

Les antibiotiques et l'apiculture Conséquences sur la qualité sanitaire des miels

Anne-Claire MARTEL*, Paul SCHWEITZER**, Cynthia CAILTEAU*** et Jean-Paul FAUCON*

* Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) Site de Sophia Antipolis, Laboratoire d'études et de recherches sur les ruminants et les abeilles, Unité de Pathologie de l'Abeille, 105 route des Chappes, F-06902 Sophia Antipolis Cedex, France

** Centre d'Etudes Techniques Apicoles de Moselle (CETAM), Laboratoire d'analyses et d'écologie apicole, 1A, Rue Jean Baptiste de la Salle, F-57310 Guénange, France

*** Université Paul Verlaine, IUT de Thionville-Yutz, Département de Génie Biologique, Impasse Alfred Kastler F-57910 Yutz, France

Résumé :

L'utilisation des antibiotiques en apiculture peut être à l'origine de la contamination du miel. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de résidus de tétracyclines dans le miel. Cependant, aucune limite maximale en résidus n'est définie pour ces substances dans cette matrice. Dans cet article, nous rappelons les mesures réglementaires qui encadrent les médicaments vétérinaires ainsi que les méthodes d'analyse appliquées pour la recherche de ces résidus dans le miel. Dans le cadre des concours de miels organisés chaque année en France, certains règlements ne prévoient aucun contrôle de résidus de contaminants. Par conséquent, un échantillonnage de miels de concours récoltés en 2007 a été réalisé. Les résidus de tétracyclines ont été recherchés à l'aide de deux méthodes d'analyse (ELISA et LC/MS/MS). Les résultats montrent la présence de résidus de tétracycline dans certains échantillons à des teneurs parfois élevées, ce qui entache l'image de marque du miel. Il ressort de cette étude que la recherche de résidus de contaminants devrait être prise en compte dans les règlements des concours et que l'harmonisation des méthodes d'analyse est indispensable. Sur le plan de la pratique apicole, les apiculteurs doivent être à nouveau sensibilisés des risques de contamination du miel lors de l'utilisation des antibiotiques.

Mots clés : tétracyclines ; miel ; résidus ; LMR ; analyse

Summary :

The use of antibiotics in beekeeping entails the contamination of honey. Several studies have shown the presence of tetracyclines residues in honey. However, no maximum residue limit has been defined for these substances in this matrix. In this paper, the statutory measures which supervise veterinary drugs and the analytical methods applied for the determinations of residues in honey are reviewed. In the frame of honey contests organized every year in France, some rules do not require the control of contaminants residues. Consequently, a sampling of honey harvested in 2007 during agricultural contests was done. Residues of tetracyclines were searched by two analytical methods (ELISA and LC/MS/MS). Results show the presence of tetracycline residues in some samples at levels that can sometimes affect the image of the honey. The conclusions of this study are that the search for residues of contaminants should be taken into account in the rules of agricultural contests and that the harmonization of analytical methods is necessary. For the beekeeping management, beekeepers must be aware of risks of honey contamination following the antibiotic treatments.

Keywords : tetracyclines; honey; residues; MRL; analysis

1. Introduction

Depuis plusieurs années, certains antibiotiques, notamment les tétracyclines, sont utilisés en apiculture pour lutter contre les maladies bactériennes du couvain (loques américaine et européenne). Aucune limite maximale en résidus (LMR) n'a été définie pour ces substances dans le miel. Ces médicaments ne possèdent donc pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'abeille. La mise en œuvre des traitements antibiotiques est alors délicate car il faut s'assurer de l'absence de résidus dans les produits de la ruche. Dans cet article, nous faisons le point sur les mesures réglementaires prises pour la gestion des risques que les traitements vétérinaires à base d'antibiotiques peuvent entraîner pour la santé publique.

Nous abordons également les méthodes d'analyses mises en œuvre pour la recherche de ces résidus dans le miel, préalable indispensable en vue du contrôle de la qualité des produits de la ruche. Nous présentons ensuite les résultats de l'enquête réalisée sur des miels de concours produits en 2007 et provenant des principales régions françaises. La présence de résidus entache l'image de qualité des miels et nous amène à revenir sur les problèmes que pose l'utilisation des antibiotiques en apiculture (Faucon *et al*, 2001 ; Bogdanov, 2006).

2. Le point sur les mesures réglementaires qui encadrent les médicaments vétérinaires

Les antibiotiques ont été introduits en médecine vétérinaire au début des années 1950 pour lutter contre les infections bactériennes. Mais l'emploi des anti infectieux chez les animaux d'élevage peut contaminer la filière de production et entraîner la présence de résidus dans le produit final. Les conséquences pour la santé publique sont de deux ordres. Les antibiotiques peuvent d'une part, créer une pression de sélection favorisant l'émergence de certaines bactéries résistantes et d'autre part, la teneur en résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale peut atteindre des niveaux toxiques pour le consommateur.

Face à ces risques microbiologiques et toxicologiques, des mesures réglementaires ont été prises pour sécuriser les denrées alimentaires d'origine animale. Dans un mémoire présenté dans le Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France (Dehaumont et Moulin, 2005), le directeur de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) constate que l'augmentation des exigences réglementaires et scientifiques a contribué au déficit croissant de médicaments vétérinaires. Ce déficit est particulièrement marqué pour les «petites» filières animales qui ne constituent pas un marché important pour les industriels du médicament. C'est le cas notamment pour la filière apicole.

Le point de départ de la législation française est la loi sur la pharmacie vétérinaire de 1975 et ses décrets d'applications parus à partir de 1977. Les principales dispositions relatives au médicament vétérinaire sont rassemblées dans le Code de la Santé Publique et le Code Rural. Par ailleurs, la réglementation française est étroitement liée à la réglementation communautaire. Le règlement CEE N°2377/90 du 26 juin 1990 établit la procédure communautaire pour la fixation des LMR. Pour demander une AMM afin de commercialiser un médicament vétérinaire, il est indispensable d'établir une LMR. La demande d'AMM doit pour la France être déposée auprès de l'ANMV, en l'accompagnant d'un dossier composé de 5 parties dont la partie IIIA concerne la toxicologie et la partie IIIB les résidus. Pour les antibiotiques, un temps d'attente minimal doit être défini. Il correspond à la période nécessaire entre la dernière administration du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi, précisées dans le dossier d'AMM et l'obtention des denrées alimentaires afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux LMR fixées. Il doit être défini pour chaque espèce animale et pour chaque type d'aliment produit. Mais, compte tenu du coût élevé des études scientifiques nécessaires pour établir les dossiers de LMR, seules les espèces les plus importantes dites «majeures» ont fait l'objet de travaux. Ainsi, pour les abeilles, espèce dite «mineure», aucun antibiotique n'a pu faire l'objet d'une demande d'AMM, ce qui pose le problème du traitement médicamenteux des maladies bactériennes du couvain.

Concernant les tétracyclines utilisées depuis plusieurs années en apiculture, la note de service DGAL/SDSPA/N2005-8046 propose un protocole comprenant un traitement aux tétracyclines adapté aux ruchers atteints de loque américaine et de loque européenne. Le traitement aux antibiotiques est intégré dans un ensemble de pratiques apicoles qui doivent être strictement respectées notamment

le transvasement¹, l'élimination du miel de corps de ruche avant la pose des hausses et l'élimination du miel de la récolte annuelle. En cas d'utilisation de ces antibiotiques, une ordonnance vétérinaire est obligatoire et doit être jointe au registre d'élevage.

Une étude menée par MARTEL *et al* (2006) sur le rucher expérimental de l'AFSSA Sophia Antipolis a consisté à suivre le devenir de la tétracycline au sein des ruches traitées et dans le miel produit dans ces conditions. L'étude a montré que les antibiotiques appliqués dans la ruche sont très rapidement incorporés dans le miel. Les résidus de tétracycline ont été retrouvés à des taux non négligeables (teneur moyenne égale à 1,54 mg/kg et 0,15 mg/kg après application de l'antibiotique par sirop et par poudrage respectivement) dans le miel récolté jusqu'à 5 mois après le traitement de la ruche, mais par contre, ces résidus ne sont généralement plus détectés l'année suivante. Nous avons également constaté que le mode d'application de l'antibiotique a une importance sur le niveau de contamination des miels. En effet, les miels issus des ruches dont l'antibiotique est appliqué avec du sirop contiennent des teneurs en résidus de tétracycline 10 fois supérieures à ceux issus des ruches qui reçoivent l'antibiotique par poudrage avec du sucre. Enfin, il faut aussi tenir compte du phénomène de dérive² des abeilles qui entraîne la contamination du miel entre ruches les plus proches. Dans notre expérimentation, nous avons pu mettre en évidence ce phénomène avec la tétracycline en détectant des résidus dans certaines ruches témoins n'ayant pas reçu de traitement antibiotique et situées entre 20 et 45 mètres de celles traitées. Par contre, nous n'avons pas trouvé de résidus de tétracycline dans les ruches témoins éloignées de 3 km des ruches traitées. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de l'étude de Thompson *et al* (2005). Ces auteurs ont observé que l'application dans les colonies de la Terramycine, soit 1 g d'oxytétracycline (matière active) dans 200-250 ml de solution sucrée, entraîne des résidus d'oxytétracycline détectables à une teneur élevée égale à 3,7 mg/kg huit semaines après l'application.

L'ensemble de ces résultats montre qu'après une administration de tétracyclines pour traiter une colonie, le miel de la ruche est contaminé et ne doit par conséquent, ni être livré à la consommation humaine, ni être réutilisé pour le nourrissage³ des abeilles. Ceci résulte de l'absence de réglementation concernant les LMR et de médicament vétérinaire adapté à la problématique apicole. Pour le miel, des discussions au niveau européen sont en cours pour proposer une LMR à 25 µg/kg pour l'oxytétracycline (EMEA).

Dans ce contexte, les analyses de miel présentent évidemment un intérêt pour s'assurer de l'absence de résidus.

3. La surveillance des résidus d'antibiotiques dans le miel

Selon la directive 96/23/CE, des contrôles de résidus sont réalisés chaque année sur les denrées d'origine animale. Concernant la filière apicole, les plans de contrôle des résidus sont mis en place chaque année en France par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) sur des miels français prélevés par les Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV) dans les principales régions de production. Dans ce cadre officiel, divers analytes (pesticides, antibiotiques et métaux lourds) sont recherchés dans les miels par le laboratoire de l'AFSSA Sophia Antipolis parmi lesquels figurent les tétracyclines.

Plusieurs méthodes peuvent être mises en œuvre pour la recherche des résidus dans le miel :

- des méthodes de dépistage : Tetrasensor (REYBROECK *et al*, 2007) et Charm II,
- des méthodes semi-quantitatives comme la méthode ELISA basée sur les réactions antigène-anticorps,
- des méthodes quantitatives : les techniques de chromatographie liquide comme la CLHP avec le détecteur à barrette de diodes (DAD) et la technique de confirmation, la CLHP couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM/SM) (Debayle *et al*, 2008).

Chaque méthode a ses propres performances qu'il faut connaître et prendre en compte pour interpréter les résultats. En particulier, le seuil de détection est déterminant pour définir le seuil de non-conformité du miel analysé.

¹ Définition du transvasement : pratique apicole qui consiste à récupérer les abeilles d'une ruche et à les placer dans une nouvelle ruche équipée de cadres vides construits ou de cadres de cire gaufrée.

² Définition de la dérive : erreur des butineuses qui se trompent de ruche et déposent leur récolte dans les ruches voisines de leur propre ruche.

³ Définition du nourrissage : apport de nourriture (sucre, miel, sirop) fait par l'apiculteur qui pallie à l'insuffisance des provisions d'une colonie.

Pour établir un bilan des méthodes employées pour la recherche des résidus d'antibiotiques au niveau européen, l'AFSSA Sophia Antipolis a organisé en 2005, en collaboration avec l'AFSSA Fougères (laboratoire communautaire de référence pour les résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale), une étude inter-laboratoire sur les analyses pratiquées par 40 laboratoires de 20 pays différents.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un groupe de travail sur les résidus dans les produits de la ruche de la Commission Internationale du Miel (IHC) (MARTEL *et al*, 2005) en vue d'une harmonisation des méthodes d'analyses. Elle portait sur les techniques de recherche de la tétracycline et du sulfathiazole pouvant se retrouver dans le miel. Cette étude inter-laboratoire (EIL) nous a permis de constater qu'il n'existait pas de faux positifs quelle que soit la méthode d'analyse utilisée par les participants. Par contre, les faux négatifs parfois observés révèlent les limites de détection qui varient selon les méthodes. D'autre part, nous avons observé que les teneurs en tétracyclines obtenues avec la méthode ELISA s'avèrent en général 2 à 3 fois plus élevées que celles obtenues avec la chromatographie liquide. La plupart des laboratoires ont été capables de détecter la tétracycline présente à une concentration supérieure à 20 µg/kg de miel, quelle que soit la technique utilisée.

4. Recherche de résidus de tétracyclines dans des miels produits en France en 2007

Dans le cadre des concours de miels organisés chaque année par les associations d'apiculteurs, des analyses physico-chimiques sont effectuées concernant les critères de qualité tels que l'humidité, l'hydroxy-méthyl-furfural (HMF), les sucres, l'analyse pollinique. Aucun contrôle n'est généralement réalisé concernant les résidus de contaminants à l'exception de certains concours où la recherche des résidus de tétracyclines est imposée. Ainsi, par exemple, le règlement du concours régional des miels de Lorraine pour 2008 prévoit dans son article 6 la recherche d'antibiotiques.

Une étude a été faite par le Centre d'Etudes Techniques Apicoles de Moselle (CETAM) dans le but d'évaluer les teneurs en tétracyclines sur un échantillonnage le plus représentatif possible de miels français. Le choix s'est donc porté sur les miels suivants :

- les miels présentés au Concours Général Agricole (CGA) car ils proviennent de l'ensemble du territoire français, y compris des DOM-TOM. En 2008, 72 apiculteurs ont présenté au CGA 169 échantillons de miel récoltés en 2007.
- les miels vendus à la Foire aux Miels de Montauban qui regroupe des producteurs originaires d'un grand quart sud-ouest allant du Bassin méditerranéen au Poitou-Charentes. En 2007, 28 apiculteurs participaient à la Foire de Montauban en présentant 121 échantillons de miel.

Les règlements de ces 2 manifestations ne prévoient aucun contrôle de résidus de contaminants. Dans ce cadre, 290 échantillons ont été présentés par 100 apiculteurs.

Dans un premier temps, le CETAM s'est limité à l'analyse d'un seul miel par apiculteur, soit au total 100 échantillons. Lorsque les apiculteurs ont présenté plusieurs miels, les appellations les plus printanières ont été retenues car ce sont souvent les miels les plus contaminés par les tétracyclines du fait des pratiques apicoles. En effet, les traitements ont souvent lieu à l'automne précédent ou au début du printemps. Chaque miel a été analysé 3 fois par la méthode ELISA (R-Biopharm) avec une limite de détection de 15 µg/kg et une limite de quantification de 25 µg/kg.

Dans un deuxième temps, lorsqu'un miel a été trouvé positif au premier contrôle, tous les autres miels éventuellement disponibles de l'apiculteur concerné ont été également analysés.

Sur les 100 miels analysés, 9 présentent des teneurs en résidus de tétracyclines supérieures ou égales à 15 µg/kg. Le tableau 1 rassemble les résultats des recherches de tétracyclines dans les miels des apiculteurs chez lesquels des résidus ont été détectés lors de la première série d'analyses et les résultats pour les autres miels de ces mêmes apiculteurs lorsqu'ils étaient disponibles. L'origine florale de ces miels est aussi indiquée.

Tableau 1 : Résultats des recherches réalisées en ELISA par le CETAM sur les 9 échantillons positifs lors de la première série d'analyses et sur les échantillons disponibles provenant des mêmes apiculteurs lors de la deuxième série d'analyses

1 ^{ère} série d'analyses			2 ^{ème} série d'analyses	
N° des miels	Origine florale	Moyenne ($\mu\text{g}/\text{kg}$) sur 3 analyses	Nombre de miels supplémentaires du même apiculteur	Moyenne ($\mu\text{g}/\text{kg}$) sur 3 analyses
1	Rhododendron	635	0	/
2	Colza	65	2	<LD <LD
3	Polyfloral foncé	27	0	/
4	Acacia	1217	2	193 697
5	Acacia	26	4	<LD <LD <LD <LD
6	Acacia	345	4	578 635 826 <LD
7	Lavande	traces (15)	0	/
8	Colza	649	6	636 33 199 876 115 <LD
9	Miel de fleurs (printemps)	142	3	89 112 64

LD : limite de détection

Pour confirmation des résultats et identification de la molécule, le CETAM a envoyé à l'AFSSA Sophia Antipolis 10 miels dont 9 échantillonnés parmi les miels positifs. La technique utilisée (CL/SM/SM) a une limite de détection et de quantification respectivement de $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ et de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Les analyses ont identifié la présence de résidus de tétracycline dans 9 miels sur 10. Les résultats obtenus en ELISA sont 2,5 à 8 fois supérieurs à ceux obtenus en CL/SM/SM. Les teneurs des miels analysés en chromatographie liquide varient de 11 à $474 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Tableau 2).

Tableau 2 : Identification par l'AFSSA Sophia Antipolis des résidus de tétracycline dans les miels français envoyés par le CETAM pour confirmation

N° des miels	Origine florale	Département	Résultats ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
			ELISA	CL/SM/SM
1	Rhododendron	11	635	147,6
2	Colza	17	65	traces (8,1)
3	Polyfloral foncé	70	27	10,8
4	Acacia	63	1217	474,2
5	Acacia	09	26	< LD
6	Acacia	63	345	117,9
7	Lavande	13	traces (15)	< LD
8	Colza	81	649	131,7
9	Miel de fleurs (printemps)	81	142	27,8
10	Pissenlit	82	< LD	< LD

L'utilisation de deux techniques différentes (ELISA et CL/SM/SM) explique les différences de résultats observées. Celles-ci ne sont cependant pas contradictoires. Elles sont en accord avec les conclusions de l'EIL réalisée en 2005 par notre laboratoire dans le cadre de l'IHC. Cela montre l'importance de la standardisation des méthodes d'analyses qui doivent être validées dans chaque laboratoire. Une harmonisation assurée par l'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) reste indispensable pour permettre de mieux interpréter les résultats d'analyses.

5. Conclusion

Actuellement, aucune LMR n'a été définie pour les résidus d'antibiotiques dans le miel ce qui entraîne l'impossibilité pour les industriels du médicament vétérinaire de proposer une spécialité adaptée à la filière apicole pour le traitement des maladies bactériennes. Pour les apiculteurs, cette situation rend la mise en œuvre des traitements antibiotiques délicate car ils doivent s'assurer de l'absence de résidus dans les produits de la ruche.

Cette enquête montre que les miels français livrés à la consommation peuvent présenter des résidus de tétracycline. Ils devraient être retirés de la vente. Le nombre de miels trouvés positifs et les teneurs parfois atteintes entachent fortement l'image de marque du miel, cela d'autant plus que certains de ces miels ont été primés à des concours renommés. Les apiculteurs concernés ont été informés de ces résultats. Ils sont soucieux d'améliorer leur production.

Deux types d'enseignements doivent être tirés de cette étude :

- dans le cadre des concours de miels organisés chaque année par les associations d'apiculteurs, des analyses physico-chimiques sont effectuées pour s'assurer de la qualité des miels. Mais, ces analyses ne visent généralement pas la recherche de contaminants. Le règlement des concours devrait prendre en compte cet aspect.
- concernant les analyses de résidus dans le miel, l'harmonisation des méthodes d'analyse est indispensable afin d'éviter que des résultats divergents d'un laboratoire à un autre soient une source de litiges et pénalisent les échanges commerciaux.

6. Références

FAUCON J.P., MARTEL A.C., ANTINELLI J.F., CLÉMENT M.C., ZEGGANE S., CORDELLA C., DAVICO R., ROGNONE C. et AURIÈRES C. 2001 - Sondage sur la qualité des miels de lavande-lavandin, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 91, n°956, 251-261.

BOGDANOV S. 2006 – Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1-18.

DEHAUMONT P. et MOULIN G. 2005 - Evolution du marché des médicaments vétérinaires et de leur encadrement réglementaire : conséquence sur leur disponibilité, *Bull. Acad. Vét. France*, 158, n°2, 125-136.

Règlement (CEE) N°2377/90 du Conseil, du 26 juin 1990, établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1990R2377:20050711:FR:PDF>, consulté en 2008.

Note de service DGAL/SDSPA/N2005-8046 (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité). <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/dgaln20058046z.pdf>, consulté en 2008.

MARTEL A.C., ZEGGANE S., DRAJNUDEL P., FAUCON J.P. et AUBERT M. 2006 - Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Additives and Contaminants*, 23 (3), 265-273.

THOMPSON H.M.; WAITE R.J.; WILKINS S.; BROWN M.A.; BIGWOOD T.; SHAW M.; RIDGWAY C. et SHARMAN M. 2005 - Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood. *Food Additives and Contaminants*, 22, Issue 6, 573 – 578.

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (EMA). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/press/pr/4930607en.pdf>, consulté en 2008.

Directive 96/23/CE du Conseil, du 29 avril 1996, relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE. *Journal officiel* n° L 125 du 23/05/1996 p. 0010 – 0032. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0023:FR:HTML>, consulté en 2008.

REYBROECK W., OOGHE S., DE BRABANDER H. et DAESELEIRE E. 2007 - Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey, *J. Agric. Food Chem.*, 55, Issue 21, 8359-8366.

DEBAYLE D., DESSALCES G. et GRENIER-LOUSTALOT M.F. 2008 – Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1011-1020.

MARTEL A.C., ZEGGANE S. et HALIMI C. 2005 – Report Results of collaborative trial on antibiotic residues in honey, Study code : IHC 2005, AFSSA Sophia Antipolis, France, 40 p.

Règlement du concours régional des miels de Lorraine 2008 - http://www.cetam.info/IMG/pdf/Reglement_concours_2008.pdf, consulté en 2008.

Règlement du concours général agricole 2008 - http://www.cga-paris.com/documents/produits_reglement.pdf, consulté en 2008.