrioventricular block related to mad honey intoxication. *Ann Emerg Med*. 2007;50(4):484-5.
72. Aliyev F, Türkoğlu C, Çeliker C. Nodal Rhythm and Ventricular Parasystole: An Unusual Electrocardiographic Presentation of Mad Honey Poisoning. *Clin Cardiol*. 2009;32(11):52-4.
73. Yildirim N, Aydin M, Cam F, Celik O. Clinical presentation of non-ST-segment elevation myocardial infarction in the course of intoxication with mad honey. *Am J Emerg Med*. 2008;26(1):1-2.
74. Qiang Y, Zhou B, Gao K. Chemical constituents of plants from the genus *Rhododendron*. *Chem Biodivers*. 2011;8(5):792-815.
75. Cho HE, Ahn SY, Kim D-W, Woo S-H, Park S-H, Hwang K, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of

- Grayanotoxins in rat blood and its application to toxicokinetic study. Biomed Chromatogr BMC. 2014;28(12):1624-32.
76. Frohne D, Pfänder H-J, Anton R. Plantes à risques. Lavoisier ; 2009.
 77. Gunduz A, Kalkan A, Turedi S, Durmus I, Turkmen S, Ayaz FA, et al. Pseudocholinesterase levels are not decreased in grayanotoxin (mad honey) poisoning in most patients. J Emerg Med. 2012;43(6):1008-13.
 78. BfR. Vergiftungsfälle durch Grayanotoxine in Rhododendron-Honigen aus der türkischen schwarzmeerregion.
http://www.bfr.bund.de/cm/343/vergiftungsfaelle_durch_grayanotoxine_in_rhododendron_honigen_aus_der_tuerkischen_schwarzmeerregion.pdf (consulté le 28.12.2014).
 79. Journal de l'île. Pas de risque avec le miel en pot.
http://www.clicanoo.re/index.php?page=archive.consulter&id_article=354402&acheter=o (consulté le 4.02.2015).
 80. Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe. Ecogrippe 2006 : combien coûte la grippe ? http://www.grog.org/documents/jour_2007/Ecogrippe.pdf (consulté le 14.08.2014).
 81. Silici S, Sagdic O, Ekici L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. Food Chem. 2010;(1):238-43.
 82. Scott PM, Coldwell BB, Wiberg GS. Grayanotoxins. Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice. Food Cosmet Toxicol. 1971;9(2):179-84.
 83. White JW, Riethof ML. The composition of honey. III. Detection of acetylandromedol in toxic honeys. Arch Biochem Biophys. 1959;79:165-7.
 84. Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier ; 2010.
 85. Chase MW, Reveal JL. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Bot J Linn Soc. 2009;161(2):122-7.
 86. Dupont F, Guignard J-L. Botanique: Les familles des plantes. Elsevier Masson ; 2012.
 87. Monier C. *Gaultheria procumbens* L. et son huile essentielle. Thèse d'exercice: Pharmacie: Nantes; 2010.
 88. Drot Saunier C. Etude botanique et pharmaceutiques des Ericacées. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie: Paris; 1985.
 89. Mobot.org. Angiosperm phylogeny website, version 13.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (consulté le 23.10.2014).
 90. Judd W, Campbell C, Kellogg E, Stevens P. Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Paris :De Boeck ; 2002.
 91. Watson L, Dallwitz MJ. The families of flowering plants. <http://delta-intkey.com/angio/www/ericacea.htm> (consulté le 24.09.2014).

92. Lhuillier A. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook. f. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique: Toulouse; 2007.
93. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Band IV Dicotyledoneae : Daphniphyllaceae- Lythraceae. Birkhauser Verlag. Basel. 1966.
94. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen - Band VIII (Acanthaceae bis Lythraceae). Birkhäuser Verlag. Basel. 1989.
95. Kim S-E, Shin M-C, Akaike N, Kim C-J. Presynaptic effects of grayanotoxin III on excitatory and inhibitory nerve terminals in rat ventromedial hypothalamic neurons. *Neurotoxicology*. 2010;31(2):230-8.
96. Conservatoire botanique national de Brest. Rhododendron pontique. <http://www.cbnbrest.fr/site/pdf/rhododendron.pdf> (consulté le 06.09.2014).
97. Tela Botanica. <http://www.tela-botanica.org/site:accueil> (consulté le 07.08.2014).
98. Esen D. Ecology and Control of Rhododendron (*Rhododendron ponticum* L.) in Turkish Eastern Beech (*Fagus orientalis* Lipsky) Forests. Thèse de doctorat : Virginia (USA) ; 2000.
99. Tasdemir D, Demirci B, Demirci F, Dönmez AA, Baser KHC, Rüedi P. Analysis of the volatile components of five Turkish Rhododendron species by headspace solid-phase microextraction and GC-MS (HS-SPME-GC-MS). *Z Naturforsch C*. 2003;58(11-12):797-803.
100. Onat F, Yegen BC, Lawrence R, Oktay A, Oktay S. Site of action of grayanotoxins in mad honey in rats. *J Appl Toxicol JAT*. 1991;11(3):199-201.
101. Onat FY, Kurtel H, Yegen BC, Oktay A, Oktay S. Atropine and AF-DX 116 in mad honey intoxication. *Eur J Pharmacol*. 1990;183(2):575.
102. Poon WT, Ho CH, Yip KL, Lai CK, Cheung KL, Sung RYT, et al. Grayanotoxin poisoning from *Rhododendron simsii* in an infant. *Hong Kong Med J*. 2008;14(5):405-7.
103. Takahashi H, Hirata S, Minami H, Fukuyama Y. Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*. 2001;56(8):875-9.
104. Schatz GE. Flore Generale des Arbres de Madagascar. Royal Botanic Gardens, Kew. 2001.
105. Kron KA, Judd WS, and Crayn DM. Phylogenetic analyses of Andromedeae (Ericaceae subfam. Vaccinioideae). *Am J Bot*. 1999;86(9):1290-300.
106. Stevens PF. *Agauria* and *Agarista* : an example of tropical transatlantic affinity. Notes from the Royal Botanic Garden at Edinburgh. 1970;30:341-59.

107. Kron KA, Judd WS. Systematics of the *Lyonia* Group (Andromedeae, Ericaceae) and the Use of Species as Terminals in Higher-Level Cladistic Analyses. *Systematic Botany*. 1997;22(3): 479-92.
108. Lavergne R. Le grand livre des Tisaneurs et plantes médicinales indigènes de la Réunion ». *Orphie* ; 2001. p. 263-6.
109. Aubry P. Intoxication par les plantes toxiques dans les zones tropicales et inter tropicales. 2012.
110. Ewane-Nyambi G, Bois P, Raymond G. The voltage-dependent effect of *Agauria salicifolia* leaf extract on the sodium current of isolated frog skeletal and cardiac muscle cells. *J Ethnopharmacol*. 1993;38(1):39-47.
111. Gregoire J, Nyembo L. Trietpenoides d'Agauria salicifolia. *Phytochemistry*. 1977;16(10):1609-10.
112. L'info.re. Intoxication au miel : explications d'un apiculteur. <http://www.linfo.re/la-reunion/societe/intoxication-au-miel-explications-d-un-apiculteur> (consulté le 03.12.2014).
113. Bucak AM. Zehirli bal (Toxic honey). *Farmakolo*. 1938;8:33- 40.
114. Ungan A. Şimali Anadolu'nun zehirli ball (Toxic honey of Northern Anatolia). *Türk Hijyen ve Tecdübi Biyoloji Dergisi*. 1941;2:161.
115. Tallent WH, Riethof ML, Horning EC. Studies on the Occurrence and Structure of Acetylandromedol (Andromedotoxin). *J Am Chem Soc*. 1957;79(16):4548-54.
116. Hardikar SW. *J. Pharmacol Expil Therap*. 1922;20:17.
117. Makino M, Okayama-Igakki-Zasshi. 39, 2099 (1927); 40,138 (1928); [C. A., 23, 1691, 3027 (1929)].
118. Wood HB, Stromberg VL, Keresztesy JC, Horning EC. *This journal*. 1954;76:5689.
119. Takemoto T, Nishimoto Y, Meguri H, Katayama K. *J. Pharm. Soc*. 1955;75:1441.
120. Lee S-W, Choi S-H, Hong Y-S, Lim S-I. Grayanotoxin poisoning from flower of *Rhododendron mucronulatum* in humans. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007;78(2):132-3.
121. Hough RL, Crews C, White D, Driffield M, Campbell CD, Maltin C. Degradation of yew, ragwort and rhododendron toxins during composting. *Sci Total Environ*. 2010;408(19):4128-37.
122. Masutani T, Hamada M, Kawano E, Iwasa J, Kumazawa Z, Hueda H. Biosynthesis of Grayanotoxins in *Leucothoe grayana* Max. Incorporation of Mevalonic Acid and (-)-Kaurene into Grayanotoxin-III. *Agric Biol Chem*. 1981;45(5):1281-2.

123. Holstege DM, Puschner B, Le T. Determination of grayanotoxins in biological samples by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2001;49(3):1648-51.
124. Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.* 4e éd. Lavoisier ; 2009.
125. Kan T, Hosokawa S, Nara S, Oikawa M, Ito S, Matsuda F, et al. Total Synthesis of (-)-Grayanotoxin III. *J Org Chem.* 1994;59(19):5532-4.
126. Hikino H, Ohta T, Ogura M, Ohizumi Y, Konno C, Takemoto T. Structure-activity relationship of ericaceous toxins on acute toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1976;35(2):303-10.
127. Plumlee KH, VanAlstine WG, Sullivan JM. Japanese pieris toxicosis of goats. *J Vet Diagn Invest.* 1992;4(3):363-4.
128. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):397-409.
129. Katakawa J, Tetsumi T, Sakaguchi K, Katai M, Terai T. Crystal and molecular structure of 10,20-epoxy-grayanotoxin-II. *J Chem Crystallogr.* 2004;34(5):311-5.
130. Maejima H, Kinoshita E, Seyama I, Yamaoka K. Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Na(v)1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9464-71.
131. Terai T, Osakabe K, Katai M, Sakaguchi K-I, Narama I, Matsuura T, et al. Preparation of 9-hydroxy grayanotoxin derivatives and their acute toxicity in mice. *Chem Pharm Bull.* 2003;51(3):351-3.
132. Kimura T, Yamaoka K, Kinoshita E, Maejima H, Yuki T, Yakehiro M, et al. Novel site on sodium channel alpha-subunit responsible for the differential sensitivity of grayanotoxin in skeletal and cardiac muscle. *Mol Pharmacol.* 2001;60(4):865-72.
133. Wong J, Youde E, Dickinson B, Hale M. Report of the Rhododendron feasibility study. School of Agricultural and Forest Sciences. 2002.
134. Eller P, Hochegger K. Honey intoxication and the Bezold-Jarisch reflex. *Int J Cardiol.* 2010;144(2):251.
135. Stevens M, Peigneur S, Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol.* 2011;2:71.
136. Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* 2000;82(9-10):883-92.
137. Maejima H, Kinoshita E, Yuki T, Yakehiro M, Seyama I, Yamaoka K. Structural determinants for the action of grayanotoxin in D1 S4-S5 and D4 S4-S5 intracellular linkers of sodium channel alpha-subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295(2):452-7.

138. Seyama I, Yamada K, Kato R, Masutani T, Hamada M. Grayanotoxin opens Na channels from inside the squid axonal membrane. *Biophys J*. 1988;53(2):271-4.
139. Hough I. Rhododendron poisoning in a western grey kangaroo. *Aust Vet J*. 1997;75(3):174-5.
140. Milewski LM, Khan SA. An overview of potentially life-threatening poisonous plants in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care*. 2006;16(1):25-33.
141. Humphreys DJ, Stodulski JB. Detection of andromedotoxins for the diagnosis of Rhododendron poisoning in animals. *J Appl Toxicol*. 1986;6(2):121-2.
142. Holstege DM, Francis T, Puschner B, Booth MC, Galey FD. Multiresidue screen for cardiotoxins by two-dimensional thin-layer chromatography. *J Agric Food Chem*. 2000;48(1):60-4.
143. Mol HGJ, Van Dam RCJ, Zomer P, Mulder PPJ. Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011;28(10):1405-23.

Annexes

Annexe 1 : Concentrations en GTX I et GTX III retrouvées dans des échantillons de miel, d'après (23).

Production year				
	Storage time (months)	2010	2011	2012
GTX I	1	16.0 ± 1.49 ^a	25.6 ± 1.76 ^a	22.3 ± 0.66 ^a
	2	15.1 ± 0.17 ^a	26.0 ± 0.07 ^a	22.7 ± 0.09 ^a
	3	18.2 ± 1.75 ^b	25.8 ± 2.46 ^a	22.3 ± 2.67 ^a
	6	17.2 ± 0.46 ^b	25.2 ± 1.32 ^a	22.3 ± 0.61 ^a
GTX III	1	2.53 ± 0.82 ^a	12.0 ± 1.02 ^a	11.9 ± 1.02 ^a
	2	2.68 ± 0.26 ^a	12.1 ± 0.07 ^a	11.4 ± 0.35 ^a
	3	4.88 ± 0.33 ^b	11.8 ± 0.12 ^a	11.6 ± 0.51 ^a
	6	4.23 ± 0.42 ^b	11.6 ± 0.20 ^a	11.4 ± 0.26 ^a

*Data in the same column with different superscript letters are significantly different for each toxin ($p \leq 0.05$).

Annexe 2 : Arrêté préfectoral réglementant la vente de miel en gaufres à la Réunion.



PRÉFET DE LA RÉUNION
Direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt
Service de l'alimentation

ARRÊTE PRÉFECTORAL n° 2013 - 1977

Réglementant la vente de miel en gaufres à la Réunion.

Le préfet de la Réunion,
Chevalier de la Légion d'honneur
Chevalier de l'Ordre national du mérite

- VU** le règlement CE n°178/2002 du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires, notamment son article 14,
- VU** le règlement CE n°853/2004 du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires,
- VU** le code rural et de la pêche maritime, et notamment son livre II ;
- VU** l'arrêté préfectoral n° 0716 du 2 avril 2003 relatif à la détention, la circulation, la vente, le transport, l'exposition dans les foires, marchés et concours des abeilles et des espèces sensibles aux maladies des abeilles ainsi que des produits et matériels susceptibles d'être contaminés
- VU** l'arrêté préfectoral n° 1312 du 27 août 2012, portant délégation de signature à Monsieur Louis BIANNIC, Directeur de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt ;
- VU** la décision du 31 mai 2013 portant sur la subdélégation de signature à M. Olivier DEGENMANN, M. Emmanuel FOEX, M. Aymeric LECOUFFE, M. Olivier PINGUET, M. Jean-Claude BELOT-ARNAUD, M. Patrick GARCIA, Mme Frédérique STEIN et M. Laurent-Xavier DELMOTTE pour signer, au nom du Préfet, les actes du Service de l'alimentation ;

CONSIDERANT les toxi-infections alimentaires collectives survenues à la suite de la consommation de miel en gaufre produit à La Réunion notamment dans les années 2007, 2008, 2013,

CONSIDERANT que les toxi-infections alimentaires dues à la consommation de miel en gaufre se sont toutes produites à la même période, correspondant à la floraison de certaines plantes endémiques toxiques, notamment le bois de rempart (*Agarista salicifolia*).

CONSIDERANT Les résultats des analyses toxicologiques du 1er février 2013 concernant des recherches polliniques et ceux du 3 avril 2013 qui concernaient la recherche de grayanotoxine et qui ont mis en évidence la présence de grayanotoxine III dans le miel en gaufre suspecté d'avoir entraîné des intoxications alimentaires.

CONSIDERANT le risque manifeste pour la santé publique que représente la consommation de miel en gaufre produit pendant la période de floraison de certaines plantes toxiques à La Réunion.

Page 1 / 2

CONSIDERANT l'avis de la filière apicole représentée par le syndicat apicole de La Réunion, l'association de développement apicole et la Coopémiei, en date du 19 août 2013.

SUR proposition du directeur de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt de La Réunion :

ARRETE :

ARTICLE 1er :

La vente de miel en gaufre (miel contenu dans ses alvéoles en cire d'origine) produit durant la période du 1er novembre au 31 mars est interdite sur l'ensemble du territoire de La Réunion.

ARTICLE 2 :

Cet arrêté pourra faire l'objet de modifications au fur et à mesure de l'évolution des connaissances scientifiques relatives aux modalités de contamination du miel par des toxines végétales.

ARTICLE 3 :

le secrétaire général de la préfecture, le commandant du groupement de gendarmerie, le directeur départemental de la police nationale, le directeur de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt, le directeur des entreprises, de la concurrence, de la consommation, du travail et de l'emploi sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au recueil des actes administratifs de la Préfecture de La Réunion. Une copie sera tenue à la disposition du public dans les mairies de toutes les communes de l'île.

Fait à Saint Denis, le 22 OCT 2013

Pour le préfet, et par délégation,



Jean-Luc BOUTIER

Annexe 3 : Communiqué de presse concernant la réglementation de la vente du miel en gaufre à la Réunion.



Communiqué de presse

Saint-Denis

Le 12 novembre 2013

Réglementation de la vente du miel en gaufre

La filière apicole réunionnaise a dû faire face à plusieurs événements sanitaires consécutifs à la consommation de miel vendu dans ses alvéoles de cire originelles, encore appelé « miel en gaufre », dont le dernier a eu lieu en janvier 2013.

La cause la plus probable de ces intoxications alimentaires est l'absorption de toxines végétales provenant de certaines plantes telle l'Agauria, plus connue sous le nom de « bois de rempart ». Les abeilles, en butinant le nectar de ces fleurs, transportent ces toxines qui sont susceptibles de se retrouver dans les alvéoles de cire proposées à la vente.

Dans l'objectif de protéger la santé des consommateurs, un arrêté préfectoral a été pris pour interdire la vente de miel en gaufre du 1er novembre au 31 mars, correspondant à la période de floraison des plantes réputées toxiques. La date de production doit être mentionnée sur l'étiquetage et le consommateur est invité à la contrôler au moment de l'achat.

Le miel en pot n'est pas concerné par cette interdiction, sachant que le procédé de production permet de garantir l'absence de risque pour le consommateur, et ce quelle que soit la période de l'année.

Contact presse

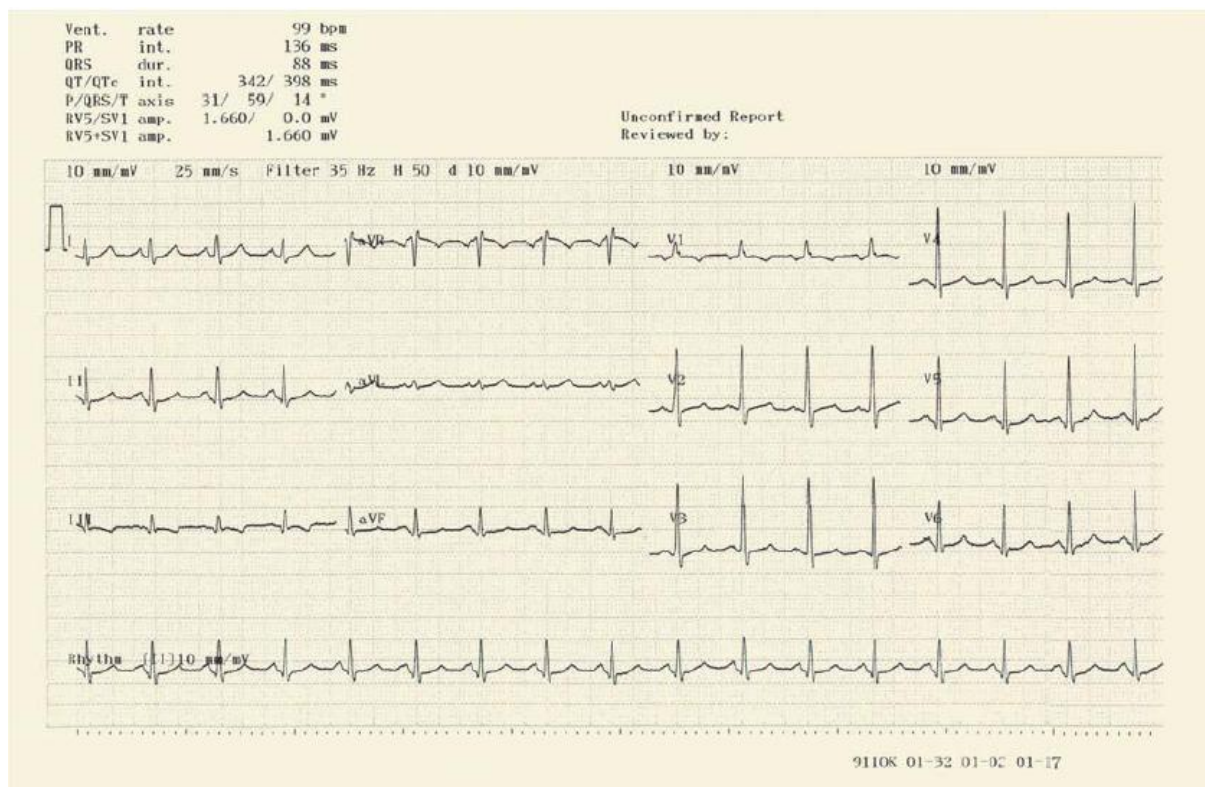
Préfecture de La Réunion - Service régional de la communication interministérielle

Tél. 0262 40 74 18 / 74 19 - courriel : communication@reunion.pref.gouv.fr

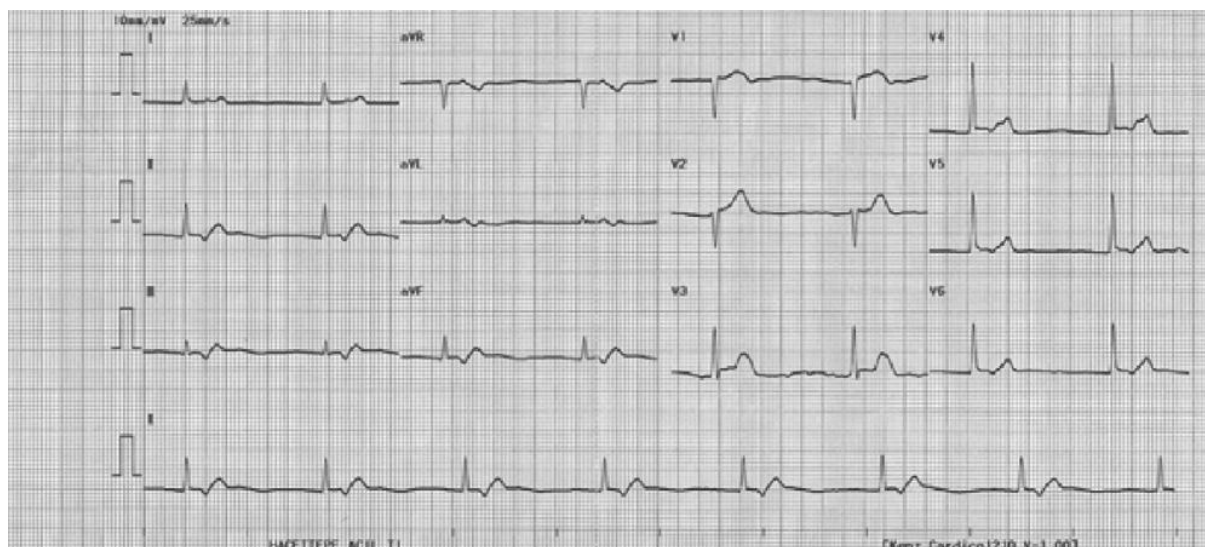
www.reunion.gouv.fr



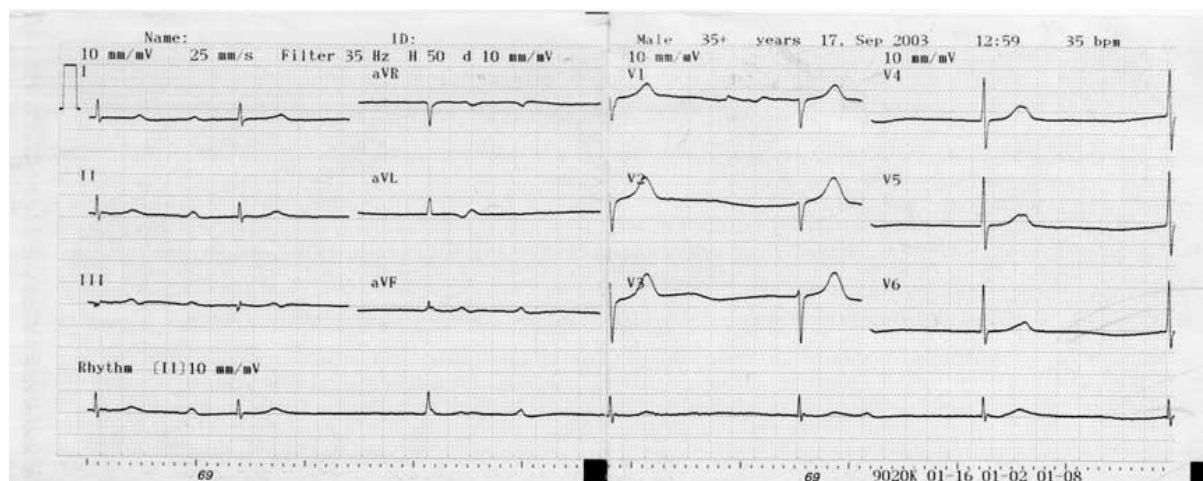
Annexe 4: ECG après la récupération d'un patient, présentant un rythme sinusal normal de 99 battements / minute, d'après (42).



Annexe 5: ECG lors de l'admission d'un patient intoxiqué par du miel fou, présentant un rythme nodal, d'après (58).



Annexe 6 : ECG lors de l'admission d'un patient intoxiqué par du miel fou, présentant un bloc AV complet, d'après (55).



Annexe 7 : Plantes sources de GTX selon Adler, d'après (17).

Table 4. Sources of grayanotoxin/honey toxic to humans reported by Adler (34)

Species	Family
<i>Agauria</i> spp.	Ericaceae
<i>Andromeda</i> spp.	Ericaceae
<i>Kalmia</i> spp.	Ericaceae
<i>Rhododendron flavum</i> (<i>Rhododendron luteum</i>)	Ericaceae
<i>Rhododendron ponticum</i>	Ericaceae
<i>Kalmia latifolia</i>	Ericaceae

Annexe 8 : Glossaire

Accrescent : Se dit d'un périanthe lorsqu'il poursuit sa croissance après la fécondation.

Acuminé : Se dit d'un organe dont l'extrémité se termine en une pointe fine et plus ou moins allongée.

Androcée : Ensemble des étamines, formant la partie mâle des fleurs des Angiospermes.

Anthère : Partie terminale de l'étamine, organe mâle de la fleur, qui produit et renferme le pollen.

Axile : Se dit d'une placentation lorsque les carpelles sont soudés après fermeture.

Caduque : Se dit de tout organe qui tombe, annuellement ou au cours de la vie.

Calice : Enveloppe protectrice la plus externe de la fleur, entourant la corolle et formée par l'ensemble des sépales.

Campanulée : Se dit d'une corolle en forme de clochette, renversée ou dressée.

Capsule : Fruit sec déhiscent issu d'un ovaire formé de plusieurs carpelles soudés entre eux.

Carpelle : Élément constitutif du gynécée chez les angiospermes. Il présente à sa base une cavité fermée nommée ovaire, surmontée par le style qui constitue la partie effilée du carpelle, et terminé par le stigmate, dont le rôle est de recevoir les grains de pollen.

Corolle : Nom donné à l'ensemble des pétales d'une fleur.

Corymbe : Type d'inflorescence où les pédicelles, de longueur différente, partent de points variables vers le haut pour aboutir relativement au même niveau.

Déhiscent : Se dit des fruits ou d'un organe s'ouvrant naturellement à maturité pour libérer les graines, le pollen ou des spores.

Dialypétale : Se dit de la corolle d'une fleur lorsque les pétales sont séparés.

Diplostémone : Se dit d'une fleur ou d'un androcée ayant leurs étamines en deux verticilles (en nombre double des pétales ou des tépales), les externes alternent avec les pièces du verticille interne du périanthe.

Epiphyte : Plante ayant comme support une autre plante sans qu'il y ait de relation de parasitisme.

Gamopétale : Se dit de la corolle d'une fleur lorsque les pétales sont soudés entre eux.

Gynécée : Ensemble des carpelles, constituant la partie femelle de la fleur.

Hermaphrodite : Se dit d'une fleur bisexuée, c'est-à-dire portant des organes mâles et femelles.

Hypogyne : Terme botanique, qualifiant les fleurs dont l'androcée et le gynécée sont situés au-dessous de l'ovaire, c'est-à-dire directement sur le pédoncule.

Infundibuliforme : Se dit d'une corolle en forme d'entonnoir.

Isocarpellé : Se dit d'un gynécée constitué d'un nombre de carpelles égal au nombre fondamental de la fleur.

Laticifère : Qui contient du latex.

Loculicide : Se dit d'une capsule dont les fentes de déhiscence sont situées au niveau des loges.

Mycorhize : Symbiose entre un champignon et une plante au niveau de sa racine.

Nervation pennée : Nervation dans laquelle une nervure principale partage le limbe en deux parties sensiblement identiques selon l'axe de symétrie et à partir de laquelle les nervures secondaires se détachent selon une disposition alterne ou opposée.

Nervation palmée : Nervation où plusieurs nervures, en nombre impair, se détachent du pétiole au point de contact avec le limbe.

Obdiplostémone : Se dit d'une fleur ou d'un androcée ayant leurs étamines en deux verticilles, les externes sont opposées aux pièces du verticille interne du périanthe.

Orbiculaire : Se dit d'un organe dont la surface a une forme arrondie.

Ovule : Organe naissant du placenta à l'intérieur de l'ovaire, abritant l'œuf (ou embryon) après fécondation et évoluant en graine à maturité.

Panicule : En grappe composée de grappes.

Périanthe : Ensemble des pièces florales constituant le calice et la corolle, formant la partie stérile de la fleur. Le périanthe peut être persistant, accrescent ou caduc.

Placentation : Organisation des ovules à l'intérieur de l'ovaire.

Polystémone : Se dit d'une fleur ou d'un androcée ayant un grand nombre d'étamines, habituellement plus de 20 disposées en verticilles ou en spirales.

Racémeux : En grappe.

Saprophyte : Se dit d'une plante se nourrissant de matières organiques en décomposition. C'est le cas de nombreuses plantes épiphytes.

Septicide : Se dit d'une capsule dérivée d'un ovaire fécondé dont les fentes de déhiscence sont situées au niveau des septums. En cas de déhiscence septicide, la placentation est ordinairement axile, avec en général, la formation de parois ou septums.

Sempervirent : Se dit des plantes qui portent des feuilles vertes toute l'année.

Sépale : Pièce florale, d'aspect semblable à une feuille, sur le pourtour de la corolle, et dont l'ensemble regroupé en verticille constitue le calice.

Septicide : Qualifie la déhiscence d'une capsule s'effectuant au niveau des cloisons (lignes de suture latérale des carpelles).

Style : Extrémité du pistil (voire gynécée) prolongeant l'ovaire et portant le stigmate.

Stigmate : Extrémité du style ou partie au sommet du pistil permettant la réception des grains de pollen.

Stipule : Appendice foliacé généralement à la base du pétiole de certaines feuilles.

Stomate : Orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens des végétaux (sur la face inférieure des feuilles le plus souvent) permettant notamment des échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant.

Tégument : Désigne un tissu différencié formant une enveloppe autour de divers organes, notamment l'ovule et la graine.

Tenuinucellé : Se dit de l'ovule, lorsque la cellule mère archégoniale ne subit aucune mitose préliminaire tangentielle et donne directement la cellule mère des mégasporocytes, sans formation d'une calotte.

Tissu nucellaire : Tissu qui forme l'intérieur de l'ovule.

Tomenteux : Se dit d'un organe aérien (feuille, tige, fruit) dont la surface est couverte de poils cotonneux.

Unitégumenté : Se dit d'un ovule ayant une seule enveloppe autour du nucelle.

Urcéolée : En forme d'urne.

Verticille : Ensemble d'organes semblables insérés suivant un cycle concentrique à un même niveau, et au moins au nombre de trois, autour ou au sommet d'un axe qui les porte.

Zygomorphe : Qualifie une plante dont les différentes parties de chaque cycle (sépal, pétale, étamine) sont disposées symétriquement par rapport au plan axe/bractée ou ne présentent éventuellement aucune symétrie.

La Faculté de Pharmacie de Lyon n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

RESUME

En janvier 2013, plusieurs cas d'intoxication ont été signalés sur l'île de la Réunion, suite à la consommation de miel, vendu à l'état brut dans ses alvéoles de cire. Le miel produit naturel et apprécié du grand public, n'est donc pas toujours inoffensif. L'objectif de mon travail a donc été de faire un état des lieux des connaissances actuelles concernant ces intoxications dues à la consommation de ce miel, appelé « miel fou ».

Cette intoxication décrite sur l'île de la Réunion n'était pas la première en date. Cependant, la plupart des cas contemporains ont lieu en Turquie sur la côte Est de la Mer Noire. Les premiers symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion et le tableau clinique associe une hypotension, une bradycardie et des troubles neurologiques. Cet empoisonnement peut être grave mais la guérison est le plus souvent rapide et sans séquelle. De fait, la prise en charge se limite à une surveillance médicale associée à des traitements symptomatiques, comprenant si nécessaire de l'atropine et un remplissage vasculaire.

Ce miel est produit à partir du nectar récolté sur les fleurs de certaines plantes, appartenant toutes à la famille des Ericacées. D'après les cas d'intoxications au miel fou décrits dans la littérature les espèces responsables sont *Rhododendron ponticum*, *R. luteum*, *R. simsii* et *Agauria salicifolia*. Toutes ces plantes contiennent des grayanotoxines (GTX) qui ne sont pas toxiques pour les abeilles qui les butinent.

Ces GTX sont des diterpènes liposolubles interagissant avec le site 2 des canaux sodiques voltage-dépendants. Les symptômes semblent liés à ces effets membranaires qui sont observés dans les muscles squelettiques et cardiaques, ainsi que dans les cellules nerveuses périphériques et centrales. Les GTX I, II et III sont les principales GTX retrouvées dans les intoxications.

Pouvant devenir un réel problème de santé publique, de plus en plus de recherches sont effectuées sur ce miel. Des mesures sont également prises par certains pays pour éviter de nouveaux incidents.

MOTS CLES

Miel fou
Grayanotoxines
Intoxication
Ericacées

JURY

Mme KERZAON Isabelle, Maître de Conférences
Mme DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur
M. DIDIER Jean-Marc, Pharmacien d'officine

DATE DE SOUTENANCE

Jeudi 19 Mars 2015

ADRESSE DE L'AUTEUR

44 allée des bruyères – 01120 Dagneux