

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2020

THESE 2020 TOU3 2103

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent BARTHE

ANALYSE LC/MS DU MIEL ET SON INTERET EN SANTE

16 décembre 2020

Directeur de thèse : MARTI Guillaume

JURY

Président : FABRE Nicolas

1^{er} assesseur : BONIN Jean

2^{ème} assesseur : MARTI Guillaume

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATToux K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELENDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

Remerciements

À **Guillaume**, pour avoir accepté de diriger cette thèse et de faire partie de mon jury. Merci pour ta disponibilité et ta bienveillance sans faille tout au long de ces derniers mois. Je me souviendrai longtemps des après-midis dans le jardin botanique et des anecdotes qui ont accompagné ces cours. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

À **Nicolas Fabre**, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse en ces temps troublés. Il m'arrive de penser à vous lorsqu'un labo n'est pas capable de me donner le DER du médicament qu'il veut me vendre.

À **Jean**, merci d'avoir accepté sans hésiter de faire partie de ce jury. Merci aussi pour m'avoir accueilli avec Florence et toute l'équipe dans votre officine il y a six ans. Merci d'avoir guidé, avec bienveillance et bonne humeur, mes premiers pas dans le monde de la pharmacie. Je ne pouvais trouver meilleur endroit pour commencer.

À **Annick Barre** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de mener à bien nos extractions.

À **Mathias, Guillaume et Mickael** pour votre aide, empreinte de bonne humeur lors de nos après-midi passés au laboratoire.

À **Maman et Jean Pierre**, merci de m'avoir toujours soutenu sans jamais faiblir, de m'avoir supporté pendant toutes ces années d'études et d'avoir toujours ri à mes blagues. Vos conseils et votre aide me sont très précieux.

À **Sophie**, tu me comprends mieux que quiconque sans que nous ayons besoin de parler.

À **Papi** et **Mamie**, pour l'indéfectible soutien, l'affection et la générosité que vous me témoignez. Merci d'avoir pris une part si importante à mon éducation et mon éveil dans de nombreux domaines. Les soirées à Rogalle au coin du feu me manquent un peu.

À **Mélanie**, **Roxanne**, **Victor** pour toutes les épreuves que nous avons surmontées ensemble, et pour tous les bons moments passés avec vous. Comptez sur moi pour les tickets de bus.

À **Alexandre**, **Guilhem**, **Hugo**, **Lucas**, **Paul**, **Robin**, **Valentin**, **Julie** et **Laurène**, pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble et tous ceux à venir. Votre amitié m'est très chère.

À **Fanny**, pour toutes les choses que nous avons partagées ensemble et toutes celles qu'il nous reste à découvrir. Merci pour tout ce que tu m'as appris. « Aujourd'hui plus qu'hier et bien moins que demain ».

À **Papa**, parfois je me demande ce que tu penserais de mon parcours depuis 10 ans. J'espère que tu approuverais mes choix.

Liste des figures

FIGURE 1 : MORPHOLOGIE DE L'ABEILLE PAR E. HAUBRUGE (5)	21
FIGURE 2 : ANATOMIE DE LA TETE DE L'ABEILLE (8)	22
FIGURE 3 : DEVELOPPEMENT DE L'ABEILLE (10)	28
FIGURE 4 : STRUCTURE DE LA RUCHE (11)	29
FIGURE 5 : CADRE DE MIEL PRE-ALVEOLE	30
FIGURE 6 : DESOPERCULATION DU MIEL (12)	31
FIGURE 7 : DANSE EN "8" DE L'ABEILLE" (15)	34
FIGURE 8 : ROLE DU PEROXYDE D'HYDROGENE DANS L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU MIEL (26)	46
FIGURE 9 : PRODUCTION DU MGO LORS DE LA GLYCOLYSE(28)	48
FIGURE 10 : POUVOIR INHIBITEUR DES MIELS SUR UNE SOUCHE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN FONCTION DE LEUR ORIGINE FLORALE (27)	51
FIGURE 11 : EXEMPLE D'UNE PENTAHYDROXYFLAVONE ET SES 5 FONCTIONS PHENOL	52
FIGURE 12 : EFFET DU MIEL SUR L'OXYDATION DES LIPOPROTEINES HUMAINES (31)	53
FIGURE 13 : A COLZA, B ROMARIN, C TOURNESOL, D CHATAIGNER, E RHODODENDRON, F LAVANDE, G ACACIA	62
FIGURE 14 : LOI DE SNELL DESCARTES (50)	65
FIGURE 15 : REFRACTOMETRE A LECTURE OPTIQUE (50)	65
FIGURE 16 : DESHYDRATATION DU GLUCOSE EN HYDROXY-METHYL FURFURAL (53)	67
FIGURE 17 : A POLLEN DE TOURNESOL, B POLLEN DE COLZA, C POLLEN DE ROMARIN (M. GIRARD)	68
FIGURE 18 : ORGANISATION GENERALE D'UN SPECTRE DE MASSE COUPLE A UNE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (55)	71
FIGURE 19 : 2-PHENYLCHROMANE	74
FIGURE 20 : EXTRACTION SUR COLONNE SPE (55)	76
FIGURE 21 : RESUME DES ETAPES D'EXTRACTION SUR COLONNE SPE (54)	78
FIGURE 22 : COURBES D'INTENSITE EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION DES QC, PAR EXTRACTION SPE A GAUCHE ET EXTRACTION LIQUIDE/LIQUIDE PAR MEOH A DROITE	79
FIGURE 23 : COMPARAISON PCA DES MIELS D'ACACIA, DE CHATAIGNER, DE COLZA, DE LAVANDE, DE RHODODENDRON, DE ROMARIN DE ET TOURNESOL.	80
FIGURE 24 : PCA MIEL CHATAIGNER, TOURNESOL, RHODODENDRON, COLZA ET TOURNESOL	82
FIGURE 25 : S-PLSDA MIEL CHATAIGNER, COLZA, LAVANDE, RHODODENDRON, TOURNESOL, LAVANDE	83
FIGURE 26 : HEATMAP MIEL CHATAIGNER, COLZA, LAVANDE, RHODODENDRON, TOURNESOL	84

FIGURE 27 : KUSHENOL	85
FIGURE 28 : NYMPHAEOL B	85
FIGURE 29 : 10(20),16-GRAYANOTOXADIENE-2,3,5,6,14-PENTOL	86
FIGURE 30 : LASIODIPLODIN; 5R-HYDROXY, O-DE-ME	86
FIGURE 31 : 7-C- β -D-GLUCOPYRANOSYL-4',6,8-TRIHYDROXYFLAVONE	87
FIGURE 32 : SWIETENOCOUMARIN A	87
FIGURE 33 : TANSHINONAL	88
FIGURE 34 : PLSDA FLEURS ACACIA, LAVANDE, TOURNESOL	89
FIGURE 35 : PLSDA CROISEE, FLEURS ET MIELS	91
FIGURE 36 : ACIDE ABSCISSIQUE	92
FIGURE 37 : CAPSTEMOL	94
FIGURE 38 : GINGERDIONE	95
FIGURE 39 : INHIBITION DE LA PRODUCTION DE PROSTAGLANDINE E2 (75)	95
FIGURE 40 : PINOBANSKIN	96
FIGURE 41 : LEDEBOURIN A	96

Liste des abréviations

LC/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

HMF : hydroxyméthylfurfural

EGF : Facteur de croissance épidermique

TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TGF β : Facteur de croissance transformant bêta

PDGF : Facteur de croissance plaquette-dérivé

pH : Potentiel hydrogène

ADN : Acide désoxyribonucléique

MGO : Méthylglyoxal

ORAC : Capacité d'absorbance des espèces radicalaires de l'oxygène

CPR : Protéine C réactive

EPIC : European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament

ORL : Oto-rhino-laryngologie

OTC : En vente libre (over the counter)

UFC : Unités formatrice de colonie

OMS : Organisation mondiale de la santé

FAO : Food and agriculture organization

CETAM : Centre d'étude technique agricole Moselle Lorraine

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

UV : Ultraviolets

m/z : Rapport masse sur charge

SPE : Extraction en phase solide

ACP (PCA) : Analyse en composante principale

QC : Quality control

s-PLSDA : Analyse discriminante par les moindres carrés partiels.

MAO-B : Monoamine oxydase B

FGF18 : Facteur de croissance fibroblastique 18

SARS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère

PPAR γ : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosome

LANCL2 : LanC-like protein 2

DPPH : 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl

TEAC : Trolox équivalent antioxidant capacity

PEG2 : Prostaglandine E2

LPS : lipopolysaccharide

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
TABLE DES MATIERES.....	10
INTRODUCTION	15
I. L'ABEILLE, LE MIEL ET L'HOMME	17
1. Une relation de longue date	17
a. Un peu d'histoire	17
b. L'abeille, un insecte pollinisateur	18
c. Rôle économique de l'abeille	19
d. Rôle écologique de l'abeille	19
2. Apis mellifera.....	20
a. Taxonomie	20
b. Morphologie de l'abeille	21
1. Anatomie de la tête (7)	22
2. Anatomie du thorax	24
3. Anatomie de l'abdomen.....	24
c. La colonie.....	26
1. La reine.....	26
2. Les mâles	27
3. Les ouvrières	27
3. L'apiculture.....	28
a. Schéma de la ruche.....	29
1. Le corps et les hausses.....	29
2. Les cadres	30
b. La récolte du miel	30
c. Extraction du miel et mise en pot	31

d.	Conservation	32
4.	Le miel.....	33
a.	La récolte des abeilles	33
1.	La danse des abeilles.....	33
2.	Le miel de nectar.....	34
3.	Le miel de miellat	35
b.	Élaboration du miel.....	36
c.	Caractère monofloral	37
d.	Composition du miel	37
1.	Les sucres.....	37
2.	L'eau.....	38
3.	Les protides, les protéines et les enzymes.....	38
4.	Les acides organiques.....	39
5.	Les métabolites secondaires	39
6.	Les lipides	39
7.	Les vitamines	40
8.	Les sels minéraux	40
II.	LE MIEL EN THERAPEUTIQUE.....	41
1.	Propriétés thérapeutiques du miel	41
a.	Propriétés cicatrisantes	41
1.	Rappel sur la cicatrisation.....	41
2.	Intérêts du miel.....	43
b.	Propriétés antibactériennes	44
1.	Le peroxyde d'hydrogène, inhibine peroxydée	45
2.	Les inhibines non peroxydées	47
3.	L'osmolarité.....	50
4.	Le pH.....	50
5.	Le pouvoir antibactérien des miels européens	50
c.	Propriétés anti-oxydantes	52
1.	Le pouvoir antioxydant des aliments	52
2.	Études sur le miel.....	53
d.	Propriétés anti-inflammatoires	54
2.	Application en santé.....	54
a.	Spécialités commercialisées	54
1.	Pansements	54

2.	Voie per os.....	57
3.	Restrictions d'utilisation	58
b.	Qualité médicale.....	58

III. CARACTERISATION, IDENTIFICATION ET OUTILS D'ANALYSE DES MIELS

60

1.	Pourquoi analyser le miel.....	60
2.	Caractéristiques organoleptiques des différents miels de l'échantillon.....	62
a.	Le miel d'acacia.....	62
b.	Le miel de tournesol	62
c.	Le miel de colza	63
d.	Miel de châtaigner	63
e.	Miel de lavande	63
f.	Miel de romarin.....	63
g.	Miel de rhododendron	64
3.	Principales méthodes d'analyse qualitative du miel.....	64
a.	Le taux d'humidité	64
b.	Le pH et l'acidité libre	66
c.	La conductivité électrique	66
d.	La concentration en hydroxy-méthyl furfural (HMF).....	67
e.	Activité diastasique.....	67
f.	L'analyse pollinique	68
4.	Spectrométrie de masse principe et intérêt	69
a.	Rappel sur la spectrométrie de masse.....	70
1.	Chromatographie en phase liquide haute performance	70
2.	Spectrométrie de masse.....	70
b.	Molécules d'intérêts.....	71
1.	Les métabolites primaires.....	71
2.	Les métabolites secondaires	72
3.	Les flavonoïdes	73

IV. ANALYSES EN SPECTROMETRIE DE MASSE D'UN PANEL DE MIEL

REGIONAUX..... 75

1.	Matériel et méthode.....	75
-----------	---------------------------------	-----------

a.	Constitution des échantillons	75
b.	Extraction des flavonoïdes et séparation des sucres	76
1.	Préparation des échantillons	76
2.	Conditionnement des colonnes.....	77
3.	Passage des échantillons	77
4.	Lavage et séchage de la colonne	77
5.	Elution.....	78
6.	Conditionnement des échantillons pour l'analyse.....	78
2.	Résultats	79
a.	Données brutes	79
b.	Comparaison et identification des différents miels monofloraux.....	80
1.	Simplification et réduction du nombre de classe.....	81
2.	Analyse en s-PLSDA.....	83
3.	Identification des molécules clés : la Heatmap.....	84
c.	Comparaison miel/fleur.....	89
1.	Analyse en PLSDA de 3 essences florales	89
2.	Recherche de molécules communes aux miels et aux fleurs.....	90
d.	Molécules communes aux différentes classes de miel	91
1.	Trihydroxyflavones	91
2.	Tetrahydroxyflavones	92
3.	Pentahydroxyflavones	92
4.	Acide abscissique.....	92
5.	Tephroleocarpin	94
6.	Capstemol.....	94
7.	Gingerdione	95
8.	Pinobanksin	96
9.	Ledebourin A.....	96
	CONCLUSION	97
	BIBLIOGRAPHIE	98
	ANNEXES	105
	Annexe 1 : Tableau des échantillons	105
	Annexe 2 : Manuel d'utilisation des colonnes Strata XL 200.....	106

Introduction

L'histoire de l'Homme et du miel remonte aux premiers primates, lesquels avec de simples bâtons, récoltaient la précieuse substance. Des chasseurs cueilleurs du néolithique jusqu'aux ruches à cadres modernes, en passant par la Grèce et l'Égypte antique, les populations de toutes les civilisations et de toutes les religions se sont intéressées au miel, tantôt pour ses propriétés édulcorantes et nutritives, tantôt pour ses supposées propriétés curatives. Les recherches historiennes et préhistoriennes font état de témoignages de la récolte du miel 7000 ans avant Jésus Christ sur les parois d'une grotte en Espagne. Ce n'est que bien plus tard que la domestication de l'abeille par l'Homme a commencé, probablement dans l'Antiquité. Au cours de cette période, nombreux sont les écrits anciens qui mentionnent le miel dans la confection de médicaments et de cosmétiques. On peut citer comme exemple le papyrus d'Ebers, écrit par les Égyptiens, un des plus anciens traités médicaux découverts par les historiens. Celui-ci fait mention de plusieurs préparations à base de miel dans le but de guérir des maladies du tube digestif, des yeux, ou encore des reins. On retrouve dans ces préparations, d'une part, des formes orales (des décoctions, des pilules) et d'autre part, des formes topiques (des onguents, des emplâtres, des collyres et des pommades). De l'autre côté de la Méditerranée, chez les Grecs et les Romains, le miel revêt une dimension religieuse importante. Il est offert aux dieux et aux esprits des défunts. Il sert aussi à la fabrication de l'hydromel, boisson alcoolisée issue de la fermentation du miel et consommée par de nombreuses civilisations dans le monde entier et à de nombreuses époques. Si les Grecs prêtaient à l'hydromel des propriétés sacrées et magiques, il revient également dans la médecine d'Hippocrate sous de nombreuses formes. En somme, les propriétés nutritives, thérapeutiques et surtout cicatrisantes du miel étaient déjà reconnues.

Même si le miel a longtemps été oublié par la médecine moderne, fondée sur les principes de la *based evidence* médecine et sur les travaux de Claude Bernard, les études sur les propriétés thérapeutiques de ce dernier réapparaissent, dans un contexte marqué par un regain d'intérêt pour les médecines alternatives et naturelles.

Mais étudier les propriétés curatives du miel à l'égard des maladies humaines et animales peut s'avérer difficile, du fait de la complexité de sa composition mais aussi de sa variabilité importante. Le miel étant davantage destiné à la consommation courante qu'à un usage médical, les méthodes existantes d'analyse et de contrôle qualité sont avant tout destinées et adaptées aux besoins de l'industrie agroalimentaire plutôt qu'aux exigences du monde médical. Il existe aujourd'hui des méthodes d'analyse suffisamment performantes, telles que la spectrométrie de masse, pour mener à bien des analyses plus approfondies du miel.

C'est pourquoi nous allons nous intéresser à l'analyse du miel grâce à une technique aussi moderne qu'efficace, la spectrométrie de masse. Le but de ces travaux est donc d'élaborer un protocole d'analyse et de vérifier la capacité de la méthode à décrypter la composition chimique d'un miel. Plus précisément, ces analyses ont pour but de détecter et identifier les métabolites secondaires issus des plantes qui confèrent au miel une partie de ses propriétés thérapeutiques.

Il s'agira, dans un premier temps, de décrire la physiologie et le comportement de l'abeille, la composition du miel, et le lien que les êtres humains entretiennent avec cet animal, si important pour les écosystèmes (I), avant d'aborder les différentes utilisations de ce dernier en thérapeutique (II). Ensuite, il sera question des différentes méthodes de références permettant de caractériser et de contrôler la conformité et la qualité des miels (III). Enfin, la spectrométrie de masse, en tant que méthode novatrice, sera présentée afin d'évaluer son intérêt dans le cadre de l'analyse du miel (IV).

I. L'abeille, le miel et l'Homme

1. Une relation de longue date

a. Un peu d'histoire

Le miel est une denrée connue depuis des millénaires par l'Homme, comme le prouvent des témoignages de son utilisation dès la Préhistoire. Le plus ancien témoignage retrouvé à ce jour est la peinture de la grotte araignée en Espagne, datée d'environ 8000 avant Jésus Christ (1). On peut y deviner des humains grim pant le long de falaises à l'aide de cordes dans le but de récupérer le précieux miel, une pratique encore retrouvée aujourd'hui dans certaines régions d'Asie (2). Mais il se pourrait que l'utilisation du miel et des produits de la ruche remonte encore plus loin que notre espèce puisque certains grands singes, aujourd'hui, récoltent le miel à leur façon. C'est le cas, par exemple, du chimpanzé qui sait se servir de bâtons comme d'outils rudimentaires lui permettant d'extraire le miel de ruches sauvages trouvées dans la forêt. Par la suite, au Néolithique, les études d'archéochimie suggèrent que l'homme de cette époque utilise aussi les produits de la ruche. Ainsi, on retrouve dans les fragments de poteries de l'époque, non pas du miel, qui ne se conserve pas plus de quelques années - contrairement aux idées reçues - mais des traces de cire. Plus tard, ce sont les Grecs et les Égyptiens qui utilisent le miel pour soigner les maux du quotidien, tel que le prouve l'existence du papyrus d'Ebers, un des plus anciens traités médicaux découverts par les historiens, faisant mention de plusieurs préparations à base de miel dans le but de guérir des maladies du tube digestif, des yeux ou encore des reins.

Plus tard, les propriétés du miel ont été un peu oubliées avec l'arrivée de la médecine moderne, caractérisée par la nécessité de la preuve comparative et de la standardisation des pratiques de soins et de fabrications de médicaments supplantant les siècles d'empirisme. C'est depuis les années 1990 que des études s'intéressent de nouveau aux propriétés de cette substance en utilisant les méthodes et les outils

d'investigation de notre époque. Aujourd'hui, les dispositifs médicaux et les médicaments à base de miel sont présents dans toutes les pharmacies. Avec l'avènement d'internet, on trouve en quelques clics des quantités de recettes vantant les mérites du miel, parfois à raison et parfois à tort. De là vient aujourd'hui la nécessité de comprendre et d'expliquer par des méthodes scientifiques les propriétés thérapeutiques de ce produit de consommation courante.

b. L'abeille, un insecte pollinisateur

La pollinisation est un phénomène intervenant dans la reproduction sexuée des angiospermes et des gymnospermes. Il consiste au transport du pollen depuis les étamines, organes mâles de reproduction, vers le pistil, organe femelle. Ce transport peut avoir lieu au sein d'une même fleur. On parle alors d'autopollinisation. Il peut également se produire entre deux fleurs de la même espèce, portées par un même individu ou non. On parle alors de pollinisation croisée ou allopollinisation. L'allogamie est le mode de reproduction le plus fréquent chez les plantes à fleur, qu'elles soient dioïques, monoïques ou hermaphrodites.

Il existe plusieurs vecteurs de pollinisation. Les plus connus sont bien sûr les insectes pollinisateurs. Parmi eux, et par ordre d'importance, on retrouve les abeilles domestiques, les bourdons, les mouches, les fourmis, les abeilles sauvages, les guêpes. Ce sont les abeilles domestiques qui assurent à elles seules 80% du travail des insectes pollinisateurs. Il existe également d'autres vecteurs de pollinisation de moindre importance. Certains vertébrés, et notamment les oiseaux, participent aussi au transport des pollens. Le vent peut parfois être un vecteur du pollen, comme c'est le cas des plantes anémogames. Enfin, de façon plus anecdotique, l'eau suffit parfois à assurer la pollinisation, on parle alors d'hydrogamie.

c. Rôle économique de l'abeille

Aujourd'hui, si l'humanité exploite encore les abeilles pour l'intérêt des produits de la ruche que sont le miel, la cire ou encore la propolis, le principal bénéfice de l'apiculture moderne réside dans le rôle de pollinisateur majeur des grandes cultures. À l'aube du XXIème, l'humanité doit nourrir les sept milliards d'êtres humains qui la composent. Une grande partie de notre chaîne alimentaire repose sur l'agriculture, et en particulier la culture des plantes à fleurs, les angiospermes. Or, ces plantes ont besoin d'être pollinisées. Parmi les angiospermes, on retrouve non seulement nos arbres fruitiers et nos légumes mais aussi certaines de nos grandes cultures céréalières telles que le colza ou le tournesol, qui sont aussi des plantes à fleur. Si ces deux dernières essences permettent de produire de très bons miels monofloraux comme nous le verrons par la suite, l'intérêt de ces grandes cultures est surtout de produire les céréales nécessaires à l'élevage intensif et donc, *in fine*, de nourrir les populations.

Ce service rendu par l'abeille aux êtres humains a été étudié d'un point de vue économique dans l'intention de le chiffrer. Au niveau mondial, la contribution économique de l'abeille dans la production agricole a été évaluée entre 190 et 320 milliards de dollars (3). En France, cette contribution a été estimée à 2,8 milliards d'euros. Pourtant, en pratique, si les abeilles venaient à disparaître, l'homme serait bien incapable d'assurer lui-même le travail de celles-ci, abstraction faite de quelques exemples marginaux comme la pollinisation de la vanille par exemple.

d. Rôle écologique de l'abeille

Une abeille butineuse doit, pour remplir son jabot de miel, visiter entre 600 et 900 fleurs par heure. Par son action pollinisatrice, elle permet la survie de 80% des espèces de plantes à fleurs dans le monde (3). Le transport des pollens par l'abeille assure non seulement la pérennité de nombreuses espèces d'angiospermes mais permet également des fécondations croisées qui donnent lieu à un brassage génétique bénéfique à la biodiversité et à l'évolution des taxons.

2. Apis mellifera

a. Taxonomie

L'abeille appartient à la classe des Insectes, à l'ordre des Hyménoptères, et à la famille des Apidés qui regroupe un certain nombre d'espèces vivant en colonie, notamment les bourdons. Le genre *Apis* qui appartient à la famille des Apidés contient quatre espèces :

- *Apis dorsata*, l'abeille géante, principalement retrouvée en Asie et plus particulièrement en Inde. Elle produit du miel et de la cire mais n'est pas domestiquée et vit dans des nids sauvages. Les sous-espèces d'*Apis dorsata* sont réputées agressives.
- *Apis florea* est également une abeille originaire d'Asie. Elle se caractérise par sa petite taille et n'est que rarement utilisée en apiculture.
- *Apis cerana* est uniquement présente en Asie. À l'inverse des deux espèces précédentes, elle se prête plus facilement à la domestication.
- *Apis mellifera* ou l'abeille occidentale. Cette dernière espèce est la plus largement utilisée en apiculture. Originaire d'Europe, elle s'est imposée un peu partout sur la planète essentiellement parce qu'elle est l'espèce la plus adaptée à l'élevage. Il existe un très grand nombre de sous espèces interfécondes entre elles qui ont évolué en grandes lignées géographiquement isolées sur les cinq continents.

b. Morphologie de l'abeille

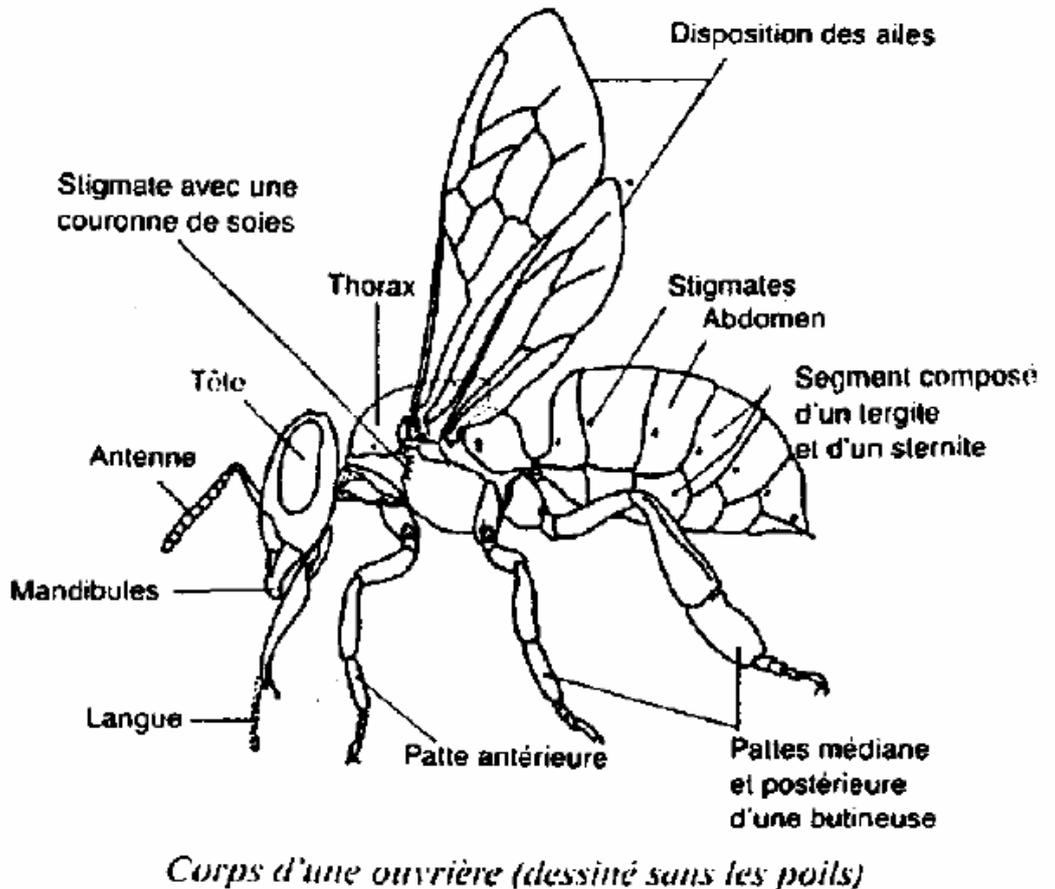


Figure 1 : Morphologie de l'abeille par E. HAUBRUGE (5)

Comme tous les insectes, le corps de l'abeille est segmenté en métamères (4). On distingue trois parties : la tête, le thorax, et l'abdomen. Chacun des trois métamères porte des organes dédiés à des fonctions spécifiques (5). Chez l'abeille, la tête porte, en plus des yeux et des antennes, un appareil buccal adapté à la récolte du nectar. Le thorax porte les membres de l'appareil locomoteur : les pattes et les ailes. L'abdomen, quant à lui, contient les organes vitaux, tels que les systèmes digestif, respiratoire et reproductif ainsi que l'appareil vulnérant. À l'instar des arthropodes, l'abeille est un animal invertébré. Elle ne possède pas de squelette mais un exosquelette prenant la forme d'une cuticule dont le principal composant est la chitine (6).

1. Anatomie de la tête (7)

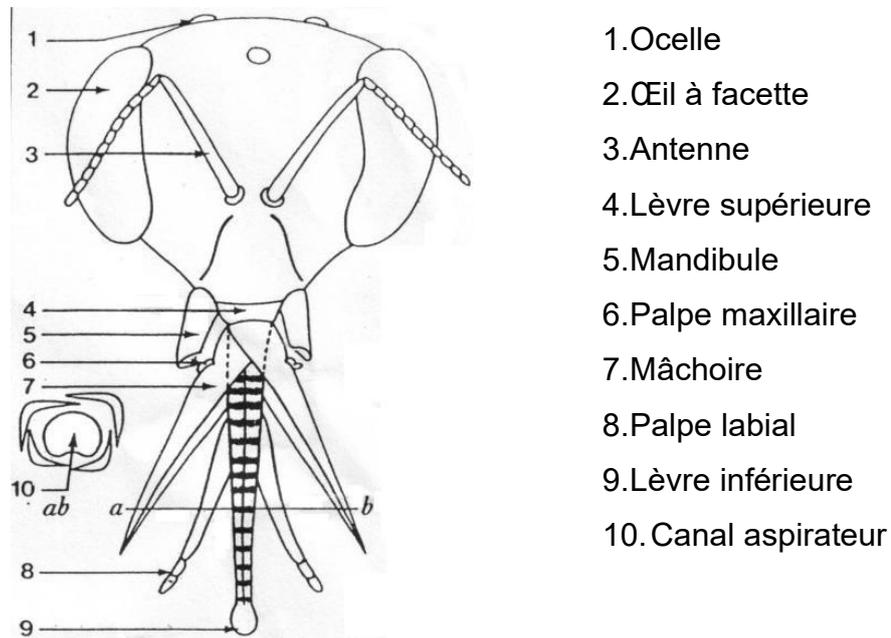


Figure 2 : Anatomie de la tête de l'abeille (8)

a. Les yeux et les ocelles

Les yeux sont au nombre de deux. Ils sont composés de 3000 à 8000 facettes appelées ommatidies. Chaque ommatidie est indépendante. Leur disposition permet à l'abeille de voir à 360 degrés autour d'elle. Leur spectre de perception est décalé vers les ultraviolets par rapport à celui de l'homme et s'étend de 300 à 500 nanomètres. Ce décalage très utile lui permet de distinguer et de différencier les couleurs de certaines fleurs, mieux que ne pourrait le faire la vision humaine (6).

Les ocelles du latin « petit œil » sont des dispositifs optiques plus simples que les yeux. Placés sur le dessus de la tête au nombre de trois, ils permettent à l'abeille de détecter les changements d'intensité lumineuse et donc de mieux se repérer et se déplacer.

b. Les antennes

Elles sont d'une importance capitale pour l'abeille et sont l'outil de mesure de plusieurs sens : le toucher, l'odorat, le goût, les vibrations. Elles jouent un rôle majeur dans la communication entre individus en captant les phéromones et permettent également de détecter les sources de nectar.

c. L'appareil buccal

Les abeilles font partie du groupe des insectes suceur-lécheurs. En d'autres termes, ses pièces buccales sont particulièrement adaptées à la récolte du nectar. Elles se composent d'une paire de mandibules, lui permettant de broyer et de malaxer la cire et la propolis, et d'une trompe. Cette dernière est elle-même décomposée en plusieurs structures : les maxilles, les palpes labiaux et la langue. Également appelée proboscis, la langue, est composée d'un tube capillaire ainsi que d'une ventouse. C'est cet ensemble extensible qui permet à l'abeille d'aspirer le nectar dans des endroits difficilement accessibles comme le fond du calice floral (6).

d. Les glandes de l'appareil buccal

La tête de l'abeille porte trois types de glandes différentes :

- Les glandes hypopharyngiennes sécrètent la gelée royale et les nutriments servant à nourrir le couvain ainsi que la reine.
- Les glandes salivaires participent dans une moindre mesure à la sécrétion de la gelée royale.
- Enfin, les glandes mandibulaires contribuent également à la sécrétion de gelée royale mais sont surtout connues pour jouer un rôle dans la communication entre les abeilles en sécrétant des phéromones produites en cas de danger et pouvant entraîner une réaction de la colonie (6).

2. Anatomie du thorax

a. Les pattes

Les trois paires de pattes de l'abeille sont toutes composées de cinq segments : le coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse. Les pattes antérieures servent principalement au nettoyage de la tête et des antennes alors que les pattes postérieures possèdent un peigne qui permet de récolter le pollen (6).

b. Les ailes

L'abeilles possède deux paires d'ailes. Durant le vol, les ailes postérieures, plus petites que les ailes antérieures, peuvent s'attacher à ces dernières grâce à un système de crochets et de gouttières appelés hamuli. Cette particularité anatomique permet une meilleure stabilité en vol. La vitesse d'une abeille en vol peut atteindre jusqu'à 60 km/h et jusqu'à 400 battements par seconde.

Cependant, le rôle des ailes ne se limite pas au déplacement. En effet, elles permettent également aux abeilles de ventiler la ruche régulant ainsi sa température et permettant de déshydrater le miel. Les ailes jouent également un rôle dans la communication des abeilles en diffusant les phéromones sécrétées par les glandes de Nasanov (6).

3. Anatomie de l'abdomen

L'abdomen de l'abeille est formé de sept segments, chacun étant composé d'une plaque dorsale et d'une plaque ventrale, reliées entre elles par une membrane. À l'intérieur de l'abdomen, protégés par cette armure de chitine, on retrouve le système digestif, le système reproductif, le système respiratoire mais aussi des organes spécifiques de l'espèce (6).

a. Le jabot

Le jabot est un organe appartenant au système digestif de l'abeille. Il se situe juste après l'œsophage et juste avant l'intestin. C'est une poche d'environ 70 μL qui permet à l'abeille de stocker les aliments liquides que sont l'eau et le nectar, pour pouvoir ensuite les régurgiter. C'est grâce au jabot que les abeilles peuvent ramener à la ruche les nutriments nécessaires à l'élevage du couvain et l'alimentation des ouvrières d'intérieur. La régurgitation et la transmission des nutriments grâce au jabot, phénomène que l'on appelle trophallaxie, jouent un rôle majeur dans l'élaboration du miel.

b. Les glandes cirières

Situées à la face ventrale de l'abdomen, ce sont ces glandes qui sécrètent la cire dont se sert constamment l'abeille. Au nombre de huit, elles se répartissent par paire le long de l'abdomen. La cire est excrétée sous forme lamellaire au niveau de structures appelées miroir (6).

c. Les glandes de Nasanov

Ces glandes sécrètent des phéromones principalement composées de terpènes volatiles, proches des terpènes retrouvés dans certaines essences comme l'eucalyptus ou le géranium. Ces phéromones sont connues pour jouer un rôle de communication et d'orientation. Elles permettent notamment aux abeilles de retrouver l'entrée de la ruche et l'emplacement des points d'eaux (6).

d. L'appareil vulnérant et le venin

L'appareil vulnérant, situé à l'arrière de l'abdomen, est un reliquat de l'appareil reproducteur. D'un appendice destiné à pondre les œufs, il a évolué chez les hyménoptères en un organe de défense. Le venin, très acide, est produit par une glande également située dans l'abdomen. Il est injecté par un aiguillon. Ce dard est

muni à son extrémité de dents barbelées. Si celles-ci n'empêchent pas l'abeille de rétracter son dard après avoir piqué un animal chitineux, ce n'est en revanche pas le cas pour une pique dans la chair. L'aiguillon ne pouvant pas ressortir de la chair, l'abdomen de l'abeille se déchire et elle meurt (6).

Le venin de l'abeille est un mélange complexe dans lequel plus de quarante molécules ont été identifiées, pour la plupart des enzymes et des peptides ainsi que des amines biogènes. Il contient principalement de la mélittine et de la phospholipase A2 (environ 50% de la matière sèche pour le premier et 10% pour le deuxième). La mélittine est un peptide possédant une activité hémolytique ainsi qu'une activité vasodilatatrice. La phospholipase A2 est une hydrolase qui dégrade les phospholipides membranaires et altère la perméabilité membranaire des cellules jusqu'à la cytolyse (6).

c. La colonie

L'abeille est un insecte social qui vit regroupé en colonie, formée de 30 000 à 40 000 individus. La colonie peut être vue et décrite comme un organisme à part entière, composé de différentes castes, possédant chacune un rôle et une place définis au sein de la colonie. On distingue trois grandes castes au sein de la ruche : la reine, les ouvrières et les mâles (8).

1. La reine

Elle se distingue des autres abeilles par sa grande taille, environ 1,8 mm contre 1,2 pour les ouvrières. La reine pèse également le double de ses ouvrières. C'est la seule abeille femelle féconde au sein de la ruche. Sa fonction est donc d'assurer la ponte et le renouvellement permanent de la colonie. Tout commence par le vol nuptial qui se déroule à l'extérieur de la ruche et qui n'a lieu qu'une seule fois dans la vie d'une reine. À cette occasion, elle s'accouple avec une vingtaine de faux bourdons et emmagasine des millions de spermatozoïdes qu'elle conservera dans une spermathèque et qui resteront actifs pendant plusieurs années. La reine utilisera ces

gamètes pour pondre entre 1500 et 2000 œufs par jour en fonction de la bonne santé de la colonie et selon la période de l'année. Son espérance de vie estimée à cinq ans est bien plus longue que celle des simples ouvrières (8).

La reine est nourrie avec de la gelée royale produite par les ouvrières. C'est un nutriment suffisamment riche pour permettre à la reine d'assurer son rythme de ponte. C'est également la nourriture utilisée pour nourrir les larves lors de leurs trois premiers jours de développement. Les larves nourries à la gelée royale au-delà de trois jours sont destinées à devenir reines, soit pour remplacer la reine actuelle vieillissante, soit en vue d'un essaimage.

2. Les mâles

Aussi appelés faux bourdons, ils ont pour seul rôle de féconder la reine et donc de participer au maintien de la population. Ils ne survivent pas à l'accouplement. Fait suffisamment atypique pour être signalé, les mâles sont issus des œufs non fécondés de la reine. C'est la raison pour laquelle leur génome est aploïde contrairement au génome de la reine et ses ouvrières. Les mâles sont pondus dans des cellules spécialisées plus larges que les cellules des ouvrières. Pour cette raison, lorsque la reine pond dans ces cellules, l'écartement de ses pattes bloque l'accès de la spermathèque et les œufs pondus ne sont pas fécondés. Au contraire, lorsque la reine pond dans des cellules destinées à engendrer des ouvrières, l'écartement de ses pattes plus resserré (du fait de la taille plus étroite de la cellule) libère l'accès de la spermathèque. Les œufs pondus sont alors fécondés et donneront naissance à des individus femelles diploïdes (9).

3. Les ouvrières

Bien que d'une espérance de vie plus courte (environ trois mois), les ouvrières ont une vie bien remplie et leur fonction au sein de la colonie évolue avec le temps. La vie d'une ouvrière commence avec la ponte de la reine dans des cellules spécialisées au centre de la ruche. Les œufs éclosent au bout de trois jours pour

donner une larve. Les trois premiers jours de sa vie, la larve est nourrie avec de la gelée royale. Par la suite, elle sera nourrie avec du pollen. Cette larve se développe pendant dix jours avant de confectionner un cocon et de se transformer en nymphe. Il faut ensuite huit jours supplémentaires à cette nymphe pour se transformer en abeille adulte. C'est donc au total 21 jours qui sont nécessaires pour voir éclore une ouvrière d'un œuf pondu par la reine (10).

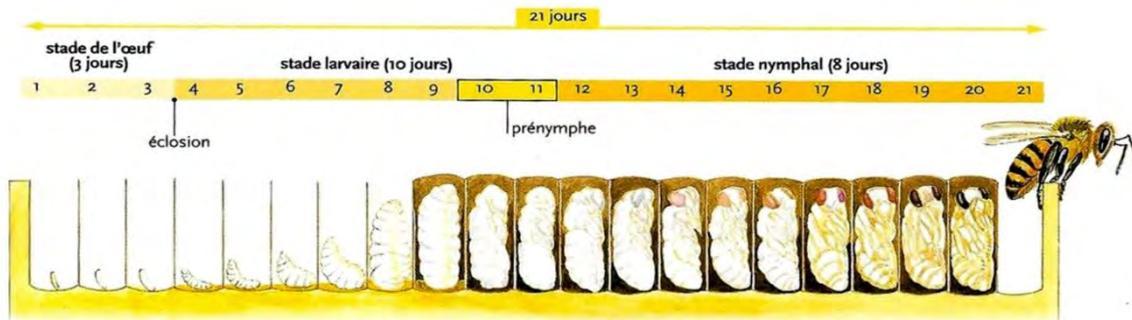


Figure 3 : Développement de l'abeille (10)

3. L'apiculture

L'apiculteur poursuit deux desseins. Le premier, le plus évident, est bien sûr de récolter le miel produit par ses abeilles. Pour vivre de son métier, il doit s'assurer que ses ruches atteignent un rendement suffisant. Mais l'apiculteur est aussi le gardien des abeilles. Par son métier et son action, il participe à la sauvegarde des abeilles, de la diversité du règne végétal et celle de toutes les espèces animales qui découlent de la chaîne alimentaire et dont l'humanité fait partie intégrante. À l'heure où les abeilles sont de plus en plus menacées par les activités humaines, par la disparition de la biodiversité et des aires de butinages, par l'utilisation massive de produits phytosanitaires, le rôle de l'apiculteur est plus important que jamais et va bien au-delà du producteur de miel pour notre petit déjeuner.

a. Schéma de la ruche

1. Le corps et les hausses

La ruche la plus couramment utilisée en apiculture s'organise en deux parties : le corps et les hausses. Le corps est généralement plus haut que les hausses. C'est la partie de la ruche qui abrite la reine, son couvain et la majeure partie de la colonie. Le corps renferme des cadres qui permettent aux abeilles de stocker du miel operculé et d'élever le couvain. Le miel du corps de ruche n'est pas récolté, il est réservé à la colonie et constitue la réserve de nourriture pour la saison froide. En bas du corps de ruche, se trouve une ouverture horizontale donnant un accès direct au plateau d'envol. Par temps chaud, c'est une zone de trafic intense. Les butineuses entrent et sortent de la ruche par ce plateau. Les hausses contiennent également des cadres. Contrairement aux cadres du corps de ruche, ceux de la hausse sont uniquement destinés à accueillir le miel qui sera récolté par l'apiculteur s'il estime que la colonie a suffisamment produit de miel pour passer l'hiver. Pour éviter que la reine et le couvain ne se retrouvent dans les hausses, l'apiculteur peut placer une grille à reine entre le corps de ruche et les hausses. Les mailles de cette grille laissent circuler librement les ouvrières d'une partie à l'autre de la ruche alors que la reine, plus grosse, ne peut pas la traverser (11).

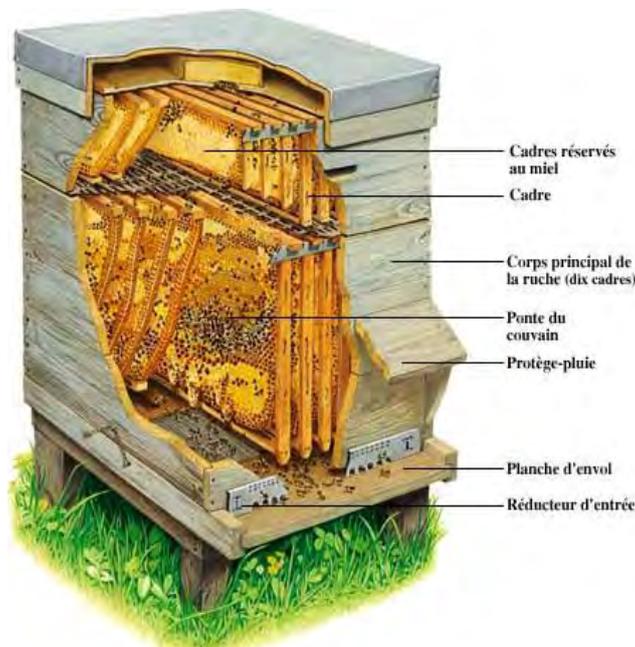


Figure 4 : Structure de la ruche (11)

2. Les cadres

Afin de faciliter le travail des abeilles et d'accélérer les travaux de construction, les cadres portent généralement une plaque de cire pré-alvéolée sur laquelle les ouvrières bâtissent les alvéoles. La cire pré-alvéolée est fabriquée à partir de la cire récupérée sur les cadres bâtis de l'année précédente.

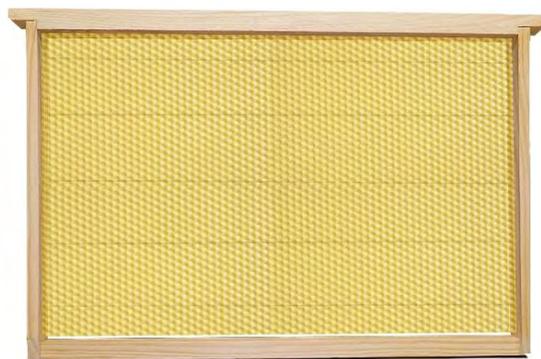


Figure 5 : Cadre de miel pré-alvéolé

b. La récolte du miel

En période de floraisons, les ruches sont pesées afin de connaître leur état de remplissage. Lorsque la ruche est pleine ou que l'apiculteur souhaite récolter et isoler un miel monofloral, il ouvre les hausses et en extrait les cadres. Pour limiter le risque de piqûre, il enfume les abeilles avant d'ouvrir la ruche. Ce faisant, il reproduit les conditions d'un incendie. Cela se traduit par un changement de comportement des abeilles. Craignant que la ruche soit en danger, elles perdent leur agressivité et se réfugient dans le corps de ruche afin de consommer le miel en vue d'une évacuation et d'un départ de la colonie vers un autre site plus propice à les accueillir. Pour plus de précaution, l'apiculteur peut aussi utiliser une combinaison couvrante qui limite le risque de piqûre.

Les cadres sont désoperculés manuellement à l'aide d'un couteau ou d'outils plus modernes comme la machine de Caillas. Une fois les alvéoles ouvertes, le miel

peut être extrait de sa prison de cire, à condition d'être suffisamment liquide.



Figure 6 : Désoperculation du miel (12)

c. Extraction du miel et mise en pot

Les cadres désoperculés sont placés dans un extracteur qui fonctionne comme une centrifugeuse. En tournant, les cadres se vident de leur miel qui est éjecté hors des alvéoles et récupéré dans une cuve. Lors de cette étape, si le miel est trop visqueux, ou s'il a commencé à cristalliser, le rendement sera très faible. Il est ensuite filtré pour éliminer les résidus de cire, de propolis, d'abeille et autres impuretés présentes dans la ruche.

C'est à cette étape que l'apiculteur contrôle la teneur en eau de son miel. Au-delà de 20% d'humidité, une étape de séchage à l'aide d'un déshumificateur est nécessaire pour garantir une bonne conservation dans le temps. Le miel peut ensuite être mis en pot.

d. Conservation

Si la teneur en eau est conforme aux recommandations, le miel pourra être conservé à l'abri de la chaleur et de la lumière pendant plusieurs années. Néanmoins, sa composition n'est pas figée dans le temps. La présence conjointe d'hydrolases, de glucosidases, et de sucres en milieu acide, crée les conditions suffisantes à des transformations chimiques.

Le fructose se transforme par déshydratation en milieu acide en hydroxyméthylfurfural (HMF). N'étant pas présent dans le nectar ou le miellat des pucerons, l'HMF peut être utilisé pour donner un âge. Par exemple, les miels de nectar atteignent généralement une concentration en HMF comprise entre 5 et 15 mg/kg au bout de deux ans de conservation dans de bonnes conditions. La transformation étant grandement accélérée par la température, il est également possible de voir qu'un miel a été chauffé lors de sa mise en pot, ou conservé dans de mauvaises conditions.

À l'inverse de la teneur en HMF qui augmente avec le temps, l'activité enzymatique du miel va décroître avec le temps, au fil de la dégradation des enzymes. Une trop forte chaleur est susceptible d'accélérer le phénomène. Le travail des enzymes telles que des oxydases et des hydrolases donne cours à une maturation du miel après la récolte (13).

4. Le miel

a. La récolte des abeilles

1. La danse des abeilles

Pour produire un kilogramme de miel, les abeilles butineuses d'une colonie parcourent une fois et demie à deux fois le tour du monde et butinent dix millions de fleurs pour un temps de travail estimé à 50 000 heures (3). Pour parvenir à de tels résultats, elles peuvent compter sur leur sens de l'orientation hors norme, aidé par les signaux visuels et olfactifs. Elles peuvent ainsi parcourir plusieurs kilomètres qui séparent la colonie des aires de butinage et retrouver les fleurs, grâce à leur couleur, leur forme et leur odeur.

Les ouvrières deviennent butineuses au 21^{ème} jour de leur vie. Leur travail consiste dans un premier temps à jouer les éclaireuses pour les butineuses plus âgées. Lorsqu'elles trouvent une aire de butinage, elles reviennent à la ruche pour en informer le reste de la colonie. Afin d'orienter correctement ses congénères, l'abeille qui a trouvé une source de nectar effectue une « danse » par l'intermédiaire de laquelle elle transmet des informations sur la localisation de cette source par rapport à la ruche. Cette danse s'effectue à l'intérieur de la ruche, sur un cadre, à la verticale. Si l'aire de butinage est proche, l'abeille effectue alors une danse en rond et tourne sur elle-même en décrivant un arc de cercle. Les butineuses autour d'elle comprennent alors qu'une source de nectar se trouve proche de la ruche, dans un rayon d'une cinquantaine de mètres. Elles se mettent en quête de celle-ci avec pour seule information l'odeur de fleur ramenée par la danseuse. Ce comportement a été décrit pour la première fois par l'éthologue autrichien Karl von Frisch.

Lorsqu'une butineuse repère une aire de butinage plus éloignée de la ruche, elle effectue à son retour une « danse en huit ». Cette danse, destinée à guider les ouvrières sur de plus grandes distances, transmet plus d'informations que la danse en rond. L'orientation du huit, par rapport à la verticale du cadre, définit la direction de

l'aire de butinage par rapport à une droite imaginaire ruche-soleil. Le nombre d'oscillations qu'effectue l'abeille au cours de sa danse en huit donne une indication sur la distance qui sépare la ruche de la source de nectar (14,15). Le schéma ci-dessous illustre les deux formes que peut prendre cette danse :

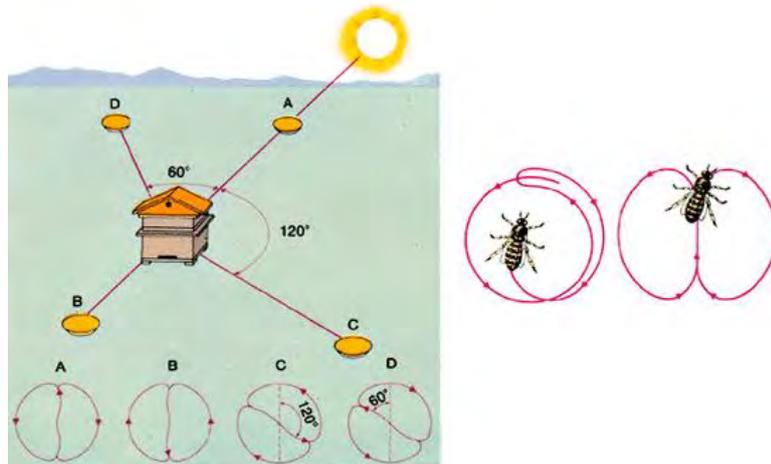


Figure 7 : Danse en "8" de l'abeille" (15)

2. Le miel de nectar

Pour fabriquer le miel, l'abeille utilise deux types de matières premières, la plus connue et la plus répandue étant le nectar floral. C'est un suc riche en sucre qui constitue la principale source de nourriture des abeilles. Sa fonction est d'attirer les insectes pollinisateurs afin qu'ils transportent les pollens de fleur en fleur et permettent la reproduction des espèces végétales.

Le nectar est produit par des organes spécialisés de la fleur appelés nectaires. Ces nectaires peuvent être de deux types : d'une part, les nectaires floraux qui sont le plus souvent situés à la base des pétales de la fleur, et d'autre part, les nectaires extra-floraux qui peuvent se retrouver sur diverses parties de la plante comme les bractées, les pétioles ou la base des feuilles. Le nectar est fabriqué à partir de la sève élaborée de la plante, elle-même transformée par les cellules nectarifères. Sa composition finale varie fortement d'une espèce de plante à l'autre et selon les conditions climatiques. Il

est principalement composé d'eau à laquelle s'ajoutent des sucres pour une teneur comprise entre 7 et 70% selon la plante. La nature et la proportion de chacun de ces sucres changent en fonction des espèces de plantes. Parmi eux, on trouve des mono et disaccharides comme le fructose, le glucose et le saccharose. On retrouve également des oligosaccharides tels que le maltose et le raffinose. En quantité moindre, le nectar contient des molécules issues du métabolisme primaire telles que des acides aminés, des protéines, des enzymes ainsi que des molécules issues du métabolisme secondaire telles que des pigments, des flavonoïdes, des terpènes. Enfin, le nectar peut aussi contenir de petites quantités de pollen. Une grande partie de la diversité et de la particularité chimique du nectar se retrouve dans le miel (16).

3. Le miel de miellat

Lorsque l'environnement de la ruche est pauvre en fleurs, à cause des conditions climatiques ou parce qu'elle se situe dans une forêt de conifères, les abeilles peuvent utiliser une autre ressource pour se nourrir et élaborer leur miel : le miellat. Ce substitut du nectar est issu des excréments des insectes piqueurs suceurs (comme les pucerons et les cochenilles) qui se nourrissent de la sève élaborée des arbres. Pour se nourrir, les pucerons utilisent leurs pièces buccales afin de percer la surface des feuilles ou de l'écorce et aspirer la sève. Lors de la digestion, seule une partie des sucres contenus par la sève est assimilée et une majeure partie est rejetée par l'anus du puceron sous forme de gouttelettes. Le miellat est un liquide visqueux composé d'environ 16% d'eau et 80% de sucres auxquels viennent s'ajouter des acides aminés et des minéraux. Ces proportions ne sont pas sans rappeler celles retrouvées dans le miel. Pour les abeilles, c'est une source de nourriture par défaut moins qualitative que le nectar dont la composition plus variée lui confère de meilleures qualités nutritives (17). Le miellat rejeté à la surface de la plante par les pucerons peut favoriser le développement de champignons. Dès lors, il n'est pas rare de retrouver dans le miellat des spores ainsi que des substances directement venues de la division des ascomycètes (3).

Les miels élaborés majoritairement à partir de miellat sont appelés tout simplement miels de miellat. Il s'agit généralement de miels de forêt fabriqués à partir

de miellat de chêne, de sapin, d'épicéa ou encore de mélèze. Cependant, on trouve des traces de miellats dans de nombreux miels théoriquement élaborés à partir de nectar, les abeilles se souciant assez peu de l'étiquette qui sera posée sur le pot de miel (18).

b. Élaboration du miel

Entre l'œsophage et l'intestin de l'abeille, on trouve un jabot. Cet organe est parfois qualifié d'estomac social. C'est à l'intérieur de ce dernier qu'elle stocke le nectar et le miellat à raison de 50 à 70 mg. C'est là que commence la transformation du nectar en miel. L'action des enzymes du tube digestif de l'abeille conduit à l'hydrolyse du saccharose et la commutation du glucose en fructose. Lorsque la butineuse arrive à la ruche, le jabot plein de nectar, celle-ci régurgite son contenu et le transmet à une ouvrière qui l'aspire et le stocke à son tour dans son jabot. Ce processus de transmission par régurgitation est appelé trophallaxie (19). Une goutte de nectar va ainsi être régurgitée, aspirée et stockée d'abeille en abeille pendant plusieurs minutes au cours desquelles il va se transformer sous l'action des sucs digestifs. Au cours de cette digestion collective, le nectar est enrichi par les enzymes salivaires et digestives, notamment, les glucose oxydases, qui participent indirectement au pouvoir antiseptique du miel (20).

À mi-chemin entre le miel et le nectar, le liquide régurgité par les ouvrières est progressivement déshydraté jusqu'à ne contenir plus que 50% d'eau. C'est à ce stade que le mélange est finalement déposé dans une alvéole de stockage. Les ouvrières chargées de ventiler la ruche se servent alors de leurs ailes pour sécher le liquide visqueux qui voit sa teneur en eau diminuer entre 16 et 20%. Le contenu des alvéoles est alors du miel propre à la conservation. L'alvéole est operculée par la cire produite par les ouvrières. Le miel ainsi mis en réserve, pourra être stocké et consommé pendant les mois d'hiver, lorsque toute source de nourriture aura disparu autour de la ruche (21).

c. Caractère monofloral

On parle de miel monofloral lorsqu'il provient d'une récolte où prédomine une seule espèce florale par opposition au miel toutes fleurs, issu d'un grand nombre d'essences différentes. La récolte d'un tel miel n'est possible que si l'environnement de la ruche contient majoritairement un seul type de plante durant la période de floraison. Il est impossible de certifier à 100% le caractère monofloral d'un miel, cependant, certaines essences s'y prêtent mieux que d'autres. C'est par exemple le cas du colza, du tournesol ou de la lavande, qui fleurissent dans les champs en grande quantité au même moment et représentent plus de la moitié de la production de miel en France. D'autres espèces, par leur isolement géographique ou la brièveté de leur floraison, permettent aussi de récolter des miels monofloraux comme le châtaignier, l'acacia ou le rhododendron en montagne.

d. Composition du miel

L'origine botanique variée du miel ainsi que l'étape animale nécessaire à son élaboration en font un produit à la composition complexe que l'homme est incapable de reproduire. Plusieurs facteurs influent sur sa composition : les essences florales, le climat, l'humidité, la race d'abeille, la nature des sols sont des exemples parmi d'autres. Ainsi, d'une année à l'autre, d'une région à l'autre, parfois d'un rucher à l'autre, un miel, même dit monofloral, verra sa composition varier. Cependant, on peut résumer la composition moyenne d'un miel de la façon qui suit :

1. Les sucres

Comme nous l'avons déjà évoqué, les sucres constituent la partie la plus importante du miel. Il s'agit majoritairement de fructose (environ 40% en masse de miel) puis de glucose (environ 35%). Viennent ensuite des disaccharides comme le maltose, l'isomaltose et le saccharose, ainsi que des oligosides comme le raffinose, l'erlose, le mélézitose. La grande diversité des sucres provient de la diversité florale dont est issu le miel mais également des isomérisations provoquées par les enzymes

apportées par l'abeille lors du processus de trophallaxie. Cette très forte teneur en sucre permet une très bonne conservation du miel, empêchant la prolifération bactérienne et fongique (22).

2. L'eau

En plus de la forte concentration en sucre, la teneur en eau est un élément clé de la conservation du miel. Elle ne doit idéalement pas dépasser 20%, sous peine de fermenter, sauf dans le cas particulier de certains miels monofloraux comme le miel de bruyère callune par exemple qui peut atteindre jusqu'à 22% d'eau. Exception faite de ce miel, on trouve une teneur en eau généralement située entre 15 et 20% selon les essences florales et les conditions climatiques au moment de la récolte puis de l'operculation des alvéoles par les abeilles (22).

3. Les protides, les protéines et les enzymes

Le miel contient une proportion de protides inférieure à 1%. On y trouve cependant un certain nombre de métabolites primaires azotés comme les acides aminés, mais aussi des protéines et des enzymes. Du fait de leur caractère thermolabile, ces enzymes font du miel un produit qui ne supporte pas la chaleur sous peine de perdre une partie de ses propriétés (22). Parmi les enzymes connues dans le miel, on peut en citer trois qui proviennent toutes des glandes salivaires de l'abeille :

- L'invertase est une enzyme capable d'hydrolyser les polysaccharides. Elle transforme le saccharose en glucose et en fructose.
- Les alpha et beta amylases sont des glycosidases, c'est-à-dire des enzymes qui hydrolysent les polysaccharides. Elles transforment l'amidon en glucose.
- La glucose oxydase qui catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène est responsable d'une grande partie des propriétés bactériostatiques du miel. À ce titre, il est considéré comme la principale inhibine du

miel, inhibine étant le terme permettant de désigner l'ensemble des espèces chimiques présentes dans le miel et ayant pour effet de limiter la croissance bactérienne. L'activité de la glucose oxydase s'arrête lorsque le miel arrive à maturité et contient moins de 20% d'eau. Lorsque la concentration en eau remonte, quand le miel est dilué ou mis en contact avec les fluides corporels par exemple, l'activité de l'enzyme redémarre ainsi que la production de peroxyde d'hydrogène.

4. Les acides organiques

Les acides organiques du miel viennent pour certains, directement du nectar des plantes que l'abeille a butiné. D'autres sont issus de la métabolisation du nectar par les abeilles. Le principal acide organique trouvé dans le miel est l'acide gluconique, formé comme évoqué précédemment par l'oxydation du glucose. À ses côtés, sont également présents des dérivés des acides acétique, benzoïque, citrique, succinique (22).

5. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, occupant une place importante dans ce travail, seront décrits plus en détail dans la 3^{ème} partie s'intitulant « Caractérisation, identification et outils d'analyse des miels ». Il s'agit principalement de composés phénoliques, de flavonoïdes, et de terpènes. Ils font partie des inhibines non peroxydés du miel, c'est-à-dire que leur action inhibitrice sur la croissance bactérienne ne passe pas par des propriétés radicalaires oxydantes. La quercétine, la lutéoline et le kaempférol font partie des flavonoïdes les plus connus.

6. Les lipides

Des lipides sont présents en très petite quantité dans le miel. Il s'agit principalement de stérols, de triglycérides et d'acides gras (acide palmitique, oléique et linoléique). Leur présence varie d'un miel à l'autre en fonction des fleurs butinées (22).

7. Les vitamines

Le miel est une source de vitamines hydrosolubles B1 (la thiamine), B2 (la riboflavine), B3 (l'acide nicotinique), B5 (l'acide pantothénique), B6 (la pyridoxine), B8 (la biotine), B9 (l'acide folique) et la vitamine C (acide ascorbique). Les vitamines liposolubles A, D et K peuvent, selon les fleurs butinées, être présentes (22).

8. Les sels minéraux

Les minéraux présents dans le miel sont très variés. Ils dépendent des fleurs butinées mais aussi de l'environnement géographique et de la nature des sols. Les métaux sont largement représentés. Du fer au lithium en passant par l'or, ils sont présents en infime quantité. Quelle que soit l'origine du miel, c'est le potassium qui est le cation majoritaire (22).

Le miel est une substance aussi riche que complexe et les vertus thérapeutiques qu'on lui prête sont nombreuses. Son utilisation en santé implique que sa composition soit connue et maîtrisée, d'une part pour s'assurer de son innocuité, et d'autre part pour garantir son activité thérapeutique. Le contrôle de sa composition ainsi que les propriétés thérapeutiques qui lui sont associées seront traités dans les deux parties suivantes.

II. Le miel en thérapeutique

En santé, le miel est l'objet de nombreuses attentions depuis des siècles. Dès l'Antiquité, l'homme lui prête des propriétés curatives et préventives. On le retrouve aujourd'hui aussi bien dans les tiroirs des officines que dans les services hospitaliers. Si certains de ses usages, et certaines de ses propriétés, ont été démontrés, d'autres, au contraire, font l'objet de démentis par différentes études. Voici un tour d'horizon des utilisations actuelles du miel.

1. Propriétés thérapeutiques du miel

a. Propriétés cicatrisantes

Parmi les utilisations thérapeutiques qui sont faites du miel, son indication pour ses propriétés cicatrisantes est la plus sérieusement documentée et la plus étudiée. Elle est retrouvée dans les protocoles post-opératoires de nombreux centres hospitaliers mais aussi en ambulatoire à travers divers produits et dispositifs médicaux. En France, le CHU de Limoges fait figure de précurseur en la matière, notamment grâce aux travaux du professeur Descottes qui a été l'un des premiers à mettre en place des protocoles post opératoires faisant appel au miel pour accélérer et améliorer la cicatrisation de ses patients.

1. *Rappel sur la cicatrisation*

La cicatrisation est un processus de réparation spontanée des tissus qui se déroule en trois étapes se chevauchant dans le temps : la détersion, le bourgeonnement et l'épithélialisation (23).

- Phase de détersion

Également qualifiée de phase vasculaire et inflammatoire, elle dure entre deux

et quatre jours et permet de stopper le saignement et d'assurer l'élimination des débris tissulaires. Elle débute avec l'extravasation plaquettaire qui aboutit à la formation d'un caillot de plaquettes permettant de rétablir l'hémostase. En regard du thrombus, l'activation d'un grand nombre de plaquettes assure la libération de médiateurs cellulaires qui permettent le recrutement des cellules de l'inflammation telles que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. Ces cellules jouent à la fois un rôle anti-infectieux en empêchant la prolifération bactérienne en regard de la plaie, et permettent également le nettoyage des débris tissulaires en sécrétant des enzymes telles que des collagénases et des élastases. Ces enzymes ont pour rôle de détruire les constituants de la matrice extracellulaire en vue de sa reconstruction lors de la phase de bourgeonnement. À la fin de cette phase inflammatoire, la plaie est débarrassée de tous les déchets, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène. La reconstruction peut alors commencer.

- Phase de bourgeonnement

Au cours de cette étape intermédiaire vers la cicatrisation, la zone cicatricielle est colonisée par des fibroblastes sous l'action de plusieurs facteurs de croissances cellulaires (EGF, le $TNF\alpha$, le $TGF\beta$ et le PDGF). Les cellules du tissu conjonctif migrent des berges de la plaie vers le centre en formant un réseau cellulaire ayant pour rôle de régénérer la matrice extracellulaire. Parallèlement, les facteurs endothéliaux également sécrétés par les fibroblastes, recrutent les vaisseaux alentours pour assurer la néo-angiogenèse et revasculariser le tissu en devenir. Enfin, la différenciation d'une partie des fibroblastes en myofibroblastes permet un rapprochement des berges de la plaie par contraction du tissu cicatriciel (23).

- Phase d'épithélialisation

Sous l'effet des facteurs de croissance sécrétés par le tissu en bourgeonnement, les kératinocytes vont progressivement coloniser le tissu cicatriciel en s'orientant grâce au collagène sécrété par les fibroblastes. Du bord vers le centre, la plaie se couvre d'une mono couche de kératinocytes. Ce n'est que lorsqu'elle est totalement recouverte, que les kératinocytes commencent leur différenciation et leur migration afin

de s'organiser en épithélium pavimenteux stratifié. Progressivement, les kératinocytes seront rejoints par d'autres cellules de l'épiderme, les mélanocytes, responsables de la production de mélanine, le pigment de la peau.

Une fois la plaie refermée, la matrice extracellulaire est remodelée durant plusieurs mois au cours desquels sa composition en collagène et en élastine se modifie pour donner à la cicatrice une résistance proche de celle de la peau (23).

2. *Intérêts du miel*

- Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle capital dans les propriétés cicatrisantes du miel. La réaction enzymatique qui est responsable de sa production, a lieu lorsque le miel s'enrichit en eau comme c'est le cas lorsqu'il entre en contact avec les fluides biologiques d'une plaie. La dilution du miel s'accompagne d'une augmentation du pH favorable à l'activité de l'enzyme. La libération du peroxyde d'hydrogène est alors lente (4 à 5 µg par gramme de miel) et continue, pouvant se prolonger plusieurs heures de manière régulière (24).

Son action antiseptique empêche la prolifération bactérienne et la surinfection des plaies. La libération progressive du peroxyde d'hydrogène par le miel au contact des plaies permet d'obtenir une concentration efficace pour assurer l'asepsie des tissus sans toutefois être néfaste pour les cellules œuvrant à la cicatrisation. En complément de l'action antiseptique, la neutralisation du peroxyde d'hydrogène par les catalases de l'organisme aboutit à une libération d'oxygène gazeux produisant ainsi une micro-effervescence. Ce phénomène participe à la détersion mécanique de la plaie lors de la phase vasculaire et inflammatoire. D'autre part, le peroxyde d'hydrogène exerce une action positive sur la prolifération des cellules responsables de la cicatrisation. Il stimule la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales ainsi que la néo-angiogenèse au sein du tissu cicatriciel (24).

- Pression osmotique

La forte concentration en sucre du miel lui confère une très forte pression osmotique, et cela même lorsqu'il se dilue au contact des fluides biologiques. Cette force est suffisante pour créer un flux favorisant la circulation de nutriments essentiels aux cellules intervenant dans le processus de cicatrisation. Elle favorise également la détersion de la plaie en absorbant et en attirant les résidus tissulaires. L'appel osmotique de liquide permet un apport des protéases sériques utiles à la dégradation des déchets nécrotiques. La circulation générée dans le lit de la plaie permet de limiter la macération mais également de résorber les œdèmes péri-lésionnels et la douleur qui leur est associée.

- Propriétés nutritives

Le miel joue un rôle nutritif essentiel à la prolifération et la croissance des cellules épithéliales, fibroblastiques, vasculaires et immunitaires. Il apporte une grande quantité de sucres nécessaires à la production d'énergie mais également de nombreux micro-nutriments tels que des vitamines, des sels minéraux, des acides aminés facilement assimilables par les cellules et indispensables à leur métabolisme. Ainsi la vitamine C favorise la production de collagène par les fibroblastes et participe au bon fonctionnement des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes tandis que les vitamines du groupe B, en particulier l'acide folique (B9), favorisent la multiplication et la régénération tissulaires en se rendant indispensables à la réplication de l'ADN.

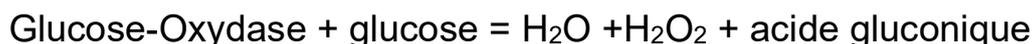
b. Propriétés antibactériennes

Le pouvoir antibactérien du miel fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années. Au fil du temps, les chercheurs ont trouvé plusieurs origines à cette activité et leurs mécanismes sont aujourd'hui partiellement compris. Parmi les principaux facteurs et composés responsables de cette activité, se trouvent des substances issues du métabolisme animal et végétal comme le peroxyde d'hydrogène, le methylglyoxal, la défensine 1. On trouve également des caractéristiques chimiques

et physiques comme le pH et l'osmolarité (24). En 2010, une étude menée par des chercheurs néerlandais a permis de préciser l'implication et l'importance de différents constituants du miel dans son activité antibactérienne. Pour cela, ils ont mesuré le pouvoir inhibiteur du miel utilisé dans la spécialité REVAMIL, sur la croissance de colonies bactériennes de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et *Escherichia coli* (25). En neutralisant les différentes composantes connues de cette activité, les chercheurs ont pu isoler le rôle de la défensine 1 ou encore du pH. Ainsi, après la neutralisation enzymatique du peroxyde d'hydrogène et du MGO, le miel a conservé une activité antibiotique sur certaines souches bactériennes alors qu'après neutralisation du peroxyde d'hydrogène, du MGO et de la défensine 1, il a perdu presque toute activité antibiotique. C'est n'est donc pas tant les différents composés du miel qui semblent importants, mais plutôt la synergie qui découle de leur mélange.

1. Le peroxyde d'hydrogène, inhibine peroxydée

Le peroxyde d'hydrogène de formule H_2O_2 , aussi appelée eau oxygénée, est une espèce chimique générée par le métabolisme des êtres vivants. C'est une molécule oxydante et chimiquement instable qui réagit fortement avec les cations métalliques. Elle est utilisée en santé pour la désinfection des plaies grâce à son fort pouvoir antiseptique et son action hémostatique. L'eau oxygénée présente dans le miel est qualifiée d'inhibine en rapport à son activité inhibitrice de la croissance des bactéries. Sa présence dans le miel est le résultat de la double origine, végétale et animale, de ce dernier. Le peroxyde d'hydrogène se forme dans le miel à partir de la dégradation des sucres par une enzyme, la glucose oxydase suivant la réaction :



Alors que les sucres proviennent du nectar des fleurs, la glucose oxydase qui est produite par les glandes hypophrygiennes de l'abeille, est sécrétée dans le miel lors du processus du trophallaxie. Le peroxyde d'hydrogène possède une activité oxydante modérée qui ne suffit pas à expliquer son action antiseptique qui découle d'une seconde réaction chimique. En présence d'ion fer Fe^{2+} , le peroxyde d'hydrogène réagit pour former des espèces réactives de l'oxygène : c'est la réaction de Fenton. Les espèces réactives de l'oxygène sont des radicaux libres capables de réagir avec de nombreuses molécules organiques issues du métabolisme des êtres vivants. Ils sont capables de dénaturer les protéines, d'oxyder les phospholipides constituant les membranes cellulaires et d'endommager l'ADN, conduisant ainsi à une inhibition de la prolifération bactérienne. La concentration en peroxyde d'hydrogène d'un miel dépend directement de l'activité enzymatique des glucoses oxydases qu'il contient. Comme toutes les protéines, les enzymes sont thermolabiles et un miel porté à trop haute température lors de son conditionnement verra son activité enzymatique fortement amputée. L'activité enzymatique est également conditionnée par la température, le pH et la teneur en eau du miel. Ainsi la libération de peroxyde par un miel sera décuplée lorsque celui-ci sera mis en contact avec les liquides biologiques qui le réchaufferont, le dilueront et diminueront son acidité. On comprend mieux dans ces conditions pourquoi le miel est réputé pour ses propriétés cicatrisantes.

Les graphiques suivants, tirés de l'étude de KWAKMAN (26) au Pays-Bas, illustre la part d'activité antibactérienne du miel liée au peroxyde d'hydrogène :

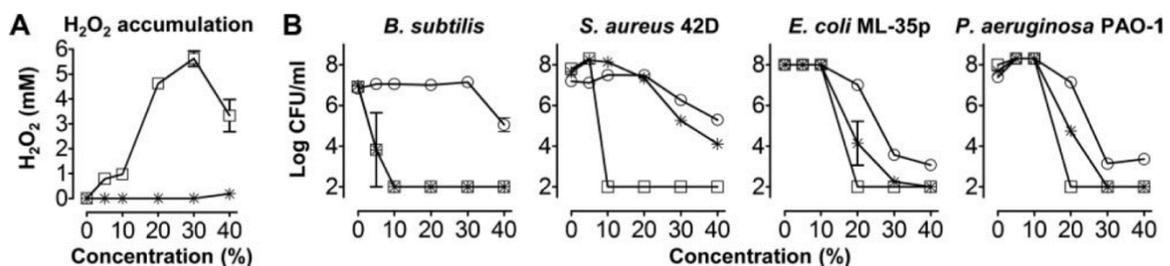


Figure 8 : Rôle du peroxyde d'hydrogène dans l'activité antibactérienne du miel (26)

Sur le graphique A est représenté la quantité de peroxyde d'hydrogène dans des échantillons de miel dilués de 40% à 10% (courbe avec les carrés). La courbe avec les astérisques représente également la quantité de peroxyde d'hydrogène dans des miels dilués mais, avec cette fois, l'adjonction d'une catalase. L'ajout de la catalase permet de neutraliser complètement l'eau oxygénée produite par la glucose oxydase. Dans un même temps, l'expérience montre que la glucose oxydase atteint son activité enzymatique maximale lorsque le miel est dilué à 30%. L'activité de l'enzyme décroît lorsque la concentration en miel est supérieure ou inférieure.

Les graphiques B comptabilisent le nombre d'UFC pour différentes espèces bactériennes en fonction de la concentration en miel. La courbe des carrés correspond au miel non dénaturé, la courbe des astérisques correspond à des miels dénaturés par des catalases et la courbe des cercles correspond à des solutions de glucose de concentrations équivalentes aux miels. Au travers de ces essais, les chercheurs mettent en évidence que l'activité antibactérienne du miel non dénaturé est très marquée, et ce dès lors que la concentration atteint les 10%. L'étude montre aussi que selon les espèces bactériennes, le peroxyde d'hydrogène peut jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la prolifération, comme c'est le cas pour de *S. aureus*, alors qu'il joue un rôle mineur dans le cas de *B. subtilis*.

2. Les inhibines non peroxydées

L'eau oxygénée n'est pas la seule substance responsable de l'activité antimicrobienne du miel. D'autres substances exercent une activité inhibitrice mais, contrairement à celle du peroxyde d'hydrogène, cette activité ne découle pas d'une production de radicaux libres. Par opposition, elles sont donc qualifiées d'inhibines non peroxydées. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de cette activité. Pour y arriver, les chercheurs ont mesuré l'activité inhibitrice d'un miel avant et après neutralisation du peroxyde d'hydrogène. Pour cela deux solutions s'offrent à eux : chauffer le miel suffisamment fort pour détruire la glucose oxydase et empêcher la formation d'eau oxygénée (27) ou bien ajouter une catalase qui va directement neutraliser le peroxyde d'hydrogène (26). Cette expérience montre qu'après

soustraction de l'effet du peroxyde, le miel conserve une action antibiotique provenant donc des autres espèces chimiques qu'il contient. Les inhibines non peroxydées, plus stables chimiquement, seraient susceptibles de conserver une meilleure activité *in vivo* que le peroxyde d'hydrogène neutralisé par les catalases endogènes et à la demi-vie plus courte. C'est notamment la raison pour laquelle un des miels les plus plébiscités en thérapeutique reste le miel de manuka, un des plus riches en composés phytochimiques.

- Le methylglyoxal :

Le methylglyoxal, abrégé MGO, est un aldéhyde cytotoxique présent dans de nombreux produits naturels en tant que produit du métabolisme. Il se forme notamment lors du catabolisme de la thréonine et de la peroxydation des lipides, mais sa principale source reste le catabolisme du glucidique avec le clivage enzymatique du glycéraldéhyde-3-phosphate :

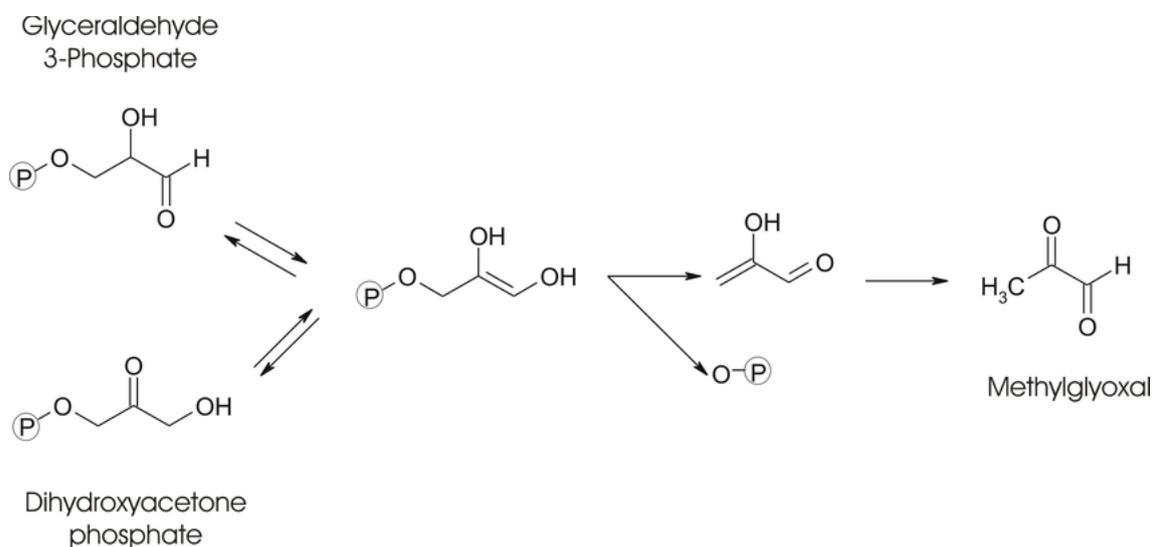


Figure 9 : Production du MGO lors de la glycolyse(28)

Ses propriétés antibactériennes ont été mises en évidence à partir du miel de manuka (*Leptospermum scoparium*), une plante de la famille des myrtacées, endémique de la Nouvelle Zélande. Le miel mono-floral de manuka contient du MGO

dans des quantités jusqu'à 80 fois supérieures aux quantités retrouvées dans nos miels européens. La possibilité dans certaines régions d'Océanie d'obtenir du miel issu quasi exclusivement du butinage de *Leptospermum scoparium*, a fait de ce miel monofloral une référence en matière d'activité antibactérienne. Si le MGO joue un rôle majeur dans cette activité, il a aussi été démontré qu'il n'était pas la seule inhibine non peroxydée du miel de manuka.

- Défensine 1

Chez l'homme, les défensines sont des peptides antibactériens à large spectre appartenant au système immunitaire inné. La défensine 1 retrouvée dans le miel appartient au système immunitaire de l'abeille. Elle est sécrétée par les glandes hyopharyngiennes lors du processus de trophallaxie. Elle est également retrouvée en quantité importante dans la gelée royale utilisée par les ouvrières pour nourrir le couvain. Grâce à son large spectre, la défensine 1 permet aux ouvrières de protéger le couvain des infections à bactéries gram positif (26).

- Métabolites secondaires

Enfin, une partie de l'activité antibactérienne du miel provient des métabolites secondaires présents dans le nectar des plantes butinées par l'abeille ouvrière. La part de cette activité revenant aux métabolites secondaires varie d'un miel à l'autre en fonction des essences florales. Ces métabolites sont nombreux et de nature chimique variée. Il s'agit le plus souvent de flavonoïdes, de terpènes ou d'alkaloïdes. Ce sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, ne faisant pas partie des fonctions métaboliques primaires que sont la reproduction, la production d'énergie ou la nutrition. Il s'agit parfois de molécules odorantes ou colorées, permettant d'attirer les insectes pollinisateurs. D'autres fois, ce sont des molécules cytotoxiques destinées à défendre la plante contre les insectes prédateurs, les infections parasitaires, bactériennes et virales. Compte tenu du fait que les métabolites secondaires varient d'une espèce de plante à l'autre, cette variabilité se retrouve également dans le miel. Or, pour faire du miel un produit de santé, il est nécessaire de standardiser sa

composition. L'étude de cette variabilité fera l'objet de la 4^{ème} partie s'intitulant « Analyses en spectrométrie de masse d'un panel de miels régionaux ».

3. L'osmolarité

La pression osmotique du miel, inhérente à sa forte concentration en sucre, est un atout de taille lorsqu'il s'agit de combattre les bactéries. Avec ses 80% de sucre, le miel est un milieu hostile à la prolifération des micro-organismes qui se déshydratent par un échange osmotique. Le phénomène est amplifié par la faible activité hydrique de l'eau qui, lorsqu'elle est dans un milieu très concentré en sucre, interagit fortement avec celui-ci. Cette eau n'est alors plus disponible pour les bactéries. La proportion d'eau libre qui reste disponible se mesure avec une unité spécifique « aw » pour *water activity*. L'activité hydrique comprise entre 0,56 et 0,62 aw est incompatible avec le développement des bactéries mais reste suffisante pour le développement de certaines levures (29).

4. Le pH

Le miel contient de nombreux acides organiques issus du nectar dont ils proviennent, ainsi que de l'acide gluconique produit par réaction enzymatique de la glucose oxydase avec le glucose. Le pH résultant est généralement compris entre 3 et 4. La plupart des bactéries a besoin d'un pH basique pour proliférer et les bactéries pathogènes pour l'homme comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Streptococcus pyogenes* se développent à partir d'un pH supérieur à 4 (24).

5. Le pouvoir antibactérien des miels européens

Le pouvoir antiseptique du miel provient donc de multiples facteurs, à la fois chimiques, physiques et pharmacologiques. Dans ces conditions, il est quasiment impossible pour les bactéries d'acquérir une résistance. Dans le contexte actuel où l'on observe chaque jour un peu plus de résistances aux antibiotiques de notre pharmacopée traditionnelle, le miel pourrait être considéré comme une alternative possible, notamment par voie locale où il conserve la majeure partie de ses propriétés.

En conséquence de l'origine multifactorielle de l'activité antibiotique, on observe également une variabilité de l'efficacité antibactérienne des miels en fonction de leur origine monoflorale, comme l'illustre l'étude menée par BOGDANOV et BLUMER (27). Les expérimentations montrent que cette variabilité se retrouve dans les miels récoltés dans nos contrées. Les chercheurs ont mesuré le pourcentage d'inhibition de plusieurs miels monofloraux sur une souche de *Staphylococcus aureus*. Il en ressort que c'est le miel de colza qui possède la plus forte activité inhibitrice, suivi de près par les miels de miellat et de lavande.

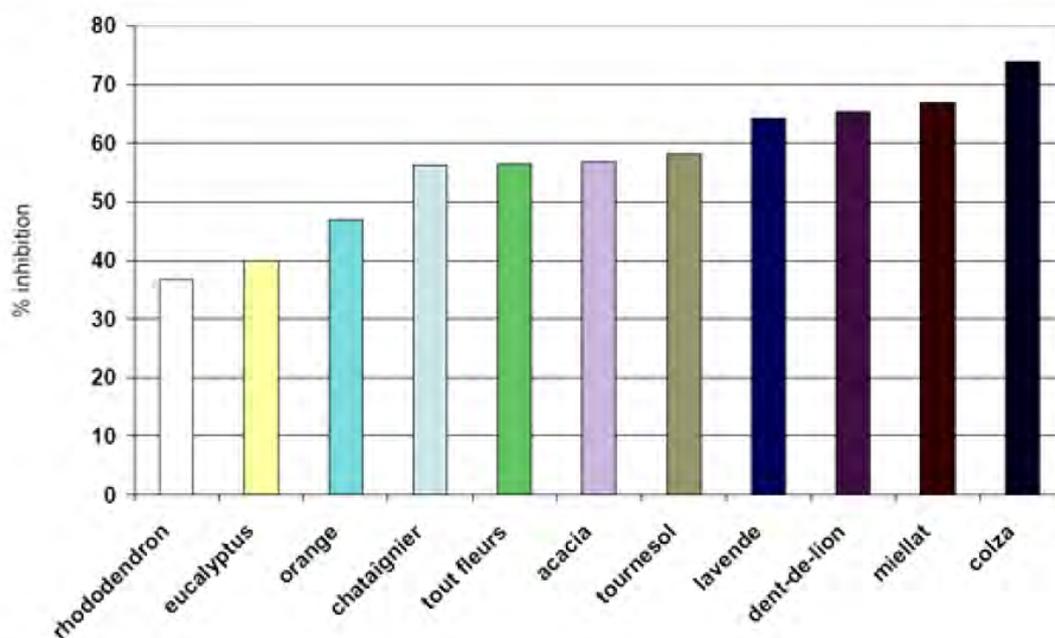


Figure 10 : Pouvoir inhibiteur des miels sur une souche de *Staphylococcus aureus* en fonction de leur origine florale (27)

c. Propriétés anti-oxydantes

1. Le pouvoir antioxydant des aliments

De nombreux aliments sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes. Ces aliments nous protégeraient des effets délétères des radicaux libres sur notre ADN. Or, le stress oxydatif, généré par notre métabolisme ou des agents exogènes, est souvent associé à un risque accru de cancer. Les molécules responsables de l'activité anti-oxydante dans les fruits et légumes, s'avèrent bien souvent être des vitamines : l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E). Mais on retrouve également parmi ces substances protectrices, les polyphénols, en particulier les flavonoïdes qui protègent les autres espèces chimiques de l'oxydation en s'oxydant à leur place. En effet, les nombreuses fonctions phénols portées par ces molécules sont autant de groupes hydroxyles susceptibles de s'oxyder en groupes carbonyles en profitant des cycles aromatiques pour partager et stabiliser la charge électronique supplémentaire acquise lors de la réaction d'oxydo-réduction. Le pouvoir antioxydant des aliments se mesure grâce à l'indice ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*). Cet indice compare le pouvoir antioxydant des aliments, en particulier les fruits et légumes, par rapport à celui d'une substance de référence le trolox (30).

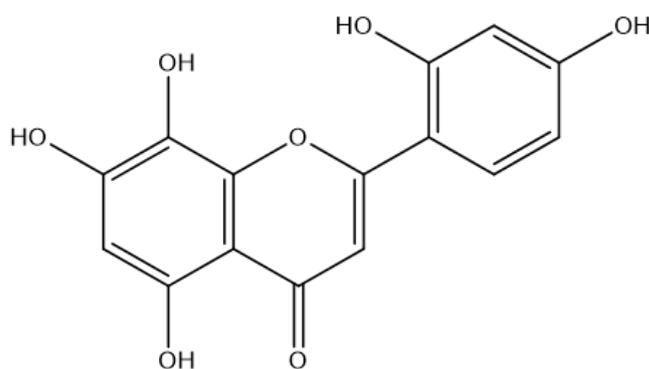


Figure 11 : Exemple d'une pentahydroxyflavone et ses 5 fonctions phénol

2. Études sur le miel

Nous l'avons vu, le miel est une substance capable de libérer du peroxyde d'hydrogène, une espèce chimique aux propriétés oxydantes. Paradoxalement, il est souvent prêté au miel des propriétés anti-oxydantes. Celles-ci ont été démontrées *in vitro* par plusieurs études, en particulier celle de GHELDOF et ANDNICKI (31) qui en plus de démontrer cette activité, va plus loin en montrant que les propriétés anti oxydantes ont un impact positif sur l'oxydation des lipoprotéines humaines *in vitro*.

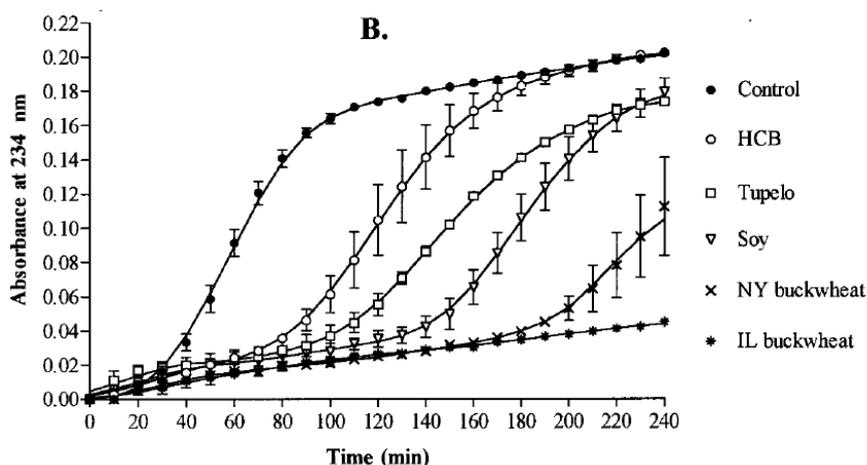


Figure 12 : Effet du miel sur l'oxydation des lipoprotéines humaines (31)

Les courbes montrent une diminution de l'oxydation des lipoprotéines de sérum humain (oxydation catalysée par le cuivre), en fonction de différents miels (soja, sarrasin). Cette étude montre aussi qu'il y a une corrélation entre la couleur du miel et les propriétés antioxydantes. Plus le miel est foncé, plus il contient de métabolites secondaires, dont les flavonoïdes, et plus son pouvoir protecteur est important. L'étude conclut sur l'intérêt pour la santé de remplacer le sucre par du miel. Toutefois il convient de signaler que cette activité antioxydante et ses hypothétiques bienfaits, en particulier sur la diminution du risque de cancer, n'ont jamais été clairement démontrés *in vivo*. Il se pourrait que les effets bénéfiques des polyphénols en termes de prévention des cancers passent par un mécanisme anti-inflammatoire.

d. Propriétés anti-inflammatoires

Si l'indice ORAC et son utilité en santé sont de plus en plus remis en cause par la communauté scientifique, il est une autre propriété du miel dont les flavonoïdes seraient responsables : l'effet anti-inflammatoire (32). Une étude très récente, publiée en 2019 par l'université de Cambridge, montre que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes s'accompagne d'une diminution significative de la concentration en protéine C réactive. Cette étude, menée sur 300 patients issus de la très grande cohorte EPIC, étudie le rôle de l'alimentation dans les pathologies cardiovasculaires et tumorales (33). L'étude met en évidence une corrélation entre la concentration de polyphénols et de flavonoïdes dans le sang, la concentration de CPR et la survenue des pathologies cardiovasculaires et cancéreuses, souvent provoquées par un état inflammatoire chronique. Cette étude est à mettre en lien avec une autre plus ancienne, de 2003. Portant sur l'expérimentation animale, cette étude montrait un effet antinéoplasique du miel chez des souris, lorsqu'il est injecté au niveau tumoral (34). Cependant, aucune étude à ce jour n'a réellement mis directement en évidence un effet du miel sur les maladies tumorales *in vivo* chez l'homme.

2. Application en santé

a. Spécialités commercialisées

1. Pansements

Dans les hôpitaux de plusieurs villes de France, des protocoles post-opératoires faisant appel au miel pour accélérer la cicatrisation sont mis en place depuis quelques années. C'est le cas notamment à l'hôpital de Limoges, précurseur en la matière, qui utilise depuis plusieurs années le miel de thym. À Toulouse, à l'hôpital Larrey dans le service des maladies respiratoires, le miel est utilisé en pansement pour traiter les escarres de patients alités à cause de maladies respiratoires chroniques. Si les CHU peuvent se permettre de faire des appels d'offres directs à des apiculteurs pour leur approvisionnement en miels nécessaires à ces soins, les officines qui souhaitent

proposer des dispositifs médicaux à base de miel, doivent passer par des spécialités commerciales. Voici quelques-unes de ces spécialités présentes sur le marché et disponibles dans nos pharmacies :

- Revamil, Pansamiel, Médi honey ®

Plusieurs laboratoires sont positionnés sur le marché des pansements au miel. Pour ne citer que les plus connus en France : Revamil Pansamiel Médi honey. Leur gamme s'articule autour de plusieurs produits enregistrés en tant que dispositifs médicaux de classe IIb par l'ANSM, avec un risque à l'utilisation qualifié d'élevé. Les laboratoires assurent avoir mis au point un processus de fabrication permettant d'obtenir des miels stériles et exempts de polluants tels que les pesticides ou les métaux lourds. Melibiotech, qui distribue la gamme Revamil, assure même une excellente reproductibilité de l'activité antibactérienne d'un lot à l'autre de son miel. Pour y parvenir, le miel est produit sous serre. Ce procédé permet de contrôler les colonies productrices et d'assurer une diversité florale identique d'une récolte à l'autre. Contrairement au miel de manuka qui possède un fort taux de MGO, le miel des produits Revamil en contient assez peu. Le laboratoire défend son produit en avançant qu'une haute concentration de MGO n'est pas un élément obligatoire à l'activité antibactérienne et cicatrisante de son miel. Il va même plus loin en affirmant qu'une trop forte concentration de ce composé est contreproductif car cytotoxique. Toujours selon le laboratoire, c'est l'activité de la glucose oxydase et la teneur en flavonoïde qui garantissent les qualités de son miel (35).

À l'inverse, Médi honey utilise du miel de manuka produit en Nouvelle-Zélande, réputé pour son pouvoir bactérien élevé (36). L'arbuste produisant le nectar utilisé pour l'élaboration du miel de manuka n'est autre que *Leptospermum scoparium*, aussi connu sous le nom d'arbre à thé. Pour autant, dans un compte rendu, la Haute Autorité de Santé estime que les pansements au miel de Médi honey n'apportent pas d'amélioration du service médical face aux pansements à base d'hydrogel.

Contrairement aux spécialités précédentes, le Pansamiel est un produit cosmétique élaboré à partir de miel de thym pur par le laboratoire Ballot-Flurin dans les Hautes-Pyrénées. Malgré son statut de cosmétique, il est utilisé en post opératoire dans certains établissements de santé pour favoriser la cicatrisation.

- Formes et utilisation

Dans les indications de ces pansements, on trouve les lésions cutanées ponctuelles telles que les brûlures, les crevasses et les engelures causées par le froid, les cicatrices post-chirurgicales. On trouve également dans les indications de ces pansements des lésions chroniques :

- Les ulcères veineux, liés à une insuffisance veineuse avancée responsable d'une nécrose des vaisseaux et des tissus voisins.
- Les escarres chez les patients, souvent âgés, alités pendant de longues périodes, chez qui la compression des tissus mous au niveau des points de contact avec l'assise ou le matelas est responsable d'une perte de l'irrigation et d'une nécrose.
- Le mal perforant plantaire, une pathologie fréquente chez les diabétiques, liée à la perte de sensibilité après des années de glycémie trop élevée et pouvant conduire dans le pire des cas à une amputation (37).

La gamme Médi honey est la plus fournie et élaborée. Elle comprend diverses formes telles que des gels, des crèmes, des tulles, des pansements hydrogels enrichis en miel, ainsi que des pansements alginates. Le laboratoire entend ainsi pallier toutes les situations. Les gels sont proposés pour la phase précoce de détersion alors que les hydrogels sont plus adaptés à des plaies en cours d'épidermisation et les alginates aux plaies exsudatives. La gamme Révamil, plus courte, propose son miel en gel, en baume, et en tulle, cette dernière forme étant plus adaptée aux brûlures, y compris les brûlures radio-induites.

2. Voie per os

Les spécialités *per os* à base de miel sont très nombreuses en pharmacie et de nombreux acteurs sont présents sur le marché, profitant du regain d'intérêt du grand public pour les médecines naturelles et alternatives. Les indications du miel par voie orale sont cependant limitées :

- Affection ORL, traitement de la toux et de la rhinopharyngite

La rhinopharyngite, plus simplement appelée rhume, est une pathologie associée aux saisons froides. C'est une infection virale bénigne des muqueuses qui tapissent les cavités nasales et le pharynx. Elle est causée par des virus de la famille des adénovirus et des coronavirus et se caractérise par des écoulements clairs et abondants, une inflammation des muqueuses de l'oropharynx associée à un œdème responsable des maux de gorge et du nez bouché. D'autres symptômes tels que la toux, la fièvre, les maux de tête et les douleurs aux oreilles sont fréquemment observés. C'est une pathologie bénigne retrouvée chez l'adulte et l'enfant au cours des mois d'hiver. Les symptômes sont spontanément résolutifs en 4 à 5 jours. Le traitement est essentiellement symptomatique. Il ne raccourcit pas la durée des symptômes mais contribue à améliorer le confort du patient pendant l'infection. Il repose sur l'utilisation de solution physiologique pour décongestionner les fosses nasales, des mucolytiques pour fluidifier les écoulements, des antitussifs et des antipyrétiques si nécessaire. Ce n'est que rarement que la rhinopharyngite peut se compliquer en otite, sinusite ou encore bronchite.

Parmi l'arsenal de médicaments OTC à disposition du pharmacien, on trouve de nombreuses spécialités à base de miel. Elles se déclinent sous forme de pastilles à sucer, de gommes et de sirops. Le miel y est utilisé pour ses propriétés adoucissantes et antitussives qui permettent de calmer les maux de gorge, les toux irritatives lors des rhinites saisonnières. L'effet antiseptique peut s'avérer utile pour prévenir de la surinfection bactérienne sur des muqueuses fragilisées par l'infection virale. Les propriétés anti-inflammatoires pourraient être bénéfiques pour soulager l'inflammation

des voies aériennes et l'œdème de la gorge retrouvés au cours de ces infections. L'utilisation du miel a été plus particulièrement étudiée chez l'enfant pour qui il existe assez peu de médicaments dédiés au traitement des symptômes de la rhinopharyngite. Une de ces études montre une supériorité du miel par rapport au dextrométorphan (38) (analogue opiacé) et à la diphényldramine (anti-histaminique H1 de la même famille de l'oxoméazine) (39) dans la prise en charge de la toux chez l'enfant. Le miel s'avère d'autant plus intéressant à utiliser qu'il ne présente aucun effet indésirable *a contrario* des antitussifs opiacés et antihistaminiques qui sont sources de somnolence et peuvent présenter des effets anticholinergiques par manque de sélectivité des récepteurs histaminiques. De plus, certains miels ont montré une activité antivirale contre les Influenza virus, responsables de la grippe. Néanmoins, les études réalisées n'ont pas permis d'élucider les mécanismes de cette activité (40).

3. Restrictions d'utilisation

L'utilisation du miel de qualité médicale ne présente aucune contre-indication hormis de possibles allergies à l'un de ses constituants. Il peut donc être utilisé sans crainte chez la femme enceinte ou chez l'enfant. Chez les diabétiques, on évitera son utilisation par voie orale en trop grande quantité pour des raisons évidentes de contrôle de la glycémie. En revanche, la voie topique ne permet pas un passage suffisant du sucre dans le sang pour présenter une contre-indication chez ces patients.

b. Qualité médicale

Pour garantir l'innocuité et la qualité du miel utilisé en thérapeutique, l'Association européenne d'apithérapie a rédigé une charte posant les bases requises de sa récolte et de sa conservation. Elle précise les conditions requises à l'environnement des ruchers, les traitements qu'il est possible d'administrer aux colonies, les conditions d'hygiène à respecter de la récolte à la mise en pot, les normes bactériologiques et la teneur en résidus exogènes. Elle permet de s'assurer d'une part que le miel aura les qualités thérapeutiques requises, et d'autre part qu'il sera sans danger pour le patient. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, un miel mal conservé, chauffé à trop

haute température ou contenant une trop grande quantité d'eau, perdra ses propriétés ou ne se conservera pas dans de bonnes conditions. Outre sa qualité, c'est aussi son innocuité qui est contrôlée. Tout d'abord, la charte précise le nombre d'UFC par gramme de miel à ne pas dépasser, le but étant de limiter le risque d'une contamination par *Clostridium botulinum* et le danger associé à l'intoxication par la toxine botulique. Enfin, le contrôle des résidus exogènes ne doit montrer aucune trace de résidu de quelque nature que ce soit dans le cas du miel thérapeutique alors que la limite est fixée à 3mg/kg pour le miel alimentaire. Ces exigences permettent de garantir l'absence de contamination par des métaux lourds ou des produits phytosanitaires.

III. Caractérisation, identification et outils d'analyse des miels

1. Pourquoi analyser le miel

Le miel est un produit issu à la fois du règne végétal et du règne animal. Sa composition varie en fonction de très nombreux facteurs : l'environnement floral autour de la ruche mais aussi les dates et les conditions de récoltes. En effet, pour un même environnement, il sera possible d'obtenir des miels monofloraux plus ou moins purs selon le calendrier de récolte. Selon les années et régions, les périodes de floraison des différentes essences sont susceptibles de varier. L'expérience des apiculteurs joue un rôle crucial dans la qualité de ces récoltes. De façon empirique, la couleur, le goût et la texture d'un miel permettent à un apiculteur de déterminer l'origine florale de sa récolte.

La méthode empirique n'est cependant pas suffisante lorsqu'il s'agit de contrôler la conformité d'un miel. Le *Codex Alimentarius* définit dans sa norme CXS 12-1981 (41) ce que doit contenir *a minima* un miel en vue de sa commercialisation pour l'alimentation humaine. C'est un document harmonisé par l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) et la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation). Il stipule qu'un miel ne doit pas contenir plus de 20% d'eau (exception faite du miel de bruyère callune qui peut en contenir jusqu'à 23%). La teneur cumulée en glucose et en fructose ne doit pas excéder les 60%. Selon les origines florales, la teneur en saccharose ne pourra pas dépasser les 15%. Aucun additif alimentaire ne doit être retrouvé dans le produit. De plus, les concentrations en métaux lourds ne doivent pas dépasser les limites qui présentent un risque pour la santé humaine. Les concentrations limites en résidus de pesticides et médicaments vétérinaires sont également fixées par le *Codex Alimentarius*. À la manière de la pharmacopée européenne, le texte prévoit également des méthodes d'analyse permettant de contrôler la qualité attendue. Parmi ces méthodes, on retrouve la réfractométrie, la

chromatographie liquide haute performance, la pH-métrie ainsi que la conductivité électrique.

Outre l'origine florale et la contamination, ce sont aussi les fraudes qui sont recherchées lorsque l'on analyse le miel. On distingue deux types de falsifications : les fraudes sur la qualité du miel et les fraudes sur l'étiquetage du miel. Dans les fraudes sur la qualité, on observe des pratiques d'adultération qui consistent à rajouter de façon délibérée des substances étrangères après la récolte, la plus courante étant le sirop de glucose.

Il existe à ce jour plusieurs outils et méthodes permettant de mesurer, quantifier et analyser les différents facteurs de variabilité d'un miel. Ces méthodes se basent sur les caractéristiques organoleptiques du miel : indice de réfraction, pH, activité enzymatique, spectrophotométrie. Plus récemment, des méthodes plus complexes comme la résonance magnétique ou la spectrométrie de masse ont fait leur apparition et permettent d'approfondir l'analyse et la compréhension de la composition du miel.

2. Caractéristiques organoleptiques des différents miels de l'échantillon



Figure 13 : A colza, B romarin, C tournesol, D châtaigner, E rhododendron, F lavande, G acacia

a. Le miel d'acacia

D'aspect limpide, sa couleur jaune tire sur le vert clair. Il conserve sa texture liquide plus longtemps que les autres miels, même s'il finit par cristalliser lorsqu'il reste stocké plusieurs années. On lui décrit un goût suave et des arômes vanillés ; son parfum rappelle fortement l'odeur de la fleur d'acacia. Il n'est ni acide ni amer. Sa récolte a lieu de mai à juin, selon la situation géographique (42).

b. Le miel de tournesol

Très présent dans le sud-ouest de la France, il représente avec le colza la plus importante production de miel du pays. Le tournesol fleurissant en fin d'été, la récolte a lieu au cours des mois d'août et septembre. De couleur jaune vif, c'est un miel qui cristallise rapidement. Ses arômes sont doux et peu prononcés (43,44).

c. Le miel de colza

De couleur blanc paille, très clair, sa texture est légèrement granuleuse. Il peut présenter une légère odeur de chou due à son appartenance à la famille des brassicacées. Son goût très sucré est doux, sans acidité ni amertume. Le colza fleurit de façon soudaine et intense durant les mois d'avril et mai, ce qui en fait une des premières récoltes de l'année. C'est un miel qui cristallise très vite, les apiculteurs doivent en tenir compte sous peine de voir la récolte se figer dans les cadres (45).

d. Miel de châtaigner

Très récolté dans les Cévennes, en Corse mais également dans les Pyrénées, c'est un miel qui peut rester liquide de nombreux mois. Sa cristallisation, lorsqu'elle survient, s'avère grossière. De couleur ambre foncé, du fait de sa forte concentration en composés phytochimiques, il est caractérisé par une odeur forte et suave et un goût amer (46,47).

e. Miel de lavande

Principalement récolté en région Provence Alpes Côte d'azur, on le trouve également dans l'Ardèche et le Gard. La lavande fleurit des mois de juin à août et la récolte du miel intervient principalement fin juillet. De couleur jaune doré, c'est un miel qui cristallise lentement.

f. Miel de romarin

En France, on trouve du romarin en quantité suffisante pour produire du miel, essentiellement dans la région Languedoc-Roussillon. Sa floraison, qui commence en hiver et s'intensifie au printemps, rend la récolte du miel très difficile. Plus la floraison sera intense et peu étalée dans le temps et meilleure sera la récolte. C'est un miel très liquide, cristallisant rapidement en grain fin, de couleur claire tirant sur le jaune. Son

arôme discret peut être qualifié de faiblement balsamique (48).

g. Miel de rhododendron

En France on trouve le rhododendron principalement dans les Alpes et les Pyrénées, entre 1000 et 1800 mètres d'altitude. Il fleurit de fin juin à fin juillet. La récolte intervient alors entre juillet et août, elle est fortement influencée par les conditions climatiques des mois d'été. De couleur très claire lorsqu'il est liquide, il devient presque blanc en se solidifiant. Sa cristallisation très fine intervient très lentement. Son arôme léger est qualifié de boisé, il peut rappeler celui du romarin (49).

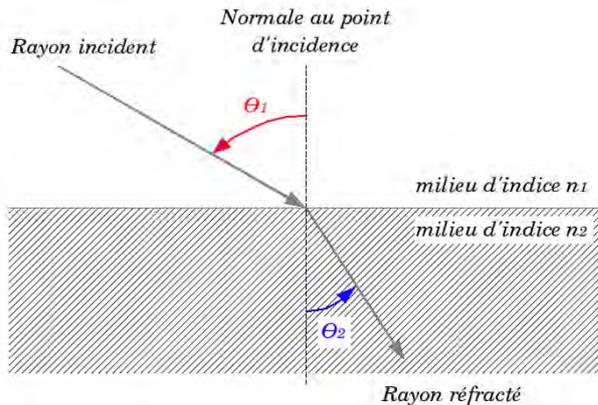
3. Principales méthodes d'analyse qualitative du miel

a. Le taux d'humidité

Le taux d'humidité constitue la mesure la plus fréquemment réalisée sur le miel. Il s'agit d'un critère primordial pour sa mise sur le marché puisque sa bonne conservation va dépendre de sa teneur en eau. À l'inverse, un miel trop sec n'est pas forcément souhaité puisqu'il cristallisera plus vite et sera plus difficile à extraire des cadres par l'apiculteur. Idéalement située entre 16 et 18%, cette teneur peut, selon les directives européennes (CEE 2001/110) atteindre un maximum de 20%.

En pratique la mesure de l'humidité du miel est obtenue par réfractométrie. La vitesse de la lumière varie d'un milieu à l'autre. Ainsi dans un milieu homogène comme le miel, la vitesse de la lumière pourra varier en fonction de la concentration en eau. Grâce à la loi de Snell Descartes décrivant le phénomène de réfraction, il est possible de mesurer la vitesse de propagation de la lumière dans un miel en mesurant l'angle

de réfraction observable à l'interface d'un miel et d'un autre milieu homogène. (50)



$$n_1 \cdot \sin(\theta_1) = n_2 \cdot \sin(\theta_2)$$

Figure 14 : Loi de Snell Descartes (50)

Cette mesure s'obtient à l'aide d'un réfractomètre (51). L'appareil est conçu et étalonné de manière à donner le résultat directement en pourcentage d'eau. Il existe plusieurs variantes, des modèles disposant soit d'une lecture optique soit d'une lecture digitale. La précision de ces outils de mesure peut sensiblement varier suivant leur coût. Compte tenu que l'indice de réfraction dépend de la température, la lecture doit se faire à 20°C. Du fait de son hygroscopie, le miel a tendance à absorber l'eau contenue dans l'air. Sa récolte et son extraction doivent être réalisées autant que possible dans des locaux relativement secs. Lorsque l'humidité du miel dépasse les valeurs recommandées, les apiculteurs peuvent avoir recours à des déshumidificateurs afin de ramener ce taux dans les limites des directives européennes.



Figure 15 : Réfractomètre à lecture optique (50)

b. Le pH et l'acidité libre

L'acidité d'un miel dépend essentiellement de ses conditions de conservation et de son origine botanique. Une trop forte acidité indique souvent une dégradation biochimique de ses composants due à de mauvaises conditions de conservation et une possible fermentation. Par ailleurs, le pH varie selon l'origine botanique du miel, s'il est généralement compris entre 3.5 et 4.5 pour les miels de nectar, il est généralement supérieur à 4,5 pour les miels de miellats (22). Exceptionnellement, certaines essences florales peuvent donner des miels au pH proche de 7 (la bourdaine, le jujubier ou encore le châtaigner). Le potentiel hydrogène qui correspond au logarithme de la concentration en ion H^+ se mesure avec un pH-mètre dont l'électrode de référence est au calomel. La mesure au papier pH, moins précise, mais plus facile à mettre en œuvre, est également possible.

Le *Codex Alimentarius* ne précise aucune norme de pH. Pour contrôler la conformité d'un miel, on mesure son acidité libre. Elle est exprimée en milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à neutraliser l'acidité d'un kg de miel. Elle ne doit pas dépasser 50 milléquivalents d'acide par 1000g. La mesure se déroule en deux temps, une première titration du miel par l'hydroxyde de potassium, puis une titration de l'hydroxyde de potassium par une solution d'acide chlorhydrique. L'acidité libre présente l'avantage de tenir compte de nombreux acides organiques faibles qui composent le miel à commencer par l'acide gluconique (41).

c. La conductivité électrique

La conductivité électrique d'un miel est une mesure indirecte de sa teneur en ions minéraux. Elle est exprimée en siemens par centimètre. Les valeurs légales varient en fonction de l'origine des miels. C'est un critère important qui permet de différencier les miels de nectar et de miellat. Lorsqu'ils proviennent du nectar, leur conductivité électrique ne doit pas excéder 800uS/cm. À l'inverse, les miels de miellat et certains miels fortement minéralisés comme celui de châtaigner doivent avoir une conductivité électrique supérieure à 800uS/cm. La mesure s'effectue sur du miel en solution à l'aide

d'un conductimètre (52).

d. La concentration en hydroxy-méthyl furfural (HMF)

L'HMF est un produit de dégradation des sucres, en particulier de la déshydratation du fructose. Il n'est pas spécifique au miel. On le retrouve dans tous les produits agroalimentaires issus d'une transformation des sucres. L'HMF est issu de la réaction de Maillard (53). Sa concentration est proportionnelle au temps et à la température de stockage du miel. C'est un indicateur de « fraîcheur » du miel. La mesure de sa concentration se fait par chromatographie liquide haute performance puis détection par un détecteur UV. Sa concentration ne doit pas dépasser 40 mg/kg.

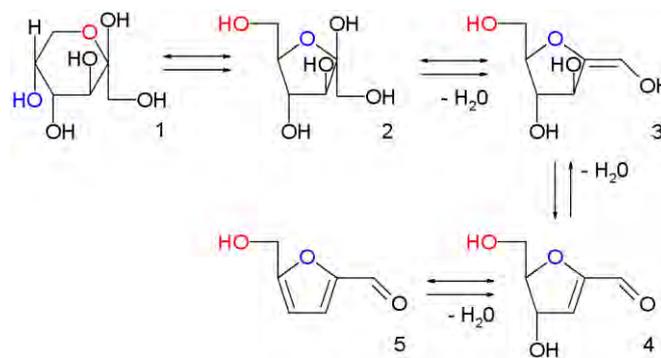


Figure 16 : Déshydratation du glucose en hydroxy-méthyl furfural (53)

e. Activité diastasique

On regroupe sous le terme de « diastases » les enzymes capables de catalyser l'hydrolyse des oligosaccharides. Elles transforment notamment l'amidon en maltose. Dans le miel, on retrouve essentiellement des alpha et beta amylases, des glucoses oxydases et des glucose invertases. Ces enzymes proviennent pour la majorité de la salive des abeilles et sont produites par leurs glandes buccales et digestives. Les miels de miellat ont une activité diastasique plus importante que les miels de nectar car on y trouve des enzymes supplémentaires issues des pucerons. La mesure de cette activité se fait par mesure de la densité optique à 620 nm en spectrophotométrie, c'est la méthode dite de Phadebas.

f. L'analyse pollinique

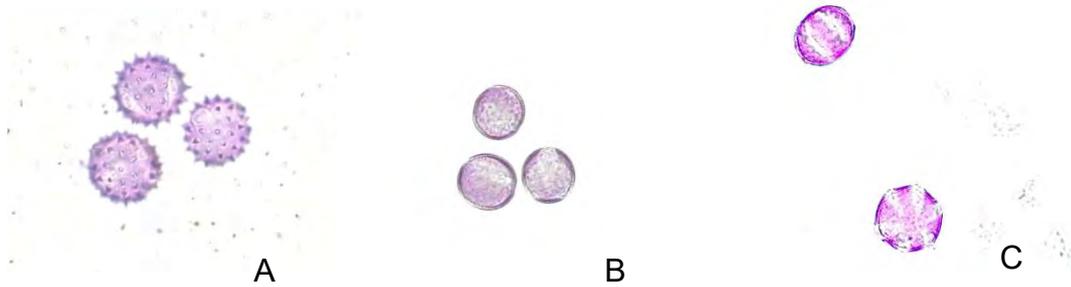


Figure 17 : A pollen de tournesol, B pollen de colza, C pollen de romarin (M. GIRARD)

La méliissopalynologie désigne l'étude pollinique du miel. Contre toute attente, l'identification des pollens dans un miel ne constitue pas une analyse de la composition florale et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les miels de miellat ne contiennent généralement pas le pollen des espèces dont ils sont issus. Ensuite, certaines espèces comme le lavandin ou la luzerne, ont des nectars très pauvres en pollen qui ne permettent pas d'utiliser la méthode pour l'identification. Enfin, pour d'autres espèces, le nectar est parfois issu de nectaires extra floraux et ne contient donc pas de pollen. À l'inverse, pour certaines espèces, comme le châtaigner par exemple, le nectar est très riche en pollen qui se retrouve dans le miel (54).

Si la méthode échoue à donner une analyse florale du miel, elle n'en reste pas moins très utilisée en pratique. Le CETAM (centre d'études techniques apicole) reconnaît que la méthode reste déterminante pour une majorité des appellations monoflorales. Elle peut également donner des informations sur l'origine géographique d'un miel, sur d'éventuelles mauvaises pratiques apicoles ainsi que d'éventuelles fraudes.

L'identification des grains de pollen récupérés dans le miel par centrifugation se fait sous microscope optique. Elle donne lieu à des diagrammes polliniques dont l'interprétation reste difficile et ne permet pas de donner de façon certaine la composition florale d'un miel.

4. Spectrométrie de masse principe et intérêt

Les exigences de l'industrie du médicament semblent à première vue peu compatibles avec l'utilisation du miel en thérapeutique. La production d'un médicament par les industriels pharmaceutiques est rigoureusement encadrée par les bonnes pratiques de fabrication (BPF) définies par l'OMS. Les BPF sont une des bases de l'assurance qualité et garantissent que les produits pharmaceutiques soient fabriqués de manière contrôlée et standardisée selon des normes de qualité adaptées. Si on peut exiger d'un médicament de connaître sa composition exacte, la provenance des matières premières, la normalisation de sa fabrication, la reproductibilité de ses lots, ce n'est pas le cas du miel. En effet, si les miels, utilisés à des fins thérapeutiques en France, répondent à la charte de qualité rédigée par l'Association européenne d'apithérapie qui garantit en théorie sa sécurité d'emploi, il n'en reste pas moins une substance naturelle produite par des animaux dans un environnement sujet à variabilité.

Dans le cadre de cette thèse, en lien avec le laboratoire de faculté de biologie de Toulouse, nous avons cherché à élaborer une technique d'analyse qualitative du miel. Pour cela, nous avons comparé la composition chimique de différents miels monofloraux avec le chémotype de différentes espèces florales présentes dans le sud de la France. La spectrométrie de masse présente de nombreux avantages parmi lesquels une très grande sensibilité permettant une détection de molécules présentes même en très faible quantité. D'autre part, dans le cadre de cette étude, nous disposons d'une banque de données conséquente recensant les différentes molécules découvertes et identifiées en spectrométrie de masse dans un grand nombre d'espèces végétales.

a. Rappel sur la spectrométrie de masse

L'identification des composés du miel par spectrométrie de masse fait appel à deux méthodes de chimie analytique : la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les composés recherchés sont avant tout les composés acides facilement détectables par cette méthode.

1. *Chromatographie en phase liquide haute performance*

L'HPLC est une technique de séparation moléculaire en vue d'une détection. Le mélange à analyser est injecté dans une colonne, c'est la phase stationnaire. Les propriétés chimiques et physiques de la phase stationnaire permettent d'éluer les différentes espèces chimiques de l'échantillon en fonction de leurs propriétés physico/chimiques. Pour nos analyses, nous avons utilisé une phase stationnaire inverse greffée 18 carbones. Sous l'effet du flux de solvant, les différentes espèces moléculaires traversent la colonne plus ou moins rapidement et sortent dans un intervalle de temps allant de quelques secondes à 15 min après l'injection permettant la séparation nécessaire à la détection. Le système se compose d'un injecteur, d'une pompe, d'une colonne thermostatée.

2. *Spectrométrie de masse*

À la suite de la chromatographie et à leur passage dans le détecteur UV, les molécules éluées passent dans un spectromètre de masse dans le but d'être identifiées. La méthode repose sur la mesure de la masse atomique exacte. L'échantillon introduit sous forme liquide est ionisé positivement ou négativement. Les molécules ainsi chargées traversent un champ magnétique. La vitesse nécessaire à la traversée de ce champ est proportionnelle à leur masse et à leur charge nette, permettant alors d'obtenir un rapport m/z . Les molécules de l'échantillon sont fragmentées et sont de nouveau analysées en spectrométrie de masse permettant l'obtention du rapport m/z des fragments produits. Les formules brutes ainsi que les

formules développées sont extrapolées à partir des rapports m/z des molécules entières et fractionnées. L'identification finale n'est possible qu'à la condition de connaître *a priori* la signature spectrale de la molécule recherchée. Pour cela, nous

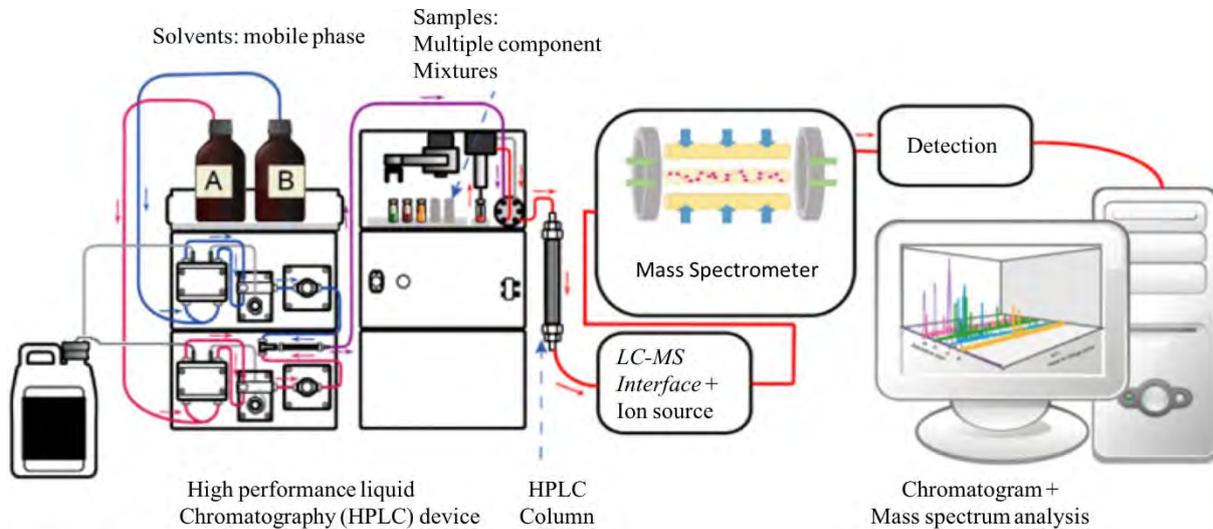


Figure 18 : Organisation générale d'un spectre de masse couplé à une chromatographie liquide (55)

nous nous sommes appuyés sur une banque de données. Le schéma ci-après illustre l'organisation générale du spectromètre de masse et de la chromatographie liquide utilisés pour ces travaux (55).

b. Molécules d'intérêts

1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires désignent l'ensemble des molécules participant à la croissance, au développement et à la reproduction des plantes. Ils sont présents dans les grandes voies biochimiques responsables de la production d'énergie et des métabolites secondaires. Les acides aminés, les sucres et les lipides font partie des métabolites primaires. Ils sont communs à toutes les espèces de plantes ainsi qu'aux autres règnes du vivant.

2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires regroupent l'ensemble des molécules produites par les plantes n'appartenant pas à leur métabolisme primaire. Ils ne jouent pas de rôle dans la croissance et la nutrition des plantes mais peuvent jouer un rôle dans la lutte contre les prédateurs et les maladies, ainsi que dans les phénomènes d'attraction des insectes pollinisateurs et la communication entre plantes. Ces métabolites secondaires intéressent particulièrement la médecine puisque nombre d'entre eux sont à l'origine de médicaments, soit par extraction, soit par hémisynthèse. Pour n'en citer que quelques-uns et parmi les plus célèbres, on pourra nommer : d'une part, la morphine extraite du pavot et tous ses dérivés à usage antalgique, et d'autre part, la quinine isolée à partir du quinquina en 1820 par Pelletier et Caventou et largement utilisée en tant qu'antipaludéen après sa découverte. Si aujourd'hui elle n'est plus utilisée dans cette indication, ce sont ses dérivés synthétiques qui l'ont remplacée. Il n'en demeure pas moins que c'est le métabolite secondaire issu du quinquina qui a permis de trouver les traitements actuels. Plus récemment, on peut citer le paclitaxel, métabolite secondaire de l'if, produit par l'association symbiotique de la plante d'un champignon endophyte. Aujourd'hui, le paclitaxel et ses dérivés issus de l'if s'utilisent en oncologie dans le traitement de certaines tumeurs et en cardiologie dans l'élaboration de stents actifs.

On distingue trois grandes familles parmi les métabolites secondaires dans les miels :

- Les terpénoïdes : issus d'une structure de base, l'isoprène, les terpènes servent principalement des fonctions de développement et de défense contre les prédateurs, qu'ils soient insectes ou herbivores supérieurs.
- Les alcaloïdes : nommés ainsi en raison de leur caractère basique, les alcaloïdes sont des molécules azotées ayant majoritairement un rôle de défense. Parmi les trois familles de métabolites secondaires, c'est la plus pourvoyeuse de médicaments.
- Enfin les flavonoïdes qui seront abordés plus en détail dans la partie suivante : ce sont des molécules pigmentaires servant à attirer les insectes pollinisateurs

vers les fleurs.

3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules pigmentaires servant à attirer les insectes pollinisateurs. Ils sont responsables de la couleur des fleurs mais aussi des fruits. Leur palette de couleurs s'étend du jaune au bleu en passant par le rouge et l'orange. Ils jouent également un rôle dans la défense de la plante contre les organismes pathogènes que sont les virus, les bactéries, les champignons et levures responsables de la moisissure et du pourrissement. Leur structure cyclique et leur capacité d'absorption dans la partie UV du spectre électromagnétique participent à protéger la plante contre les rayons ultraviolets.

Les flavonoïdes font l'objet de nombreuses allégations de santé qui sont encadrées depuis 2012 par les autorités européennes de santé. À ce jour, aucune étude sérieuse n'a pu démontrer les effets bénéfiques des flavonoïdes *in vivo*. Ainsi, malgré leurs propriétés anti oxydantes démontrées *in vitro*, les flavonoïdes ne peuvent pas prétendre à protéger les organes et les cellules des effets oxydants des espèces réactives de l'oxygène, ni à protéger la peau des effets délétères du vieillissement (notamment induit par le stress oxydatif).

Les flavonoïdes sont particulièrement présents dans le miel. Ils font partie des inhibines non peroxydées et participent à ce titre à une part non négligeable de ses propriétés antibactériennes. D'un point de vue structural, ils partagent une base commune formée par deux cycles aromatiques reliés par trois atomes de carbone : le 2-phénylchromane. Selon leur sous-famille, les flavonoïdes possèdent deux à cinq groupements hydroxyles. Dans le règne végétal, ils sont fréquemment associés à des hétérosides en position 4', 6 ou 7.

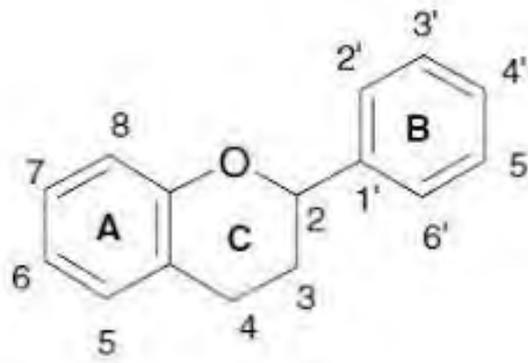


Figure 19 : 2-phénylchromane

Les flavonoïdes étant issus des plantes butinées par les abeilles, il est probable que l'analyse des miels montre des profils de flavonoïdes différents en fonction des essences étudiées. De plus, le miel étant une transformation du nectar par l'abeille, il est également possible que les flavonoïdes et les métabolites secondaires subissent une dénaturation au cours du processus d'élaboration du miel. Le protocole d'extraction a donc été pensé en priorité pour isoler les métabolites secondaires du reste des composés et ainsi étudier leur composition en fonction des essences florales.

IV. Analyses en spectrométrie de masse d'un panel de miel régionaux

1. Matériel et méthode

a. Constitution des échantillons

Les miels ayant servi à cette étude proviennent pour l'essentiel de ruchers situés dans le sud de la France : les Hautes-Pyrénées, l'Ariège, la Haute-Garonne, l'Ardèche ainsi que d'Espagne. Ils ont été récupérés pour la plupart à titre gracieux auprès d'apiculteurs indépendants ainsi qu'auprès d'Emmanuelle Marolda, apicultrice en charge du rucher de la faculté de Toulouse jusqu'en 2019. Certains miels de colza et d'acacia proviennent de la ruche familiale. Le miel étant un produit agro-alimentaire susceptible de faire l'objet de fraudes et de falsifications, le choix des apiculteurs et des échantillons a permis de garantir l'origine du miel. Leur origine florale était connue par les apiculteurs de façon empirique grâce à leurs caractéristiques organoleptiques et l'environnement des ruches. Ces différents miels proviennent de récoltes des années 2018 et 2019 afin de garantir une relative fraîcheur. Le tableau des échantillons est disponible en annexe.

b. Extraction des flavonoïdes et séparation des sucres

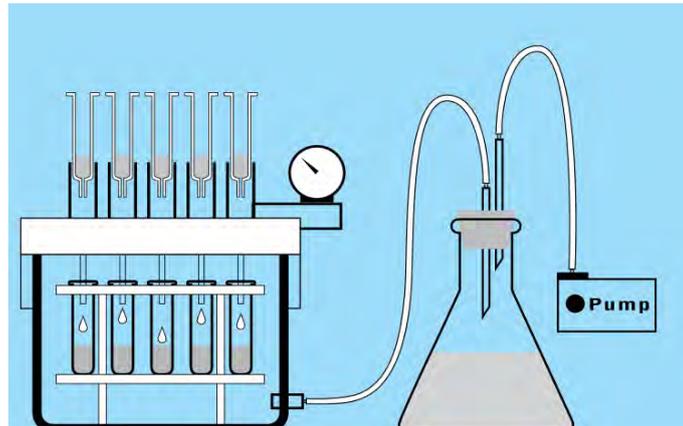


Figure 20 : Extraction sur colonne SPE (55)

Le miel étant composé à 80 % de sucre et à presque 20% d'eau, il a d'abord été nécessaire de séparer le sucre du reste de ses composants. Deux méthodes différentes ont été envisagées. La première consistait en une extraction liquide par un mélange méthanol eau. Néanmoins, cette dernière s'étant révélée insuffisante à éliminer les sucres des échantillons, nous avons retenu la deuxième méthode, à savoir, la méthode d'extraction en phase solide (SPE). Les composants à récupérer pour l'identification étant majoritairement des flavonoïdes apolaires, ce sont des colonnes de séparation en phase inverse (Strata XL 200mg/6ml) qui ont été utilisées. Les caractéristiques de ces colonnes ainsi que le mode d'emploi sont disponibles en annexes.

1. Préparation des échantillons

Selon les variétés, le miel peut se présenter sous forme liquide visqueuse, voire solide cristallisée. Par conséquent, il doit être dissout avant de passer les colonnes. 1 g de chaque miel a été prélevé. Les prélèvements ont ensuite été dissouts dans 4 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0.01 molaire afin de neutraliser d'éventuelles charges acides. Les solutions obtenues ont été placées dans des tubes Falcon puis mises en bain ultrason pendant dix minutes afin de dissoudre complètement les miels les plus cristallisés sans recourir au chauffage qui aurait pu le dénaturer.

2. Conditionnement des colonnes

Le conditionnement des colonnes et le passage des échantillons ont été réalisés à l'aide d'une chambre à vide. L'activation des colonnes a été faite par 5ml de méthanol. Puis, après passage du méthanol, les colonnes ont été rincées avec 5ml d'eau distillée. Les colonnes ont ensuite été séchées sous vide pendant 20 secondes. Lors de cette étape, le fabricant précise que la colonne ne doit pas être totalement séchée sous peine de voir sa capacité de rétention diminuer.

3. Passage des échantillons

Les échantillons ont été filtrés par groupe de huit. À chaque passage, les colonnes ont été changées pour éviter toute contamination. Pour un meilleur rendement de l'extraction le fabricant des colonnes préconise de faire passer les échantillons le plus lentement possible, idéalement sans dépasser la vitesse de 1 ml par minute. Dans la mesure du possible, les échantillons ont été filtrés uniquement par gravité. Toutefois, l'emploi de la pompe à vide a parfois été nécessaire afin d'amorcer ou de terminer la filtration. La force d'aspiration a été adaptée manuellement *via* une vanne permettant de réguler les pressions entre la cuve du vacuum et l'atmosphère.

4. Lavage et séchage de la colonne

Une fois l'échantillon fixé, la colonne est lavée avec 3 ml d'une solution de méthanol à 10% afin d'éliminer les sucres sans décrocher les flavonoïdes. Le passage de la solution de lavage est fait sous vide, le plus lentement possible, pour un débit idéal d'environ 2 ml par minute. La colonne est ensuite séchée pendant deux minutes sous vide.

5. Elution

Après avoir inséré des tubes Falcon de 10ml dans les racks du manifold, les colonnes sont éluées par 4 ml de méthanol pour récupérer les analytes.

Le schéma ci-dessous détaille les différentes étapes d'extraction sur colonne SPE telles que nous venons de les présenter (56) .

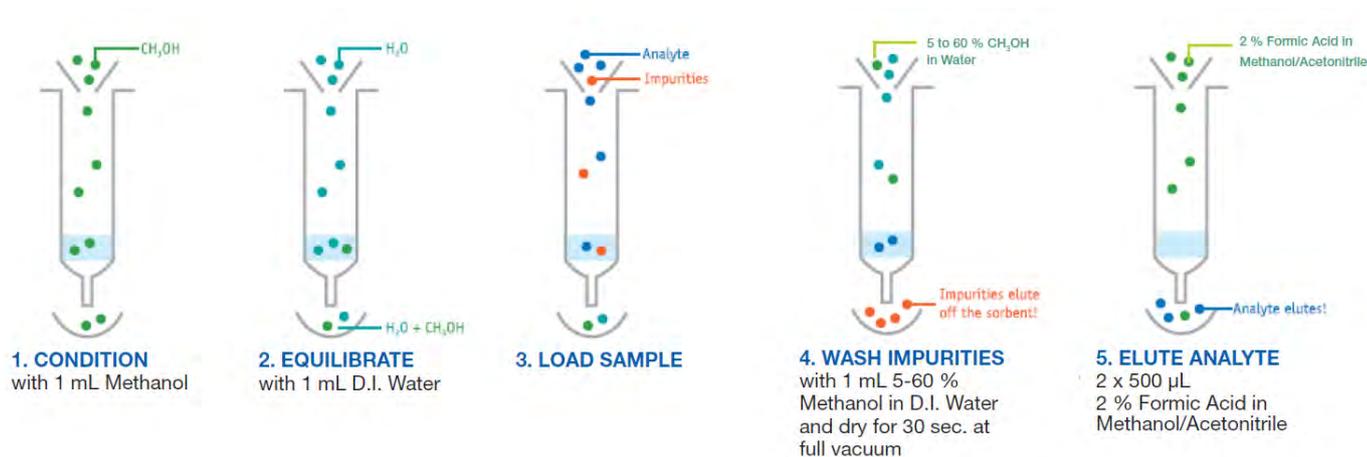


Figure 21 : Résumé des étapes d'extraction sur colonne SPE (54)

6. Conditionnement des échantillons pour l'analyse

Les tubes contenant les résidus d'extraction dilués dans le méthanol ont été placés dans un Speedvac afin d'évaporer le solvant, sans dépasser la température de 50°C pour limiter la dégradation des molécules d'intérêt. Le temps d'évaporation nécessaire à l'obtention d'un résidu sec a présenté une variabilité non négligeable, pouvant s'expliquer par un manque de séchage de certaines colonnes qui auraient pu contenir des traces d'eau au moment de l'éluion. Le temps nécessaire à l'évaporation complète du solvant a été de 45 minutes jusqu'à 1 heure 30, soit le double. Puis les extraits secs ont été dissouts dans une solution de méthanol à la concentration de 2mg/ml. Enfin, 300 μL de chaque solution obtenue ont été conditionnés dans des viales HPLC et conservés au congélateur à -15°C en attendant leur analyse.

Les données brutes ont été interprétées à l'aide des logiciels MS DIAL et MS Finder. MS DIAL a dans un premier temps permis de détecter les pics (57) avant de les identifier à l'aide de MS Finder (58) et de la base de données du *dictionary of natural products* (59)

2. Résultats

a. Données brutes

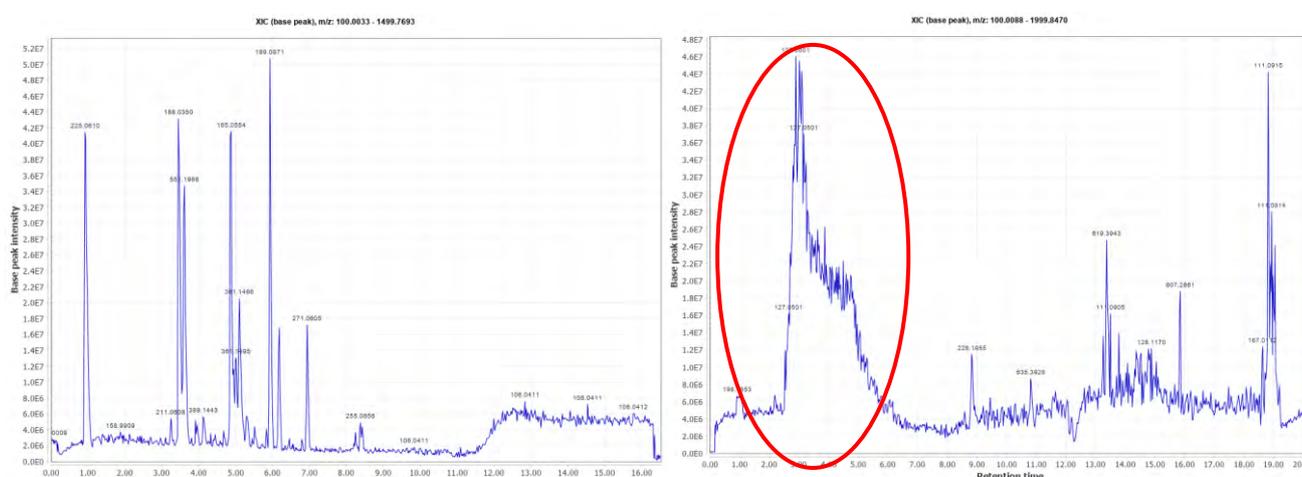


Figure 22 : Courbes d'intensité en fonction du temps de rétention des QC, par extraction SPE à gauche et extraction liquide/liquide par MeOH à droite

Les graphiques ci-dessus sont issus du logiciel MZMINE et représentent les données brutes du spectromètre. La courbe de gauche représente l'intensité des pics moléculaires détectés en fonction du temps de rétention après une purification par cartouche SPE. La courbe de droite représente les mêmes grandeurs après une extraction liquide/liquide des métabolites secondaires. La comparaison des courbes met en évidence la présence d'un large pic en début d'injection (au temps trois minutes) sur le graphique de droite. Ce pic correspond à la présence de glucose et de fructose en grande quantité. L'observation de ce pic conforte le choix d'une extraction par SPE qui permet une meilleure élimination des sucres, et donc une meilleure résolution.

b. Comparaison et identification des différents miels monofloraux

Si les différences organoleptiques entre les classes de miels sont observables et évidentes, il était intéressant de vérifier que cette différence se retrouve également dans la composition chimique de ces miels. Certains miels monofloraux sont plus plébiscités que d'autres dans le cadre d'une utilisation thérapeutique. C'est par exemple le cas des miels de manuka, de châtaigner, de thym ou encore de sarrasin. Ces miels sont préférés par les médecins à cause de leur activité antibactérienne supérieure. Cette différence d'activité repose sur une variation la composition en inhibines. Si pour le miel de manuka cette particularité s'explique par une très forte concentration en MGO, pour les miels de nos contrées, la différence pourrait vraisemblablement se situer dans la qualité et la quantité des métabolites secondaires qu'ils contiennent.

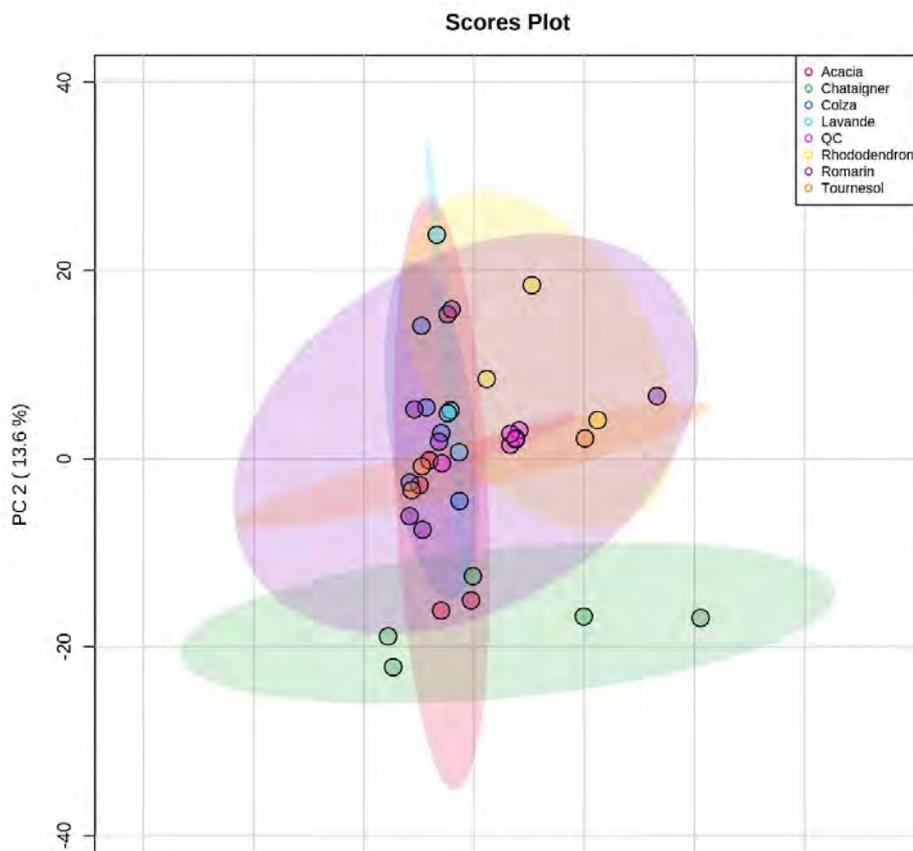


Figure 23 : Comparaison PCA des miels d'acacia, de châtaigner, de colza, de lavande, de rhododendron, de romarin de et tournesol.

La figure 23 est une comparaison des échantillons par une méthode d'analyse en composante principale (PCA). Cette méthode projette les différents échantillons sans tenir compte de leur classe sur l'espace de variance défini par les composantes principales de l'ACP. Plusieurs observations peuvent être faites :

- Le groupes des QC, bien que partiellement isolé, se retrouve très localisé, au milieu des autres groupes d'échantillon. Le résultat est cohérent avec les attentes puisque ce groupe d'échantillons est réalisé par mélange de tous les autres échantillons.
- Chaque classe est regroupée au sein d'un intervalle de confiance de 95%. Le chevauchement des classes révèle, à première vue, une absence de différence de composition significative entre les différentes classes.
- Seul le miel de châtaigner se démarque légèrement des autres classes.
- Cette première analyse PCA montre que, d'une fleur à l'autre, le miel contient un grand nombre de métabolites secondaires identiques.
- Pour mettre en évidence une réelle différence entre les classes, deux options sont possibles : réduire le nombre de classes afin de simplifier l'analyse statistique, ou bien utiliser une autre méthode d'analyse statistique plus adaptée à la mise en évidence des différences entre les classes.

1. Simplification et réduction du nombre de classe

Afin d'augmenter le pouvoir séparateur de l'analyse en composante principale, le choix est fait d'éliminer les classes les moins spécifiques et celles présentant le moins d'intérêt en thérapeutique. En supprimant les classes acacia et romarin ainsi que les QC, on obtient la représentation PCA suivante :

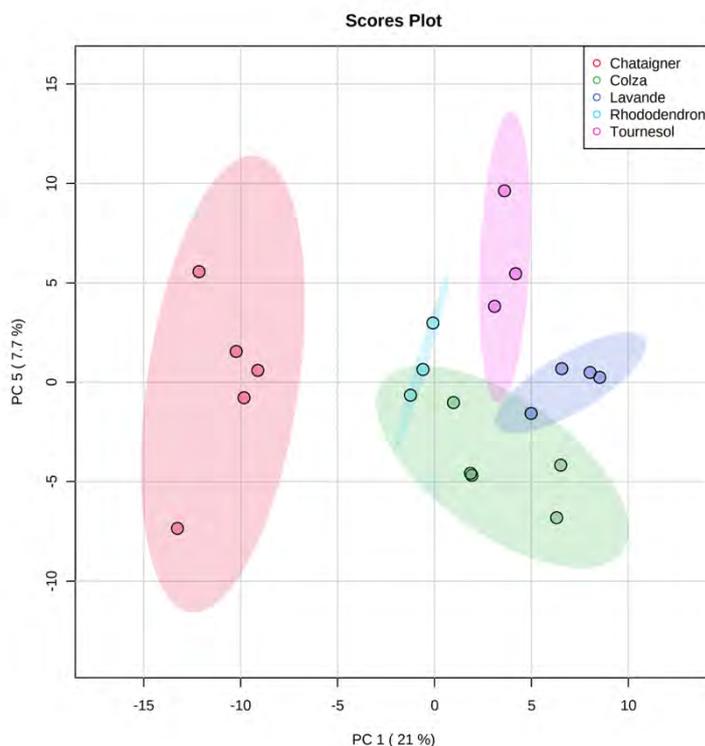


Figure 24 : PCA miel châtaigner, tournesol, rhododendron, colza et

Dans ces conditions, la PCA permet d'isoler le miel de châtaigner dans un intervalle de confiance de 95% tandis que les autres miels sont partiellement isolés. La classe romarin a été retirée de PCA car deux de ses miels présentaient des propriétés organoleptiques anormales (pâleur et fluidité anormales pour ce type de miel monofloral). La classe acacia a été retirée de la PCA car la période de floraison du robinier (faux acacia) a lieu au début du printemps, en même temps que de nombreuses espèces de fleurs. Partant de cette observation, l'hypothèse peut être faite que le miel d'acacia, bien qu'il se revendique monofloral, est élaboré à partir de nectar d'une grande variété d'espèces florales. Il ressort de ces choix arbitraires une meilleure séparation des différentes classes. Il semble donc que l'analyse en spectrométrie de masse soit capable de différencier un nombre limité de classes de miels en fonction de leur origine florale et à condition que leur récolte soit suffisamment spécifique. Il est permis de faire l'hypothèse que chaque classe monoflorale étudiée possède une composition spécifique et qu'il existerait donc un profil de métabolites secondaires spécifique à chacune d'elles.

2. Analyse en s-PLSDA

La s-PLSDA ou régression des moindres carrés partiels est une technique d'analyse statistique permettant de regrouper les échantillons en fonction de leurs classes respectives (ici origine florale des miels) et d'en déduire les variables les plus discriminantes. En d'autres termes, son application dans le cas présent permet de maximiser la séparation des classes de miels monofloraux, de repérer les métabolites secondaires spécifiques de chaque classe, et éventuellement, de prédire la classe d'un échantillon d'origine inconnue. Appliquée aux classes lavande, rhododendron, tournesol, colza et châtaigner, la s-PLSDA donne la représentation graphique qui suit :

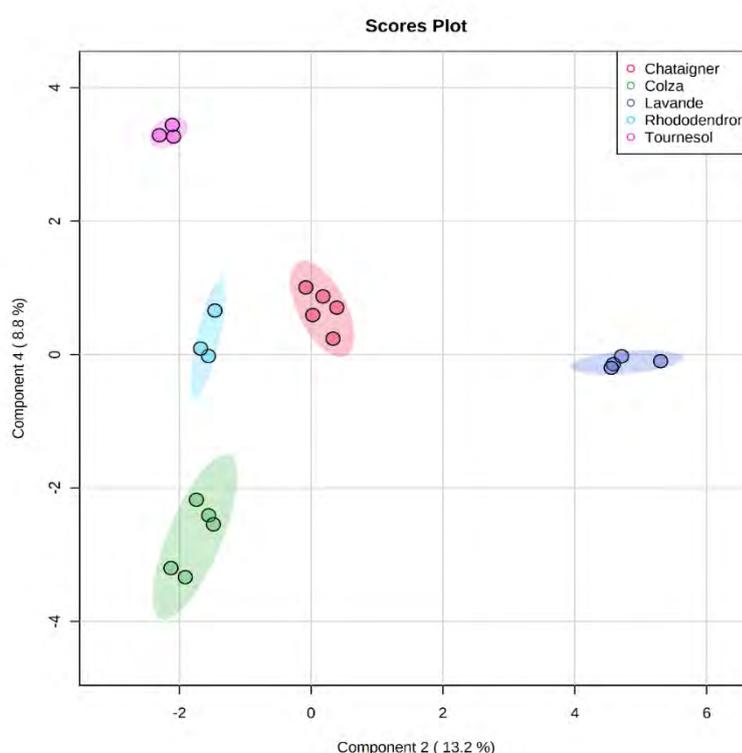


Figure 25 : s-PLSDA miel châtaigner, colza, lavande, rhododendron, tournesol, lavande

Contrairement à la PCA, la méthode s-PLSDA permet de séparer correctement les classes de miel et de conclure à l'existence de profil de métabolites secondaires spécifiques à chacune des classes.

3. Identification des molécules clés : la Heatmap

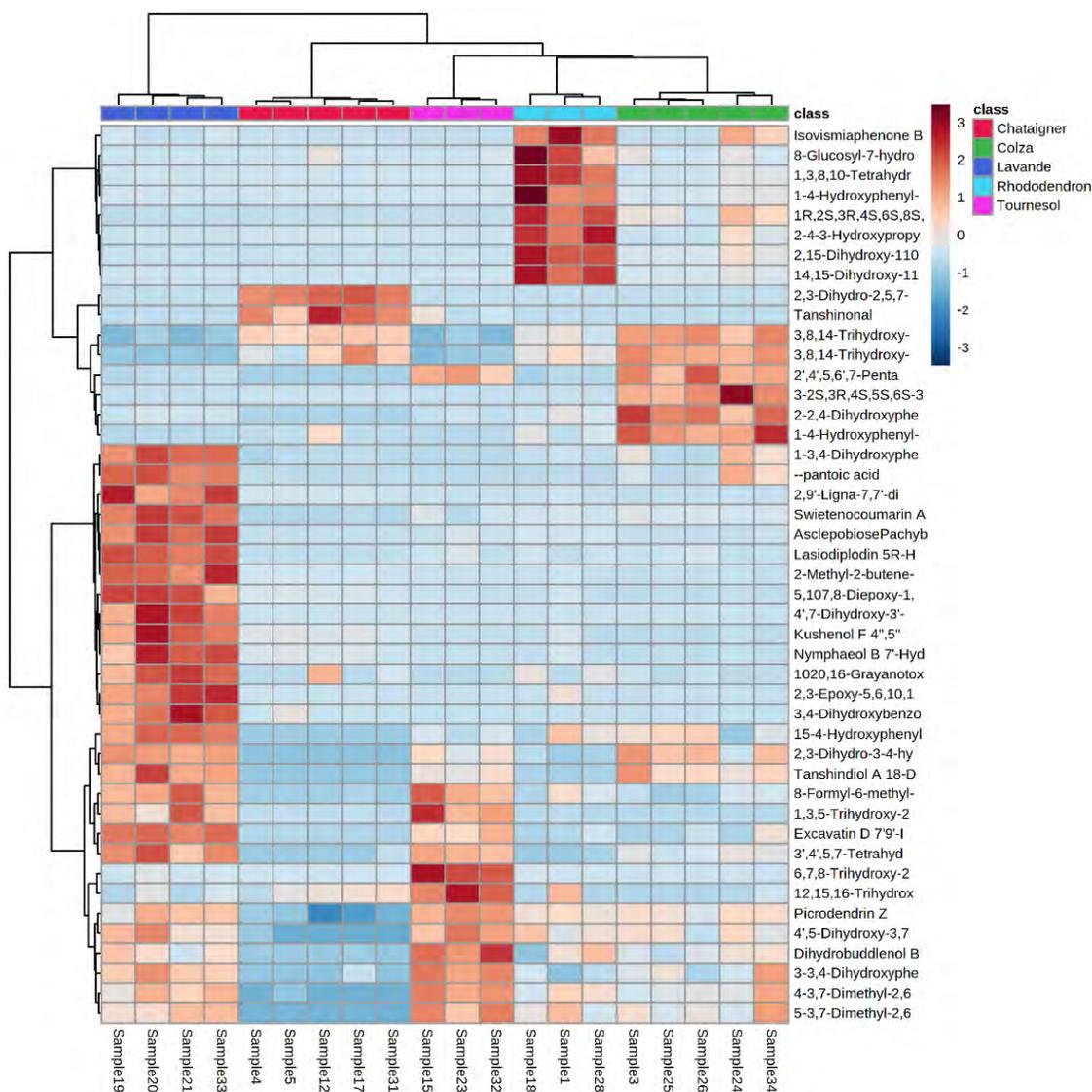


Figure 26 : Heatmap miel chataigner, colza, lavande, rhododendron, tournesol

La *heatmap* est le meilleur outil permettant une identification rapide des espèces chimiques responsables de la spécificité de chaque classe. Seule l'analyse de la lavande permet de mettre en évidence des molécules spécifiques dignes d'intérêt. Pour les autres classes de miel, il s'agit principalement de dérivés de flavonoïdes ne disposant pas de bibliographie à l'heure actuelle. Voici une liste non exhaustive de ces molécules spécifiques de chaque espèce :

- Molécules spécifiques aux miels de lavande :

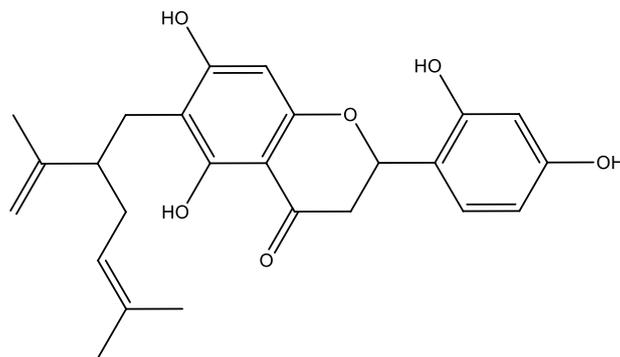


Figure 27 : Kushenol

Le Kushenol F est aussi appelé sophoraflavanone G en raison de sa découverte et son identification dans la racine de *Sophora flavescens*, un arbuste de la famille des fabacées, principalement retrouvé dans les régions chaudes de l'Océanie et de l'Europe. C'est une flavanone connue pour son activité inhibitrice des tyrosines kinases et des monoamines oxydases, en particulier la MAO-B (60). En médecine traditionnelle chinoise, cette plante est utilisée pour ses supposées vertus anti-inflammatoires et antioxydantes. Plus récemment, des études ont mis en lumière différentes activités du Kushenol F *in vitro*. L'une de ces études a, par exemple, montré l'effet pro-apoptotique des cellules tumorales de cancer du sein triple négatif (61). En infectiologie, plusieurs études font état d'une activité du Kushenol F sur des souches de staphylocoques dorés résistants à la méticilline (62,63), et en particulier, d'une synergie avec des antibiotiques tels que la norfloxacine.

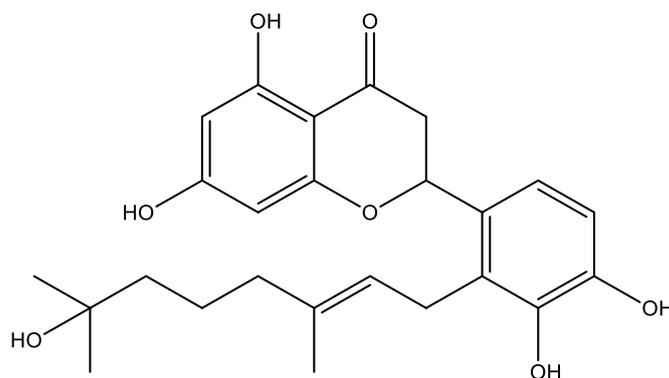


Figure 28 : nymphaeol B

Le nymphaeol B. est une tetrahydroxyflavone. C'est un analogue très proche du

nymphaeol C qui est notamment cité dans une étude de 2017 pour son activité inhibitrice de l'expression du gène codant pour le FGF18, un facteur de croissance fibroblastique parfois impliqué dans la croissance tumorale (64).

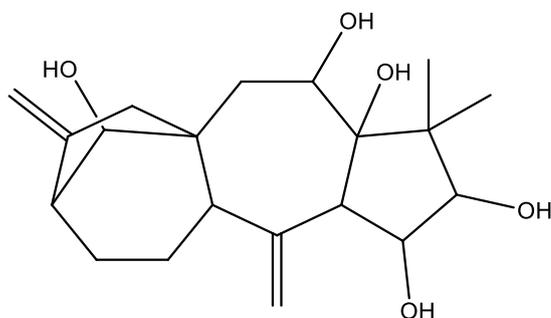


Figure 29 : 10(20),16-Grayanotoxadiene-2,3,5,6,14-pentol

Cette molécule est apparentée aux grayanotoxines, une famille de neurotoxines fréquemment retrouvées dans la famille des Éricacées. Elle est parfois retrouvée dans le Rhododendron, bien qu'elle ne soit pas présente dans les miels de rhododendron étudiés ici. Ces molécules peuvent être responsables d'intoxication par les miels produits dans le pourtour méditerranéen et de la mer Noire. Ces intoxications au « miel qui rend fou » se manifestent par des atteintes neuromusculaires, cardiaques et rénales. (65)

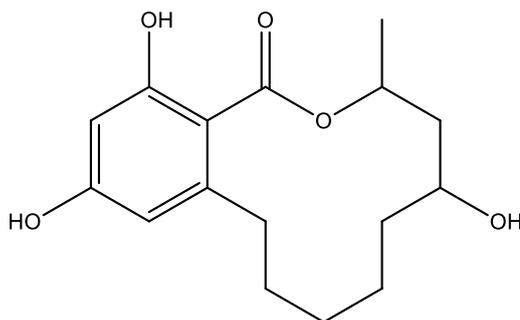


Figure 30 :Lasiodiplodin; 5R-Hydroxy, O-de-Me

La lasiodiplodine est une molécule apparentée aux macrolides, isolée à partir de l'euphorbe splendens. Sa synthèse a été étudiée dans les années 1980 en vertu de possibles propriétés anti-leucémiques qui n'ont, à ce jour, pas été démontrées.

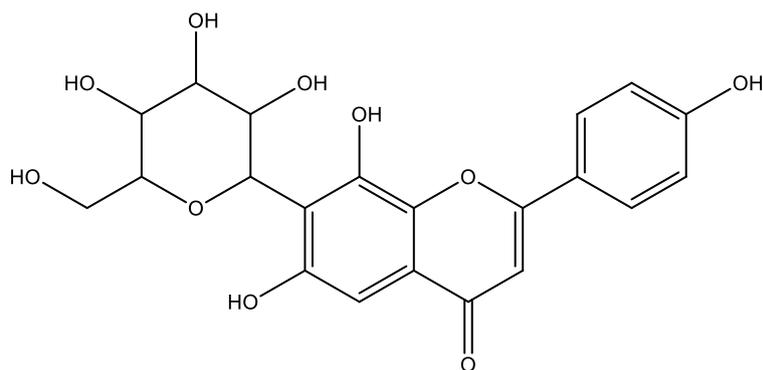


Figure 31 : 7-C-β-D-Glucopyranosyl-4',6,8-trihydroxyflavone

Ce dérivé glycosylé appartient aux trihydroxyflavones dont fait également partie l'apigénine, connue pour son haut pouvoir antioxydant *in vitro*. La glycolisation des métabolites secondaires des plantes pourrait être une conséquence de leur métabolisation par les enzymes de l'abeille lors du processus de trophallaxie.

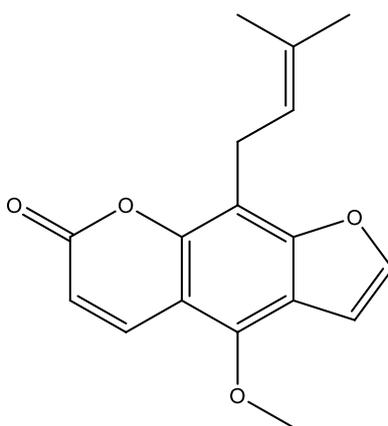


Figure 32 : Swietenocoumarin A

La swietenocoumarine A est un tanin appartenant à la famille des furanocoumarines. C'est un métabolite secondaire toxique ayant un rôle de défense de la plante contre les herbivores. La lavande vraie, *Lavandula angustifolia*, est une plante riche en dérivés de la coumarine. Sa présence dans le miel est donc cohérente. Les furanocoumarines, issues de l'adjonction d'un cycle furane sur la coumarine, sont pour la plupart photosensibilisantes. À l'heure actuelle, la swietenocoumarine n'a pas d'activité thérapeutique connue.

- Molécule spécifique aux miels de châtaigner :

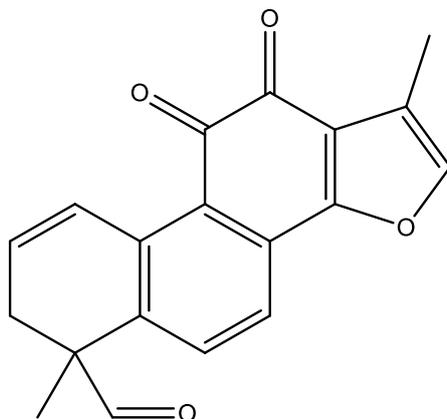


Figure 33 : Tanshinonal

Le tanshinonal est un dérivé de la tanshinone, identifiée dans la sauge rouge (*Salvia miltiorrhiza*), ayant démontré une activité cytotoxique *in vitro* sur des cellules tumorales (66). C'est la seule molécule d'intérêt spécifique à la classe miel de châtaigner mise en évidence dans cette expérience.

c. Comparaison miel/fleur

1. Analyse en PLSDA de 3 essences florales

Pour aller plus loin, trois extraits de fleur totale ont été réalisés pour les trois espèces suivantes : *Robinia pseudoacacia* (l'acacia), *Helianthus annuus* (le tournesol) et *Lavandula angustifolia* (la lavande officinale). Le but de ces investigations complémentaires était de déterminer s'il existe une corrélation entre les spectres de masse des fleurs et des miels monofloraux associés à ces fleurs. Pour y parvenir, 100 mg de fleurs de lavande, d'acacia et de tournesol ont été cueillis puis broyés dans un broyeur à billes dans 1 ml de méthanol à 20%. Le broyat a ensuite été centrifugé à 12000 tours par minute pendant cinq minutes. Le surnageant a ensuite été passé au speedvac jusqu'à évaporation complète du solvant. Par la suite, l'extrait sec obtenu a été redissout dans du méthanol pur pour être analysé en spectrométrie de masse. L'analyse PLSDA des extraits est représentée dans le graphique suivant :

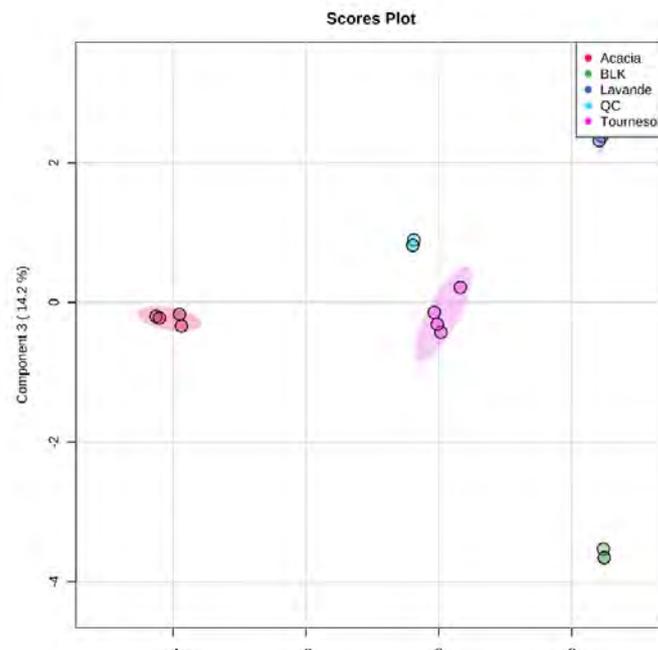


Figure 34 : PLSDA fleurs acacia, lavande, tournesol

On peut déduire de cette représentation graphique plusieurs informations :

- Contrairement aux extraits de miel, les extraits de fleurs sont plus homogènes au sein de chaque classe, ce qui se traduit sur la représentation par des intervalles de confiance à 95% plus réduits que pour les miels.
- Le groupe des QC (mélange de toutes les classes) occupe, de façon attendue, une place centrale.
- Ces résultats ont été obtenus avec les mêmes solvants, la même colonne chromatographique et les mêmes paramètres d'injection. L'identification des molécules est faite à l'aide de la même chimiothèque que celle utilisée pour les miels. La seule différence entre les groupes d'échantillons de fleurs et de miels, provient du protocole d'extraction puisque, du fait de l'absence de sucre, une simple extraction par solvant sans emploi de colonne SPE a été suffisante.

2. Recherche de molécules communes aux miels et aux fleurs.

Afin de mettre en évidence une éventuelle similarité entre un miel monofloral et la fleur dont il est issu, une analyse croisée miel/fleur a été réalisée. Sur la représentation PLSDA ci-dessus, les classes acacia, tournesol et lavande sont composées à la fois des extraits de miel et de fleurs de chaque essence. Le graphique montre l'existence d'une légère corrélation avec un intervalle de confiance à 95%. Cependant la heatmap croisée miel/fleur ne permet pas de mettre en évidence un chémotique commun à la fleur et au miel qui lui est associé. Il est possible que l'abeille, dans son processus d'élaboration du miel, métabolise de manière trop importante les composés issus de la fleur pour qu'une corrélation avec le miel monofloral associé puisse être retrouvée.

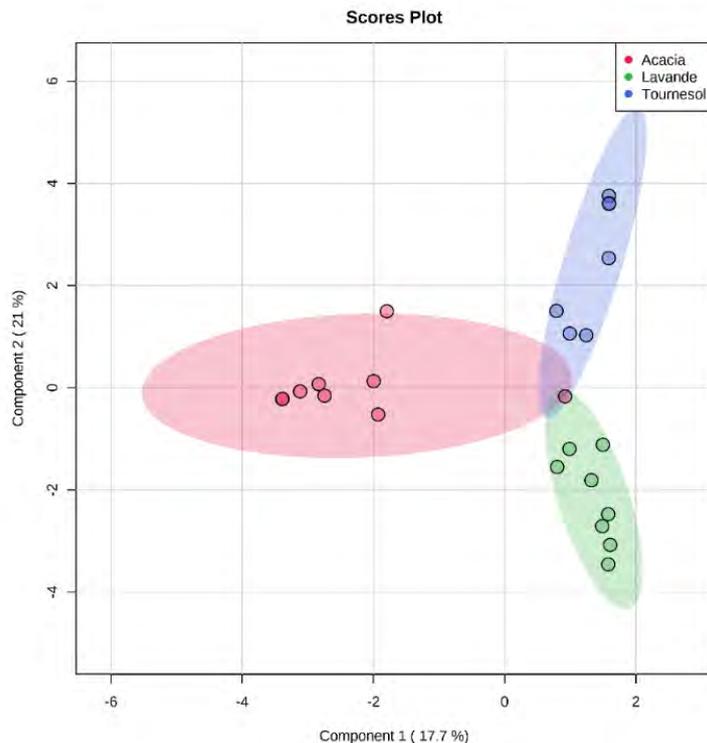


Figure 35 : PLSDA croisée, fleurs et miels

d. Molécules communes aux différentes classes de miel

1. Trihydroxyflavones

La famille des trihydroxyflavones est connue pour ces espèces chimiques aux propriétés anti-inflammatoires. L'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavanon) et la baicaléine (5,6,7-Trihydroxyflavone) font partie des plus connues. La liste de leurs vertus semble infinie : effet anti-inflammatoire par inhibition des lipoxygénases, effet anti-radicalaire, inhibition de l'angiogenèse tumorale, synergie avec certaines classes d'antibiotiques, activité antivirale(67). Si l'apigénine et la baicaléine ne sont pas directement retrouvées dans le miel, ce sont en revanche leurs dérivés glycosylés et méthylés qui le sont : 8-Formyl-6-methyl-4',5,7-trihydroxyflavanone, 8-C-?-D-Glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyflavone et 5,6,7-Trihydroxyflavone; 6-O-?-D-Glucopyranoside

2. Tetrahydroxyflavones

Les tetrahydroxyflavones sont également connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires. La plus connue, la lutéoline, exercerait son activité anti-inflammatoire en inhibant la production d'IL-6 (68). Elle est présente dans un très grand nombre d'espèces végétales. Des études ont démontré une activité antitumorale par inhibition de l'angiogenèse ainsi qu'un intérêt dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans les miels analysés, c'est un dérivé glycosylé de la lutéoline (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone ; 4'-O-[-D-Glucopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranoside]) qui est retrouvé plus particulièrement dans les miels de romarin et de colza. Dans les autres miels, c'est un analogue de la lutéoline qui est retrouvé : la 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanone ; 4'-O-(3-Methyl-2-butenyl)

3. Pentahydroxyflavones

Tous les échantillons analysés se sont avérés riches en pentahydroxyflavones, dont fait partie la quercétine. Les propriétés prêtées à cette flavone sont très nombreuses : anti-inflammatoire (69), antitumorale (70), antivirale avec une possible utilisation contre le SARS-CoV (71), réduction du risque coronarien. Si la quercétine n'est pas retrouvée dans les échantillons analysés, on y retrouve en revanche cinq pentahydroxyflavones différentes.

4. Acide abscissique

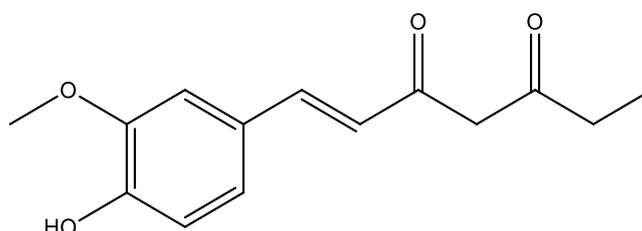


Figure 36 : Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) est une phytohormone de la famille de

sesquiterpènes. Il est présent dans toutes les plantes et retrouvé chez les mousses, les algues, et les champignons. Il tire son nom de l'abscission, phénomène par lequel les feuilles et les fruits se détachent de la plante. Il joue également un rôle majeur dans les mécanismes de sénescence et de dormance des plantes et des graines.

Chez l'Homme, l'acide abscissique se lie au récepteur LANCL2 impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique et de la glycémie. Des études sur la souris ont mis en évidence que les effets pharmacologiques de l'acide abscissique passaient par une régulation du métabolisme glucidique des muscles squelettiques via un effet agoniste sur le récepteur LANCL2. Très présent dans les fruits qu'il fait murir et tomber, l'acide abscissique aiderait ensuite les êtres vivants qui consomment le fruit à assimiler le fructose et le glucose qu'il contient. Son action sur l'assimilation des sucres serait étroitement liée à la régulation de l'inflammation (72,73). En effet, il a été démontré que son effet hypoglycémiant peut être supérieur à celui de l'insuline dans un environnement cellulaire inflammatoire où l'action de l'insuline se retrouve considérablement réduite par la présence de cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs études ont démontré un intérêt thérapeutique de l'acide abscissique à de faibles concentrations chez les patients souffrant de diabète et d'obésité. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence que l'acide abscissique possédait une activité pharmacologique similaire à l'Avandia, un hypoglycémiant de la famille des glitazones, agissant sur les récepteurs nucléaires PPAR γ .

La présence systématique de l'acide abscissique dans les échantillons analysés laisse à penser que tous les miels pourraient en contenir une quantité non négligeable. Dans ces conditions, le miel pourrait s'avérer être une alternative intéressante au sucre, en particulier chez les patients souffrant de trouble du métabolisme et de diabète de type 2 mais également pour l'ensemble de la population, dans la mesure où il limiterait les hyperglycémies consécutives à la prise de sucre à fort index glycémique.

5. *Tephroleocarpin*

La tephroleocarpin est retrouvée dans la quasi-totalité des miels analysés. C'est une flavanone structuralement très proche du dihydrokaempferol, un flavanolol essentiellement retrouvé dans la résine de pin.

6. *Capstemol*

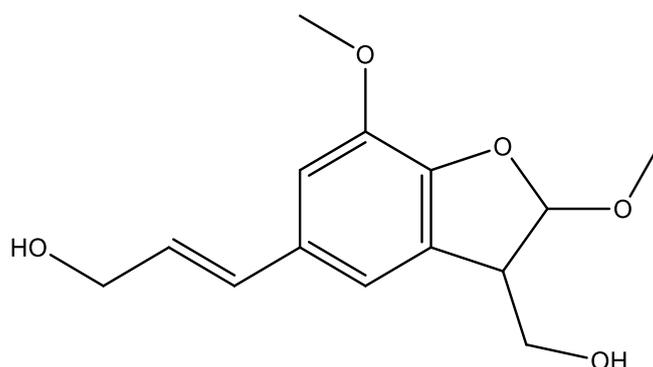


Figure 37 : *Capstemol*

Le capstemol est un benzofurane identifié dans une plante utilisée en médecine traditionnelle en Afrique tropicale *L. Heudelotti*. Il est retrouvé dans la classe lavande et romarin des échantillons analysés. Les vertus prêtées à cette plante vont du traitement de l'ulcère gastro duodéal au traitement du glaucome. Le capstemol est soupçonné d'être à l'origine d'une part importante de l'activité antioxydante des extraits de cette plante puisque son activité anti-radicalaire, évaluée par le test au DPPH, s'avère significative(74). Pour autant, aucune étude à ce jour n'a étudié l'activité du capstemol dans une quelconque application en thérapeutique humaine.

7. Gingerdione

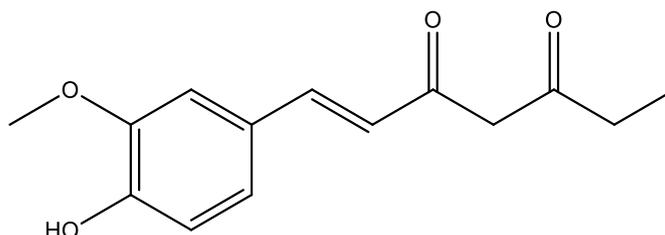


Figure 38 : Gingerdione

La gingerdione est un phénol identifié dans le rhizome du gingembre duquel il tire son nom. *In vitro* la gingerdione a démontré une activité anti-inflammatoire significative en diminuant la quantité de prostaglandine E2 (75). Sur la figure 39, sont représentées les concentrations de PGE2 obtenues par stimulation *in vitro* de macrophages à l'aide de LPS bactérien. L'adjonction de 1-dehydro-6-gingerdione permet de réduire, quasiment de moitié, la sécrétion de PGE2. La gingerdione est retrouvée dans tous les miels de l'échantillon, excepté dans les miels de châtaigner. Sa présence vient corroborer les observations faites sur les propriétés anti-inflammatoires du miel et toutes les implications sur les propriétés cicatrisantes et anti-cancéreuses du miel. D'autre part, la même étude démontre que la gingerdione possède un pouvoir anti-oxydant supérieur à l'hexahydrocurcumine, un métabolite de la curcumine.

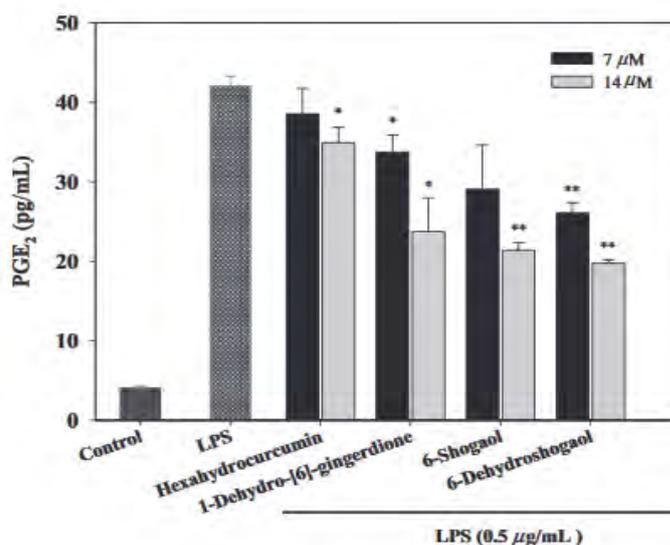


Figure 39 : Inhibition de la production de prostaglandine E2 (75)

8. Pinobanksin

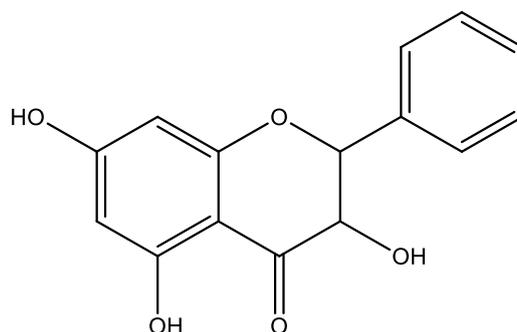


Figure 40 : Pinobanksin

La pinobanksin est un métabolite secondaire de la famille des tri-hydroxyflavone. C'est un dérivé de la pinobanksin-3-O-pentanoate qui a montré *in vitro* des propriétés apoptotiques sur des lignées tumorales de lymphocyte B. Cet effet apoptotique, observé avec le seul usage de la pinobanksin, était majoré lors de son utilisation conjointe avec une chimiothérapie de référence par rapport à la chimiothérapie seule (76).

9. Ledebourin A

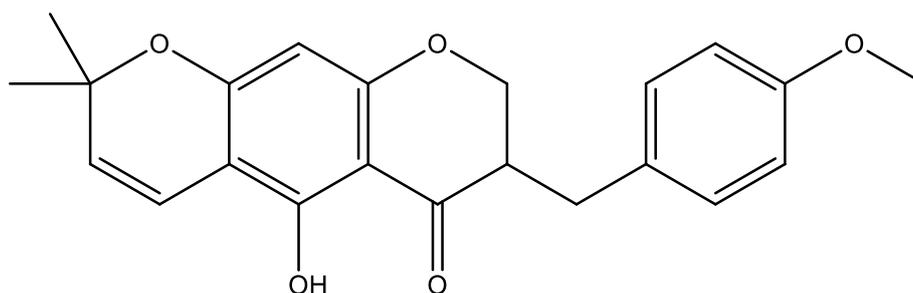


Figure 41 : Ledebourin A

La ledebourin est une isoflavone isolée à partir du bulbe de *Ledebouria floribunda*. Une étude a montré son activité anti-radicalaire significative dans le test du DPPH (77). Aucune application en thérapeutique n'a été démontrée à ce jour.

Conclusion

Tel que le démontre cette étude, la spectrométrie de masse se révèle être un outil supplémentaire pertinent de l'analyse du miel. En santé, le besoin grandissant de qualité exige toujours plus de traçabilité et de reproductibilité. À cause de ses origines animale et végétale, le miel est extrêmement difficile à standardiser. Cette étude montre que la spectrométrie de masse permet de contrôler la fraction du miel sujette à une grande variabilité, à savoir les métabolites secondaires. La méthode d'extraction par SPE s'avère suffisamment efficace à éliminer les sucres et permet ensuite l'identification de nombreuses espèces chimiques. D'autre part, la spectrométrie de masse offre la possibilité d'étudier le comportement des abeilles et de suivre la récolte des butineuses grâce à la séparation des chémotypes de miels monofloraux. Cependant, la séparation et l'identification de ces chémotypes pourraient sans doute être affinées en utilisant des banques de miels plus importantes que celle utilisée dans ce travail. Enfin, la spectrométrie de masse se limite à l'aspect qualitatif de l'analyse du miel. Par conséquent, un couplage avec des données quantitatives pourrait permettre de dégager des biomarqueurs du métabolisme secondaire, caractéristiques de chaque miel monofloral et ainsi apporter une réelle plus-value aux contrôles qualités existants.

Au-delà du contrôle de la qualité du miel, la spectrométrie de masse ouvre la porte à une connaissance plus approfondie du miel. La méthode confirme la présence de nombreuses molécules d'intérêt comme les flavonoïdes, les terpènes, et un certain nombre de métabolites secondaires dont la présence dans le miel était déjà connue. La spectrométrie de masse permet également de mettre en exergue des composés dont la présence dans le miel n'était pas documentée jusque-là, comme l'acide abscissique. Avant d'être un moyen de contrôle utile à l'utilisation du miel dans un cadre thérapeutique, la spectrométrie de masse se place avant tout comme un outil de connaissance et d'investigation du miel.

Bibliographie

1. Viel C, Doré J-C. Histoire et emplois du miel, de l'hydromel et des produits de la ruche. Rev Hist Pharm. 2003;91(337):7-20.
2. Des abeilles et des hommes [Internet]. CNRS Le journal. [cité 8 sept 2020]. Disponible sur: <https://lejournel.cnrs.fr/articles/des-abeilles-et-des-hommes>
3. Abeille noire [Internet]. [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=256>
4. st-ambroise.be [Internet]. [cité 8 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.st-ambroise.be/home>
5. Anatomie et biologie d'une abeille [Internet]. Mes Abeilles. 2019 [cité 15 sept 2020]. Disponible sur: <https://mesabeilles.fr/les-abeilles/anatomie-et-biologie-dune-abeille>
6. ENCYCLOPEDIE UNIVERSELLE DE LA LANGUE FRANCAISE - ABEILLES - ANATOMIE - THORAX [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.encyclopedia-universelle.net/abeille1/abeille-anatomie-thorax.html>
7. appareil buccal de type lecheur suceur , abeille, insecte, ravageur des cultures [Internet]. [cité 16 sept 2020]. Disponible sur: http://www.agriculture-de-demain.fr/ravageurs/appareils_buccaux/abeille.html
8. hierarchie chez les abeilles dans la ruche expliquée [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.ooobo.com/Savoir/les-abeilles/hierarchie.htm>
9. Génétique et vie en société chez les Hyménoptères (Apis mellifera) [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <https://apihappy.fr/45-genetique-societe-des-abeilles>
10. Clement H. Le traité rustica de l'apiculture. 2011.
11. Comment ça fonctionne une ruche? [Internet]. 2018 [cité 15 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.mieldejuniat.fr/comment-ca-fonctionne-une-ruche>
12. Orchies - Participer à la dernière récolte de miel des ruches de la Maison Leroux [Internet]. La Voix du Nord. 2018 [cité 15 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.lavoixdunord.fr/452183/article/2018-09-19/participer-la-derniere-recolte-de-miel-des-ruches-de-la-maison-leroux>

13. Syndicat des Producteurs de Miel de France. Réglementation miel HMF.
14. La danse des abeilles est-elle un langage ? [Internet]. µTime. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <http://utime.unblog.fr/2007/09/27/la-danse-des-abeilles-est-elle-un-langage/>
15. Un blog pour les abeilles » La vie de la ruche en juillet [Internet]. [cité 15 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.untoitpourlesabeilles.fr/blog/la-vie-de-la-ruche-en-juillet-2/>
16. Etienne BRUNEAU. Nectaires et nectar.
17. Bonté F, Desmoulière A. Le miel : origine et composition. Actual Pharm. 1 déc 2013;52(531):18-21.
18. Maurizio A. LE SPECTRE POLLINIQUE DES MIELS LUXEMBOURGEOIS. Apidologie. 1971;2(3):221-38.
19. Comment les abeilles fabriquent le miel ? (OPIE) [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: http://www.insectes.org/insectes/questions-reponses.html?id_quest=40
20. Les bienfaits de l'apithérapie. 1ère Edition. Eyrolles Ed. 2009, 158 p.
21. JOUVE F. Le grand livre du miel et des abeilles. Solar Ed. 143 p.
22. Les miels. Ed. Techniques Ingénieur; 20 p.
23. FMPMC-PS - Orthopédie - Questions d'internat [Internet]. [cité 1 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/orthopedie/polyortho/POLY.Chp.19.html>
24. Couquet Y, Desmoulière A, Rigal M-L. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. Actual Pharm. 1 déc 2013;52(531):22-5.
25. Kwakman PHS, Van den Akker JPC, Güçlü A, Aslami H, Binnekade JM, de Boer L, et al. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 juin 2008;46(11):1677-82.
26. Kwakman PHS, te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. FASEB J. 12 mars 2010;24(7):2576-82.
27. Bogdanov S, Blumer P. Propriétés antibiotiques naturelle du miel.

28. Figure 10: Subsequent steps in the formation of methylglyoxal from... [Internet]. ResearchGate. [cité 8 nov 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Subsequent-steps-in-the-formation-of-methylglyoxal-from-dihydroxyacetone-phosphate-DHAP_fig10_292348617
29. Molan PC. The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World*. 1 janv 1992;73(1):5-28.
30. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1 mars 1993;14(3):303-11.
31. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples - Université de Lorraine [Internet]. [cité 6 oct 2020]. Disponible sur: <https://ulyse.univ-lorraine.fr>
32. Harms LM, Scalbert A, Zamora-Ros R, Rinaldi S, Jenab M, Murphy N, et al. Plasma polyphenols associated with lower high-sensitivity C-reactive protein concentrations: a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Br J Nutr*. janv 2020;123(2):198-208.
33. cokuntz. Des polyphénols pour réduire les risques de cancers et de maladies cardiovasculaires [Internet]. Université Paris-Saclay. 2019 [cité 6 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.universite-paris-saclay.fr/actualites/des-polyphenols-pour-reduire-les-risques-de-cancers-et-de-maladies-cardiovasculaires>
34. Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, et al. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. *Int J Urol*. 2003;10(4):213-9.
35. Revamil : Miel medical [Internet]. Melibiotech. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.melibiotech.com/>
36. Les bienfaits du miel de Manuka Medihoney® [Internet]. Le Miel Médical. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.lemielmedical.com/>
37. LECHAUX D. LE MIEL ET LA CICATRISATION DES PLAIES. [cité 4 avr 2020]; Disponible sur: <https://www.abcd-chirurgie.fr/mediastore/fckEditor/file/TAP.pdf>
38. Oduwole O, Meremikwu MM, Oyo-Ita A, Udoh EE. Honey for acute cough in children. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2012 [cité 21 oct 2020];(3). Disponible sur: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007094.pub3/full/fr>

39. Shadkam MN, Mozaffari-Khosravi H, Mozayan MR. A comparison of the effect of honey, dextromethorphan, and diphenhydramine on nightly cough and sleep quality in children and their parents. *J Altern Complement Med N Y N*. juill 2010;16(7):787-93.
40. Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. *Arch Med Res*. 1 juill 2014;45(5):359-65.
41. NORME POUR LE MIEL CXS 12-1981 [Internet]. Disponible sur: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012f.pdf
42. myhubert. Le miel d'acacia : un aliment naturel ultra puissant ! [Internet]. Hubert. 2018 [cité 14 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.myhubert.com/miel-dacacia/>
43. Miel de tournesol [Internet]. [cité 21 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.guide-du-miel.com/lesmiels/Miel-de-tournesol.html>
44. Le tournesol en apiculture : floraison, vertus et intérêt [Internet]. [cité 14 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.apiculture.net/blog/plante-mellifere-le-tournesol-n219>
45. Miel de Colza : conservation, vertus et récolte [Internet]. [cité 21 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.apiculture.net/blog/tout-savoir-sur-le-miel-de-colza-n145>
46. Caractéristiques et Bienfaits du Miel de Châtaignier [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.apiculture.net/blog/savoir-miel-de-chataignier-n111>
47. Miel de châtaignier [Internet]. [cité 21 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.guide-du-miel.com/lesmiels/Miel-de-chataignier.html>
48. Miel de romarin [Internet]. [cité 22 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.guide-du-miel.com/lesmiels/Miel-de-romarin.html>
49. Le rhododendron en apiculture : floraison, vertus et intérêt [Internet]. [cité 21 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.apiculture.net/blog/plante-mellifere-le-rhododendron-n236>
50. Lois de Snell-Descartes. In: Wikipédia [Internet]. 2020 [cité 15 nov 2020]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Lois_de_Snell-Descartes&oldid=176576807
51. Le réfractomètre, un outil essentiel [Internet]. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur:

http://www.cari.be/medias/abcie_articles/122_refractometre.pdf

52. Rapport d'essai [Internet]. [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: http://www.cari.be/analyses_pdf/Saison_15_16_PDF/A_18088_20151002_Fin.pdf
53. Hydroxyméthylfurfural. In: Wikipédia [Internet]. 2020 [cité 16 nov 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Hydroxym%C3%A9thylfurfural&oldid=168807723>
54. Les analyses [Internet]. [cité 27 avr 2020]. Disponible sur: <http://cetam.fr/site/2010/07/24/les-analyses/>
55. Liquid chromatography–mass spectrometry. In: Wikipedia [Internet]. 2020 [cité 16 nov 2020]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry&oldid=986522968
56. Phenomenex Strata XL 200 [Internet]. [cité 16 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/XL,%20Polymeric%20Reversed%20Phase?phaseTab=true>
57. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. juin 2015;12(6):523-6.
58. Tsugawa H, Kind T, Nakabayashi R, Yukihiro D, Tanaka W, Cajka T, et al. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal Chem*. 16 août 2016;88(16):7946-58.
59. Dictionary of Natural Products 29.1 Chemical Search [Internet]. [cité 17 nov 2020]. Disponible sur: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml;jsessionid=7EE07DF3CAAC46AB4CB03724211FABE2>
60. Kushenol A and 8-prenylkaempferol, tyrosinase inhibitors, derived from *Sophora flavescens*. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [cité 21 sept 2020]. Disponible sur: <https://europepmc.org/article/med/29873272>
61. Huang W-C, Gu P-Y, Fang L-W, Huang Y-L, Lin C-F, Liou C-J. Sophoraflavanone G from *Sophora flavescens* induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. août 2019;61:152852.

62. Sun Z-L, Sun S-C, He J-M, Lan J-E, Gibbons S, Mu Q. Synergism of sophoraflavanone G with norfloxacin against effluxing antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 1 sept 2020;56(3):106098.
63. Sakagami Y, Mimura M, Kajimura K, Yokoyama H, Linuma M, Tanaka T, et al. Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents. *Lett Appl Microbiol*. août 1998;27(2):98-100.
64. Yoshimura K, Hosoya T, Fujinami M, Ohta T, Kumazawa S. Nymphaeol-C, a prenylflavonoid from *Macaranga tanarius*, suppresses the expression of fibroblast growth factor 18. *Phytomedicine*. 1 déc 2017;36:238-42.
65. Jansen SA, Kleerekooper I, Hofman ZLM, Kappen IFPM, Stary-Weinzinger A, van der Heyden MAG. Grayanotoxin poisoning: « mad honey disease » and beyond. *Cardiovasc Toxicol*. sept 2012;12(3):208-15.
66. Zhang Y, Jiang P, Ye M, Kim S-H, Jiang C, Lü J. Tanshinones: Sources, Pharmacokinetics and Anti-Cancer Activities. *Int J Mol Sci*. 22 oct 2012;13(10):13621-66.
67. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci [Internet]*. 15 mars 2019 [cité 21 oct 2020];20(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6472148/>
68. Jang S, Kelley KW, Johnson RW. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 mai 2008;105(21):7534-9.
69. Boots AW, Drent M, de Boer VCJ, Bast A, Haenen GRMM. Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin Nutr Edinb Scotl*. août 2011;30(4):506-12.
70. Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, et al. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem [Internet]*. 29 juill 2017 [cité 21 oct 2020];22(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152094/>
71. Colunga Biancatelli RML, Berrill M, Catravas JD, Marik PE. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Front Immunol [Internet]*. 19 juin 2020 [cité 21 oct 2020];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7318306/>
72. Leber A, Hontecillas R, Tubau-Juni N, Zoccoli-Rodriguez V, Goodpaster B,

Bassaganya-Riera J. Abscisic acid enriched fig extract promotes insulin sensitivity by decreasing systemic inflammation and activating LANCL2 in skeletal muscle. *Sci Rep.* 26 juin 2020;10(1):10463.

73. Zocchi E, Hontecillas R, Leber A, Einerhand A, Carbo A, Bruzzone S, et al. Abscisic Acid: A Novel Nutraceutical for Glycemic Control. *Front Nutr* [Internet]. 2017 [cité 18 oct 2020];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2017.00024/full>
74. PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTI-OXIDATIVE PROPERTIES OF LANDOLPHIA HEUDELOTTI ROOTS | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH [Internet]. [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: <https://ijpsr.com/bft-article/phytochemical-constituents-and-anti-oxidative-properties-of-landolphia-heudelotti-roots/?view=fulltext>
75. Li F, Nitteranon V, Tang X, Liang J, Zhang G, Parkin KL, et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of 1-dehydro-[6]-gingerdione, 6-shogaol, 6-dehydroshogaol and hexahydrocurcumin. *Food Chem.* 15 nov 2012;135(2):332-7.
76. Alday E, Valencia D, Carreño AL, Picerno P, Piccinelli AL, Rastrelli L, et al. Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact.* 5 déc 2015;242:35-44.
77. Calvo MI. Three new homoisoflavanones from the bulbs of *Ledebouria floribunda*. *Fitoterapia.* 1 oct 2009;80(7):394-8.

Annexes

Annexe 1 : Tableau des échantillons

N°	Essence	Origine	Année
2	Acacia	Plantaurel, Haute Garonne	2019
10	Acacia	Haute Garonne	2018
16	Acacia	Ardèche	2018
22	Acacia	Sainte Croix-Volvestre Ariège	2019
4	Châtaigner	Montfa, Ariège	2018
5	Châtaigner	Ariège	2018
12	Châtaigner	Ariège	2019
17	Châtaigner	Ardèche	2018
3	Colza	Bérat Haute Garonne	2018
24	Colza	Plantaurel, Haute Garonne	2018
25	Colza	Sud-Ouest	2018
26	Colza	Bérat Haute Garonne	2019
15	Tournesol	Espagne	2018
23	Tournesol	Plantaurel, Haute Garonne	2018
19	Lavande	Ardèche	2019
20	Lavande	Ardèche	2019
21	Lavande	Ardèche	2019
8	Romarin	Haute Garonne	2018
9	Romarin	Espagne	2019
11	Romarin	Ardèche	2019
13	Romarin	Haute Garonne	2019
14	Romarin	Espagne	2019

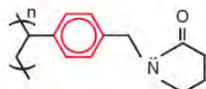
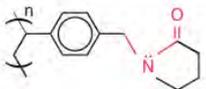
TN-0029

GENERAL METHODS

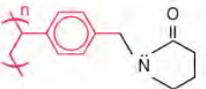
Strata™-XL General Method for the Extraction of Neutral Compounds

Strata-XL is a large particle, reversed phase functionalized polymeric sorbent that gives strong retention of neutral, acidic, or basic compounds under aggressive, high organic wash conditions.

This sorbent retains analytes by several different mechanisms:

 π - π BondingHydrogen Bonding,
Dipole-Dipole Interaction

Hydrophobic Interaction

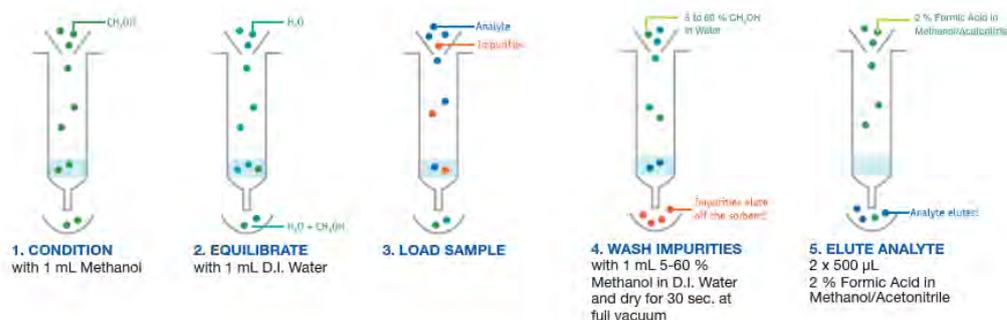
**Strata-XL Method for General Screening**

Note: Method uses solvent volumes appropriate for a 30 mg sorbent mass. For larger or smaller masses, refer to Technical Note TN-013.

Suggested Optimization Steps:

For better clean up and to elute stubborn, strongly retained analytes, be more aggressive in the wash step and increase the strength of the elution solvents.

	Polar Compounds	Acidic Compounds	Basic Compounds
1. Condition:	Methanol	Methanol	Methanol
2. Equilibrate:	D.I. Water	2 % Acetic Acid in D.I. Water	2 % NH ₄ OH in D.I. Water
3. Load:	Diluted sample	Diluted sample with 2 % Acetic Acid	Diluted sample with 2 % NH ₄ OH
4. Wash:	10 to 50 % Acetonitrile or Methanol in Water	2 % Acetic Acid in Methanol/ D.I. Water (10 to 50 % Methanol)	2 % NH ₄ OH in Methanol/ D.I. Water (10 to 50 % Methanol)
5. Elute:	Methanol/ Acetonitrile/ Acetic Acid (50:50:0.1)	2 % NH ₄ OH in Methanol	2 % Acetic Acid in Methanol



HONEY LC/MS ANALYSIS AND THERAPEUTIC INTEREST

KEYWORDS : Honey – Analysis -Mass spectrometry – Secondary – metabolites-
Therapeutic use – Beekeeping

ABSTRACT :

With a growing demand for a return to natural medicines, honey has experienced in recent years a renewed interest in its use in health. It is a complex substance, both plant and animal, which needs human intervention through the work of beekeepers. It has surprising healing and antiinfectious properties. However, its use in therapeutics requires its characterization and precise study thanks to modern analytical chemistry techniques. In this context, we were interested in the relevance of the use of mass spectrometry, a tool that is as recent as it is effective, in the in-depth study of the composition of honey. Among the many compounds found in honey, we chose to focus on the secondary metabolites of plants.

ANALYSE LC/MS DU MIEL ET SON INTERET EN SANTE

RESUME :

Avec une demande grandissante d'un retour à des médecines naturelles, le miel connaît depuis quelques années un regain d'intérêt quant à son utilisation en santé. C'est une substance complexe, à la fois végétale et animale, qui requiert également l'intervention humaine au travers du travail des apiculteurs. On lui prête d'étonnantes propriétés cicatrisantes et antiinfectieuses. Cependant, son utilisation en thérapeutique nécessite sa caractérisation et son étude précise grâce aux techniques de chimie analytiques modernes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la pertinence de l'utilisation de la spectrométrie de masse, un outil aussi récent que performant, dans l'étude approfondie de la composition du miel. Parmi les nombreux composés retrouvés dans le miel, nous avons choisi d'axer la recherche sur les métabolites secondaires des plantes.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie

MOTS-CLES : Miel - Analyse - Spectrométrie de masse - Métabolites secondaires - Thérapeutique - Apiculture

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier Toulouse III
Faculté des sciences pharmaceutiques
35 chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 9, France

Directeur de thèse : MARTI Guillaume