



HAL
open science

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : origine biosynthétique, toxicité et répartition environnementale

William Faure

► To cite this version:

William Faure. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : origine biosynthétique, toxicité et répartition environnementale. Sciences pharmaceutiques. 2024. <dumas-05224203>

HAL Id: dumas-05224203

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-05224203v1>

Submitted on 26 Aug 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2024

N° :

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le vendredi 28 juin 2024

par

William FAURE

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : origine biosynthétique, toxicité et répartition environnementale

Directrice de thèse : **Mme Catherine FELGINES**

Jury :

Présidente :

Mme Catherine FELGINES

Maître de Conférences,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres :

M. Pascal COUDERT

Professeur des Universités,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Caroline PEYRODE

Maître de Conférences,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

M. Bruno BORDAS

Docteur en Pharmacie,
Pharmacie BORDAS à Messeix

UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2024

N° :

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le vendredi 28 juin 2024

par

William FAURE

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : origine biosynthétique, toxicité et répartition environnementale

Directrice de thèse : **Mme Catherine FELGINES**

Jury :

Présidente :

Mme Catherine FELGINES

Maître de Conférences,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres :

M. Pascal COUDERT

Professeur des Universités,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Caroline PEYRODE

Maître de Conférences,
UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

M. Bruno BORDAS

Docteur en Pharmacie,
Pharmacie BORDAS à Messeix

Remerciements

À Mme Felgines d'avoir accepté de diriger ma thèse et de présider le jury de ma soutenance. Je tiens également à vous remercier pour vos retours rapides, vos conseils judicieux, vos remarques pertinentes et d'avoir aussi su tempérer mes ardeurs rédactionnelles et mon incorrigible prolixité. Je suis sincèrement honoré d'avoir pu rédiger ma thèse sous votre direction.

À Mme Peyrode et M. Coudert d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je vous remercie pour la qualité de votre enseignement que vous avez toujours dispensé avec passion. Une passion contagieuse qui attisa ma curiosité pour vos domaines respectifs durant mes années d'étude et qui perdure encore aujourd'hui.

À M. Bordas de m'avoir pris sous son aile dès le début de mes études, de bien avoir voulu être mon Maître de stage tout au long de ces années et de m'avoir prodigué tout son savoir. Bruno, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as toujours chaleureusement accueilli ; tu n'as pas cessé de m'encourager ; et surtout, surtout, tu m'as indéfectiblement soutenu même quand j'étais au cœur des plus sombres tempêtes. Je suis tellement fier d'être à présent l'un de tes confrères !

À mes parents, Maman et Papa, de m'avoir transmis votre attrait pour les sciences, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu durant tout mon parcours scolaire. Je vous dois la majeure partie de ce que je suis aujourd'hui et sans vous toute ma vie n'aurait été que vide et tristesse. Je ne le vous dis presque jamais mais sachez que je vous aime plus que tout.

À mes grands-parents, Mémé Josette, Pépé Michel, Mémé Marie-Claude et Pépé Armand, de m'avoir donné le goût des choses simples et de m'avoir inculqué le respect de la Nature. Vous serez toujours au fond de mon cœur et dans ma mémoire pour tous les merveilleux moments que nous avons partagés. Des promenades vespérales d'été aux matins enneigés de décembre, vous avez marqué mon enfance et embellissez depuis ma vie par votre éternelle bienveillance ; je vous aime.

À mon frère, Axel, d'avoir été là toutes ces années, même discrètement, et de m'avoir soutenu durant toute la rédaction de ma thèse. Je sais que je prends beaucoup de place et que tu ne peux t'épanouir totalement ; mais tu es mon petit frère et mon rôle est de te rendre la vie plus facile. Je ne cesserai donc jamais de vouloir ton bonheur afin de te revoir rire et sourire comme autrefois. Je t'aime Axel.

À ma sœur, Charlotte, de m'avoir encouragé et soutenu pendant toute la rédaction de ma thèse. Malgré ton emploi du temps chargé, j'apprécie sincèrement que tu trouves toujours un créneau pour passer du temps avec moi, cela me comble de joie. Aujourd'hui tu es certes devenue une femme mais tu seras à jamais ma petite sœur et je veillerai tout au long de ma vie à te protéger. Je t'aime Charlotte.

À Nounou, ma petite Louise d'amour, de m'accompagner chaque jour de ma vie depuis la fin de mes études. De ton regard tu m'as envoûté, de ta tendresse tu m'as apaisé ; sans toi je crois que je me serais totalement perdu, tu es devenue ma boussole, mon phare dans la nuit. Je suis tellement heureux de pouvoir partager chaque instant de mon existence avec toi, ma petite fleur pleine de douceur. Je t'aime de tout mon cœur ma Louise chérie.

À Sibylle d'être ce petit rayon de soleil qui embellit mes journées. Tu es la plus adorable des créatures, pleine de fougue et d'empathie. Et comment ne pas avoir également une brève pensée pour cette petite chipie de Bianca.

À Fabienne de m'avoir accueilli à bras ouverts dans sa famille. Tu as été si généreuse envers moi sans rien attendre en retour. Grâce à ton dévouement tu m'as permis d'avancer sur ma thèse bien plus que je ne l'aurais pu. Merci.

À mes amis de ma tendre jeunesse, les compères de toujours :

À Mathilde d'être présente dans ma vie depuis plus de vingt ans. Nous nous sommes brièvement perdus de vue mais je me réjouis de t'avoir à nouveau à mes côtés pour célébrer tout et n'importe quoi. Ton éternel entrain éclaira toutes ces nuits festives que nous passâmes ensemble et brille encore dans les vagues souvenirs que j'en conserve.

À Benjamin de m'avoir adressé la parole il y a presque quinze ans, à notre premier jour au collège. Grâce à toi, j'ai pu faire partie d'un clan d'amis qui subsiste encore de nos jours. Je te remercie également pour ton hospitalité qui engendra une nuée de soirées plus mémorables les unes que les autres.

À Arnaud d'avoir été cet indéboulonnable compagnon de route durant de très nombreuses années avant que nos chemins ne divergent légèrement. Ma vie aurait été beaucoup plus terne et fade si je ne t'avais jamais rencontré mon très cher ami.

À Benjamin d'être cet ami autant jovial qu'imprévisible. Il est vrai qu'au fil des ans nous avons fait les quatre cents coups ensemble ; toutes ces innombrables virées rocambolesques en des lieux incongrus qui resteront à jamais gravées dans nos mémoires !

À Maëlle, dite Malou, d'être cette amie autant loyale qu'attentionnée. Une soirée est toujours plus agréable quand tu es là pour rigoler, danser et chanter avec moi ce bon vieux funk. C'est comme deux vies, deux voix qui se rencontrent ; deux histoires qui se racontent : juste une chanson pour le dire.

À Nicolas, dit Nico, d'avoir été mon fidèle compère pendant mes premières années étudiantes. Nos chemins se sont depuis éloignés mais je garde dans mon cœur tous ces instants de bonheur que nous avons partagés tous les deux, sobres ou saouls.

À tous les autres membres du Clan d'avoir partagé avec moi tous ces moments de joie et d'insouciance, peu importe l'heure, le jour ou la saison : Léna, Éloïse, Jérémy, Anna, Timothée, Geoffrey...

À Samuel d'être présent depuis le lycée. Des après-midis à flâner au Bosquet Sacré aux soirées endiablées, j'ai appris que je pouvais toujours compter sur toi et que tu es indiscutablement bien meilleur que moi au billard.

À Baptiste de répondre toujours à l'appel. Ta nonchalance légendaire est tellement apaisante que j'apprécie toujours de passer du temps avec toi ; pour discuter du monde de Tolkien, du monde bel et bien réel ou de toutes nos péripéties lycéennes.

À mes amis de mes études pharmaceutiques, les acolytes d'un nombre incommensurable de soirées :

À Camille de m'avoir donné la motivation pour assister aux cours et la rigueur nécessaire pour réviser correctement les partiels. Tu as indubitablement marqué ma vie même si tu le fis parfois fait d'une manière cruellement douloureuse. Quoiqu'il en soit, je ne garde à ton égard aucune rancœur car tu m'as fait grandir et je ne te remercierai jamais assez pour cela.

À Ophélie d'être une amie loyale, généreuse et au caractère bien trempé. C'est pour cela que j'apprécie d'autant plus ta magnanimité envers moi car je sais que je ne suis pas toujours facile à supporter et que tu dois parfois mettre beaucoup d'eau dans ton vin.

À Loïc d'être simplement toi. Comment d'ailleurs te résumer avec de vulgaires adjectifs quand tu mériterais une foule de superlatifs ? Je ne m'attarderai ici que sur ton immense sens de l'abnégation ; je sais que tu seras toujours disponible pour m'épauler si jamais je te le demande, peu l'importe l'heure ou l'endroit. Pour cela tu auras toujours tout mon respect.

À Yann de m'avoir accepté à tes côtés durant les cours. Grâce à ta gentillesse et à ta sensibilité, nous avons ensuite pu tisser une solide amitié. Je ne pensais pas que je pourrais un jour fredonner du Bruce Springsteen avec quelqu'un ou aller en soirée en kilt avec un camarade ayant le même tartan ! Merci, tout simplement mon ami.

À Pierre de m'avoir hébergé à titre gracieux après moult apéritifs. Je garde au fond de ma mémoire ces moments suspendus hors du temps où nous écoutions ensemble toutes ces chansons enivrantes : des Bee Gees à Joe Dassin, en passant par Michel Sardou, Johnny Hallyday et Renaud. C'est au travers de ce genre d'ambiance magique que l'on noue les amitiés les plus immuables.

À Hamza d'avoir pris le temps de m'attendre pour que l'on se retrouve en fin de cursus. Tu es une rencontre inattendue mais elle a lieu au meilleur moment qui soit car cette amitié perdurera tout au long de nos vies ; j'en suis convaincu mon très cher ami !

À Rami d'être toujours partant pour aller taquiner les cartes. Que de sensations avons nous ressenties à essayer d'avoir un meilleur score que celui de la banque ; rien qu'en y repensant, j'ai les poils qui s'hérissent de nouveau.

À tous mes autres amis de la Fac de m'avoir fait une place dans leur vie. J'aurais aimé faire des remerciements plus personnels mais cela rajouterait un peu trop de pages à cet imposant manuscrit... J'ai donc une pensée générale pour vous : Stéphane, Lucas, Franck, Laura, Mathilde, Sofiane (dit Sof'), Mathilde, Lucie, Claire, Pierre-Yves (dit Piwaye), Urbain, Auréa, Louise, Joana, Julie, Matthias... Qu'il s'agisse de bagnards d'Estaing, d'escrocs du vaccinodrome ou tout simplement de compagnons de la filière officinale.

À mes amis de la Providence, d'insubmersibles amitiés issues très belles rencontres dont seul le destin a le secret :

À Marc de m'avoir pris sous son aile durant mon stage au laboratoire de bactériologie. Parfois on ne peut aller contre la destinée, je ne sais pas pourquoi mais quand je t'ai aperçu j'ai directement su que tu allais faire partie de ma vie. Et vois-tu, je ne m'étais pas trompé car cela fait déjà presque cinq ans que j'ai terminé mon stage hospitalier et l'on continue pourtant de se voir. J'ai de la chance d'avoir pu rencontrer une personne aussi généreuse, joviale et sensible que toi. Tu seras toujours pour moi un ami unique que je ne pourrais jamais remplacer.

À Stéphane, dit Stéph', d'avoir été présent pour moi quand personne d'autre ne l'était. Malgré ce que les gens peuvent penser, tu es quelqu'un d'attentionné, de généreux et de fidèle. J'ai toujours plaisir à venir te voir pour prendre de tes nouvelles car je sais que je passerai également un agréable moment à tes côtés.

À M. Godefroy d'avoir vu l'élève facétieux que j'étais. Mon cher Serge, j'ai particulièrement apprécié de t'avoir comme professeur au lycée ; tu as illuminé ma scolarité par ta manière si personnelle de faire cours. Je me réjouis d'avoir maintenu le contact avec toi malgré les ans qui s'égouttent et je suis toujours ravi de te revoir autour d'une pizza pour se rappeler tous ces merveilleux souvenirs.

À toutes les autres personnes qui comptent dans ma vie : Lisa, Mathilde, Gwen, Olivier, Sébastien, Jacques, Pamela, Alexis et tous ceux que malencontreusement j'omets... Je suis sincèrement flatté d'avoir autant de personnes à remercier mais j'aurais aimé avoir la place et le temps pour exprimer une pensée plus personnelle à tout le monde, même ceux que j'oublie malheureusement de nommer... J'en suis vraiment désolé.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	8
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	16
Introduction.....	18
1. Alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	19
1.1. Définitions.....	19
1.2. Structure.....	20
1.2.1. Nécines.....	20
1.2.2. Acides néciques.....	22
1.2.3. Esters entre nécines et acides néciques.....	25
1.3. Propriétés physico-chimiques.....	33
1.4. Méthodes d'extraction.....	35
1.5. Volet analytique.....	38
1.5.1. Caractérisation.....	38
1.5.2. Isolement et dosage.....	42
2. Biosynthèse.....	44
2.1. Formation des nécines.....	45
2.1.1. Formation du précurseur aminé.....	45
2.1.2. Formation du cycle pyrrolizidinique.....	48
2.1.3. Diversification des nécines.....	51
2.2. Formation des acides néciques.....	52
2.2.1. Acides néciques en C ₅	53
2.2.2. Acides néciques en C ₇	56
2.2.3. Acides néciques en C ₈	61
2.2.4. Acides néciques en C ₁₀	63
2.2.5. Acides aromatiques et autres.....	68
2.3. Formation des esters.....	69
2.4. Chimiotaxonomie.....	72

2.5. Diversification post-biosynthétique.....	75
3. Pharmacologie.....	78
3.1. Toxicocinétique.....	78
3.1.1. Absorption.....	79
3.1.2. Distribution.....	80
3.1.3. Métabolisme.....	81
3.1.3.a). Phase de fonctionnalisation.....	81
3.1.3.b). Phase de conjugaison.....	85
3.1.4. Élimination.....	89
3.2. Toxicodynamie.....	90
3.2.1. Hépatotoxicité.....	91
3.2.1.a). Mécanismes cytotoxiques.....	97
3.2.1.b). Mécanismes génotoxiques.....	101
3.2.1.c). Toxicité biliaire.....	102
3.2.2. Toxicités secondaires.....	103
3.2.2.a). Entérotoxicité.....	103
3.2.2.b). Pneumotoxicité.....	106
3.2.2.c). Néphrotoxicité.....	107
3.2.3. Effets pharmacologiques non toxiques.....	108
3.2.3.a). Activité antimicrobienne.....	108
3.2.3.b). Activité antivirale.....	109
3.2.3.c). Activité anti-inflammatoire.....	110
3.2.3.d). Activité anticancéreuse.....	111
3.2.3.e). Activité cholinergique.....	112
3.2.3.f). Propriétés diverses.....	113
4. Principales plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	114
4.1. <i>Boraginaceae</i>	114
4.1.1. <i>Borago officinalis</i> L., la bourrache.....	115
4.1.2. <i>Symphytum officinale</i> L., la consoude officinale.....	117
4.1.3. <i>Anchusa officinalis</i> L., la buglosse officinale.....	119
4.1.4. <i>Cynoglossum officinale</i> L., le cynoglosse officinal.....	120
4.1.5. <i>Echium vulgare</i> L., la vipérine vulgaire.....	122
4.1.6. <i>Heliotropium europaeum</i> L., l'héliotrope commun.....	124
4.1.7. <i>Lithospermum officinale</i> L., le grémil officinal.....	125

4.1.8. Autres espèces.....	126
4.2. <i>Asteraceae</i>	129
4.2.1. <i>Tussilago farfara</i> L., le tussilage.....	130
4.2.2. <i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn., le séneçon jacobée.....	132
4.2.3. <i>Petasites hybridus</i> (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb., le pétasite officinal.....	134
4.2.4. <i>Senecio vulgaris</i> L., le séneçon commun.....	135
4.2.5. <i>Eupatorium cannabinum</i> L., l'eupatoire chanvrine.....	136
4.2.6. Autres espèces.....	138
4.3. Autres familles botaniques.....	143
4.3.1. <i>Fabaceae</i>	144
4.3.2. <i>Orchidaceae</i>	145
4.3.3. <i>Poaceae</i>	146
5. Présence résiduelle environnementale, recommandations et législations sanitaires.....	147
5.1. Voies de contamination.....	147
5.2. Contamination alimentaire.....	148
5.2.1. Thés et plantes pour infusions.....	149
5.2.2. Compléments alimentaires et médicaments à base de plantes.....	151
5.2.3. Épices, plantes aromatiques et autres plantes culinaires.....	154
5.2.4. Miels et produits à base de pollen ou de propolis.....	157
5.2.5. Produits laitiers, viandes et œufs.....	159
5.3. Cas d'intoxication notables et rôle de prévention du pharmacien officinal.....	161
5.4. Législations en vigueur et recommandations sanitaires.....	162
5.4.1. Chronologie et évolution des recommandations sanitaires.....	163
5.4.2. Législation de l'Union Européenne.....	165
5.4.3. Législation de la République Française.....	169
Conclusion.....	171
Bibliographie.....	172
Annexe I : Extraction des alcaloïdes du bourgeon floral de <i>Tussilago farfara</i> L.....	189
Annexe II : Extraction de la thésinine-4'-O-β-D-glucoside de la graine de <i>Borago officinalis</i> L....	190
Annexe III : Caractérisation par le réactif de Mattocks des N-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques	191
Annexe IV : Caractérisation par le réactif de Mattocks des alcaloïdes pyrrolizidiniques dits classiques.....	192

Annexe V : Caractérisation simultanée par le réactif de Mattocks des alcaloïdes pyrrolizidiniques et de leurs dérivés <i>N</i> -oxydes.....	193
Annexe VI : Principales réactions de diversification structurale du <i>N</i> -oxyde de sénécionine dans la tribu des <i>Senecioneae</i> (<i>Asteraceae</i>).....	194
Annexe VII : Architecture du sinusoïde hépatique.....	195
Annexe VIII : Développement de la tumorigénicité.....	196
Annexe IX : Plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques inscrites à la liste A de la Pharmacopée française.....	197
Annexe X : Plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques inscrites à la liste B de la Pharmacopée française.....	198
Annexe XI : Alcaloïdes pyrrolizidiniques ciblés par la procédure analytique de la monographie générale relative aux alcaloïdes pyrrolizidiniques contaminants présente dans la 11 ^{ème} édition de la Pharmacopée européenne.....	199
Serment de Galien.....	200

Liste des figures

Figure 1 : Cycles azotés.....	19
Figure 2 : Nécines monohydroxylées.....	20
Figure 3 : Nécines dihydroxylées.....	21
Figure 4 : Nécines trihydroxylées.....	21
Figure 5 : Nécines diverses.....	22
Figure 6 : Acides néciques en C ₅	23
Figure 7 : Acides néciques en C ₇ ou C ₈	23
Figure 8 : Acides néciques en C ₁₀	24
Figure 9 : Acides néciques aromatiques et halogénés.....	25
Figure 10 : Monoesters.....	26
Figure 11 : Diesters d'acides monocarboxyliques.....	26
Figure 12 : Diesters d'acides dicarboxyliques.....	28
Figure 13 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques divers.....	29
Figure 14 : Dérivé <i>N</i> -oxyde.....	30
Figure 15 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques avec additions supplémentaires.....	32
Figure 16 : Caractérisation des alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	39
Figure 17 : Biosynthèse de la putrescine.....	46
Figure 18 : Cycle réactionnel de l'homospermidine synthase.....	47
Figure 19 : Réaction de désamination oxydante de l'homospermidine oxydase.....	49
Figure 20 : Détails du mécanisme réactionnel de type Mannich responsable de la double cyclisation intramoléculaire retrouvée lors de la biosynthèse des nécines.....	50
Figure 21 : Biosynthèse des acides angélique et tiglique.....	54
Figure 22 : Cascade catabolique de la leucine.....	55
Figure 23 : Cycle réactionnel du diphosphate de thiamine.....	57
Figure 24 : Mésonérie du diphosphate d'hydroxyéthylthiamine.....	58
Figure 25 : Origine biosynthétique du squelette de l'acide (+)-trachélanthique.....	60
Figure 26 : Origine biosynthétique des acides néciques formant des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C ₁₁	62
Figure 27 : Origine biosynthétique de l'acide sénécique.....	64

Figure 28 : Déplacements électroniques induits par la perte de l'hydrogène en α de la fonction acide carboxylique.....	65
Figure 29 : Mécanisme réactionnel impliqué dans la formation de la liaison covalente entre les carbones C-3 et C-4 de l'acide sénécique.....	66
Figure 30 : Molécules impliquées dans la biosynthèse des acides aromatiques.....	69
Figure 31 : Mécanisme réactionnel général du site catalytique des acyltransférases de la famille des BAHD.....	70
Figure 32 : Réaction d'estérification entre l'acide sénécique activé et la rétronécine.....	71
Figure 33 : Principaux types d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de la classification chimiotaxonomique	73
Figure 34 : Principales réactions de diversification structurelle du <i>N</i> -oxyde de sénécionine dans la tribu des <i>Senecioneae</i> (<i>Asteraceae</i>).....	76
Figure 35 : Métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques à nécine 1,2-insaturée.....	82
Figure 36 : Métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques à nécine saturée.....	83
Figure 37 : Autres voies métaboliques des alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	85
Figure 38 : Molécules impliquées dans la phase de conjugaison des alcaloïdes pyrrolizidiniques et de leurs métabolites déshydropyrrolizidiniques.....	86
Figure 39 : Possibilités de conjugaison au glutathion des alcaloïdes déshydropyrrolizidiniques.....	87
Figure 40 : Rôle de la voie de l'acide mercapturique dans le devenir des métabolites déshydropyrrolizidiniques <i>S</i> -conjugués au glutathion.....	88
Figure 41 : Mécanismes d'additions électrophiles des métabolites pyrroliques.....	95
Figure 42 : Mécanisme réactionnel intramoléculaire des alcaloïdes déshydropyrrolizidiniques diestérifiés.....	96
Figure 43 : Voies de l'apoptose.....	99
Figure 44 : Mécanismes de l'obstruction sinusoidale.....	100
Figure 45 : Axe entérohépatique et relations immunologiques.....	104
Figure 46 : <i>Borago officinalis</i> L.....	115
Figure 47 : <i>Symphytum officinale</i> L.....	117
Figure 48 : <i>Anchusa officinalis</i> L.....	120
Figure 49 : <i>Cynoglossum officinale</i> L.....	121
Figure 50 : <i>Echium vulgare</i> L.....	122
Figure 51 : <i>Heliotropium europaeum</i> L.....	124
Figure 52 : <i>Lithospermum officinale</i> L.....	125
Figure 53 : <i>Myosotis scorpioides</i> L.....	128

Figure 54 : <i>Tussilago farfara</i> L.....	130
Figure 55 : <i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn.....	133
Figure 56 : <i>Petasites hybridus</i> (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.....	134
Figure 57 : <i>Senecio vulgaris</i> L.....	136
Figure 58 : <i>Eupatorium cannabinum</i> L.....	137
Figure 59 : <i>Adenostyles alliariae</i> (Gouan) A.Kern.....	139
Figure 60 : <i>Jacobaea maritima</i> (L.) Pelsler & Meijden.....	141
Figure 61 : <i>Crotalaria retusa</i> L.....	144
Figure 62 : <i>Vanda cristata</i> Wall. ex Lindl.....	145
Figure 63 : <i>Lolium perenne</i> L.....	146

Liste des tableaux

Tableau I : Répartition au sein des familles botaniques et classification chimiotaxonomique des alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	74
Tableau II : Distribution des réactions de diversification structurelle dans cinq espèces de la tribu des <i>Senecioneae</i> (<i>Asteraceae</i>).....	77
Tableau III : Évolution de certaines valeurs biologiques en cas de syndrome d'obstruction sinusoidale suite à une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	94
Tableau IV : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des thés et des autres plantes pour infusions (dans la matière sèche avant infusion).....	150
Tableau V : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des thés et des autres plantes pour infusions (dans le liquide après infusion).....	151
Tableau VI : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des compléments alimentaires et des médicaments à base de plantes.....	153
Tableau VII : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des épices, des plantes aromatiques et des autres plantes culinaires.....	155
Tableau VIII : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des produits à base de miel, de pollen ou de propolis.....	158
Tableau IX : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des aliments d'origine animale.....	160
Tableau X : Dénrées visées par le règlement (UE) 2023/915 de la Commission européenne du 25 avril 2023 relatif aux teneurs maximales en alcaloïdes pyrrolizidiniques autorisées dans les produits alimentaires.....	166

Liste des abréviations

AcCoA : Acétyl-coenzyme A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine 5'-diphosphate

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

APAF1 : Facteur 1 d'activation de la peptidase apoptotique (de l'anglais *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*)

AlcDHP : Alcaloïde déshydropyrrolizidinique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

BAK : Protéine tueuse BCL-2 antagoniste (de l'anglais *BCL-2 Antagonist Killer*)

BAX : Protéine BCL-2 associée à X (de l'anglais *BCL-2-Associated X-protein*)

BMDL₁₀ : Limite de confiance inférieure de la valeur de référence d'une substance accroissant de 10 % l'apparition d'un effet toxique spécifique (ici, la survenue d'un cancer).

DRP1 : Protéine liée à la dynamine 1 (de l'anglais *Dynamin-Related Protein 1*)

FAD : Forme oxydée de la flavine adénine dinucléotide

FADD : Protéine au domaine de mort associée au récepteur Fas (de l'anglais *Fas-Associated Death Domain protein*)

FADH₂ : Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide

FasL : Ligand de Fas (de l'anglais *Fas Ligand*)

FasR : Récepteur Fas (de l'anglais *Fas Receptor*)

Glu : Acide glutamique

Gly : Glycine

His : Histidine

kg.pc : Kilo de poids corporel

LAP : Leucyl-aminopeptidase

Lys : Lysine

MOMP ; Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (de l'anglais *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*)

NAD⁺ : Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide

NADP⁺ : Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAT, *N*-acétyltransférase

ppb : Partie par milliard

ppm : Partie par million

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

TNF : Facteur de nécrose tumorale (de l'anglais *Tumor Necrosis Factor*)

TNFR : Récepteur du TNF (de l'anglais *TNF Receptor*)

TRADD : Protéine au domaine de mort associée au récepteur du TNF (de l'anglais *TNF Receptor-Associated Death Domain protein*)

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

2OG : Acide 2-oxoglutarique

γ -GT, γ -glutamyltransférase

Introduction

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des composés du métabolisme secondaire des végétaux principalement synthétisés par les *Asteraceae* et les *Boraginaceae* mais qui se retrouvent aussi plus sporadiquement dans une dizaine d'autres familles botaniques. À ce jour identifiés dans au moins 6000 espèces végétales, les alcaloïdes pyrrolizidiniques seraient potentiellement élaborés par près de 3 % des Angiospermes.

Constituées d'une structure azotée bicyclique, ces substances ne présentent globalement pas d'intérêt thérapeutique particulier ; à vrai dire, elles sont même hautement toxiques. Par le biais de leur édifice cyclique si caractéristique, les alcaloïdes pyrrolizidiniques exercent effectivement des effets hépatotoxiques pouvant mener à des syndromes mortels en cas d'ingestion conséquente, et ce, tout autant pour les humains (plantes médicinales, aliments contaminés, etc.) que pour le bétail (pâturages, fourrage, etc.). Ayant en outre des propriétés mutagènes, ces molécules peuvent induire des tumeurs hépatiques lors d'une exposition prolongée.

Au cours des dernières décennies, la répartition environnementale quasi ubiquitaire des alcaloïdes pyrrolizidiniques et leur pharmacologie pernicieuse suscita non seulement l'attrait de plus en plus de scientifiques mais également celui d'agences sanitaires étatiques. Présents en effet dans plusieurs plantes médicinales traditionnellement utilisées et contaminant par ailleurs de nombreuses denrées alimentaires (infusions, miel, aromates, compléments alimentaires...), les alcaloïdes pyrrolizidiniques représentent aujourd'hui un enjeu sanitaire extrêmement important. Désormais considérés par la réglementation européenne comme des phytotoxines à part entière, ces composés sont soumis à une teneur maximale dans différentes catégories d'aliments afin d'éviter à la population générale toute surexposition chronique aux conséquences néfastes.

Complémentairement à la législation européenne, le pharmacien a donc un rôle essentiel à jouer en distillant aux patients amateurs de phytothérapie les conseils adéquats quant à la bonne utilisation des plantes médicinales outrageusement riches en alcaloïdes pyrrolizidiniques et ainsi éviter toute intoxication aiguë menant au mieux à l'hospitalisation et dans le pire des cas au décès...

Dans un premier temps, nous nous intéresserons donc à la diversité structurale des alcaloïdes pyrrolizidiniques ainsi qu'à l'origine biosynthétique de leurs différents constituants. Puis nous nous pencherons sur les mécanismes impliqués dans leur toxicité et leur distribution dans le règne végétal. Enfin, nous terminerons par leur fascinante capacité à contaminer de nombreuses denrées alimentaires et par les législations découlant de cette particularité phytochimique.

1. Alcaloïdes pyrrolizidiniques

1.1. Définitions

Le terme *alcaloïde* provient étymologiquement de l'arabe *al kali* « la soude » auquel lui a été ajouté le suffixe hellénique *είδος* « forme, aspect ». Il est créé par un pharmacien prussien, Carl Friedrich Wilhelm Meißner, qui l'utilise pour la première fois en 1819 (1).

Leur diversité est telle qu'il est bien difficile de résumer leurs caractéristiques communes en une seule et même définition à la fois simple et synthétique... Cependant, les alcaloïdes sont définis de manière générale comme des molécules organiques azotées, plus ou moins basiques et possédant un squelette hétérocyclique dans lequel y est inclus leur atome d'azote, ce qui leur confère *in fine* une certaine complexité structurale. En outre, ce sont des composés que l'on retrouve à l'état naturel sous forme de sels, et qui sont très majoritairement synthétisés par des végétaux, plus précisément, ils sont issus de leur métabolisme secondaire et ont comme précurseur initial un acide aminé. Enfin, les alcaloïdes ont des propriétés pharmacologiques prononcées, et ce, à des doses minimales (1,2).

C'est ainsi que l'on définit les alcaloïdes vrais afin de les différencier des pseudo-alcaloïdes et des proto-alcaloïdes. En effet, les pseudo-alcaloïdes répondent à la définition précédente à la seule exception que ce ne sont pas des dérivés d'acides aminés ; tandis que les proto-alcaloïdes, eux, sont formés à partir d'acides aminés mais à la différence des alcaloïdes vrais, l'atome d'azote n'est pas compris dans un hétérocycle ce qui, *de facto* classe les proto-alcaloïdes parmi les amines (1).

Quant à la définition d'un cycle pyrrolizidinique, elle est bien plus brève. La pyrrolizidine, de formule chimique $C_7H_{13}N$, correspond à l'accolement de deux pyrrolidines (Figure 1-A) et dont l'atome d'azote est commun aux deux cycles (Figure 1-B).

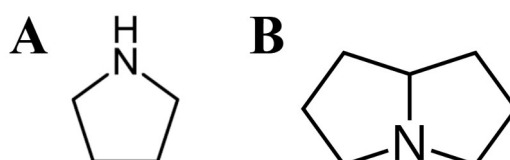


Figure 1 : Cycles azotés
(A) Pyrrolidine (B) Pyrrolizidine

1.2. Structure

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont constitués d'une base, appelée nécine, et d'un ou plusieurs acides carboxyliques, appelés acides néciques. L'acide nécique et la nécine sont liés entre eux par une fonction ester.

1.2.1. Nécines

Les nécines sont des amino-alcools dérivés de la pyrrolizidine, cette dernière a subi différentes modifications, responsables ainsi de la grande diversité des nécines. Pour l'immense majorité d'entre elles, il y a un groupe hydroxyméthyle qui est présent sur le carbone C-1 (Figure 2) (1–3).

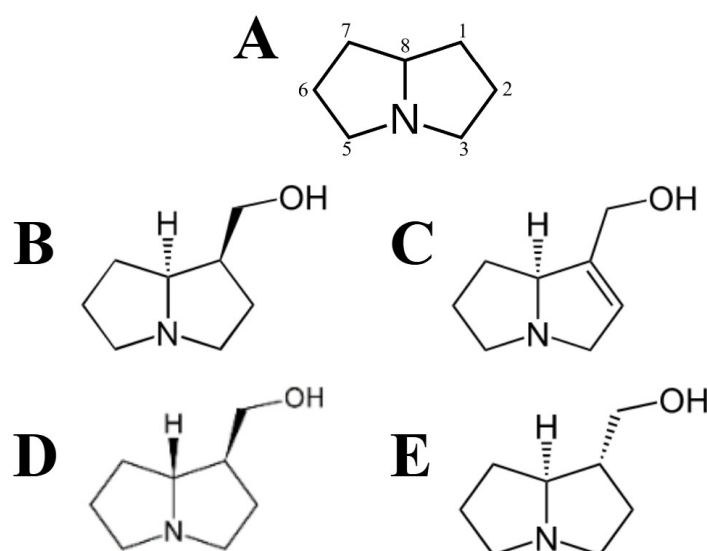


Figure 2 : Nécines monohydroxylées

(A) Numérotation de la pyrrolizidine (*N.B.* : *Le carbone du groupe hydroxyméthyle est numéroté en tant que carbone C-9.*) (B) (-)-Isorétronécanol (C) (-)-Supinidine (D) (+)-Laburnine (E) (-)-Trachélanthamidine

En plus de cette addition, la plupart des nécines possèdent en position 1,2 une double liaison C=C, cette insaturation est d'ailleurs à l'origine d'une majoration de la toxicité de la nécine. Suivant le degré d'hydroxylation, plusieurs types de nécines se dégagent : certaines nécines ne comportent que l'alcool primaire du groupe hydroxyméthyle (isorétronécanol, supinidine, laburnine, trachélanthamidine) (Figure 2), tandis qu'un alcool secondaire en C-7 en plus du groupe

hydroxyméthyle donne une nécine dihydroxylée (rétronécine, héliotridine, platynécine) (Figure 3) et plus rarement, il peut y avoir un troisième groupe hydroxyle, en C-2 (rosmarinécine) (Figure 4-A), en C-6 (crotanécine) (Figure 4-B) ou encore en C-8 (otonécine) (Figure 4-C), et dont l'oxydation entraîne ici, la rupture de la liaison entre le carbone et l'azote pour conduire *in fine* à l'ouverture de la structure bicyclique et provoquer ainsi un phénomène de résonance au sein de la molécule (Figure 4-D) (1–3).

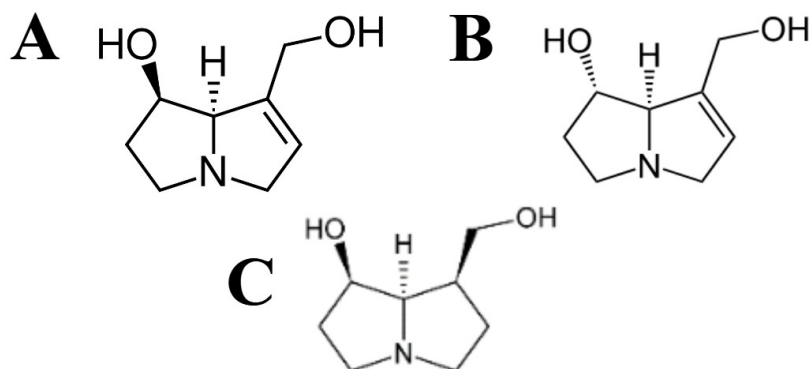


Figure 3 : Nécines dihydroxylées

(A) (+)-Rétronécine (B) (+)-Héliotridine (C) (-)-Platynécine

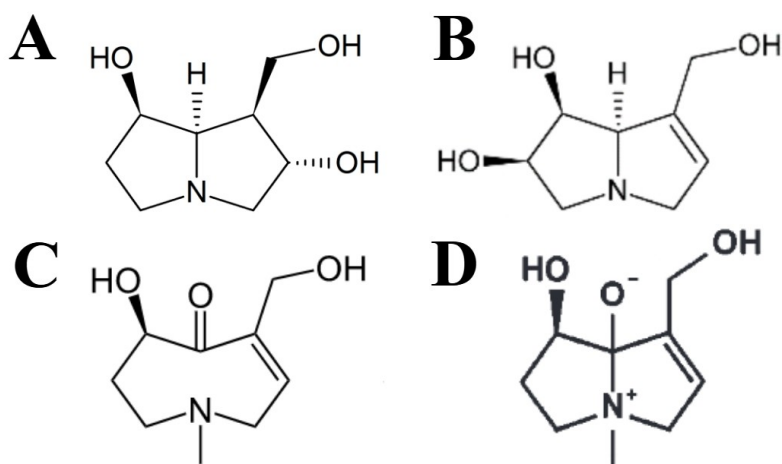


Figure 4 : Nécines trihydroxylées

(A) (-)-Rosmarinécine (B) (-)-Crotanécine (C) Otonécine
(D) Résonance de l'otonécine

À titre informatif, on retrouve chez certaines espèces végétales, quelques nécines à la structure originale comme la 1-aminopyrrolizidine (Figure 5-A), présente dans *Laburnum*

anagyroides Medik., le cytise à grappes, ou encore la pétranécine qui comporte un groupe méthoxyle entre le carbone C-7 et le doublet non liant de l'atome d'azote le transformant alors en ammonium quaternaire (Figure 5-B) (2).

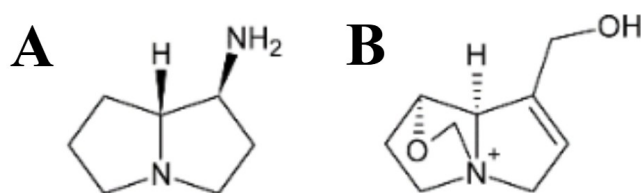


Figure 5 : Nécines diverses

(A) (1*S*,8*R*)-1-aminopyrrolizidine

(B) (7*S*,8*R*)-Pétranécine

Le nombre important de nécines trouve également pour origine la présence de plusieurs centres de chiralité, créant ainsi plusieurs stéréoisomères pour une même structure moléculaire. Les carbones hydroxylés sont sujets à ce phénomène tout comme le carbone C-8 avec son unique atome d'hydrogène. Il en va de même pour le carbone C-1 lorsque celui-ci ne forme pas de liaison π (2,3). En somme, dès qu'un carbone est asymétrique, il apporte une configuration spatiale particulière au squelette de la nécine.

Par exemple, la rétronécine et l'héliotridine sont deux diastéréoisomères, l'un ayant une configuration *trans* (la rétronécine) et l'autre une configuration *cis* (l'héliotridine) ; ces deux molécules ont aussi chacune leur énantiomère, un isomère spécifique obtenu uniquement grâce à un miroir plan et qui fait ainsi que deux composés énantiomériques sont l'image l'un de l'autre, autrement dit des reflets non superposables spatialement. Ils sont toutefois différenciés dans leur nom par le symbole « + » ou « - » qui précède ce dernier. Pour illustration, la figure 3-A correspond à la (+)-rétronécine et la figure 3-B à la (+)-héliotridine ; la (-)-rétronécine ayant le groupe hydroxyle dans une orientation postérieure tandis que l'atome d'hydrogène est en position antérograde, et pour ce qui est de la (-)-héliotridine, elle a ces deux éléments envoyés vers l'avant.

1.2.2. Acides néciques

Les acides néciques sont le plus souvent des acides carboxyliques aliphatiques à la longueur de chaîne carbonée variable : en C₅, en C₇, en C₈ ou en C₁₀, créant ainsi divers groupes d'acides néciques (1-3).

Les acides en C₅ sont dits simples (acide angélique, acide tiglique, acide sénéciöique, acide sarracinique) (Figure 6) (1–3).

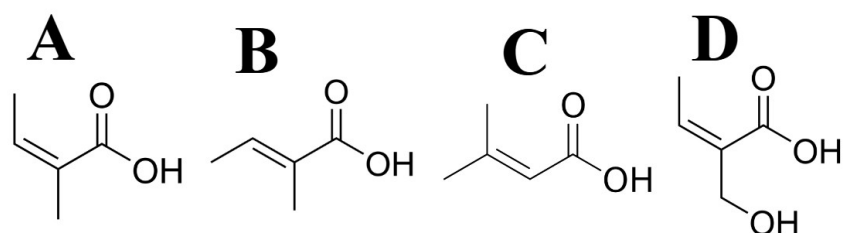


Figure 6 : Acides néciques en C₅

(A) Acide angélique (B) Acide tiglique (C) Acide sénéciöique
(D) Acide sarracinique

Les acides monocarboxyliques en C₇ possèdent, quant à eux, une structure hydroxyisopropylbutanoïque (acide (±)-trachélanthique, acide (±)-viridiflorique, acide échimidinique, acide héliotrique, acide lasiocarpique...) (Figures 7-A à 7-E) ; sauf dans de très rares cas, où les acides en C₇ peuvent être cycliques et à proprement parler sous forme de γ -lactones (acide latifolique et acide hackélique) (Figures 7-F et 7-G) (1–3) !

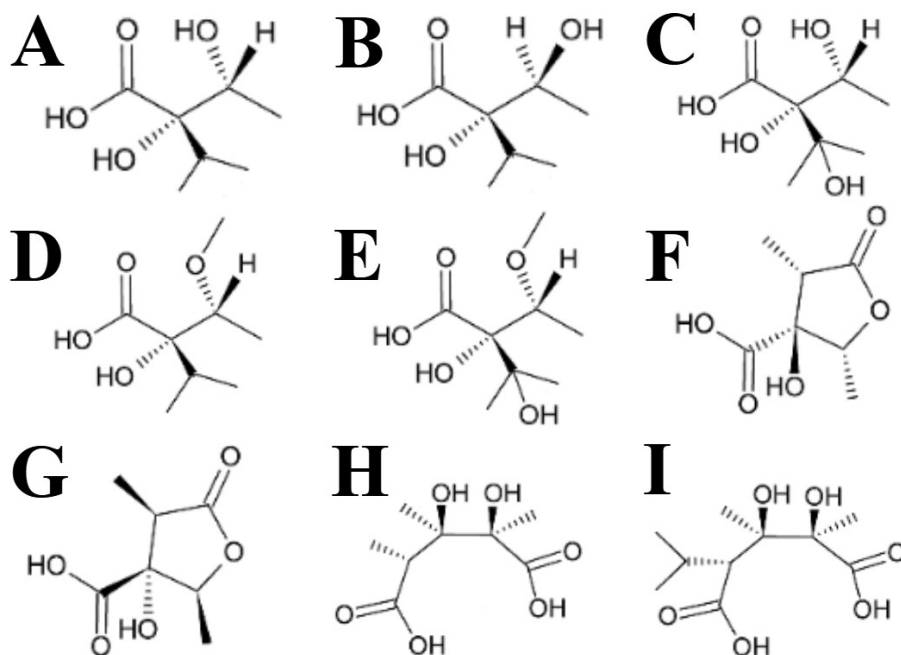


Figure 7 : Acides néciques en C₇ ou C₈

(A) Acide (+)-trachélanthique (B) Acide (-)-viridiflorique (C) Acide échimidinique (D) Acide héliotrique (E) Acide lasiocarpique (F) Acide latifolique (G) Acide hackélique (H) Acide monocrotalique (I) Acide trichodesmique

Et pour ce qui est des acides dicarboxyliques, ceux-là peuvent être soit en C₈ (acide monocrotalique, acide trichodesmique) (Figures 7-H et 7-I), soit en C₁₀ (acide sénécique, acide sénéciphyllique, acide sénécivernique, acide rétronécique, acide isatinécique, acide jacobinécique, acide érucifolinécique, etc.) (Figure 8) (1–3).

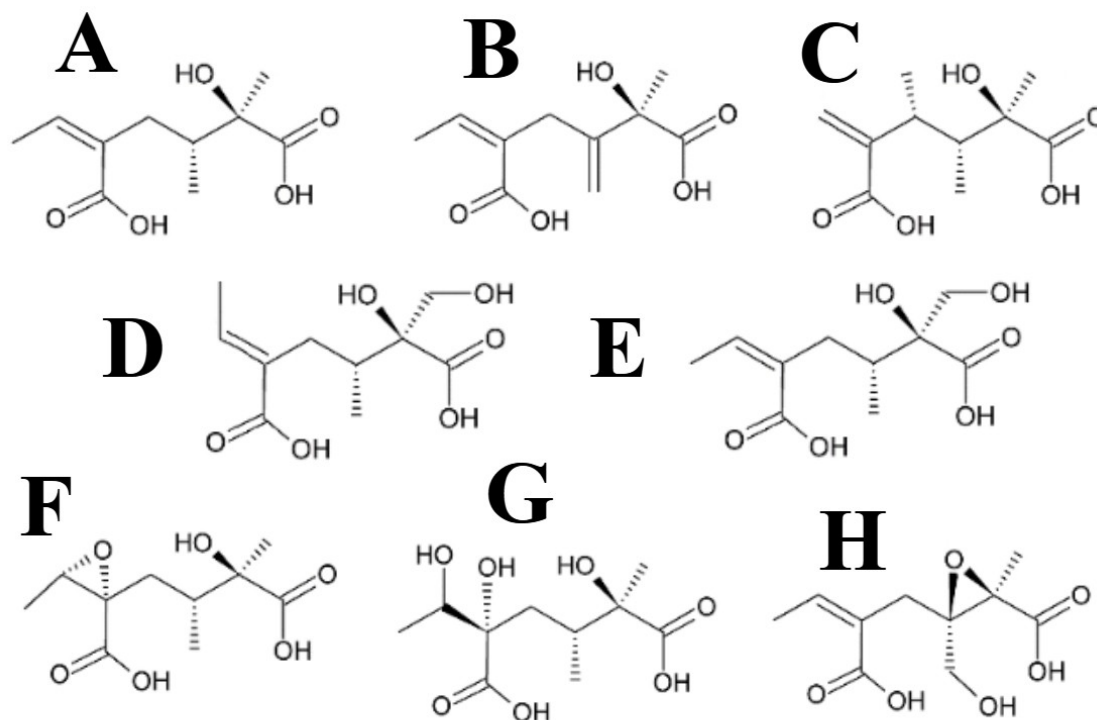


Figure 8 : Acides néciques en C₁₀

(A) Acide sénécique (B) Acide sénéciphyllique (C) Acide sénécivernique (D) Acide rétronécique (E) Acide isatinécique (F) Acide jacobinécique (G) Acide jacolinécique (H) Acide érucifolinécique

Là encore, la présence d'isomères est de mise si tant est qu'une double liaison ou qu'un carbone asymétrique soit retrouvé(e) dans le squelette de l'acide nécique. C'est notamment le cas de l'acide angélique (à la configuration *Z*) et de son diastéréoisomère, l'acide tiglique (à la configuration *E*) (Figures 6-A et 6-B) ; ou bien encore celui de l'acide rétronécique (de stéréoisomérisation *trans*) et de l'acide isatinécique (de stéréoisomérisation *cis*) (Figures 8-D et 8-E).

Il y a, dans une moindre mesure, des acides aromatiques qui s'estérifient à la nécine, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique ou encore l'acide nervogénique (Figure 9). Les deux premiers sont présents au sein des métabolismes primaire et secondaire de la plupart des espèces végétales ; cependant, les alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'ils forment avec la base nécine *via* la liaison ester ne

sont presque exclusivement retrouvés que chez les *Orchidaceae*, et plus précisément dans les genres *Phalaenopsis* et *Liparis* (2).

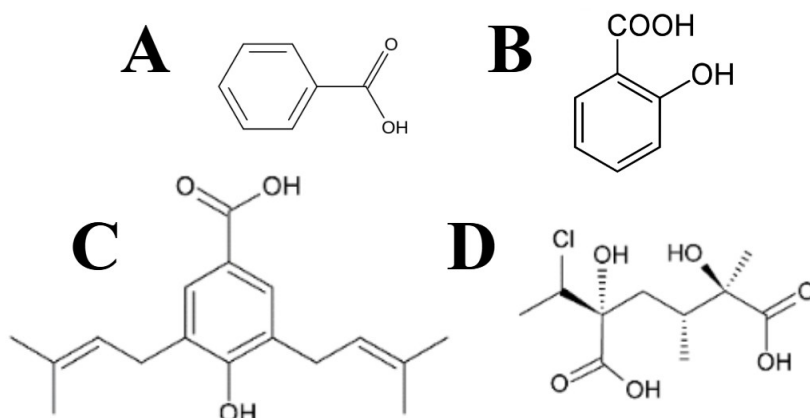


Figure 9 : Acides néciques aromatiques et halogénés
(A) Acide benzoïque (B) Acide salicylique (C) Acide nervogénique
(D) Acide jaconiné

1.2.3. Esters entre nécines et acides néciques

Les nécines sont rarement présentes sous forme libre. En effet, ces dernières sont pour l'immense majorité d'entre elles sous forme estérifiée, c'est-à-dire en étant des alcaloïdes pyrrolizidiniques *stricto sensu*. À ce propos, la fonction ester liant la nécine à l'acide nécique laisse entrevoir une multitude de combinaisons au vu de la diversité faramineuse de ces deux types de constituants ! Il existe par ailleurs plusieurs méthodes pour classer les alcaloïdes pyrrolizidiniques, notamment suivant le type d'acide nécique impliqué dans la fonction ester, la famille ou le genre botanique synthétisant majoritairement le chef de file de chaque groupe ou bien encore le degré d'estérification de la nécine. C'est cette dernière classification qui est le plus souvent retenue (1–3).

En premier lieu, il y a les esters d'acides monocarboxyliques ou esters à chaîne ouverte, qui sont des mono- ou des diesters. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques appartenant aux monoesters ont, d'une part, l'hydroxyle en C-9 de la nécine qui est inclus dans cette fonction et, d'autre part, un acide hydroxyisopropylbutanoïque (intermédiine, lycopsamine) (Figure 10) (1).

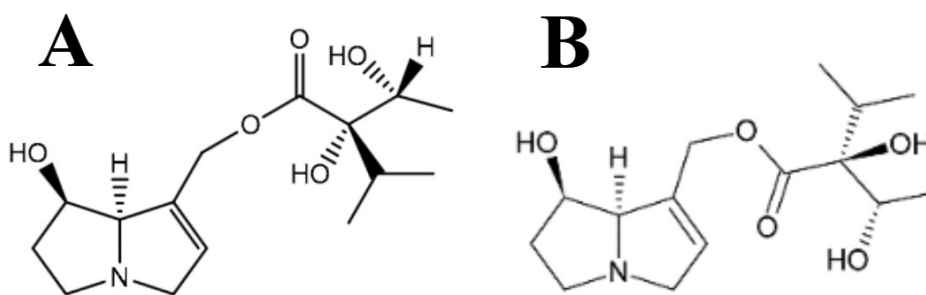


Figure 10 : Monoesters
 (A) Intermédine (B) Lycopsamine

Si une seconde fonction ester est présente, alors c'est bien régulièrement l'acide angélique ou l'acide tiglique qui estérifie l'hydroxyle en C-7 de la nécine, tandis que celui situé en C-9 est, à l'instar de la catégorie précédente, compris dans une fonction ester avec un acide à la structure hydroxyisopropylbutanoïque et ce, dans la plupart des cas ; cela forme ainsi le groupe des diesters à acides monocarboxyliques (échimidine, symphytine) (Figure 11) (1).

Les mono- et diesters d'acides monocarboxyliques sont caractéristiques des *Boraginaceae* mais certains d'entre eux sont aussi retrouvés dans les genres *Senecio* et *Eupatorium* de la famille des *Asteraceae* (1,2).

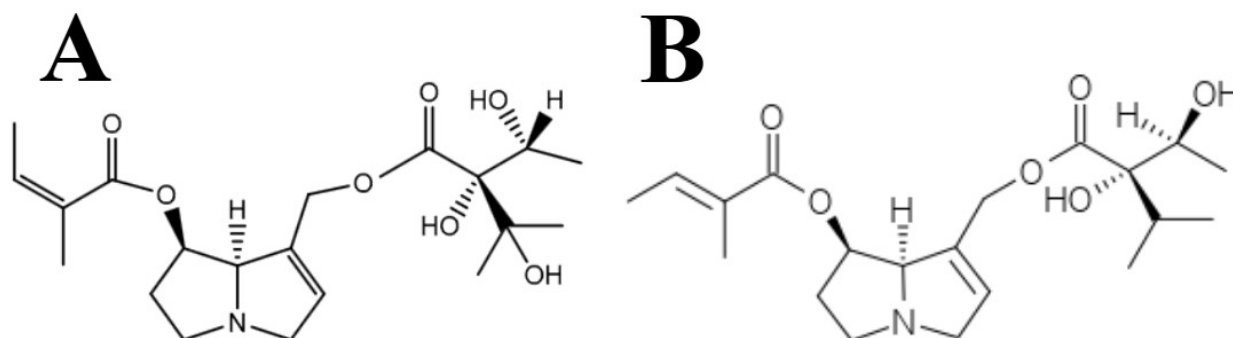


Figure 11 : Diesters d'acides monocarboxyliques
 (A) Échimidine (B) Symphytine

Aux types d'estérification détaillés ci-dessus s'ajoute une dernière classe : les diesters macrocycliques. D'une part, il y a les similitudes avec les diesters vus préalablement, qui sont que les hydroxyles de l'amino-alcool portés en C-7 et en C-9 s'intègrent dans leur fonction ester

respective. Mais d'autre part — et c'est là la différence majeure par rapport aux autres diesters — , il n'y a qu'un seul et même acide qui se retrouve mis en jeu au cœur des deux esters !

Ce genre d'estérification est possible parce que ce n'est ni plus ni moins qu'un acide dicarboxylique qui s'implique au sein des liaisons avec la 7,9-diolpyrrolizidine. Le fait que ce genre d'acide puisse estérifier simultanément ses deux fonctions acides carboxyliques avec les groupes hydroxyles de la nécine permet donc l'obtention d'alcaloïdes pyrrolizidiniques comportant un macrocycle à l'intérieur de leur édifice moléculaire (1).

Il existe néanmoins différentes sortes de diesters macrocycliques suivant la grandeur de leur cycle intramoléculaire :

– des macrocycles en C₁₁ (monocrotaline, trichodesmine) (Figures 12-A et 12-B) avec une occurrence prédominante chez les *Fabaceae* (2) ;

– des macrocycles en C₁₂ (sénécionine, rétorsine, sénéciphylline, riddelliine, senkirine) (Figures 12-C à 12-G) qui sont les diesters macrocycliques majoritaires et dont certains d'entre eux appartiennent également aux alcaloïdes pyrrolizidiniques halogénés (doronine) (Figure 13-E). Ces cycles constitués de douze atomes sont principalement synthétisés par les *Asteraceae* et dans une moindre mesure par les *Fabaceae* (1,2) ;

– des macrocycles en C₁₃ (némorensine, madurensine) (Figures 13-C et 13-H) qui présentent d'ailleurs quelques caractéristiques propres à chaque composé (1,2).

Concernant ces dernières, ce peut être : un éther cyclique de la famille des oxolanes qui est compris dans la structure de l'acide nécique dicarboxylique ; et donc *de facto*, dans celle de l'alcaloïde pyrrolizidinique, aboutissant *in fine* à un macrocycle incluant en son sein un tétrahydrofurane, c'est notamment le cas de la némorensine (2).

Ou bien alors cela peut aussi être une double estérification particulière de la nécine, qui n'est plus en C-7 et en C-9 mais *via* d'autres hydroxyles, c'est ici le cas de la madurensine : une crotanécine dont les groupes alcools — portés par les carbones C-6 et C-9 — sont estérifiés par le diastéréoisomère de l'acide sénécique, c'est-à-dire, comme déjà vu un peu plus haut, par l'acide intégerrinéique (2).

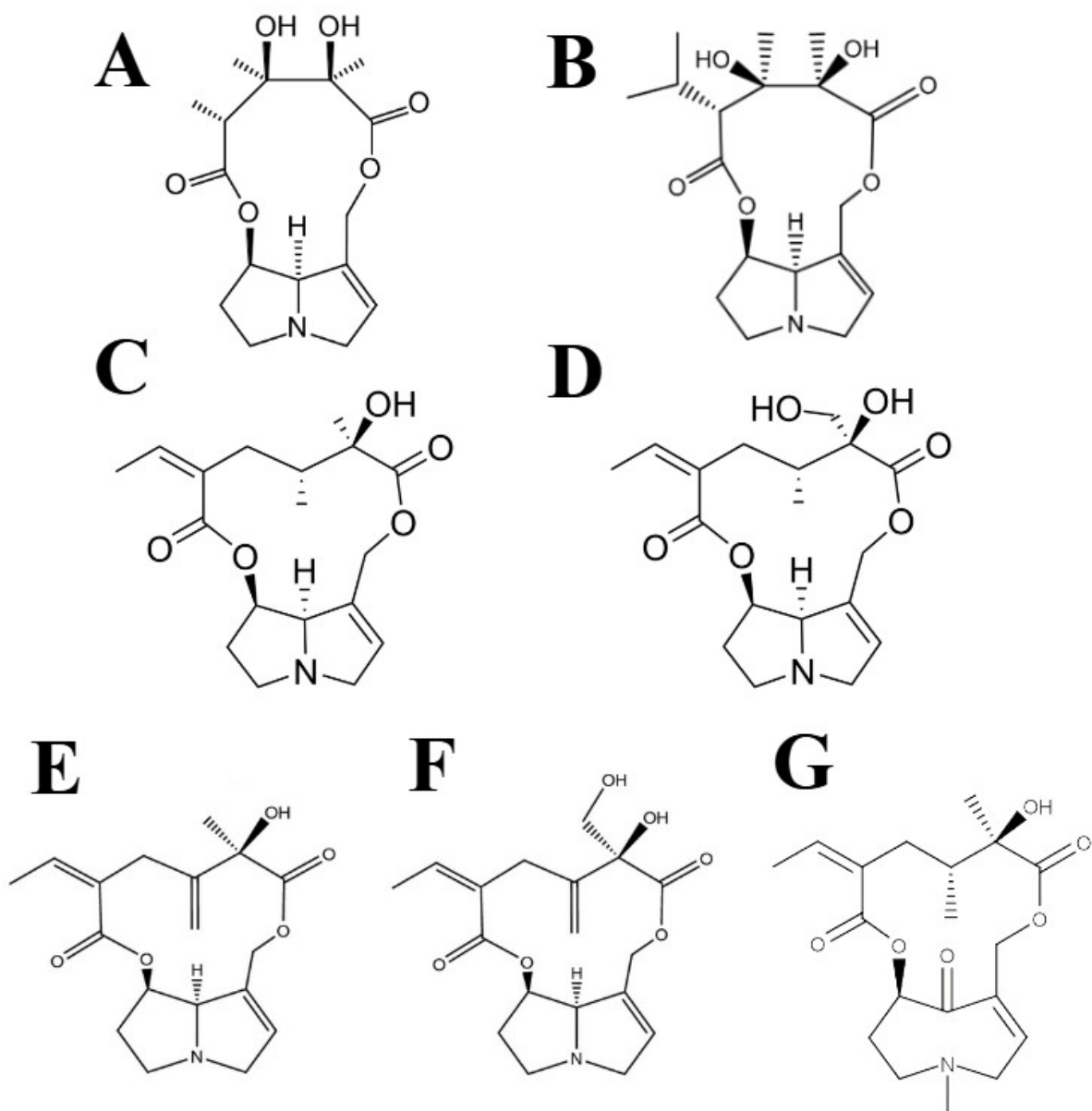


Figure 12 : Diesters d'acides dicarboxyliques

(A) Monocrotaline (B) Trichodesmine (C) Sénécionine (D) Rétrorsine (E) Sénéciophylline
(F) Riddelliine (G) Senkirkine

Pour terminer sur la diversité plus qu'importante de ces fonctions esters, attardons-nous légèrement sur certains alcaloïdes pyrrolizidiniques comportant des liaisons peu communes. Il y a ceux dont leur nécine est liée à un acide nécique aromatique ou arylalkylé (nervosine VII, ipanguline B, phalænopsine T) (Figures 13-A, 13-B et 13-D). Ce genre d'estérification est par ailleurs, quasi spécifique des *Orchidaceae* ; cependant, de manière plus sporadique, on en retrouve dans quelques rares spécimens des familles des *Convolvulaceae* et des *Boraginaceae* (1,2).

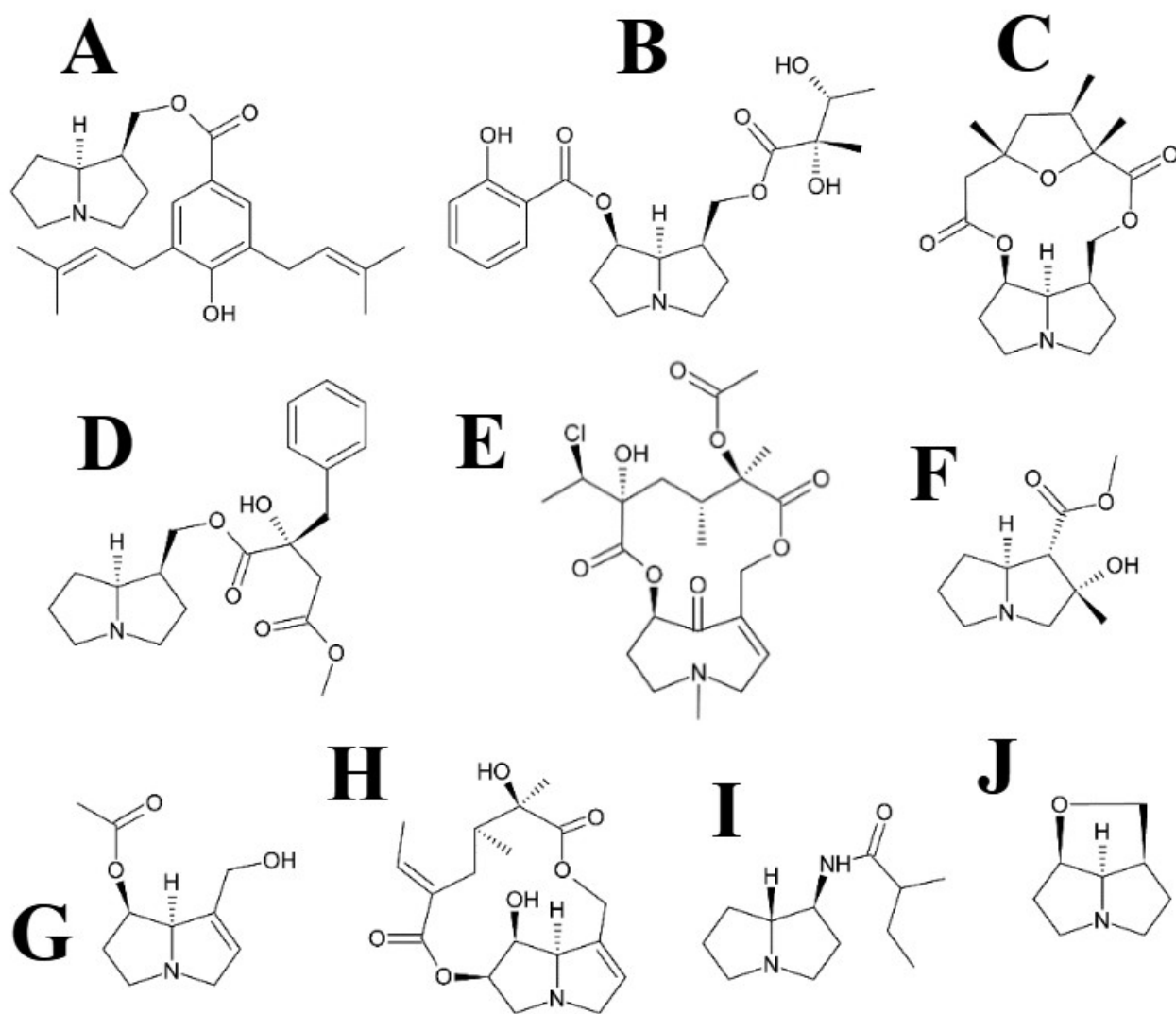


Figure 13 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques divers

(A) Nervosine VII (B) Ipanguline B (C) Némorensine (D) Phalænopside T (E) Doronine
 (F) Tussilagine (G) 7-acétylrétronécine (H) Madurensine (I) Laburnamine
 (J) Anhydroplatynécine

D'autres alcaloïdes pyrrolizidiniques sont quant à eux dits « simples », leur nécine n'étant pas reliée à un acide nécique *stricto sensu* mais par un acide carboxylique considéré comme relativement lambda : c'est le cas de la 7-acétylrétronécine (Figure 13-G) qui, comme son nom le suggère, correspond à la rétronécine estérifiée en C-7 par l'acide acétique. En outre, cet acide ubiquitaire est régulièrement retrouvé dans le squelette des alcaloïdes pyrrolizidiniques, qu'ils soient constitués d'une nécine seule ou estérifiée à un acide nécique (2).

Ajoutons que certains alcaloïdes pyrrolizidiniques aux liaisons chimiques très peu courantes ne sont souvent isolés qu'au sein d'une seule et unique espèce : pour exemple, la tussilagine (Figure 13-F) uniquement extraite de *Tussilago farfara* L., le tussilage, et dont la structure moléculaire dénote avec les nécines classiques (2). En effet, le carbone C-1 n'a pas de groupe hydroxyle, mais en lieu et place de ce dernier, c'est une fonction acide carboxylique qui y est retrouvée, celle-ci se voyant par la suite estérifiée avec une molécule de méthanol.

Enfin, il existe étonnamment des alcaloïdes pyrrolizidiniques sans la moindre fonction ester, comme la laburnamine (Figure 13-I) qui possède une fonction amide ou bien encore l'anhydroplatynécine (Figure 13-J) qui, quant à elle, n'est ni plus ni moins que la platynécine dépourvue d'une molécule d'eau conduisant alors à la formation d'un pont éther-oxyde entre les carbones C-7 et C-9, créant ainsi un tétrahydrofurane et donc, au final, un édifice tricyclique (2).

De plus, aux différents types d'estérification entre nécine et acide nécique s'ajoutent quelquefois des modifications chimiques ou enzymatiques (2).

Celle que l'on retrouve le plus régulièrement est une *N*-oxydation, elle a lieu sur l'atome d'azote du cycle pyrrolizidinique, transformant ainsi cette amine tertiaire, électroniquement neutre, en ammonium quaternaire, chargé positivement. En effet, lors de cette réaction, l'atome d'azote s'est retrouvé à devoir engager son doublet non liant avec un atome d'oxygène, le rendant par la suite lui aussi porteur d'une charge électronique, mais cette dernière se retrouve *a contrario* être excédentaire, autrement dit négative. Au final, le composé obtenu est un amine-oxyde (Figure 14), une molécule globalement neutre mais dont les présences simultanées d'un cation et d'un anion modifient grandement les propriétés chimiques de l'alcaloïde pyrrolizidinique, et par extension, son comportement *in vivo* (cf. Partie 3.) (2,3).

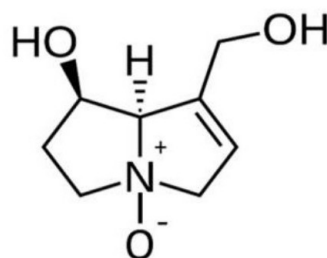


Figure 14 : Dérivé *N*-oxyde

La proportion des dérivés *N*-oxydes par rapport aux alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux est conséquente au sein de bon nombre d'espèces végétales pouvant en synthétiser ; néanmoins, comme toute règle a son lot d'exceptions, certaines plantes voient quelques-unes de leurs parties être presque complètement dépourvues de ces amines-oxydes : notamment dans le genre *Crotalaria* (*Fabaceae*) dont les graines de plusieurs espèces ont un pourcentage très faible de ce type de dérivés (2).

Mais la modification peut, dans une moindre mesure, être une estérification supplémentaire, en particulier celle de l'acide nécique principal par un second acide nécique, exemple que l'on peut observer entre autres dans la structure de la scorpioïdine (Figure 15-A) : la rétronécine étant liée à l'acide trachélanthique lui-même estérifié par l'acide tiglique. Il peut quelquefois s'agir d'une *O*-acétylation, c'est-à-dire de la formation d'une fonction ester grâce à la condensation d'un groupe alcool de l'alcaloïde pyrrolizidinique avec la fonction acide carboxylique de l'acide acétique avec perte d'une molécule d'eau : c'est le cas de la 7-acétylscorpioïdine (Figure 15-B) qui est tout simplement la scorpioïdine vue précédemment mais dont l'alcool en C-7 s'estérifie avec l'acide acétique (2).

Toutefois, ces mécanismes additionnels sont relativement rares, les deux composés cités ci-dessus étant exclusivement synthétisés par *Myosotis scorpioides* L., le myosotis des marais, de la famille des *Boraginaceae*. Notons également que les alcaloïdes pyrrolizidiniques dérivés de l'otonécine sont régulièrement sujets au phénomène d'*O*-acétylation mais que celui-là se produit au niveau de leur acide nécique dicarboxylique (doronine) (Figure 13-E) (2).

Une des dernières catégories d'additions possibles est cette fois d'origine enzymatique, il s'agit de réactions de glycosylation. Bien que ces dernières soient très fréquentes dans les métabolismes des végétaux, elles sont exceptionnelles lorsqu'il s'agit de la formation des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En effet, seuls quelques composés particuliers, aux acides néciques aromatiques, se retrouvent porteurs d'un ose dans leur structure moléculaire : la nervosine I (Figure 15-C), et des hétérosides dérivés de la thésinine : la (+)-lindélofidine (synonyme de (+)-isorétronécanol) estérifiée à l'acide *p*-coumarique (Figure 15-D) (2).

En rentrant un petit peu plus dans les détails, ce sont la thésinine-4'-*O*- β -D-glucoside (Figure 15-E), dont le groupe alcool de son cycle aryle a subi une *O*-glycosylation le liant ainsi au glucose, plus précisément au β -D-glucose ; et les deux stéréoisomères éthyléniques regroupés sous le nom de (*E/Z*)-thésinine-4'-*O*- α -L-rhamnoside, qui eux, ont vu le groupe hydroxyle de leur cycle

aromatique se lier à l' α -L-rhamnose, et ce, toujours *via* une *O*-glycosylation (Figures 15-F et 15-G) (2).

Cependant, les présences concomitantes d'un sucre et d'une pyrrolizidine rendent poreuses les frontières de la classification, rapprochant tout autant la molécule concernée des alcaloïdes que des hétérosides. Fort heureusement, seules quelques espèces du genre *Lolium* de la famille des *Poaceae*, une espèce d'orchidées, *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. et *Borago officinalis* L., la bourrache, sont capables d'une telle prouesse lors de la biosynthèse de leurs dérivés pyrrolizidiniques (2) !

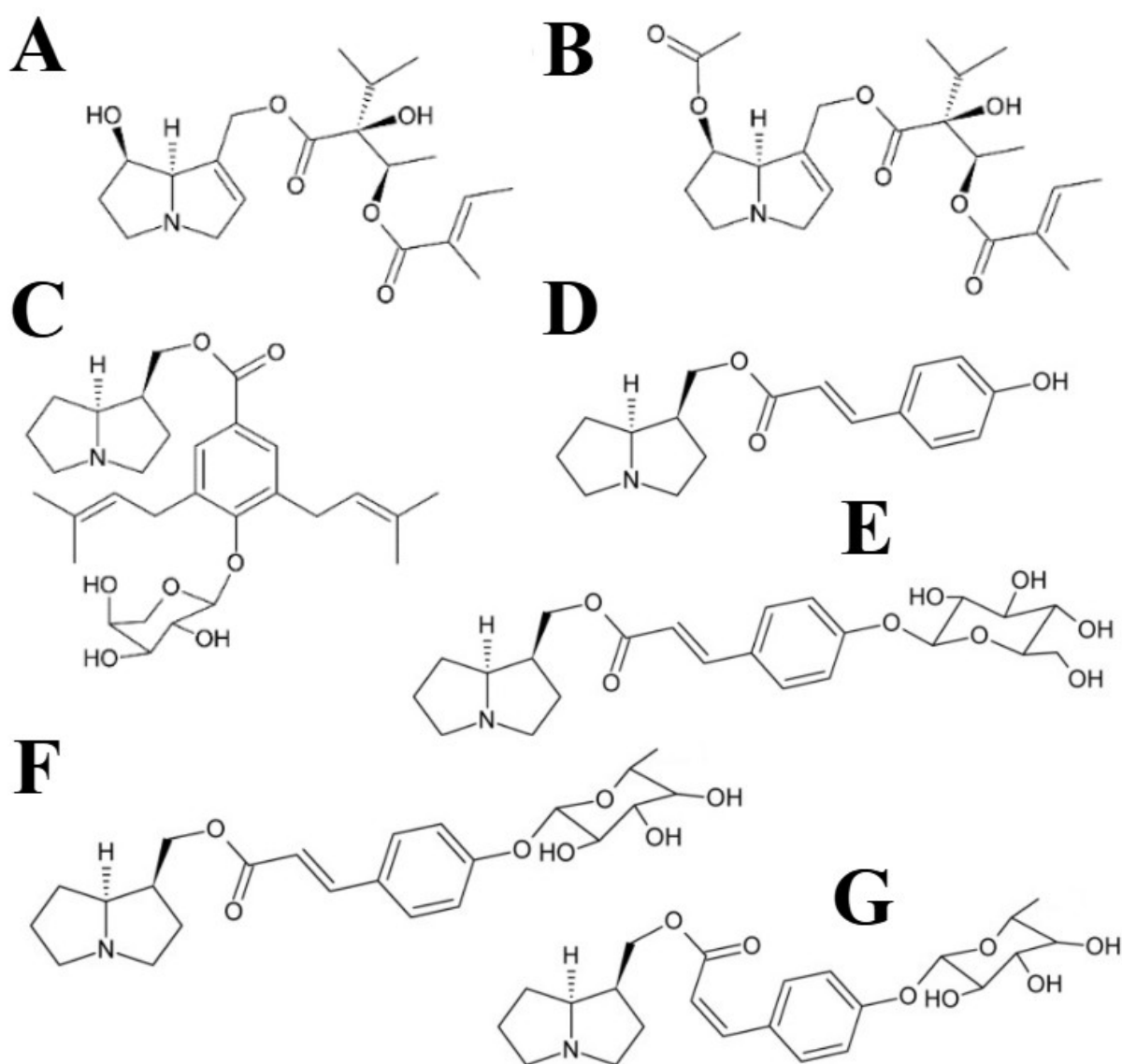


Figure 15 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques avec additions supplémentaires
 (A) Scorpioïdine (B) 7-acétylscorpioïdine (C) Nervosine I (D) Thésinine
 (E) Thésinine-4'-*O*- β -D-glucoside (F) *E*-thésinine-4'-*O*- α -L-rhamnoside
 (G) *Z*-thésinine-4'-*O*- α -L-rhamnoside

1.3. Propriétés physico-chimiques

À l'instar des alcaloïdes *lato sensu*, les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont une masse molaire moléculaire comprise entre 100 et 900 g/mol. La présence de l'oxygène dans leur formule chimique confère à ces composés une forme solide et cristallisée à température ambiante ; de plus, leur point de fusion est en général situé au-dessus des 200 °C (1).

Pour ce qui est de leurs caractères organoleptiques à l'état solide, ils ne sont guère nombreux et peu discriminants. En effet, les alcaloïdes pyrrolizidiniques n'ont qu'un aspect blanc et une saveur amère (1).

En outre, de par leurs nombreux centres de chiralité, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont capables de dévier la lumière polarisée. En effet, les énantiomères sont des isomères optiques, c'est-à-dire qu'ils dévient avec un angle identique la lumière polarisée mais dans deux directions opposées : soit à droite pour l'énantiomère (+) que l'on appelle aussi dextrogyre, parfois noté (*d*) ; soit à gauche pour l'énantiomère (-) qui quant à lui est appelé lévogyre, que l'on abrège en (*l*) (1).

Comme pour l'immense majorité des alcaloïdes, une certaine basicité est retrouvée dans les alcaloïdes pyrrolizidiniques, toutefois celle-ci reste fortement influencée par différents paramètres pouvant varier au sein de chaque molécule (1).

Parmi les facteurs intrinsèques modulant la basicité, il y a en premier lieu le niveau de disponibilité du doublet libre de l'azote, une disponibilité qui est factuellement réduite à cause de l'encombrement stérique présent tout autour de cet atome. Effectivement, de par la configuration spatiale de la pyrrolizidine, cette paire d'électrons est moins susceptible d'être dans la capacité à capter un ion H⁺ et donc entraîne *in fine* une diminution du caractère basique de ces alcaloïdes par rapport à ceux ayant un hétérocycle azoté à la structure plus propice comme, par exemple, un noyau tropane ou un cycle isoquinoléique (1).

Une autre caractéristique déterminante est la présence d'effets inductifs qui peuvent être soit attracteurs, soit donneurs suivant l'électronégativité propre à chaque élément. Pour en revenir à l'influence que l'électronégativité avoisinante peut avoir sur l'atome d'azote et son caractère basique, un effet inductif attracteur atténuera la basicité alors qu'un effet inductif donneur l'amplifiera (1,4). Dans le cas des alcaloïdes pyrrolizidiniques, les deux principaux effets inductifs responsables de la variabilité de la basicité sont, d'une part, la complète saturation du cycle pyrrolizidinique qui majore l'effet inductif donneur des liaisons C-C, exaltant ainsi la basicité de l'azote et, d'autre part, la présence d'une N-oxydation qui déplace la propriété alcaline de

l'alcaloïde pyrrolizidinique : passant du doublet non liant de l'azote à l'un des trois de l'atome d'oxygène (5). Cependant, l'atome d'oxygène se retrouve être soumis à un important effet inductif donneur à cause de sa charge négative tandis que l'atome d'azote, étant quant à lui chargé positivement, voit son électronégativité s'accroître fortement et, finalement, limite *de facto* l'aptitude d'un des doublets libres de l'oxygène à pouvoir capter un ion H^+ (4).

Les notions d'acidité et de basicité sont retranscrites conventionnellement par le biais du pK_a . Plus ce dernier est faible, plus l'acide est fort et inversement, plus le pK_a se retrouve être élevé et plus la base est considérée comme alcaline. Le pK_a est défini comme la constante logarithmique reliée à la constante d'acidité (K_a) par la formule suivante :

$$pK_a = -\log_{10}(K_a) \quad \text{Où } K_a = \frac{[A^-] \times [H_3O^+]}{[AH]}$$

Et où A^- est la base conjuguée de l'acide AH et forme ainsi le couple acido-basique AH/A^- (4).

En ce qui concerne les alcaloïdes pyrrolizidiniques, il existe deux valeurs majeures de pK_a suivant que l'atome d'azote est *N*-oxydé ou non. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques possédant un amine-oxyde ont un pK_a aux alentours de 5,55, ce qui en fait des bases relativement faibles (6). Tandis que ceux qui en sont dépourvus possèdent, en moyenne, un pK_a d'environ 6,50, ayant donc une basicité un peu plus marquée (7). De manière plus globale, la valeur du pK_a des alcaloïdes pyrrolizidiniques oscille entre 5,37 et 10,60 (5,8,9).

Ainsi, de par leurs propriétés acido-basiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent être présents sous deux formes distinctes suivant le pH du milieu : soit sous la forme de base, soit sous la forme de sels (1). C'est de par cette propriété que la solubilité des alcaloïdes pyrrolizidiniques devient variable suivant le solvant utilisé. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques bases (à la structure moléculaire non chargée électroniquement) sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires et dans les alcools de titre élevé. À l'inverse, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sels sont solubles dans l'eau et les alcools dilués et insolubles dans les solvants organiques faiblement polaires ou apolaires.

Qui plus est lorsque les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont sous forme saline, l'ammonium quaternaire leur confère non seulement une forme ionisée, mais aussi le pouvoir de former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates) ou organiques (tartrates, citrates, oxalates) (1). Toutefois, les dérivés *N*-oxydes ne sont pas soumis à cette généralité, eux qui sont intrinsèquement ionisés, mais ce, à des degrés différents : soit ils n'ont que l'ammonium quaternaire

comme charge intramoléculaire lorsque le pH est inférieur à leur pK_a (l'atome d'oxygène ayant capté un ion H^+), soit ils possèdent à la fois un ammonium quaternaire et un oxygène chargé négativement lorsque le pH est supérieur à leur pK_a .

Il est également intéressant de souligner que les sels d'alcaloïdes cristallisés sont d'une grande stabilité et donc peuvent se conserver dans cet état solide très facilement tandis qu'au contraire, leur forme solubilisée tout comme les alcaloïdes pyrrolizidiniques bases sont bien moins stables étant simultanément sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène (1).

1.4. Méthodes d'extraction

Comme pour celle de n'importe quelle autre classe d'alcaloïde, l'extraction des alcaloïdes pyrrolizidiniques repose sur la différence de solubilité qui existe avec divers solvants suivant que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont sous leur forme base ou sous leur forme sel ; et sur le fait que les alcaloïdes de manière générale sont habituellement retrouvés à l'état de sels dans la plante et qu'ils possèdent un caractère basique. Il y a cependant deux variantes d'extraction existantes : en milieu alcalin ou en milieu acide (1). Pour le cas des alcaloïdes pyrrolizidiniques, c'est principalement la seconde qui est utilisée (10).

Le procédé d'extraction mis en jeu et la détermination des composés chimiques utilisés lors de la phase d'extraction des alcaloïdes pyrrolizidiniques varient de façon significative suivant l'espèce végétale et le type de drogue concernées. Il en est de même pour la température à atteindre lors de l'extraction qui doit évidemment être adaptée au plus grand nombre d'alcaloïdes pyrrolizidiniques y compris les plus fragiles. C'est notamment le cas de ceux étant sous forme libre qui sont bien plus thermosensibles que leurs homologues estérifiés (10).

Les principales techniques extractrices employées sont la macération, la percolation ou des méthodes qui en sont dérivées, souvent bien plus performantes. Il peut alors s'agir du chauffage à reflux ou encore de l'appareil de Soxhlet (1,10).

D'autres techniques beaucoup plus poussées existent et reposent sur des paramètres ou des propriétés physiques particuliers :

– l'extraction assistée par ultrasons, où ces derniers favorisent la solubilisation, à la fois par l'augmentation de la pénétration du solvant à l'intérieur de la drogue végétale et par une meilleure diffusion des substances que celle-ci contient vers le solvant extracteur (10) ;

– l'extraction par dioxyde de carbone supercritique, qui s'effectue sous une immense pression — entre 10 et 15 MPa, soit une pression qui est *a minima* de 98 atm et pouvant atteindre jusqu'à un peu plus de 148 atm ! — et à une température comprise entre 50 et 60 °C. Ces paramètres permettent au dioxyde de carbone de posséder simultanément les caractéristiques d'un gaz (notamment une très grande diffusivité) et celles d'un liquide (dont la capacité à pouvoir solubiliser des substances chimiques, entre autres) ; de plus, cette technique peut se faire avec ou sans ajout de méthanol (10) ;

– l'extraction par liquide pressurisé qui est effectuée sous une très importante pression permettant donc, d'une part, le maintien des composés chimiques dans leur état liquide et prévenant ainsi toute perte potentielle de substances volatiles et, d'autre part, la possibilité d'atteindre des températures nettement supérieures au point d'ébullition du solvant ce qui accroît significativement la vitesse d'extraction. Néanmoins, cette technique présente quelques limites, dont la principale est la température recherchée qui peut entraîner une dégradation des molécules extraites. Effectivement au-delà des 100 °C et suivant le solvant sélectionné ainsi que son pH, la perte en alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux oscille entre 50 et 75 % par rapport à la température assurant un taux d'extraction maximal avec des paramètres identiques ! La cause de cette baisse de rendement est due à la réactivité des chaînes latérales portées par le cycle pyrrolizidinique — autrement dit le squelette de l'acide nécique — qui s'intensifie globalement avec l'élévation de la température (10).

La méthode avec le taux d'extraction le plus important est une extraction de courte durée — de l'ordre d'une trentaine de minutes en général —, qui se fait grâce à un mélange de solvants organiques légèrement acidifiés et à une température voisine de 100 °C. Malgré tout, ce principe est à adapter au type de drogue subissant l'extraction et aux substances qu'elle contient car suivant les éventuelles fragilités de ces composés, le degré d'acidité du solvant doit être finement contrôlé.

La plupart des alcaloïdes pyrrolizidiniques comportant en général au moins une fonction ester, ils sont *de facto* naturellement sensibles au pH, que ce dernier soit acide ou basique. C'est pourquoi, l'acide utilisé peut bien appartenir aux acides dit forts ; toutefois, il est impératif que celui-ci soit relativement dilué (10).

En outre, rappelons qu'une exposition prolongée à une température conséquente dégrade irrémédiablement les alcaloïdes pyrrolizidiniques quels qu'ils soient.

À présent, nous allons détailler ici les étapes d'une extraction en milieu acide *via* un chauffage à reflux. Il s'agit dans un premier temps d'une extraction solide-liquide (drogue/solvant)

suivie d'une extraction liquide-liquide (solution aqueuse/solution organique) lors de la phase de purification (Annexes I et II) (1).

Avant l'extraction à proprement parler, la drogue végétale est pulvérisée pour démultiplier sa surface en contact avec le solvant d'extraction et ainsi augmenter la quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques recueillis. La drogue est par la suite versée dans un ballon rond, puis il peut y avoir une délipidation préalable avec un solvant apolaire (éther de pétrole ou hexane, par exemple) si une forte quantité de graisses est présente à l'intérieur de la drogue. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne sont pas extractibles lors de cette étape car ils sont majoritairement présents sous forme de sels, c'est pourquoi ils demeurent au sein de la drogue pulvérisée (1,10).

L'extraction commence par l'ajout d'une solution acidifiée ($\text{pH} \approx 2-3$), très fréquemment hydro-alcoolique et principalement composée d'un mélange méthanol/eau aux proportions variables — de rapport identique 50/50 (*V/V*) ou jusqu'à 4:1 (*m/m*) — (10–12). L'utilisation d'un mélange hydro-alcoolique acide permet d'extraire une quantité d'impuretés moindre que si de l'eau seule est employée.

L'acidification se fait grâce à un acide dilué dont la force et la dilution sont déterminées en fonction de la drogue et des fragilités structurelles des alcaloïdes pyrrolizidiniques à extraire (comme déjà mentionné précédemment). Ce peut être, par exemple : de l'acide sulfurique (H_2SO_4 , $\text{p}K_{\text{a}1} = -9$), de l'acide chlorhydrique (HCl , $\text{p}K_{\text{a}} = -7$), de l'acide phosphorique (H_3PO_4 , $\text{p}K_{\text{a}1} = 2,2$), de l'acide formique ($\text{H}-\text{COOH}$, $\text{p}K_{\text{a}} = 3,8$) ou de l'acide acétique ($\text{H}_3\text{C}-\text{COOH}$, $\text{p}K_{\text{a}} = 4,7$) (4).

Cette première étape permet d'extraire de la drogue, à la fois les alcaloïdes pyrrolizidiniques sels (chlorhydrates, sulfates, citrates, tartrates, suivant l'acide utilisé) et les composés plus ou moins hydrosolubles (en fonction du titre d'alcool du mélange hydro-alcoolique employé), mais que l'on considère dans tous les cas comme des impuretés (1,11).

Suite à l'épuisement du marc, il y a une étape de filtration puis la solution hydro-alcoolique est distillée sous vide pour n'obtenir qu'une solution aqueuse acide. Après transvasement dans une ampoule à décanter, on y ajoute un solvant organique non miscible à l'eau, comme du dichlorométhane (CH_2Cl_2), du chloroforme (CHCl_3) ou dans de plus rares cas de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Cette extraction liquide-liquide permet d'éliminer les rares substances peu polaires ayant pu être potentiellement emportées lors de l'extraction (plus le mélange hydro-alcoolique a une teneur d'alcool élevée et plus des molécules faiblement polaires sont extraites) (1,10–12).

Une fois la décantation terminée, la phase organique est jetée et cette première opération de purification est reproduite une ou deux fois. Ainsi, les alcaloïdes pyrrolizidiniques restent dans la

phase aqueuse car toujours sous forme saline, mais ils sont, hélas, toujours accompagnés d'impuretés hydrosolubles (1,10–12).

C'est pour cela qu'il y a ensuite une alcalinisation du milieu grâce à une base dont le choix est crucial, à l'instar du soin apporté à la sélection de l'acide employé lors de l'étape d'extraction. En effet, les alcaloïdes pyrrolizidiniques comportant majoritairement des fonctions esters, ils sont considérés comme fragiles et donc l'utilisation d'une base faible ou diluée est de mise pour ne pas les altérer. L'alcalinisation se fait majoritairement par le biais de l'ammoniaque en solution aqueuse (NH_4OH , $\text{p}K_a = 9,2$) ou par celui du carbonate de sodium ($(\text{Na})_2\text{CO}_3$, $\text{p}K_{a1} = 6,33$ et $\text{p}K_{a2} = 10,33$) (1,4,10–12). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques passent ainsi de leur combinaison saline à leur forme base et précipitent immédiatement du fait de leur insolubilité.

Ainsi, nous obtenons d'une part, un précipité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et, d'autre part, des impuretés hydrosolubles toujours en solution (1,10–12).

La purification se poursuit de nouveau par l'ajout d'un solvant organique non miscible à l'eau (ici, exclusivement du dichlorométhane ou du chloroforme) et les alcaloïdes pyrrolizidiniques bases se retrouvent ainsi spontanément dissous dans cette solution organique. Cette extraction liquide-liquide est réitérée une à deux fois (1,10–12). La phase organique est recueillie puis le solvant est distillé.

In fine, nous obtenons un résidu sec d'alcaloïdes totaux sous forme de base. Ledit résidu contient donc l'intégralité des alcaloïdes que renfermait la plante, tout autant les alcaloïdes pyrrolizidiniques que ceux porteurs d'un hétérocycle différent (1,10).

1.5. Volet analytique

Une fois l'extraction terminée, il est nécessaire d'effectuer un dosage afin de déterminer avec précision la quantité de chaque alcaloïde pyrrolizidinique qui a été extrait de la plante. Cependant, avant cela, une ou plusieurs réactions de caractérisation peuvent avoir lieu. Celles-ci sont spécifiques d'une structure azotée particulière, ici du cycle pyrrolizidinique (1).

1.5.1. Caractérisation

À ce propos, il y a deux méthodes de caractérisation majeures des alcaloïdes pyrrolizidiniques : celle d'Ehrlich et celle de Mattocks, dont il existe d'ailleurs différentes variantes

suivant la catégorie d'alcaloïdes pyrrolizidiniques que l'on cherche à détecter en particulier (10,13,14).

Le réactif d'Ehrlich est composé d'un mélange d'éthanol (EtOH) à 95 % (V/V) et d'acide chlorhydrique concentré à 37 % (m/V) dans lequel du *para*-diméthylaminobenzaldéhyde (*p*-DMAB) est solubilisé (15,16). C'est ce réactif qui est le plus couramment utilisé (14,17,18).

Cependant, les alcaloïdes pyrrolizidiniques doivent auparavant subir une oxydation (en principe, avec du chloranil ou du peroxyde d'hydrogène) afin de transformer les pyrrolizidines en pyrroles. Puis ces cycles pyrroliques néoformés réagissent avec le *p*-DMAB grâce à un mécanisme de condensation en α de l'azote (Figure 16) (1,19).

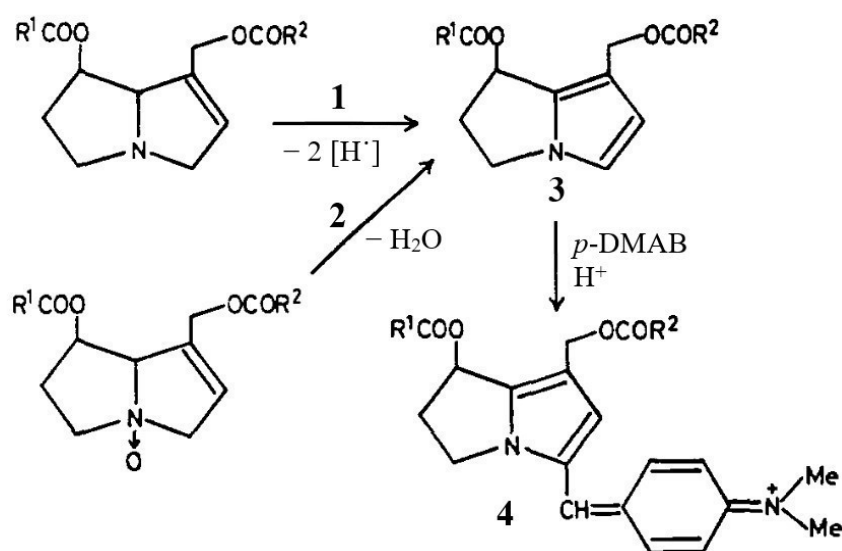


Figure 16 : Caractérisation des alcaloïdes pyrrolizidiniques

- (1) Déshydrogénation de l'alcaloïde pyrrolizidinique base libre
 (2) Déshydroxylation du *N*-oxyde de l'alcaloïde pyrrolizidinique (3) Dérivé pyrrolique (4) Chromophore (R¹/R², radical quelconque ; Me, groupe méthyle ; *p*-DMAB, *para*-diméthylaminobenzaldéhyde) [D'après (14)]

Pour ce qui est des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, une réduction préalable est nécessaire (Figure 16) : soit avec de la poussière de zinc en milieu acide (H₂SO₄ à 2 N), soit avec un complexe ferreux (Fe²⁺) en milieu ascorbique (1,14,20). La molécule créée par la condensation du pyrrole avec le *p*-DMAB possède un système de liaisons π conjuguées, ce qui *de facto*, fait de cette molécule un chromophore (Figure 16) (19).

Lorsque le résultat s'avère être positif, une coloration apparaît (fuchsia ou violacée), signifiant donc que des alcaloïdes pyrrolizidiniques étaient initialement présents à l'intérieur de la plante. La couleur obtenue est d'une intensité variable car celle-ci est proportionnelle à la quantité totale d'alcaloïdes pyrrolizidiniques que contient l'extrait testé ; lui-même étant le reflet de ce que renfermait la drogue végétale, du moins si l'extraction a été correctement conduite. Ainsi, le réactif d'Ehrlich est une méthode de caractérisation à la fois qualitative et quantitative (13,14).

Le réactif de Mattocks permet lui aussi la détection simultanée des alcaloïdes pyrrolizidiniques sous forme de base libre et de leurs équivalents *N*-oxydés (Annexes III à V). Toutefois, des variantes de ce réactif ont été créées pour une caractérisation d'une spécificité encore plus poussée : soit uniquement la mise en évidence des alcaloïdes pyrrolizidiniques classiques, soit seulement celle de leurs dérivés *N*-oxydes (14).

En réalité, le réactif de Mattocks est très proche de celui d'Ehrlich, si ce n'est que des améliorations significatives lui ont été apportées : notamment la possibilité de réaliser une caractérisation en pleine nature ou, grâce à ses variantes, de ne vouloir mettre en évidence qu'un seul type d'alcaloïde pyrrolizidinique en particulier (14) !

La caractérisation spécifique des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (Annexe III) débute par la solvatation du résidu sec d'alcaloïdes totaux grâce à une solution ascorbique. Puis, est ajouté du nitroprussiate de sodium, ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), dilué en milieu très légèrement alcalinisé par de la soude (NaOH) à 0,1 M. Un chauffage à 70 °C pendant trente secondes à une minute permet la déshydratation des amines-oxydes, cette réaction est totalement sélective grâce à la présence de l'ion fer (II) qui ne réagit qu'avec les dérivés *N*-oxydés et les transforme en pyrroles (14).

Ensuite, du *p*-DMAB en solution dans un mélange aqueux d'acide acétique (AcOH) et d'acide perchlorique (HClO_4) à 60 % (*m/V*) est ajouté et le récipient est à nouveau chauffé à 70 °C pendant une minute. Le même mécanisme de condensation avec le *p*-DMAB a lieu, toujours en α de l'azote pyrrolique. *In fine*, le réactif prend une coloration magenta lorsque des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques étaient préalablement contenus dans l'extrait végétal testé (14).

La mise en évidence spécifique des alcaloïdes pyrrolizidiniques sous forme de base libre (Annexe IV) commence, quant à elle, avec la reprise du résidu sec d'alcaloïdes totaux par un solvant organique : le chloroforme. Dans la foulée, on y ajoute de l'*ortho*-chloranil (*o*-chloranil) solubilisé dans de l'acétonitrile, aussi appelé cyanure de méthyle (CH_3CN). L'*o*-chloranil est le

composé oxydant qui permet, une fois de plus, la formation de pyrroles à partir de cycles pyrrolizidiniques, une réaction de déshydrogénation que l'on accélère par un chauffage à 70-80 °C durant une trentaine de secondes. L'excédent de chloranil crée une teinte orangée qui est dissipée par l'ajout d'une solution d'acide ascorbique et une légère agitation par retournement du récipient (qui contient donc désormais deux phases non miscibles) (14).

Par la suite, du *p*-DMAB, qui est présent au sein d'un mélange d'acide acétique, d'eau et d'acide perchlorique à 60 % (*m/V*) est ajouté. Afin d'avoir une réaction de condensation aussi rapide qu'optimale, le récipient est agité par retournement avant d'être mis à chauffer pendant une minute, et ce toujours à 70-80 °C. S'il y avait la présence préalable d'alcaloïdes pyrrolizidiniques non *N*-oxydés, alors il apparaît une coloration magenta dans la phase aqueuse supérieure (14).

Enfin, pour terminer sur les techniques de caractérisation des alcaloïdes pyrrolizidiniques, nous allons maintenant aborder le réactif de Mattocks original (Annexe V), qui permet la caractérisation concomitante des alcaloïdes pyrrolizidiniques classiques et de leurs dérivés amines-oxydes. La technique commence par solubiliser le résidu sec d'alcaloïdes totaux à l'aide d'une solution de méthanol (MeOH) contenant de l'éthylène glycol à 5 % (*m/V*). Puis la solution obtenue est versée dans deux tubes à essais (14).

✱ Dans le premier tube est ajouté de l'*o*-chloranil dissous dans du cyanure de méthyle, puis le tube est chauffé à 70-80 °C pendant une minute. Grâce à cette réaction d'oxydation, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont transformés en pyrroles. Une coloration orangée apparaît suite à l'excès de chloranil, c'est pourquoi de l'acide ascorbique à saturation dans du méthanol y est ajouté pour ôter cette teinte. Enfin, du *p*-DMAB — dissous dans un mélange d'acide acétique, d'eau et d'acide perchlorique à 60 % (*m/V*) — est ajouté et le tube à essai est mis à chauffer à 70-80 °C durant une minute (condensation en α de l'azote pyrrolique). Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration magenta et indique la présence initiale d'alcaloïdes pyrrolizidiniques classiques (14).

✱ Dans le second tube, du sulfate de fer (II) ($\text{Fe}(\text{SO})_4$) est ajouté pour permettre la déshydratation des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. Si un précipité vert se forme, un ajout supplémentaire de sulfate ferreux est nécessaire pour continuer la déshydratation des amines-oxydes. Le tube à essai est chauffé à 70-80 °C pendant soixante secondes puis le *p*-DMAB (toujours au sein du même solvant) est rajouté et le tube à essai subit à nouveau un chauffage à 70-80 °C d'une durée d'une minute (condensation en α de l'azote). Une coloration magenta se forme alors si la drogue végétale renfermait au préalable des alcaloïdes pyrrolizidiniques *N*-oxydés (14).

D'une manière similaire au réactif d'Ehrlich, l'intensité des colorations magenta obtenues avec les réactifs de Mattocks reflète la quantité totale des alcaloïdes pyrrolizidiniques que l'on a caractérisés. Autrement dit, la mise en évidence de Mattocks est à la fois qualitative et quantitative. En outre, elle offre également la possibilité de réaliser un dosage colorimétrique après l'établissement d'une gamme d'étalonnage ; néanmoins la rigueur indispensable à la mise en œuvre de cette dernière demande un environnement adéquat... Ce qui n'est pas toujours le cas étant donné que les caractérisations de Mattocks ont initialement été créées pour une identification rapide d'espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques en pleine nature lors de sorties botaniques sur le terrain (14).

Toutefois, le réactif de Mattocks et ses variantes possèdent quelques limites... En effet, les alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'ils caractérisent doivent être 1,2 insaturés afin de pouvoir réagir avec l'agent réducteur et former un pyrrole. Cette règle est valable pour tous les groupes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, que ce soit pour ceux dits classiques ou pour les dérivés *N*-oxydes. De plus, les réactifs d'Ehrlich et de Mattocks ne peuvent caractériser les alcaloïdes pyrrolizidiniques du type otonécine ; en effet, à cause du groupe méthyle lié à l'atome d'azote, aucune conversion en cycle pyrrole n'est possible (14).

Ces quelques exceptions réactionnelles empêchent, *de facto*, une visualisation qualitative globale des alcaloïdes pyrrolizidiniques que synthétise la plante étudiée. Cependant, ces méthodes de caractérisation étant fortement spécifiques, une plante contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques, quels qu'ils soient, sera toujours identifiée comme telle, même si la couleur magenta se révèle être très faible (13).

1.5.2. Isolement et dosage

À présent, nous allons aborder les différentes techniques analytiques permettant la détermination et le dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques. La méthode la plus courante utilisée pour séparer ces derniers — de par sa facilité de mise en œuvre et son coût d'utilisation dérisoire — est une chromatographie planaire : la chromatographie sur couche mince (CCM) (1,10).

Elle se déroule le plus souvent sur un support recouvert de gel de silice et à l'aide d'un éluant qui est généralement constitué d'une mixture de solvants organiques à laquelle un faible volume de base a été ajouté. À titre d'exemples, la composition de l'éluant peut être un mélange de méthanol, de dichlorométhane et de diéthylamine ($pK_a = 10,98$) (26:70:4, *V/V/V*) (10,21,22). Une fois la plaque de CCM mise dans une chambre saturée des vapeurs dudit éluant, le phénomène de

migration se déroule et permet d'emporter les divers composés à différentes distances du point de dépôt. Ensuite, la révélation de la plaque de CCM se fait par une pulvérisation de celle-ci avec un réactif de détection des alcaloïdes, qui peut être ou général ou spécifique, puis la plaque est lue soit sous un rayonnement ultraviolet, soit à la lumière naturelle (1,10,21).

Il existe également d'autres types de chromatographie qui peuvent être employés, sur colonne cette fois : la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase liquide, soit à haute performance (CLHP), soit à ultra haute performance (UHPLC, de l'anglais *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) ou encore la chromatographie par gouttelettes à contre-courant (DCCC, de l'anglais *Droplet CounterCurrent Chromatography*) (1,10).

Ces techniques de séparation sont fréquemment couplées à des méthodes de détection, d'identification et de quantification des diverses molécules : la spectrométrie de masse (SM) ou bien les spectroscopies ultraviolet (UV) ou infrarouge (IR) (1,10). Les couplages les plus souvent choisis pour l'analyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont la CPG-SM et la CLHP-SM (10).

Toutefois, les chromatographies ne sont pas les seules techniques séparatrices qui peuvent être utilisées ; en effet, l'électrophorèse capillaire rend elle aussi possible la séparation des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Cependant, ces derniers doivent être sous forme ionisée uniquement (sels ou *N*-oxydes) (10).

C'est pourquoi une électrophorèse particulière est également employée : la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire (MEKC, de l'anglais *Micellar ElectroKinetic capillary Chromatography*) qui permet la séparation simultanée des alcaloïdes pyrrolizidiniques sous forme base, sous forme sels ainsi que les dérivés amines-oxydes. Une fois l'étape de séparation des composés effectuée, l'identification se fait qualitativement par le biais d'une spectroscopie UV (10).

Enfin, des méthodes analytiques sans aucune étape de séparation préalable sont parfois choisies pour le dosage et l'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Ce peut être notamment l'emploi de la photométrie, de la quantification par résonance magnétique nucléaire (RMN) utilisant à la fois un isotope de l'hydrogène et un isotope du carbone (respectivement le ^1H et le ^{13}C) ou encore grâce une méthode immuno-enzymatique ELISA (de l'anglais *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) contenant un anticorps spécifique de l'alcaloïde pyrrolizidinique à isoler (10).

2. Biosynthèse

La biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques a fait l'objet de nombreux travaux, néanmoins une forte hétérogénéité dans l'étude de ses différentes étapes est à noter. La formation du cycle pyrrolizidinique est l'une des plus documentées au détriment de celle des acides néciques dont la plupart demeure pour le moins incomplète... Une chose est sûre, les alcaloïdes pyrrolizidiniques font partie des alcaloïdes vrais, c'est pourquoi ils ont tout ou partie de leurs précurseurs biosynthétiques qui appartiennent aux acides aminés (1).

Ajoutons à cela que les réactions métaboliques qui conduisent aux alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent être classées en deux temporalités distinctes (2). La première correspond aux étapes de formation des nécines et des acides néciques jusqu'à leur estérification entre eux et permet d'aboutir aux alcaloïdes pyrrolizidiniques primordiaux : c'est la biosynthèse primaire (ou biosynthèse *stricto sensu*). La seconde, quant à elle, est une phase de modulation structurale où les réactions se déroulent, soit sur les nécines, soit sur les acides néciques des esters primordiaux : c'est la diversification post-biosynthétique (ou biosynthèse *lato sensu*).

La différenciation de ces deux périodes dans la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques est indispensable pour pleinement comprendre toutes ses particularités. D'un côté, les espèces botaniques se sont chacune spécialisées dans la production d'une petite poignée d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qui joueraient alors le rôle de précurseurs ; et donc par extension, ce ne sont plus que quelques nécines et acides néciques qu'il leur a fallu être en capacité de synthétiser. De l'autre, les réactions de diversification structurelle ont beau être toujours plus variées les unes que les autres au sein des taxons végétaux, elles ne nécessitent généralement qu'une seule voire deux étapes biosynthétiques (2).

D'un point de vue énergétique, ce choix semble être le plus judicieux. En effet, les éléments constitutifs produits lors de la biosynthèse *stricto sensu* exigent plusieurs réactions métaboliques et donc également plusieurs enzymes ; alors que la phase de diversification post-biosynthétique a lieu sur un alcaloïde pyrrolizidinique pour en donner un autre et n'exige ainsi qu'une seule enzyme, aussi spécifique soit-elle. C'est pourquoi l'uniformisation de la biosynthèse primaire est apparue comme la solution la plus économe pour le métabolisme de la plante, quitte à accroître la diversité de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques *a posteriori*.

2.1. Formation des nécines

Le cycle pyrrolizidinique de la nécine est formé par un enchaînement de réactions que l'on peut tout à fait étendre à la plupart des alcaloïdes. En effet, la formation d'un hétérocycle azoté est le résultat de quatre étapes indispensables : l'accumulation d'un précurseur aminé, l'accumulation d'un précurseur carbonylé, la formation d'un ion iminium et une addition nucléophile (23). Toutefois, plusieurs caractéristiques font de la biogenèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques une spécificité que seules quelques espèces végétales sont capables de réaliser.

En premier lieu, le précurseur aminé est une polyamine spécifique : l'homospermidine. Ensuite, le précurseur carbonylé possède une origine intramoléculaire car celui-ci n'est ni plus ni moins que l'homospermidine ayant subi une désamination oxydante. Et enfin, la formation de l'ion iminium et l'addition nucléophile surviennent toutes deux durant une réaction de Mannich qui permet la création du cycle pyrrolizidinique *via* un mécanisme de condensation intramoléculaire (1,2,23).

2.1.1. Formation du précurseur aminé

À présent, nous allons nous attarder sur les différentes phases de cette biogenèse et commencer, tout d'abord, par les réactions métaboliques mises en jeu pour permettre d'aboutir *in fine* à une molécule d'**homospermidine**.

Les précurseurs impliqués ne sont autres que deux acides aminés : l'**ornithine** et l'**arginine** (1,2,23,24). L'**ornithine** peut provenir de deux voies métaboliques différentes (Figure 17).

✱ La première met en jeu l'**acide α -cétoglutarique** qui, par le biais d'une transaminase, est transformé en **acide glutamique**. Puis ce dernier, après plusieurs modifications structurales, toujours catalysées par des enzymes, aboutit à l'**ornithine** (23).

✱ La seconde implique, quant à elle, l'**arginine** dont la fonction guanidine est par hydrolyse grâce à une arginase, libérant ainsi une molécule d'urée pour obtenir de l'**ornithine**. Ensuite, l'**ornithine** est décarboxylée pour créer de la **putrescine**, qui est l'un des précurseurs directs de l'**homospermidine** (1,2,23).

Cependant, ce n'est pas la seule voie possible pour la biosynthèse de la **putrescine** ; en effet, l'**arginine** peut également subir un autre type de réaction enzymatique : une décarboxylation. Celle-ci conduit à la formation de l'**agmatine** dont la fonction guanidine est ensuite transformée en

fonction urée créant donc la **N-carbamoylputrescine**. Cet intermédiaire est par la suite hydrolysé pour former d'une part, de la **putrescine** et d'autre part, du dioxyde de carbone et de l'ammoniac (Figure 17) (23).

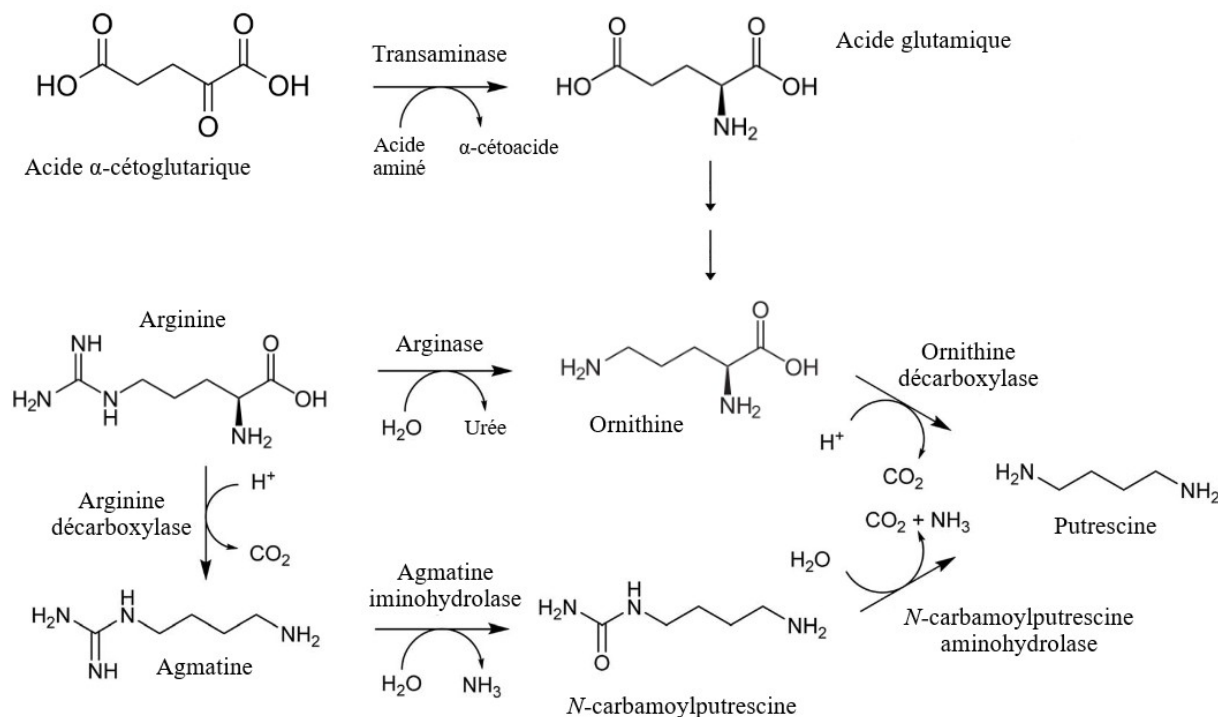


Figure 17 : Biosynthèse de la putrescine

[D'après (23)]

La formation de l'**homospermidine** implique la présence de **putrescine**, mais une autre molécule ubiquitaire au sein du règne végétal est également indispensable : la **spermidine** (1,23). Cette dernière étant un composé du métabolisme primaire des plantes, nous allons uniquement nous intéresser à son rôle lors la biosynthèse de l'homospermidine.

Afin d'obtenir de l'**homospermidine**, le transfert d'une chaîne aminobutyle sur la **putrescine** est nécessaire, cette réaction est dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en tant que cofacteur enzymatique et forme d'un côté une triamine symétrique : l'**homospermidine** (ou *N*-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutane) et de l'autre le 1,3-diaminopropane (Figure 18). Par ailleurs, cette réaction est médiée par une enzyme spécifique : l'homospermidine synthase (HSS) (1–3,23).

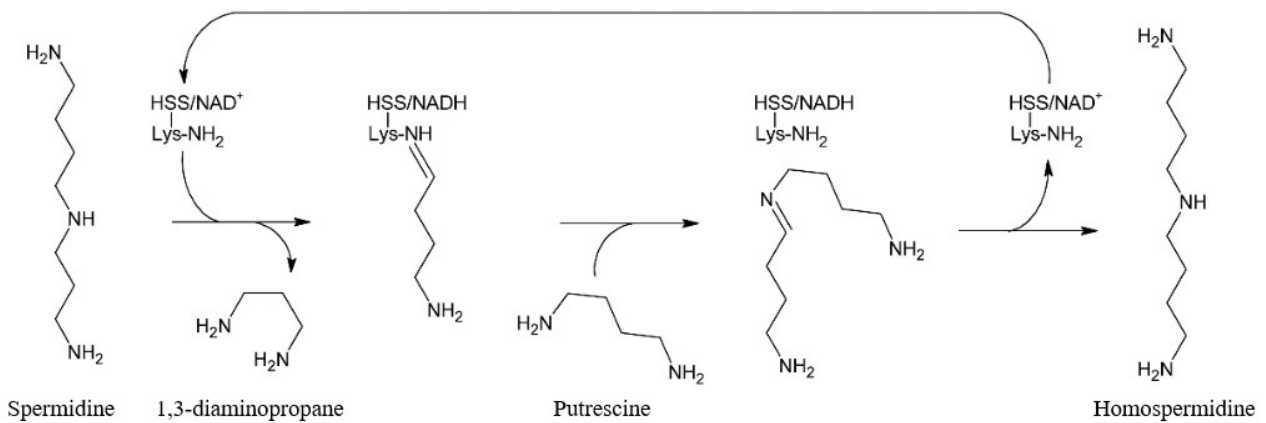


Figure 18 : Cycle réactionnel de l’homospermidine synthase

(HSS, homospermidine synthase ; NAD⁺, forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH, forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide ; Lys-NH₂, résidu de lysine aminé ; Lys-NH, résidu de lysine iminé) [D’après (2)]

L’HSS est une enzyme que l’on retrouve seulement chez certaines espèces botaniques et qui a la particularité de ne synthétiser que de l’homospermidine. Cette propriété est le résultat d’une duplication génétique d’une autre enzyme structurellement très proche : la désoxyhypusine synthase (DHS) (23,25–28). La DHS fait partie intégrante du métabolisme primaire des végétaux car elle permet de débiter l’activation du facteur d’initiation eucaryotique 5A (eIF5A, de l’anglais *eukaryotic translation Initiation Factor 5A*), transformant son résidu de lysine en désoxyhypusine avant qu’il ne soit pris en charge par une monooxygénase spécifique qui le transforme alors en hypusine, un acide aminé obtenu exclusivement par cette voie métabolique. Ce facteur a notamment un rôle crucial dans la croissance et la division cellulaires et est aussi impliqué dans les processus de germination et de sénescence. Qui plus est, la DHS peut réaliser cette réaction de transfert du groupement aminobutyle, soit pour commencer l’activation de l’eIF5A, soit pour synthétiser de l’homospermidine. Mais dans ce dernier cas, ce n’est qu’en très petite quantité (23,25,26).

Comme mentionnée précédemment, l’apparition de l’HSS est due à un phénomène de duplication de la séquence codante de la DHS au sein du génome qui est survenu indépendamment au sein de différentes familles, créant *de facto* dans leur arbre phylogénétique certains clades ayant la capacité de synthétiser des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Plus précisément, l’apparition de l’HSS a été retrouvée dans au moins sept familles botaniques : *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Convolvulaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* et *Orchidaceae* (2,26,29,30).

Elle se serait certes produite sept fois mais pas de façon identique pour autant... Pour les deux familles de Monocotylédones — les *Poaceae* et les *Orchidaceae* —, l’HSS aurait été héritée d’un ancêtre commun avant la séparation de ces deux lignées ; tandis que chez les *Asteraceae*, deux

événements seraient survenus au cours des âges : l'un dans la tribu des *Senecioneae* et l'autre dans celle des *Eupatorieae* (2,29–32) !

2.1.2. Formation du cycle pyrrolizidinique

Une fois l'homospermidine synthétisée, une désamination oxydante se produit grâce à une métalloenzyme, plus précisément une cuproenzyme : l'homospermidine oxydase (HSO) (33). Cette cupro-amine oxydase (CuAO) est localisée au niveau des peroxysomes, des organites connus pour contenir des enzymes catalysant les réactions d'oxydation ; et de surcroît, elle joue un rôle clé lors de la biogenèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques (2,23,34,35).

Suite à de nombreuses expériences, il a effectivement été montré qu'en présence d'un puissant inhibiteur connu des CuAO, la 2-hydroxyéthylhydrazine ou β -hydroxyéthylhydrazine (β -HEH), la biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques se voyait être grandement altérée. L'incorporation de l'homospermidine dans la cascade biosynthétique de la pyrrolizidine était complètement inexistante et a donc provoqué l'accumulation de cette triamine symétrique à l'intérieur des cellules végétales où, par ailleurs, la concentration intracellulaire d'homospermidine est demeurée élevée jusqu'à la dissipation de l'effet inhibiteur (2,26).

En outre, l'HSO a la capacité de réaliser deux désaminations oxydantes : celles des deux amines primaires situées à chaque extrémité de la structure de l'homospermidine. C'est une caractéristique retrouvée uniquement lors de la biosynthèse du cycle pyrrolizidinique car pour les autres classes d'alcaloïdes, les désaminations oxydantes ne concernent qu'un seul groupe amine primaire (1,2,23,33).

De par l'action de l'HSO, les amines terminales sont substituées par des carbonyles et en l'occurrence par des aldéhydes au vu de leur position au sein du squelette moléculaire. Les deux désaminations oxydantes se produisent successivement mais la capacité du site catalytique de cette cuproenzyme est telle que la seconde désamination oxydante est presque immédiate (33).

Jusqu'à très récemment, cette spécificité enzymatique avait amené les scientifiques à avancer l'hypothèse d'une cupro-amine oxydase particulière, la diamine oxydase, qui mènerait à la libération d'un intermédiaire oxydé de part et d'autre de sa structure, autrement dit, un dérivé dicarbonylé : le 4-[(4-oxobutyl)amino]butanal parfois aussi appelé le 4,4'-iminodibutanal par certains auteurs (Figure 19-A) (2,23).

Mais depuis peu, la publication de travaux a remis totalement en cause cette supposition en démontrant l'inexistence du 4,4'-iminodibutanal durant la formation des nécines (Figure 19) (33) !

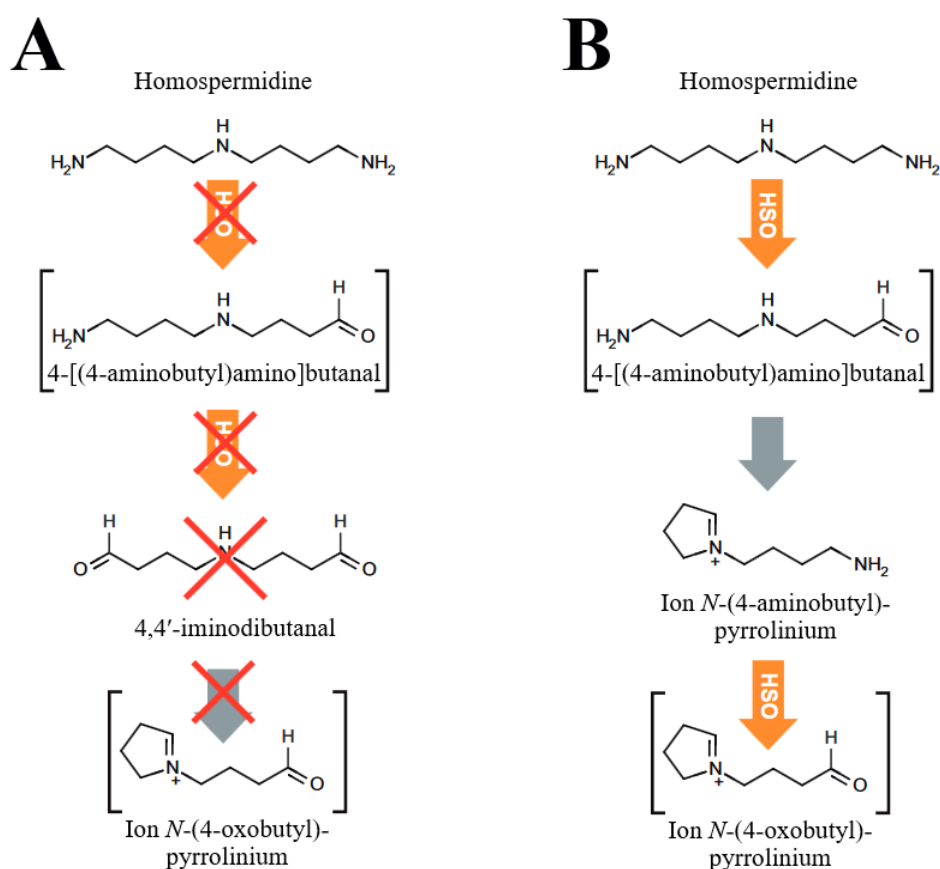


Figure 19 : Réaction de désamination oxydante de l'homospermidine oxydase

(A) Ancienne hypothèse réfutée (B) Nouvelle hypothèse avancée

(HSO, homospermidine oxydase) [D'après (33)]

En effet après avoir mis en évidence la véritable enzyme responsable de l'oxydation de l'**homospermidine** — l'HSO —, les chercheurs de ladite étude ont également pu détecter les composés réactionnels intermédiaires qui furent plus que longtemps supputés. Il s'agit du **4-[(4-aminobutyl)amino]butanal**, résultant de la première réaction de désamination oxydante avant sa cyclisation spontanée en l'**ion *N*-(4-aminobutyl)pyrrolinium**, dont le groupe amine primaire subit par la suite la **seconde réaction** de désamination oxydante — toujours médiée par l'HSO — et conduit à la formation de l'**ion *N*-(4-oxobutyl)pyrrolinium** (Figure 19-B) (33).

Ainsi d'une **triamine symétrique**, nous passons *in fine* à un **composé intermédiaire cyclique et oxydé** dont la haute réactivité permet d'obtenir les **premiers cycles pyrrolizidiniques** (2,23,33).

Les étapes charnières de la biosynthèse des nécines s'apparentent à celles d'une **réaction de Mannich** et c'est donc par le biais de celle-ci que les deux dérivés carbonylés formés par l'HSO subissent chacun un mécanisme de **cyclisation intramoléculaire**. En outre, cette réaction est généralement détaillée en deux temps suivant l'aldéhyde qui est impliqué (Figure 20) (1,2,23).

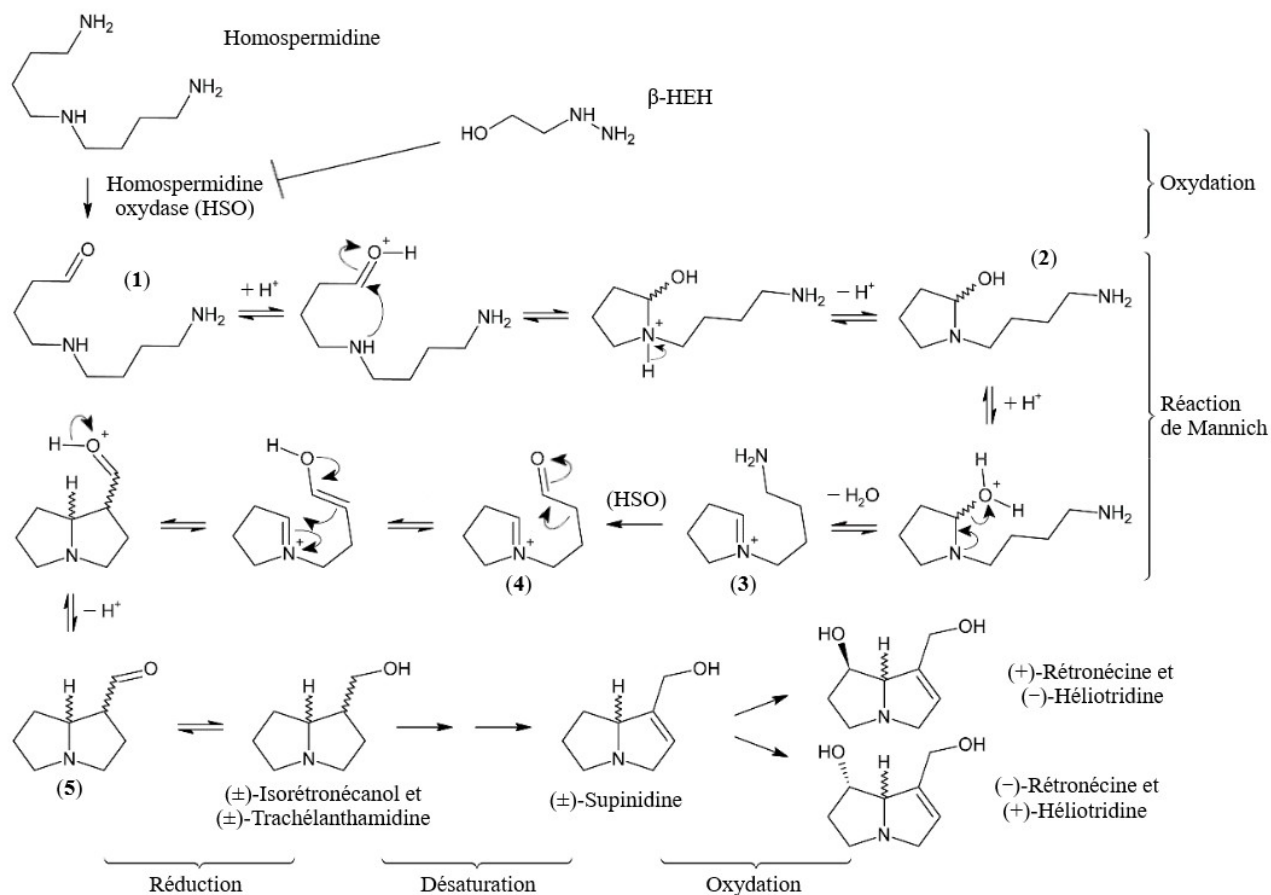


Figure 20 : Détails du mécanisme réactionnel de type Mannich responsable de la double cyclisation intramoléculaire retrouvée lors de la biosynthèse des nécines

- (1) 4-[(4-aminobutyl)amino]butanal (2) Hémiaminal cyclique (3) Ion *N*-(4-aminobutyl)pyrrolinium (4) Ion *N*-(4-oxobutyl)pyrrolinium (5) 1-formylpyrrolizidine (HSO, homospermidine oxydase ; β-HEH, β-hydroxyéthylhydrazine) [D'après (2)]

La cyclisation débute grâce à la propriété que les carbonyles ont de se protoner facilement en milieu acide et donc de créer une charge partielle δ^+ sur le carbone fonctionnel, qui devient un centre électrophile (Figure 20-1) (4). L'**amine secondaire** effectue alors une attaque nucléophile *via* le doublet non liant de l'azote et forme ainsi un composé intermédiaire cyclique fortement instable : un **hémiaminal** (Figure 20-2) (2).

Étant toujours en milieu acide, l'**hémiaminal** se déshydrate immédiatement et forme un cation iminium cyclique — précisément un pyrrolinium — caractéristique de la biogenèse des

alcaloïdes pyrrolizidiniques : l'ion ***N*-(4-aminobutyl)pyrrolinium** (Figure 20-3). Cet intermédiaire ionisé est ensuite très rapidement pris en charge par l'HSO pour devenir l'ion ***N*-(4-oxobutyl)pyrrolinium** (Figure 20-4) (23,33).

La seconde phase de cette condensation de type Mannich est également initiée par une caractéristique que possèdent les **carbonyles** : l'existence d'un phénomène de **tautomérie** en milieu acide, où le groupe fonctionnel est, soit un aldéhyde, soit un énol (Figure 20-4) (4).

Toutefois, l'équilibre entre ces deux tautomères est facilement rompu par la présence du **cation pyrrolinium** voisin. Effectivement, l'atome d'azote exerce un effet inductif attracteur si puissant sur l'ensemble de ses liaisons qu'il engendre un déplacement des électrons π vers lui, créant dès lors un **carbocation intermédiaire** en α de l'azote (Figure 20) (4).

Celui-ci est spontanément attaqué par un centre nucléophile intramoléculaire, en l'occurrence la double liaison de l'énol, pour *in fine* aboutir à un cycle pyrrolizidinique carbonylé en position C-1 : la **1-formylpyrrolizidine** (Figure 20-5) (33).

2.1.3. Diversification des nécines

Ensuite, l'intervention d'une enzyme est nécessaire afin de catalyser la réaction de réduction qui permet d'obtenir les premières nécines *stricto sensu* en transformant l'**aldéhyde** en **alcool**. Les nécines pouvant être formées par cette réduction sont au nombre de quatre : les deux énantiomères de l'**isorétronécanol** et les deux énantiomères de la **trachélanthamidine** (Figure 20) (2,33).

Là encore tout n'est qu'hypothétique mais l'enzyme la plus susceptible de pouvoir réaliser cette réduction serait l'alcool déshydrogénase (ADH) (2,23). En effet, après une expérience de marquage au deutérium (^2H) de la putrescine, la nécine monohydroxylée obtenue avait son carbone C-9 dans une configuration *S* ; or cette stéréosélectivité est caractéristique d'une réduction d'un aldéhyde en groupe hydroxyle qui aurait été catalysée par une alcool déshydrogénase (2).

Enfin, d'autres types de réactions peuvent avoir lieu comme une **désaturation** ou des **oxydations** (Figure 20). La réaction de désaturation est exclusivement localisée au niveau de la liaison entre les carbones C-1 et C-2 ; ce qui la fait passer d'une liaison simple à une double liaison, formant alors la (\pm)-**supinidine**. Quant aux oxydations ultérieures, elles permettent la création des **nécines polyhydroxylées** (rétronécine, héliotridine, rosmarinécine, crotanécine...) (Figure 20) (2).

Il est important de préciser que la cyclisation de l'ion *N*-(4-oxobutyl)pyrrolinium peut aboutir à plusieurs stéréoisomères de la 1-formylpyrrolizidine qui sont précisément au nombre de

quatre. En effet, ce précurseur contient deux carbones asymétriques (C-1 et C-8) ; cependant seules certaines nécines sont retrouvées au sein des alcaloïdes pyrrolizidiniques que synthétise chaque espèce végétale (2,33). À titre d'exemples, la quasi-totalité des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents chez les *Asteraceae* et les *Poaceae* possèdent un squelette contenant respectivement la (+)-rétronécine et la (+)-lindélofidine. Alors qu'au contraire, les espèces des *Boraginaceae* ont un panel de nécines bien plus important : (-)-trachélanthamidine, (-)-supinidine, (±)-isorétronécanol, (+)-héliotridine, (+)-rétronécine, etc. (2).

Ceci implique donc une stéréosélectivité propre à chaque plante lors de la condensation intramoléculaire ; or la condensation de type Mannich se produit spontanément une fois chaque désamination oxydante terminée. C'est pour cela qu'il est logiquement suggéré le rôle clé de l'HSO dans la stéréochimie du composé final car les deux précurseurs aldéhydiques ne pouvant être transportés vers une autre enzyme pour une initiation de la cyclisation, c'est finalement l'HSO qui est la plus à même d'être le siège de ce mécanisme stéréosélectif (2,23,33) !

2.2. Formation des acides néciques

D'une manière similaire aux nécines, les acides néciques ont partiellement ou totalement des acides aminés comme précurseurs biosynthétiques. Toutefois, ceux-ci diffèrent d'un acide nécique à l'autre et notamment suivant la longueur de la chaîne carbonée à synthétiser. Ainsi, les acides néciques dérivent de plusieurs voies de métabolisation, *a contrario* des nécines qui ont toutes une origine biosynthétique commune (2,3,36).

Les **acides néciques** sont principalement constitués d'un squelette aliphatique, c'est pour cela que les amino-acides retrouvés dans la biosynthèse des acides néciques appartiennent tous à la même catégorie : celle des **acides aminés à chaîne ramifiée**. Autrement dit, de l'**isoleucine**, de la **valine** et de la **leucine**. Néanmoins, des études d'incorporation au carbone radiomarqué (^{14}C) ont également montré l'implication de la **thréonine** dans la cascade métabolique conduisant aux acides néciques ; mais seulement parce que celle-ci joue le rôle de précurseur initial lors de la formation *de novo* de l'isoleucine (2,3,36,37).

Pour pouvoir pleinement comprendre la biogenèse des acides néciques quels qu'ils soient, il faut donc avant tout avoir en tête celle des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA, de l'anglais *Branched-Chain Amino Acids*) mais également le catabolisme qui découle de chacun d'entre eux.

En effet, ces cascades métaboliques sont étroitement liées avec celles engendrées lors de la formation des acides néciques (36–38).

Une étape enzymatique est à la fois commune à l'anabolisme et à la dégradation des BCAA, il s'agit de la réaction de transamination qui a par ailleurs un rôle clé dans le métabolisme des acides aminés de manière générale ; et ce, car elle permet le passage d'un motif **amino-acide** à celui d'un **α -cétoacide** (37,38). En ce qui concerne les dérivés cétoacides respectifs des BCAA, ce sont :

- l'**acide α -cétoisovalérique** (ou acide 3-méthyl-2-oxobutanoïque) pour la **valine** (37) ;
- l'**acide α -cétoisocaproïque** (ou acide 4-méthyl-2-oxopentanoïque) pour la **leucine** (37) ;
- et l'**acide α -céto- β -méthylvalérique** (ou acide 3-méthyl-2-oxopentanoïque) pour l'**isoleucine** (37).

L'enzyme catalysant ce transfert est une transaminase (également appelée aminotransférase) spécifique des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAT, de l'anglais *Branched-Chain Amino acid Transaminase*). Cette enzyme a la propriété de pouvoir transférer l'amine primaire d'un acide aminé aliphatique ramifié sur l'acide **α -cétoglutarique** (ou acide 2-oxoglutarique) et de l'échanger avec la cétone de ce dernier. *In fine*, elle permet d'obtenir, d'une part, l'**acide glutamique** et, d'autre part, l' **α -cétoacide** correspondant à son équivalent acide α -aminé (37,38).

2.2.1. Acides néciques en C₅

À présent, commençons par nous attarder sur la biosynthèse des acides néciques en C₅ : l'**acide tiglique**, l'**acide angélique**, l'**acide sarracinique** et l'**acide sénécioïque**.

* Le premier provient de la voie de dégradation de l'**isoleucine** menant à l'acétaldéhyde et à l'acide propionique, qui sont par ailleurs tous deux obtenus sous la forme d'un thioester avec le coenzyme A (CoA), c'est-à-dire respectivement sous la forme d'acétyl-CoA et sous celle de propionyl-CoA. Cette cascade métabolique débute tout simplement par la transformation de l'**isoleucine** en **acide α -céto- β -méthylvalérique** grâce à la BCAT (Figure 21) (37,38).

Puis cet intermédiaire est simultanément décarboxylé et estérifié avec le groupe thiol du coenzyme A pour aboutir au **2-méthylbutyryl-CoA** (Figure 21). Ce mécanisme est réalisé par la déshydrogénase des α -cétoacides à chaîne ramifiée (BCKDH, de l'anglais *Branched-Chain α -Ketoacid DeHydrogenase*) qui possède le NAD comme cofacteur de la réaction d'oxydoréduction (37,38).

L'étape suivante est une réaction de **désaturation oxydante** (Figure 21) ; cette fois-ci, l'enzyme impliquée est l'isovaléryl-CoA déshydrogénase (IVDH, de l'anglais *IsoValeryl-CoA DeHydrogenase*). Comme son nom l'indique, cette enzyme permet de créer une liaison π entre les carbones en α et en β de la fonction acide carboxylique portée par l'isovaléryl-CoA, un métabolite du catabolisme de la leucine. Toutefois, cette enzyme catalyse également le passage de l'intermédiaire **acyl-CoA** en intermédiaire **énoyl-CoA** lors des dégradations de la valine et de l'isoleucine. L'IVDH est une flavoenzyme, c'est-à-dire que son coenzyme équilibrant la réaction d'oxydoréduction est un dérivé de la vitamine B₂ (ou riboflavine) ; plus précisément, il s'agit de la flavine adénine dinucléotide (FAD) (37,38).

Cette réaction de désaturation produit du **tiglyl-CoA**, qui n'est ni plus ni moins que l'**acide tiglique** thioestérifié par le coenzyme A (Figure 21) (2,36,38).

✱ L'**acide angélique**, quant à lui, a un anabolisme identique à celui de l'**acide tiglique** à la seule différence qu'une réaction d'isomérisation additionnelle est indispensable au passage d'une stéréoisomérisation *trans* à une stéréoisomérisation *cis*. Celle-ci est médiée par une *cis/trans*-isomérase spécifique capable de convertir le **tiglyl-CoA** en **angélyl-CoA** (Figure 21) (2,36,39).

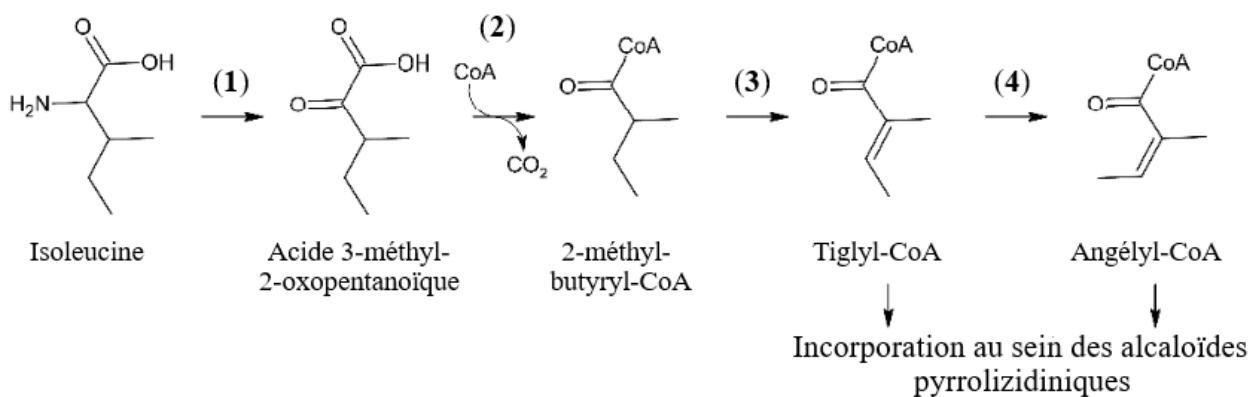


Figure 21 : Biosynthèse des acides angélique et tiglique

(1) Transamination par la BCAT (2) Thioestérification décarboxylative NAD⁺-dépendante avec le coenzyme A (CoA) (3) Désaturation stéréosélective FAD-dépendante (4) *cis*-Isomérisation
 [D'après (2)]

✱ Désormais intéressons-nous à l'**acide sarracinique**, il s'agit d'un dérivé monohydroxylé de l'**acide angélique**. Il est donc tout à fait probable que ce dernier soit en réalité le précurseur direct de l'**acide sarracinique** (40). Comme c'est le cas pour les acides en C₁₀, il se peut qu'une fois estérifié à la nécine, l'**acide angélique** subisse une réaction de diversification. En l'occurrence

ici, ce serait une **hydroxylation** du radical méthyle qui transformerait l'acide angélique en **acide sarracinique**. De plus, cette réaction laisserait supposer une catalyse enzymatique caractéristique, au vu du faible nombre d'espèces végétales dans lesquelles ont été détectés des alcaloïdes pyrrolizidiniques ayant dans leur structure de l'acide sarracinique (41,42).

✱ Malgré le fait que ce soit un diastéréoisomère des acides tiglique et angélique, l'**acide sénécioïque** a une biosynthèse qui repose sur le catabolisme d'un BCAA différent : celui de la **leucine** (Figure 22). En effet, l'acide sénécioïque est un intermédiaire de la dégradation de cet acide aminé en acétyl-CoA et en acétoacétate (37,38).

De la même manière que pour l'isoleucine, la leucine est prise en charge par la BCAT et se transforme en **acide α -cétoisocaproïque** (Figure 22). Puis, il se produit une thioestérification décarboxylative avec le coenzyme A — réaction toujours médiée par la BCKDH — pour former de l'**isovaléryl-CoA** (Figure 22). Par la suite, une désaturation oxydante a lieu — encore par le biais de l'IVDH — et conduit au **3-méthylcrotonyl-CoA**, qui est en fait la forme thioestérifiée de l'**acide sénécioïque** avec le coenzyme A (Figure 22) (37,38).

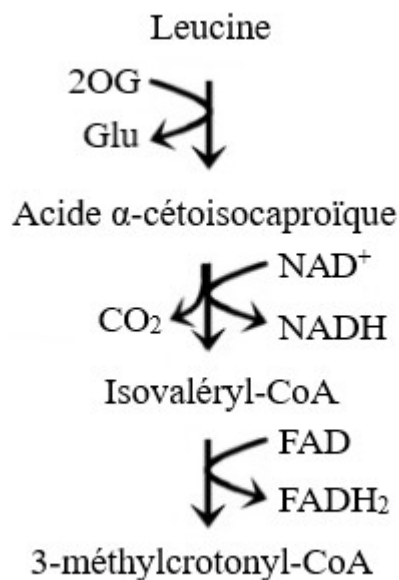


Figure 22 : Cascade catabolique de la leucine (2OG, acide 2-oxoglutarique ; Glu, acide glutamique ; NAD⁺, forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH, forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide ; FAD, forme oxydée de la flavine adénine dinucléotide ; FADH₂, forme réduite de la flavine adénine dinucléotide)

[D'après (38)]

Ainsi, les acides néciques en C₅ peuvent être classés en deux catégories : ceux étant des intermédiaires *stricto sensu* du métabolisme d'acides aminés à chaîne ramifiée (acides tiglique et sénécioïque) et ceux dont la biogenèse nécessite des réactions spécifiques supplémentaires (acides angélique et sarracinique).

2.2.2. Acides néciques en C₇

Pour ce qui est des **acides en C₇** (acide trachélanthique, acide viridiflorique, acide échimidinique, acide lasiocarpique, etc.), ils résultent de l'assemblage de l'**acide α -cétoisovalérique** avec un **précurseur** à la structure **hydroxyéthylique** (2,3,36,43,44).

⚡ La provenance de l'**acide α -cétoisovalérique** est fermement déterminée, ce dernier provient de la transamination de la **valine** médiée par la BCAT. Par extension, nous pouvons ainsi affirmer sans nul doute que les **acides néciques en C₇** ont une partie de leur squelette qui provient de la valine, plus précisément les carbones C-1, C-2 et C-5 à C-7 (2,36–38,43,44).

⚡ Quant au **fragment hydroxyéthylique** (correspondant aux carbones C-3 et C-4 de l'acide nécique final), son origine exacte est bien souvent méconnue (2). Toutefois, de nombreux auteurs suggèrent qu'il pourrait provenir d'un « **acétaldéhyde activé** » (3,36,43,44). D'un point de vue strictement chimique, ce terme n'est pas le plus approprié étant donné que ce précurseur est en réalité constitué d'un **motif énaminique**, dont le déplacement par résonance des électrons π à l'intérieur du système conjugué engendre un **carbanion mésomérique** (45–47).

Quoiqu'il en soit, l'intégration du fragment hydroxyéthylique reposerait sur un mécanisme analogue à celui réalisé par l'acétolactate synthase (ALS), une acétohydroxyacide synthase (AHAS) ubiquitaire dans le règne végétal. Les AHAS se situent au niveau des chloroplastes et permettent la synthèse *de novo* des amino-acides à chaîne ramifiée (43,45,46).

De plus, ces enzymes comportent un groupement prosthétique dérivé de la vitamine B₁ (ou thiamine) : le pyrophosphate de thiamine (TPP) parfois nommé diphosphate de thiamine (**ThDP**). Le TPP est, entre autres, constitué d'un cycle thiazole qui est naturellement présent sous la forme d'un ylure, une espèce chimique globalement neutre mais dont deux atomes adjacents possèdent une charge électronique opposée. Ici, l'azote du cycle thiazole est impliqué au sein de quatre liaisons le rendant donc chargé positivement, tandis que le carbone C-2 (situé entre l'atome de soufre et celui d'azote) est porteur d'une charge négative. En effet, l'atome d'hydrogène auquel il est lié est un proton fortement acide qui rompt sa liaison de manière quasi spontanée, faisant ainsi du carbone C-2 un carbanion hautement nucléophile et qui sera l'initiateur du cycle réactionnel du TPP (Figure 23) (37,45,46).

Par ailleurs, ce cofacteur est localisé dans le site catalytique des AHAS et permet la création d'une **liaison covalente** entre un **cétoacide** et un **radical hydroxyéthylique**, et ce par un mécanisme réactionnel réductif similaire à celui d'une **condensation de type acyloïne**, qui est normalement une réaction de couplage entre deux esters (Figure 23) (45,47).

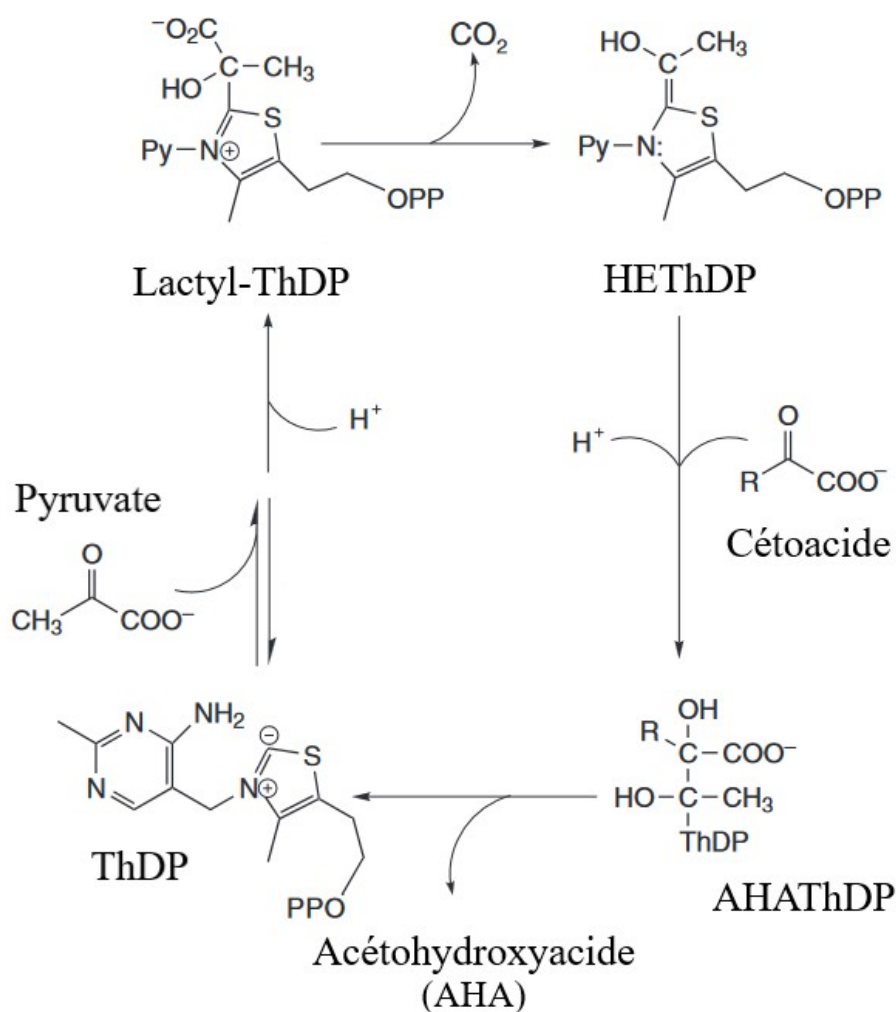


Figure 23 : Cycle réactionnel du diphosphate de thiamine (ThDP, diphosphate de thiamine ; Lactyl-ThDP, diphosphate de lactylthiamine ; HEThDP, diphosphate d'hydroxyéthylthiamine ; AHAThDP, diphosphate d'acétohydroxyacidothiamine ; Py, 4-amino-2-méthylpyrimidine ; OPP et PPO, pyrophosphate ou diphosphate ($\text{§-O}(\text{PO}_2)^- \text{-}(\text{PO}_3)^{2-}$) [D'après (45)]

À propos du mécanisme réactionnel réalisé par le **ThDP**, il est constitué de quatre étapes pleinement identifiées.

✱ Tout d'abord, il y a une **attaque nucléophile** du carbanion thiazolique sur le carbone fonctionnel électrophile de la cétone porté par le **pyruvate** (premier substrat) conduisant à une liaison covalente entre le **diphosphate de thiamine** et un radical dérivé de l'acide lactique, d'où le nom du premier intermédiaire : le diphosphate de lactylthiamine (**lactyl-ThDP**) (Figure 23) (45–48).

✱ Le **lactyl-ThDP** subit ensuite une réaction de décarboxylation par **translocation électronique** créant le fameux intermédiaire constitué d'une fonction **énamine** : le diphosphate (ou pyrophosphate) de 2-(1-hydroxyéthyl)-thiamine (**HETHDP**) (Figure 23) et dont la **forme mésomère** est l' **α -carbanion** qui entraînera la poursuite du cycle réactionnel (Figure 24) (45–48).

✱ Cet **α -carbanion mésomérique** de l'HETHDP a la capacité d'initier une attaque nucléophile sur un second substrat **α -cétoacide**, la **condensation de type acyloïne** qui en résulte mène alors au diphosphate d'acétohydroxyacidotheriamine (**AHATHDP**) (Figure 23) (45–48).

✱ Enfin, la **libération de l'acétohydroxyacide** repose sur une réaction d'oxydoréduction médiée par la FAD qui se trouve en périphérie du site catalytique du ThDP et aboutit donc, d'un côté, à un composé de type **acétohydroxyacide**, et de l'autre, à l'yliure du **ThDP** de nouveau apte à attaquer une molécule de pyruvate (Figure 23) (45–48).

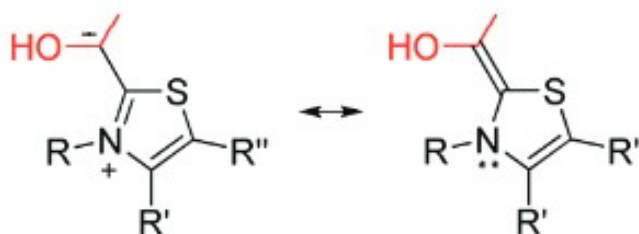


Figure 24 : Mésonérie du diphosphate d'hydroxyéthylthiamine

(R, 4-amino-2-méthylpyrimidine ; R', -CH_3 ;
R'', $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-(PO}_2\text{)}^-\text{-(PO}_3\text{)}^{2-}$) [D'après (47)]

Pour ce qui est des substrats des AHAS, quand ces dernières sont impliquées dans le métabolisme primaire des végétaux, ils sont identifiés depuis bien longtemps ; il s'agit du pyruvate et de l'acide α -cétobutyrique (37,43–46). Néanmoins, lorsque le rôle des AHAS dans la biosynthèse des acides néciques pourrait être avéré, il est plus ardu de déterminer avec certitude la provenance du dérivé énaminique. Cependant, le radiomarquage carboné (^{13}C) de plusieurs précurseurs hypothétiques de l'acide trachélanthique a montré qu'un pic de résonance correspondant à celui du pyruvate était détecté dans la structure de cet acide nécique (43).

Jusque-là, il n'y avait rien de surprenant car deux molécules de pyruvate permettent de créer une molécule de valine, notamment par le biais de l'ALS (37). Mais ici, la spectroscopie RMN démontrait qu'une troisième molécule de pyruvate se retrouvait en partie intégrée dans le squelette hydroxyisopropylbutanoïque suggérant donc une réaction de condensation catalysée par une AHAS lors de la biogenèse de l'acide trachélanthique (43) !

Grâce à cette expérience, nous pouvons ainsi supposer avec plus d'assurance la voie de biosynthèse des acides néciques en C₇. De surcroît, en regardant attentivement leur squelette, nous pouvons remarquer que deux principaux composés de ce groupe d'acides semblent être à l'origine de tous les autres : l'**acide (±)-trachélanthique** et l'**acide (±)-viridiflorique**. Mais ce n'est pas tout ! Ces deux diastéréoisomères sont par ailleurs retrouvés dans l'immense majorité des plantes qui les synthétisent sous la forme d'un seul énantiomère (1,2,36,43) !

Ainsi en ce qui concerne l'acide trachélanthique, celui-ci est présent sous la forme de l'énantiomère dextrogyre, c'est-à-dire l'**acide (2S,3R)-(+)-trachélanthique** ; tandis que pour l'acide viridiflorique, ce dernier est retrouvé sous celle de l'énantiomère lévogyre ou plus précisément l'**acide (2S,3S)-(-)-viridiflorique** (43).

Cette caractéristique signifie donc que suivant l'espèce végétale, la condensation de type acyloïne est certainement médiée par différentes isoformes enzymatiques de la famille des AHAS ; et ce, afin de pouvoir contrôler le réarrangement intramoléculaire découlant de l'attaque nucléophile de l'HETHDP sur l'acide α-cétoisovalérique. En l'occurrence, la création de ce premier centre de chiralité se situe au niveau du carbone C-2 de l'intermédiaire acétohydroxyacide ; or pour atteindre un acide néciq ue au motif hydroxyisopropylbutanoïque, une étape supplémentaire de réduction est indispensable (43,45,47).

Là encore, le passage d'une **cétone** à un **alcool** forme un autre carbone asymétrique (le carbone C-3) dont la configuration repose sur une **énantiosélectivité** intimement liée au site catalytique de l'enzyme, probablement une cétoréductase. En effet, l'aboutissement à la stéréochimie du composé final dépend de l'orientation spatiale dans laquelle s'est déroulé le **mécanisme réductif**. Sans trop rentrer dans les détails, la présence de tel ou tel acide aminé à l'intérieur du site catalytique favorise l'entrée du substrat par un accès ou un autre. Puis les chaînes résiduelles environnantes de ces amino-acides modulent la stéréosélectivité de la réaction grâce aux liaisons hydrogènes qu'elles ont engagées avec le substrat acétohydroxyacide et *in fine*, permettent de mener à un carbone C-3 dont l'ordre de priorité de ses substituants est lu, soit dans le sens horaire (*R*), soit dans le sens antihoraire (*S*) (49–52).

En somme, la dichotomie structurelle entre les **acides (+)-trachélanthique** et **(-)-viridiflorique** n'apparaît qu'à l'ultime étape biosynthétique. Il est donc plus que probable qu'ils aient tous les deux une **cascade anabolique commune**, incluant par extension le pyruvate comme premier substrat de l'AHAS, même si les expérimentations radiomarquées ne furent menées que sur l'acide trachélanthique (Figure 25) (43).

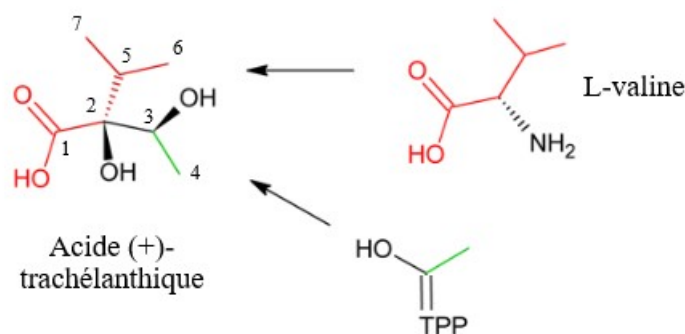


Figure 25 : Origine biosynthétique du squelette de l'acide (+)-trachélanthique (TPP, pyrophosphate de thiamine) [D'après (2)]

Qui plus est, l'acide (+)-trachélanthique est le chef de file des autres acides néciques en C₇ les plus fréquemment retrouvés : l'acide échimidinique, l'acide lasiocarpique et l'acide héliotrique. Ces derniers possèdent un troisième hydroxyle en C-5 (acides échimidinique et lasiocarpique) ou un groupe méthoxyle en lieu et place d'un alcool en C-3 (acides lasiocarpique et héliotrique) (2).

Les positions exactes de ces modifications au sein de la biosynthèse ne sont pas encore déterminées avec certitude... Mais il y a fort à penser qu'elles devraient avoir lieu après la condensation de l'acide α -cétoisovalérique avec l'HEThDP, voire même une fois que l'estérification entre l'acide (+)-trachélanthique et la nécine a été effectuée. En d'autres termes, ces diverses réactions de modulations structurales pourraient se produire sur l'acide (+)-trachélanthique déjà inclus au sein d'un alcaloïde pyrrolizidinique ! Ce mécanisme de diversification post-biosynthétique existe notamment pour les acides néciques en C₁₀, ainsi ce ne serait guère étonnant de le retrouver également pour les acides néciques en C₇ (cf. Section 2.5.).

En conclusion, de bien trop nombreux pans de la biogenèse des **acides néciques en C₇** demeurent malheureusement incertains à ce jour. Toutefois, de par les grandes similitudes qui les relient à l'acide trachélanthique, il est tout à fait logique de suggérer qu'ils possèdent tous la même cascade anabolique. Autrement dit, la **valine** et le **pyruvate** comme précurseurs originels (Figure 25) et dont la **condensation** de leurs dérivés métaboliques respectifs reposerait sur le cycle réactionnel médié par le ThDP au sein d'une AHAS (2,3,36,43,44). Certes, ce n'est là encore qu'une simple hypothèse, mais qui reste pourtant la solution privilégiée pour expliquer le complexe mécanisme qui permet d'aboutir à un **intermédiaire de type acétohydroxyacide**.

2.2.3. Acides néciques en C₈

Désormais, nous allons aborder les biosynthèses de l'**acide monocrotalique** et de l'**acide trichodesmique**. Le premier est un acide en C₈ et le second un acide en C₁₀, néanmoins tous deux forment des alcaloïdes pyrrolizidiniques en C₁₁. C'est pour cette raison que nous les traiterons conjointement. En outre, ces deux acides ont un squelette dicarboxylique long de cinq atomes de carbones en tout point identique. La seule différence que l'on puisse réellement noter entre eux est le groupe méthyle (C-8) de l'acide monocrotalique qui est remplacé par une chaîne isopropyle (de C-8 à C-10) dans l'acide trichodesmique (2,36).

C'est pourquoi une analogie dans leur biosynthèse respective est retrouvée : contrairement aux autres acides néciques que l'on a traités juste auparavant, ceux-là dérivent intégralement d'acides aminés, qui appartiennent une fois de plus à la catégorie des BCAA (2,53,54). Ajoutons que la structure en C₈ (ou en C₁₀) peut être séparée en deux parties, car elles ont chacune une voie biosynthétique qui leur est propre :

- une **partie** dite « **droite** » correspondant aux carbones C-1 à C-3, C-6 et C-7 (2) ;
- et une **partie** dite « **gauche** » correspondant aux carbones C-4, C-5 et C-8 (à C-10) (2).

‡ L'origine de la **partie droite** est **commune** aux **acides monocrotalique** et **trichodesmique**, celle-ci provient de l'**isoleucine** (Figure 26) (2,53,54). Pour rappel, cet acide aminé aliphatique ramifié est lui-même obtenu par la transformation de la **thréonine** en **acide α-cétobutyrique** avant l'initiation d'un long processus catabolique conduisant à l'**isoleucine** (37). Par la suite, l'isoleucine est dégradée mais malheureusement nous ignorons encore jusqu'à quel stade...

‡ Quant à la **partie gauche**, elle a une **origine spécifique** pour chaque acide car c'est ici que se situe, soit le groupe méthyle, soit la chaîne isopropyle.

‡ À cette heure, le **précurseur** des carbones C-4, C-5 et C-8 de l'**acide monocrotalique** demeure **inconnu** (Figure 26-A) (2). Néanmoins, le radiomarquage à l'isotope ¹⁴C de la **thréonine** et de l'**isoleucine** ont montré des taux non négligeables d'incorporation dans la structure de la partie gauche. Il a été suggéré qu'il pouvait provenir du **propionyl-CoA** étant donné qu'il est formé, entre autres, par la dégradation de l'**isoleucine** et par la décarboxylation oxydante de l'**acide α-cétobutyrique** (38,53). Toutefois, aucune étude récente n'est parvenue à corroborer cette supposition...

✱ S'agissant de l'origine de la **partie gauche** de l'**acide trichodesmique**, deux précurseurs amino-acides ont été identifiés : la **valine** et la **leucine** (Figure 26-B). Ces deux acides aminés à la chaîne isopropylique sont intégrés en proportions similaires. Cependant, il reste encore à découvrir par le biais de quel catabolite respectif (2,54).

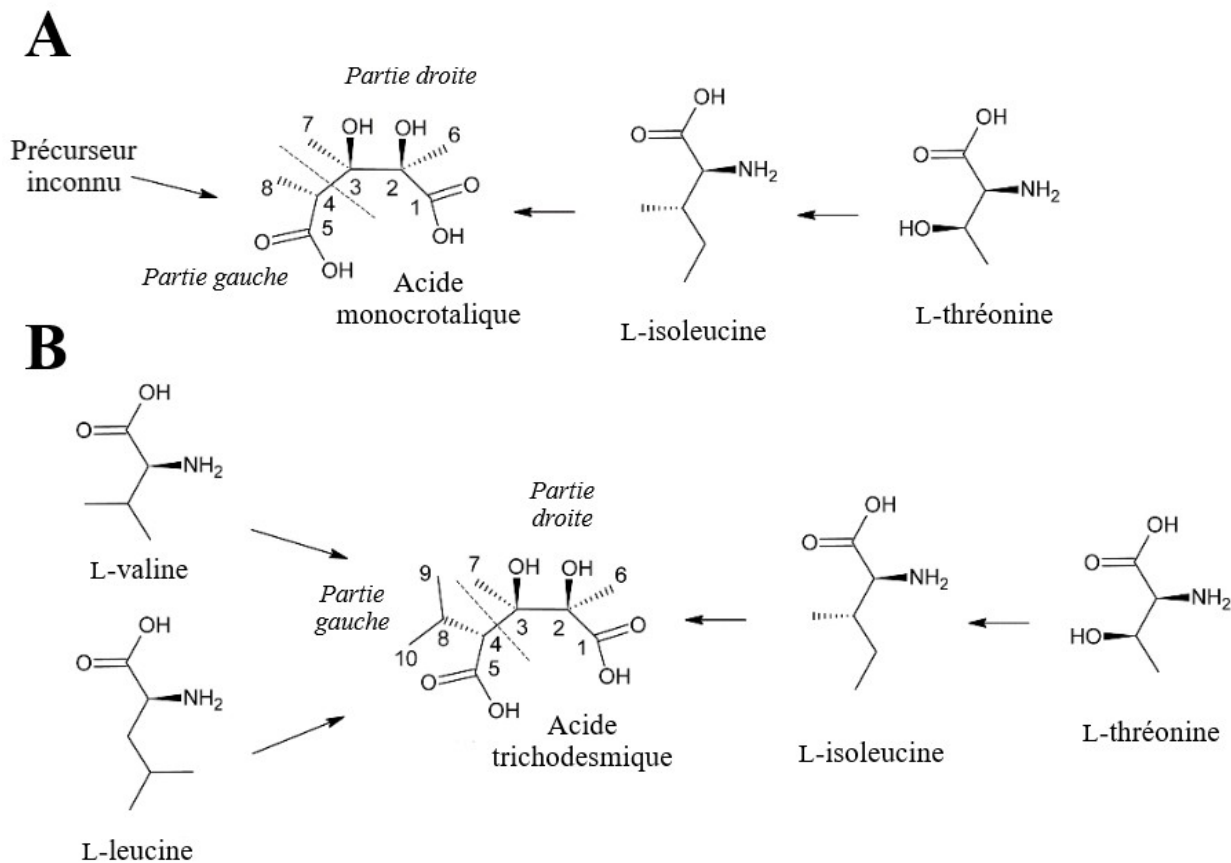


Figure 26 : Origine biosynthétique des acides néciques formant des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₁

(A) Précurseurs de l'acide monocrotalique (B) Précurseurs de l'acide trichodesmique [D'après (2)]

À vrai dire, parmi toutes les interrogations qui subsistent dans la biogenèse des **acides monocrotalique** et **trichodesmique**, la plus frustrante est certainement celle qui permet d'expliquer la formation de la **liaison covalente** entre les carbones C-3 et C-4. En effet, le mécanisme réactionnel est toujours indéterminé (2,53,54). Malgré le fait qu'il doit probablement s'agir d'une addition nucléophile initié par un **carbanion**, la vraie difficulté réside surtout dans l'élucidation des réactifs mis en jeu, et accessoirement de l'enzyme catalytique. En effet, nombreux sont ceux avançant une **addition de type Michael** et un cofacteur impliqué dans la biosynthèse de l'acide sénécique et de ses dérivés ; mais faute d'éléments réellement concrets, tout cela ne reste qu'à l'état de multiples propositions, par ailleurs plus ou moins plausibles.

2.2.4. Acides néciques en C₁₀

À propos de la biosynthèse des acides néciques formant des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂, ils proviennent tous de deux molécules d'**isoleucine** — et donc bien évidemment de la **thréonine** — (2,55,56). Cela s'explique par le fait que l'**acide sénécique** est lui-même le **précurseur direct** des autres composés de ce groupe, dont les diverses modifications ultérieures aboutissent à la multitude d'**acides néciques en C₁₀** que nous connaissons (57).

Toutefois, ces réactions de diversification n'ont pas lieu une fois l'acide sénécique *de novo* synthétisé mais elles surviennent lorsque celui-ci est déjà lié à une nécine — par ailleurs, presque exclusivement la rétronécine — ! Autrement dit, la modulation structurale prend place sur un alcaloïde pyrrolizidinique — donc très fréquemment sur la sénécionine — , ce qui lui confère *de facto* le rôle de précurseur dans la formation d'autres alcaloïdes pyrrolizidiniques (cf. Section 2.5.). C'est pourquoi, par extension, nous pouvons affirmer que l'**acide sénécique** est le **précurseur** des autres **acides néciques en C₁₀**, à quelques rares exceptions près. En outre, précisons rapidement que la mise en jeu de ces deux phénomènes (biogenèse unique et diversification post-biosynthétique) est retrouvée, dans l'immense majorité des cas, chez les espèces végétales appartenant à la tribu des *Senecioneae* (*Asteraceae*) (41,57).

La principale subtilité de la biosynthèse des acides néciques en C₁₀ n'est pas de savoir d'où provient leur squelette carboné, ni même de savoir quand se déroulent d'éventuelles réactions de modification structurale. Elle réside dans le fait de connaître — si ce n'est finement, du moins vaguement — par le biais de quel mécanisme réactionnel les deux intermédiaires issus de molécules d'isoleucine forment-ils une liaison covalente entre eux ?

Pour trancher le nœud gordien du mécanisme impliqué dans la formation de la liaison covalente entre les carbones C-3 et C-4, il fut avancé diverses explications au cours du temps.

Une proposition se voyant résoudre le problème suggérait que les isoleucines étaient d'abord dégradées jusqu'au stade de tiglyl-CoA, qui était par la suite isomérisé en angélyl-CoA avant d'être estérifié à la nécine. Puis, ces deux acides angéliques réagissaient ensemble par une addition de Michael pour former l'acide sénécique (36). Pourtant une tentative d'incorporation d'acide angélique radiomarké (¹⁴C) a contredit cette explication en démontrant que cet acide α,β -insaturé n'était retrouvé qu'à l'état de traces au sein de la structure de l'acide sénécique (58,59).

Aujourd'hui, c'est une tout autre hypothèse qui fait consensus (2). Les **deux molécules d'isoleucine** n'auraient absolument pas le même devenir catabolique suivant les carbones que chacune d'elle apporterait au squelette de l'acide sénécique (Figure 27-A) !

D'une part, l'**isoleucine** à l'origine des carbones **C-1** à **C-3**, **C-7** et **C-8** serait métabolisée jusqu'au stade de **tiglyl-CoA** (Figure 27-B) ; et d'autre part, celle responsable de l'apport des carbones **C-4** à **C-6**, **C-9** et **C-10** serait transformée en un dérivé insaturé de l'**isoleucine** : la **β -méthylènenorvaline** (Figure 27-A) (59,60).

Par la suite, la **β -méthylènenorvaline** formerait un **iminium secondaire** avec le phosphate de pyridoxal (PLP, de l'anglais *Pyridoxal 5'-Phosphate*) grâce à une **déshydratation** par substitution nucléophile se produisant sur le carbone fonctionnel de l'aldéhyde du PLP (Figure 27-C) (59). Pour rappel, le phosphate de pyridoxal est un dérivé de la vitamine B₆ (ou pyridoxine) fréquemment retrouvé en tant que groupement prosthétique des enzymes catalysant des réactions avec des substrats aminés.

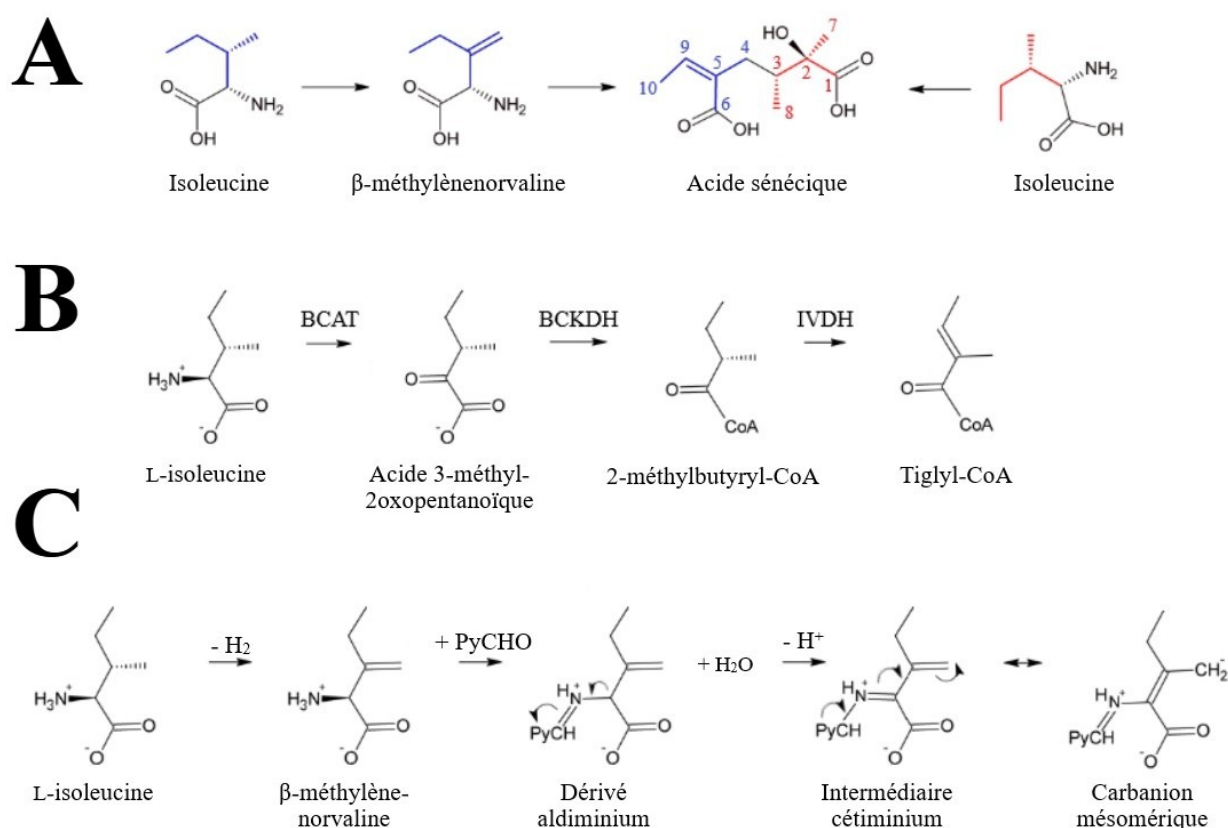


Figure 27 : Origine biosynthétique de l'acide sénécique

- (A) Détermination des précurseurs de l'acide sénécique par radiomarquage au carbone isotopique (¹⁴C) (B) Cascade métabolique de l'isoleucine aboutissant au tiglyl-CoA (BCAT, transaminase des acides aminés à chaîne ramifiée ; BCKDH, déshydrogénase des α -cétoacides à chaîne ramifiée ; IVDH, isovaléryl-CoA déshydrogénase ; CoA, coenzyme A) (C) Étapes nécessaires à l'obtention du carbanion mésomérique (PyCHO, phosphate de pyridoxal ; PyCH, dérivés iminés du phosphate de pyridoxal) [D'après (2)]

La réactivité ultérieure du radical **dérivé de la β -méthylènenorvaline** proviendrait, dans un premier temps, du **caractère acide** du **proton en α** de la fonction **acide carboxylique** ; et, dans un second temps, du phénomène de **mésomérie** généré par le **départ** de ce **proton acide** (Figures 27-C et 28-I). Effectivement, la plupart des enzymes comportant le PLP comme cofacteur possèdent également un résidu lysyle, or l'amine terminale de la lysine est connue pour sa très forte basicité et a donc une grande facilité à arracher ce proton acide. Devenue ainsi mobile, la **paire d'électrons** serait attirée par la charge positive de l'ion iminium et provoquerait un **déplacement en chaîne** jusqu'à l'azote pyridinique formant alors un **intermédiaire de type quinonoïde** (Figure 28-II) (59,61,62).

N.B. : La structure de cet intermédiaire n'étant pas un quinonoïde stricto sensu, nous préférons utiliser le terme de cétimine (mot-valise formé à partir de « cétone » et d'« imine ») en opposition à celui d'aldimine (contraction d'« aldéhyde » et d'« imine »), dont le motif est celui que l'on retrouve suite à l'addition de la β -méthylènenorvaline sur le phosphate de pyridoxal (Figure 27-C). De surcroît, ce choix permettra une distinction autant franche qu'aisée entre ces deux dérivés iminés.

Qui plus est, cet **intermédiaire cétiminium** serait sujet au phénomène de **mésomérie**, c'est-à-dire que les électrons de son système conjugué pourraient se délocaliser et créer une forme de résonance. Ici, la molécule mésomère en question contiendrait un **carbanion** dans sa structure (Figures 27-C et 28-III) (59). Plus précisément, le doublet électronique serait retrouvé sur le futur carbone C-4 de l'acide sénéciq. Or en étant toujours dans l'optique de l'hypothèse actuelle, c'est un détail qui aura toute son importance pour la suite des réactions biosynthétiques !

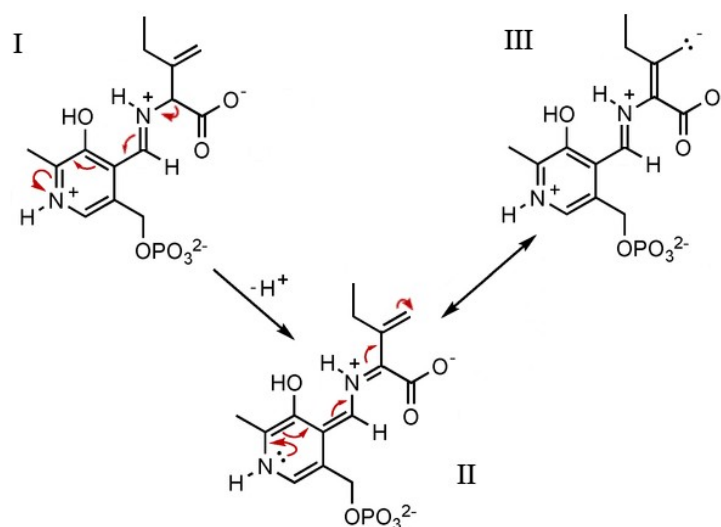


Figure 28 : Déplacements électroniques induits par la perte de l'hydrogène en α de la fonction acide carboxylique
 (I) Dérivé aldiminium (II) Intermédiaire cétiminium
 (III) Carbanion mésomérique hautement nucléophile
 [D'après (62)]

L'existence d'une délocalisation électronique permettrait donc d'avoir un mésomère possédant un carbanion et c'est là que l'hypothèse de la β -méthylènenorvaline comme intermédiaire prend tout son sens !

En effet, ce **carbanion mésomérique**, de par son excès d'électrons, jouerait le rôle de **nucléophile** et attaquerait le **carbone β** du **tiglyl-CoA** (Figure 29), qui quant à lui, serait soumis à l'effet inductif attracteur du thioester et donc aurait une charge partielle positive δ^+ (4,59).

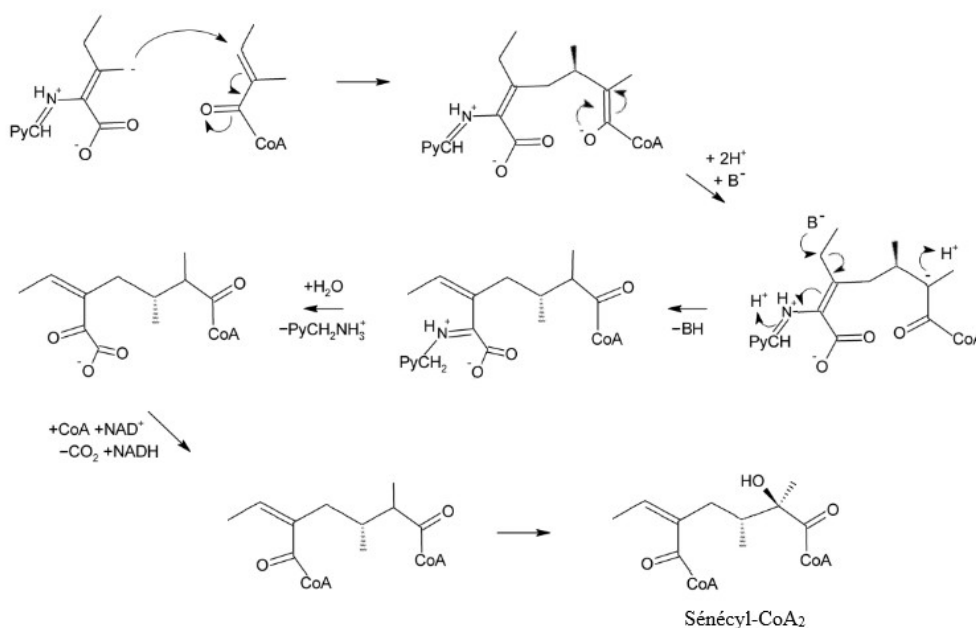


Figure 29 : Mécanisme réactionnel impliqué dans la formation de la liaison covalente entre les carbones C-3 et C-4 de l'acide sénécique

(PyCH/PyCH₂, dérivés iminés du phosphate de pyridoxal ; PyCH₂NH₃⁺, dérivé aminé du phosphate de pyridoxal ; B⁻, molécule indéterminée au caractère basique, CoA, coenzyme A ; NAD⁺, forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH, forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide) [D'après (2)]

Le composé intermédiaire obtenu par cette addition nucléophile contiendrait un **énolate**, un motif également sujet à un **équilibre mésomérique**. En l'occurrence sa forme mésomère serait formée d'un **carbanion en α** de la fonction **thioester** (Figure 29) (59).

Par la suite, grâce à un **électrophile** encore **non déterminé**, un proton serait arraché et engendrerait la création de l'**insaturation** d'isomérisation *cis* entre les carbones C-5 et C-9. Qui plus est, la présence concomitante dans le site catalytique de deux autres protons permettrait une régulation des charges intramoléculaires rémanentes (Figure 29) (59).

Dans la foulée, l'**hydrolyse** du dérivé aminé du PLP créerait un **intermédiaire α -cétoacide** dont la **décarboxylation oxydante** lierait une seconde molécule de CoA au **précurseur** de l'**acide sénécique** (Figure 29) (59).

Enfin, une ultime réaction d'**hydroxylation stéréosélective** sur le carbone C-2 permettrait d'obtenir le **sénécyl-CoA₂**, la forme dithioestérifiée de l'**acide sénécique** (Figure 29) (59).

Malgré le fait que cette cascade biosynthétique ne soit toujours qu'au stade d'hypothèse, elle a le mérite d'expliquer la formation de la liaison simple entre les carbones C-3 et C-4 et celle de la double liaison entre les carbones C-5 et C-9. Elle apporte également une justification à la régulation stéréochimique subit par les carbones C-3 et C-9 où seuls les hydrogènes *pro-R* sont maintenus, comme avait pu le démontrer un marquage au tritium (³H) de l'isoleucine (60,63).

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, les autres acides néciques en C₁₀ découlent quasi intégralement de l'acide sénécique. Ce dernier subit alors des réactions aussi spécifiques que variées permettant d'aboutir à la fameuse diversité structurelle de ce groupe. Néanmoins, rappelons tout de même que ces étapes de modifications se déroulent une fois que l'acide sénécique a été estérifié à la rétronécine (cf. Section 2.5.). Ce qui en fait là une caractéristique biosynthétique majeure qui, pour l'instant, n'a été largement documentée que pour ce type d'acides néciques (57) !

Toutefois comme chaque règle a ses exceptions, certains acides néciques semblent posséder une voie anabolique qui leur est propre (57).

C'est notamment le cas de l'acide sénécivernique (présent dans la sénécivernine) qui apparaît être un produit biosynthétique primaire à part entière, au même titre que l'acide sénécique. En effet, la structure de l'acide sénécivernique comprend, non pas deux, mais trois carbones asymétriques : les carbones C-2, C-3 et C-4. En outre, c'est un des très rares acides néciques en C₁₀ dont l'insaturation n'a pas d'isomérisation spatiale(41,57).

Toujours à propos de ces exceptions, certains acides néciques en C₁₀, retrouvés dans une poignée d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, présentent une double liaison à la stéréochimie *trans* : l'acide intégerrinéique, l'acide rétronécique et l'acide spartioïdinique. Ce sont les diastéréoisomères respectifs de l'acide sénécique, de l'acide isatinécique et de l'acide sénéciphyllique, de configuration *cis* (2,36,57). Dans bon nombre d'espèces des *Senecioneae*, l'acide sénécique et l'acide intégerrinéique sont concomitamment retrouvés dans les tissus végétaux par le biais de leur ester respectif qu'ils forment avec la rétronécine (sénécionine et

intégerrimine) (57,64). À l'instar de l'acide sénécique, il est donc fort probable que l'acide intégerrinéique joue lui aussi le rôle de précurseur direct et qu'il soit à l'origine des autres acides néciques en C₁₀ de stéréoisomérisation *trans* (57). En d'autres termes, il semble que la formation de la double liaison n'entraîne pas exclusivement une isomérisation *cis*, bien que la stéréosélectivité de la réaction lui soit pourtant favorable (2).

2.2.5. Acides aromatiques et autres

À présent, nous allons succinctement traiter des autres acides qui peuvent être retrouvés au sein des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En tout premier lieu, ce sont des acides obtenus par des voies métaboliques majeures du règne végétal (1). Deuxièmement, il s'agit bien régulièrement de l'**acide acétique**, de l'**acide salicylique** ou de l'**acide para-coumarique** (2).

De plus, leur estérification avec la nécine repose sur le même mécanisme que pour les autres acides néciques, c'est-à-dire par une activation préalable de leur fonction acide carboxylique par le coenzyme A. En effet, la liaison thioester que forme ce coenzyme avec le composé acide permet d'initier la réaction d'acylation avec l'un des groupes alcools de la nécine et *in fine* de créer un alcaloïde pyrrolizidinique (1).

✿ À propos de l'**acide acétique**, ce dernier est incorporé sous la forme d'**acétyl-CoA**. Par conséquent il peut avoir plusieurs origines métaboliques et notamment celles résultant de la dégradation des différents BCAA (37,38). Qui plus est, l'**acide acétique** est le seul acide nécique à posséder **deux possibilités** en matière d'**incorporation** :

– la **première** est tout simplement la voie classique, la formation d'un **ester** avec une **nécine** (7-acétylscorpioïdine, uplandicine, acétyllaburnine...) (2,36) ;

– mais la **seconde** est une **estérification** avec un groupe hydroxyle porté par l'**acide nécique** déjà lié à la nécine (doronine, florosénine, acétylérucifoline...) (2,36).

✿ En ce qui concerne l'**acide salicylique**, il possède **deux origines biosynthétiques** possibles.

✿ La **première** est la **voie majoritaire** car elle permet en réalité de fournir plus de 90 % de la totalité de l'acide salicylique produit par les cellules végétales (1) ! En outre, elle nécessite le même intermédiaire clé que les acides aminés aromatiques hydrophobes (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) : l'**acide chorismique** (Figure 30-A).

⚡ Quant à la **seconde origine biosynthétique**, elle sollicite l'**acide *trans*-cinnamique** (Figure 30-B) et deux réactions dont l'ordre est sans importance : une **hydroxylation** en **position *ortho*** et une **dégradation** de la **chaîne lipophile latérale** par un mécanisme analogue à la β -oxydation des acides gras (1,65).

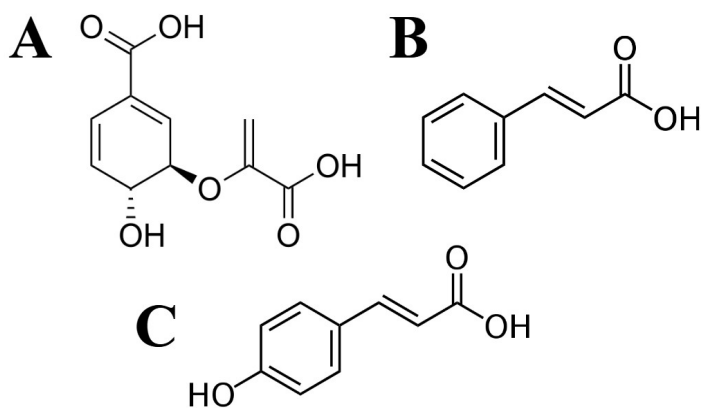


Figure 30 : Molécules impliquées dans la biosynthèse des acides aromatiques

(A) Acide chorismique (B) Acide *trans*-cinnamique
(C) Acide *para*-coumarique

⚡ Concernant maintenant l'**acide *para*-coumarique** (Figure 30-C), il dérive de deux acides aminés

aromatiques : la **phénylalanine** et la **tyrosine**. Chez l'immense majorité des végétaux, l'obtention de l'acide *p*-coumarique repose sur l'intervention de la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et provient donc uniquement de la phénylalanine. Toutefois, les espèces végétales appartenant aux Monocotylédones (*Poaceae* et *Orchidaceae*, pour les familles productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques) ont démontré que leurs PAL toléraient tout à fait la tyrosine comme substrat (1,66,67).

2.3. Formation des esters

Une fois qu'il est synthétisé, l'**acide nécique**, quel qu'il soit, doit être pris en charge par le **coenzyme A** — si ce n'est déjà le cas — afin d'**activer** son **radical acyle** (1). En effet, ce coenzyme sert de support à l'**estérification** entre l'**acide nécique** et la **nécine**. Qui plus est pour les acides monocrotalique et trichodesmique, cette liaison thioester est d'autant plus importante qu'un risque d'autocondensation intramoléculaire en une γ -lactone existe (53,54).

Par ailleurs, cette réaction serait catalysée par une acyltransférase spécifique de la famille des BAHD (2). Cet acronyme est formé de la première lettre (du nom en anglais) des quatre premières enzymes identifiées comme appartenant à cette famille :

– l'alcool benzylique *O*-acétyltransférase (BEAT, de l'anglais *benzylalcohol O-acetyltransferase*) (68) ;

– l'anthocyanine *O*-hydroxycinnamoyltransférase (AHCT, de l'anglais *anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase*) (68) ;

– la *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (HCBT, de l'anglais *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase) (68) ;

– et la désacétylvindoline 4-*O*-acétyltransférase (DAT, de l'anglais *deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase*) (68).

Bien qu'aucune acyltransférase spécifiquement impliquée dans l'estérification des alcaloïdes pyrrolizidiniques ne soit à ce jour identifiée, la famille enzymatique des BAHD est connue pour son rôle essentiel dans la formation de nombreux composés du métabolisme secondaire du règne végétal (68). Par extension, il est donc fort probable que l'ultime étape de biosynthèse des alcaloïdes pyrrolizidiniques soit médiée par des enzymes de cette famille (2).

La réaction débiterait par la **déprotonation** du groupe **alcool** du substrat — celui en C-7 ou en C-9 de la nécine, dans l'hypothèse de la formation des alcaloïdes pyrrolizidiniques — par l'**imidazole** d'un résidu histidyle environnant et crucial au déroulement de l'estérification (Figure 31) (68,69).

Un **énolate** intermédiaire hautement **nucléophile** serait ainsi formé, puis celui-ci attaquerait le **carbone fonctionnel** du **thioester** — toujours dans la même hypothèse, le carbone serait celui de l'acide nécique activé par le CoA — et dont la charge partielle est positive (δ^+) (Figure 31) (68,69).

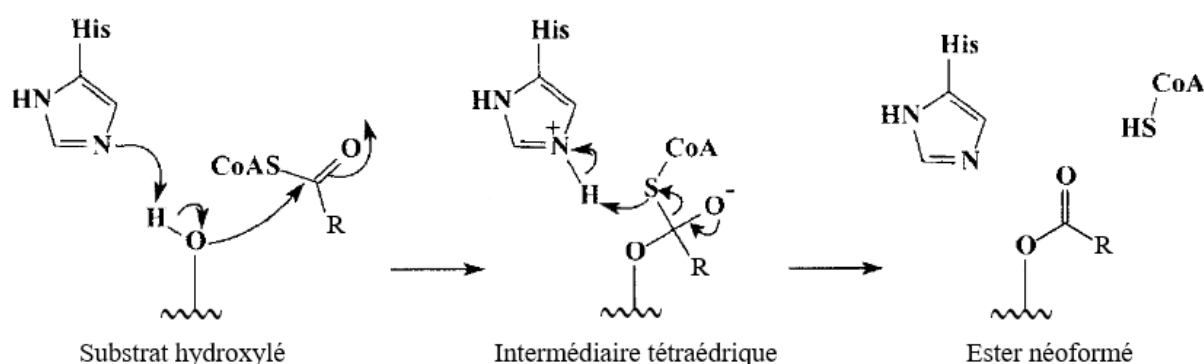


Figure 31 : Mécanisme réactionnel général du site catalytique des acyltransférases de la famille des BAHD

(His, radical histidyle ; CoA, coenzyme A ; R, chaîne d'un acide quelconque ; -OH , substrat hydroxylé quelconque ; -OCOR , ester néoformé quelconque) [D'après (69)]

Le **composé tétraédrique** ainsi créé est assurément **instable**, ce qui mène au **départ** du **coenzyme A** après la **relocalisation** des **électrons** au sein de l'intermédiaire (Figure 31) (68,69).

Presque simultanément, le coenzyme A arrache le proton à l'imidazole de l'histidine, ce qui permettra par la suite au site catalytique de recommencer l'initiation de la réaction (Figure 31). En

fin de compte nous obtenons, d'un côté, le coenzyme A avec son groupe thiol terminal, et de l'autre, l'**alcaloïde pyrrolizidinique** fraîchement néoformé (Figure 31) (68,69).

Évidemment, ce mécanisme réactionnel ne se produit qu'une seule fois lors de la formation des alcaloïdes pyrrolizidiniques ne possédant qu'un seul acide nécique dans leur structure et deux fois successives pour les alcaloïdes pyrrolizidiniques dont les nécines sont liées à deux acides néciques. Mais en ce qui concerne les alcaloïdes pyrrolizidiniques dont le squelette comporte un macrocycle — c'est-à-dire un acide nécique dicarboxylique —, l'exactitude du déroulement de cette réaction demeure inconnue. Toutefois, il est probable que les estérifications des deux hydroxyles de la nécine par les extrémités de l'acide nécique soient successives, sinon simultanées (Figure 32).

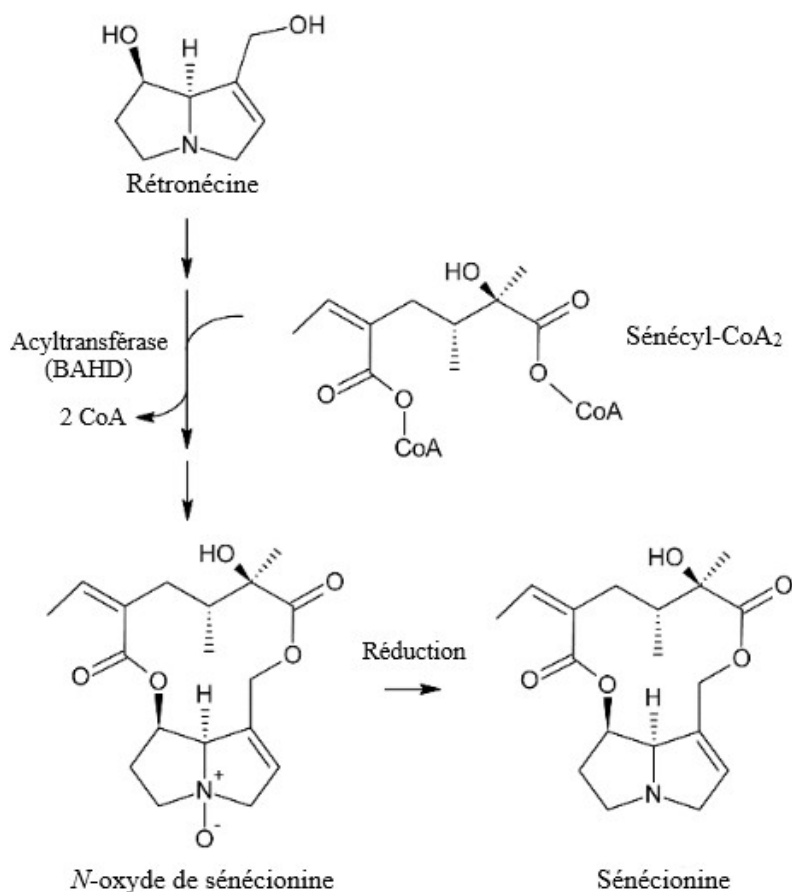


Figure 32 : Réaction d'estérification entre l'acide sénécique activé et la rétronécine
(CoA/CoA₂, coenzyme A) [D'après (2)]

Pour conclure, les alcaloïdes pyrrolizidiniques enfin obtenus sont exclusivement retrouvés sous la forme d'amines-oxydes et il leur faudra donc encore subir une ultime réaction de réduction avant d'être convertis en base libre (Figure 32) (2,3,36). Néanmoins, malgré le nombre astronomique de combinaisons d'alcaloïdes pyrrolizidiniques que permettraient de former les multitudes respectives de nécines et d'acides néciques recensés, seule une fraction d'entre eux existe réellement dans le règne végétal...

2.4. Chimiotaxonomie

C'est dans ce souci de corrélation entre le motif du squelette moléculaire des alcaloïdes pyrrolizidiniques et leur répartition dans les différents taxons botaniques qu'une classification chimiotaxonomique regroupant simultanément ces deux paramètres a été mise en place. Cette nouvelle méthode de classification se base principalement sur la structure de l'acide nécique et a permis de dégager six types d'alcaloïdes pyrrolizidiniques principaux, nommés en fonction de leur chef de file respectif (Figure 33) :

- le type sénécionine regroupant les diesters macrocycliques en C_{12} , synthétisés majoritairement par la tribu des *Senecioneae* et la famille des *Fabaceae* (2,41) ;

- le type triangularine regroupant les alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'acides néciques en C_5 , synthétisés majoritairement par les *Senecioneae* et les *Boraginaceae* (2,41) ;

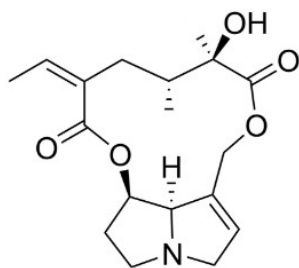
- le type lycopsamine regroupant les alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'acides néciques en C_7 , synthétisés majoritairement par la famille des *Boraginaceae* et la tribu des *Eupatorieae* (2,41) ;

- le type monocrotaline regroupant les diesters macrocycliques en C_{11} , synthétisés majoritairement par les *Fabaceae* (2,41) ;

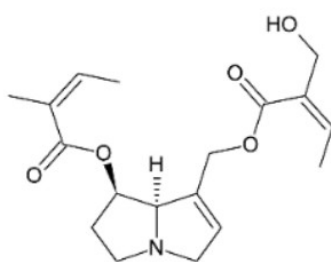
- le type phalænopsine regroupant les alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'acides néciques aromatiques, synthétisés majoritairement par la famille des *Orchidaceae* et par celle des *Convolvulaceae* (2,41) ;

- et le type divers regroupant les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne pouvant être classés dans aucune autre catégorie ci-dessus (2,41).

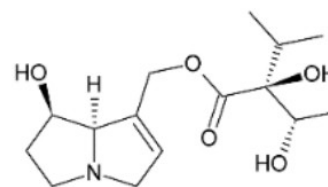
Type sénécionine



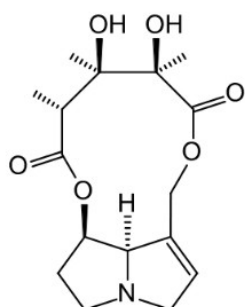
Type triangularine



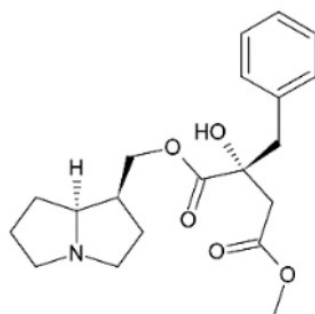
Type lycopsamine



Type monocrotaline



Type phalænopsine



Type divers

(exemple de la tussilagine)

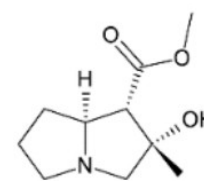


Figure 33 : Principaux types d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de la classification chimiotaxonomique

Bien sûr, des sous-types existent à l'intérieur de chaque type principal afin d'affiner la répartition des composés non plus à des familles mais à des genres, voire même à des espèces ! *In fine*, la distinction entre tous ces groupes structuraux permet de mieux mettre en lumière la relation biosynthétique qu'entretient un alcaloïde pyrrolizidinique avec ceux qui lui sont architecturalement apparentés. C'est notamment le cas dans le type sénécionine où les motifs structuraux sont pléthoriques du fait de la diversification post-biosynthétique extrêmement accrue chez les *Senecioneae* (2,41,57). Sans ces sous-types, la détermination de la biosynthèse de chaque alcaloïde pyrrolizidinique serait devenu en véritable casse-tête ! Et en effet au dernier recensement phytochimique établi dans cette tribu, on dénombrait plus d'une centaine de composés appartenant au type sénécionine, 106 pour être exact (41) !

Ainsi nous pouvons en conclure qu'une espèce botanique n'est à même de produire que certains types d'acides néciques et que certaines nécines grâce à un arsenal enzymatique qui lui est intrinsèquement propre. Par ailleurs dans l'immense majorité des cas, le panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques produit par chaque plante est d'une surprenante homogénéité structurale (32,41,42). Cependant les observations phytochimiques — toujours plus fascinantes les unes que les

autres — ne s'arrêtent évidemment pas là. Il existe une autre particularité biosynthétique bien plus insolite encore ! Bon nombre d'alcaloïdes pyrrolizidiniques retrouvés dans des taxons n'ayant pourtant aucune relation phylogénétique entre eux possèdent toutefois des éléments constitutifs analogues (Tableau I) (30,41) !

Taxon botanique	Nombre d'espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques	Nombre d'espèces produisant le type d'alcaloïde pyrrolizidinique						
		I	II	III	IV	V	VI	
<i>Apocynaceae</i>	8	1	/	5	/	1	3	
<i>Asteraceae</i>	<i>Eupatorieae</i>	23	2	2	23	/	/	/
	<i>Senecioneae</i>	313	294	72	/	3	/	12
<i>Boraginaceae</i>	144	2	20	129	6	3	8	
<i>Celastraceae</i>	1	/	1	/	/	/	/	
<i>Convolvulaceae</i>	11	/	3	2	/	8	/	
<i>Fabaceae</i>	109	41	4	1	57	/	21	
<i>Lamiaceae</i>	1	1	/	/	/	/	/	
<i>Orchidaceae</i>	37	/	/	/	/	35	2	
<i>Poaceae</i>	2	1	/	/	/	1	/	
<i>Ranunculaceae</i>	3	3	/	/	/	/	/	
<i>Santalaceae</i>	2	/	/	1	/	2	/	
<i>Sapotaceae</i>	4	/	/	1	/	2	1	

Tableau I : Répartition au sein des familles botaniques et classification chimiotaxonomique des alcaloïdes pyrrolizidiniques

(I, type sénécionine ; II, type triangularine ; III, type lycopsamine ; IV, type monocrotaline ; V, type phalænopsine ; VI, type divers) [D'après (41)]

Comme nous l'avons préalablement précisé, la classification chimiotaxonomique des alcaloïdes pyrrolizidiniques se fixe comme principal objectif de vouloir mettre en exergue les caractéristiques biosynthétiques inhérentes aux différents clades en produisant. Nous pourrions donc imaginer — et ce à juste titre — que la répartition des six types d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le règne végétal soit intimement liée à l'émergence isolée de l'HSS. Autrement dit, que chaque type majeur ne soit l'apanage que d'un seul et unique taxon. Or il n'en est rien ! La présence concomitante de plusieurs types structurels dans les principales familles botaniques productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques est certes pour le moins inattendue (Tableau I), mais prouve sensiblement que les capacités biosynthétiques d'une espèce vont au-delà de sa seule propriété héréditaire à pouvoir former un cycle pyrrolizidinique.

2.5. Diversification post-biosynthétique

Comme nous l'avions déjà souligné plus haut, les alcaloïdes pyrrolizidiniques libérés par l'acyltransférase sont systématiquement présents sous leur forme *N*-oxydée (2,3,36). Cela s'explique notamment par le fait que le siège de la biosynthèse diffère parfois de celui où se déroule les modifications structurelles annexes (2,57). Qui plus est, nombre d'espèces végétales possèdent également un lieu de production différent de celui impliqué dans le stockage des alcaloïdes pyrrolizidiniques (1–3,36). Dans les deux cas, l'organisme de la plante a un besoin impératif de pouvoir déplacer ces composés néoformés avec le plus d'aisance possible et, *de facto*, la forme amine-oxyde y contribue grandement de par la meilleure solubilité qu'elle apporte à la molécule vis-à-vis de ses analogues amine tertiaire et ammonium quaternaire (2–4,36,70). En outre, c'est la vacuole qui apparaît comme étant l'organite impliqué dans l'accumulation des alcaloïdes pyrrolizidiniques *N*-oxydés au sein de la cellule, comme c'est le cas pour de nombreux composés du métabolisme secondaire du règne végétal (1,64,70).

Les amines-oxydes primordiaux subissent ensuite des réactions additionnelles permettant leur diversification structurelle et d'aboutir *in fine* à la composition qualitative du panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques relatif à chaque espèce (57). Néanmoins, le siège intracellulaire de ces modifications annexes ne serait pas le même compartiment que celui impliqué dans le stockage des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En effet, bon nombre de réactions de diversification seraient difficiles à mettre en œuvre au sein de la vacuole compte tenu de son pH interne ; les composés *N*-oxydes seraient donc transférés vers un milieu de la cellule végétale plus adapté à l'activité catalytique des enzymes et il s'agirait à ce sujet très probablement du cytosol (71). Quelles que soient les espèces,

l'obtention de leur panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques constitutif leur est propre et ne nécessite qu'une à deux étapes réactionnelles — voire plus dans de très rares cas — (2,32,57,72).

De surcroît, les modifications chimiques sont stéréosélectives et spécifiques d'une position intramoléculaire, ce qui enterre *de facto* l'hypothèse d'une intervention d'enzymes considérées comme indifférentes et qui réaliseraient sans distinction de substrat le même processus réactionnel comme il le fut souvent avancé. En réalité, la régiosélectivité des réactions de diversification structurelle, d'une part, ajoutée à la formation de dérivés aboutissant à un bouquet d'alcaloïdes pyrrolizidiniques unique et caractéristique d'une seule espèce botanique, d'autre part, indiquent très clairement que ces transformations chimiques sont catalysées par des enzymes spécialisées et dont la présence intracellulaire relève d'un chaperonnage génétique (57,72).

La représentation la plus flagrante de la phase de diversification post-biosynthétique se trouve dans la tribu des *Senecioneae*, où la richesse des composés obtenus ne réside que dans l'existence d'une poignée de réactions de natures extrêmement variées : hydroxylations, époxydations, désaturations, *O*-acétylations, etc. (Figure 34 et Annexe VI) (72,73).

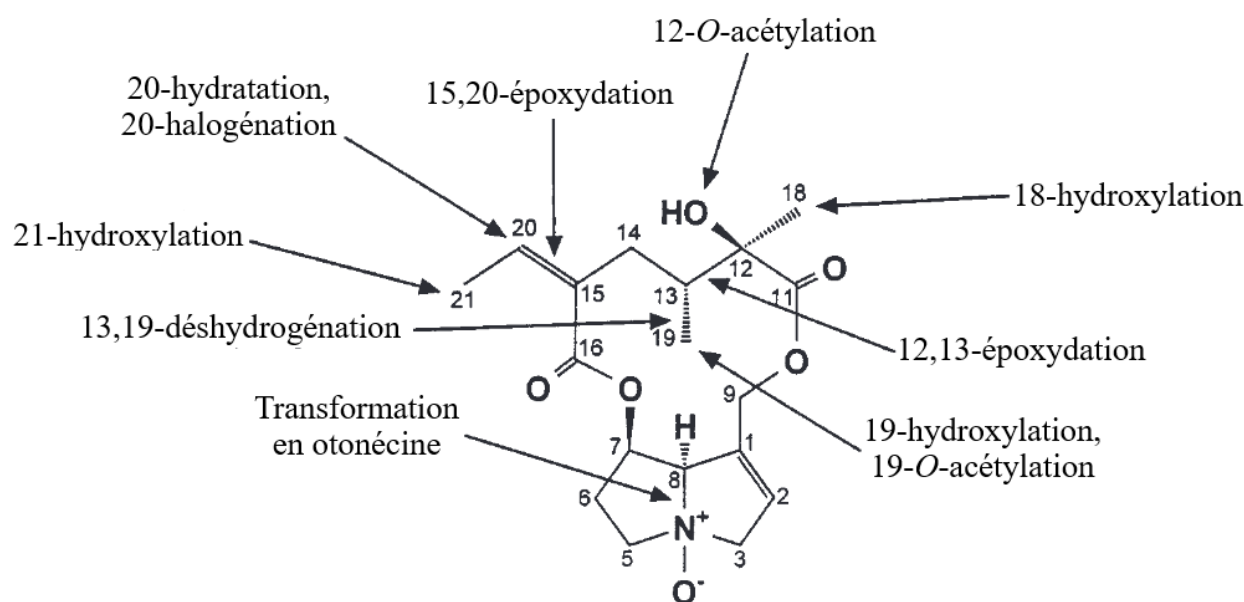


Figure 34 : Principales réactions de diversification structurelle du *N*-oxyde de sénécionine dans la tribu des *Senecioneae* (*Asteraceae*)

[D'après (72)]

Ces réactions sont communément dites spécifiques d'espèces car leur localisation sur l'édifice du *N*-oxyde de sénécionine ainsi que leur potentiel enchaînement sont bien souvent la chasse gardée d'une unique espèce voire parfois même d'un chimiotype en particulier (Tableau II) (57,72). De manière générale, il nous faut signaler qu'à l'intérieur de la tribu des *Senecioneae*, plus

de la moitié des alcaloïdes pyrrolizidiniques (55 %) n'ont été identifiés que dans une seule ou deux espèces, respectivement 38 % et 17 % (41) !

Réactions de diversification structurelle	Espèces végétales				
	<i>Senecio vulgaris</i> L.	<i>Senecio vernalis</i> Waldst. & Kit.	<i>Senecio inaequidens</i> DC.	<i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn. Chimiotypes Jacobine	<i>Jacobaea erucifolia</i> (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. Érucifoline
Transformation en otonécine		1	2, 3		
18-hydroxylation	4	4	4		
19-hydroxylation				5, 11	5, 11
21-hydroxylation				6	6
15,20-époxydation			2, 3	7, 8, 9, 10	
20-halogénéation				9	
20-hydratation				10	
12,13-époxydation				5, 11	5, 11
12-O-acétylation			3		
19-O-acétylation				11	11
13,19-déshydrogénation	12	12	12	8, 12	12

Tableau II : Distribution des réactions de diversification structurelle dans cinq espèces de la tribu des *Senecioneae* (*Asteraceae*)

(**1**, senkirkine ; **2**, otosénine ; **3**, florosénine ; **4**, rétrorsine ; **5**, érucifoline ; **6**, éruciflorine ; **7**, jacobine ; **8**, jacozone ; **9**, jaconine ; **10**, jacoline ; **11**, acétylérucifoline ; **12**, sénéciphylline)

[D'après (72)]

En somme, il s'avère donc que la majorité des alcaloïdes pyrrolizidiniques ne sont produits que par quelques espèces, elles-mêmes issues d'un genre bien précis. C'est d'ailleurs à cause de cette spécificité qu'un schisme taxonomique a eu lieu au sein du genre *Senecio* ; quelques espèces se sont finalement avérées former un genre à part entière : le genre *Jacobaea* (toujours compris dans la famille des *Asteraceae*, tribu des *Senecioneae*). En l'occurrence, cette scission vient notamment du fait de la présence de composés, certes du type sénécionine — étant donné le maintien de la rétronécine comme base nécine —, mais qui forment un sous-type particulier : le groupe jacobine, caractérisé par la suppression de l'insaturation entre les carbones C-15 et C-20 initiée par une réaction d'époxydation régiosélective (Annexe VI) (4,57). Qui plus est, les principaux alcaloïdes pyrrolizidiniques de ce groupe sont au nombre de quatre (jacobine, jaconine, jacoline et jacozine) et apparaissent être l'apanage quasi exclusif du genre *Jacobaea* (Tableau II) (2,41,57).

Les quelques énumérations de ces variabilités interspécifiques présentes dans les *Senecioneae* — qui ont pourtant été relevées à l'intérieur d'un lignage ayant eu le même événement de duplication génétique — étayent avec aisance l'hypothèse d'une biogenèse évolutive. Autrement dit, les premières étapes de la biosynthèse sont hautement conservées dans tous les taxons ayant hérité de l'apparition de l'HSS. *A contrario*, les réactions de diversification du squelette du *N*-oxyde de sénécionine sont beaucoup plus plastiques entre les différents genres de cette tribu (Tableau II) (41,57,72).

3. Pharmacologie

L'attrait qu'exercent les alcaloïdes pyrrolizidiniques ces dernières années trouve principalement sa source dans la toxicité notable que ces composés engendrent lors de leur métabolisme.

3.1. Toxicocinétique

La formation de métabolites délétères pour l'organisme est grandement influencée par la structure initiale de chaque alcaloïde pyrrolizidinique et sa capacité inhérente à pouvoir être absorbée ou non avant de se retrouver dans la circulation générale et subir ultérieurement une quelconque réaction de dégradation.

3.1.1. Absorption

Concernant la biodisponibilité des alcaloïdes pyrrolizidiniques par voie orale, elle repose essentiellement sur différents paramètres physico-chimiques comme le poids moléculaire, l'état d'ionisation intramoléculaire et la lipophilie intrinsèque de chaque molécule car le franchissement de la barrière de l'épithélium intestinal se déroule principalement de façon passive.

Ainsi les composés non ionisés, de faible poids moléculaire et les plus lipophiles traversent facilement la membrane plasmique des entérocytes et se retrouvent, dans un premier temps, en plus grande proportion dans l'espace basolatéral (le milieu extracellulaire situé entre le pôle éponyme de l'entérocyte et les vaisseaux sanguins), puis dans un second temps, dans la circulation générale. Le squelette de l'alcaloïde pyrrolizidinique influence donc nettement le phénomène de diffusion transmembranaire et notamment par le biais de sa lipophilie, elle-même modulée suivant le nombre de fonctions esters et de groupes hydroxyles que l'alcaloïde pyrrolizidinique comporte (74,75).

Un autre facteur — et non des moindres — influe sur la diffusion passive des alcaloïdes pyrrolizidiniques : il s'agit du degré d'oxydation de la nécine (75). Effectivement, la *N*-oxydation du cycle pyrrolizidinique confère une ionisation intramoléculaire à l'alcaloïde pyrrolizidinique, ce qui altère grandement son affinité pour les molécules hydrophobes et donc, par extension, son aptitude à passer la membrane plasmique entérocytaire.

Pour rappel, la lipophilie et l'hydrophilie s'expriment grâce au $\log P_{\text{oct/eau}}$, où $P_{\text{oct/eau}}$ est le coefficient de partage représentant le rapport de solubilité d'une substance chimique dans deux solvants, généralement l'octanol et l'eau. Le $\log P_{\text{oct/eau}}$ est donc obtenu par la fonction suivante :

$$\log P_{\text{oct/eau}} = \log_{10} \left(\frac{[A]_{\text{oct}}}{[A]_{\text{eau}}} \right)$$

où $[A]_{\text{oct}}$ représente la concentration du soluté dans l'octanol et $[A]_{\text{eau}}$ représente la concentration du soluté dans l'eau.

Ainsi, un $\log P$ négatif signifie que le composé chimique est hydrophile et, à l'inverse, un $\log P$ de valeur positive signifie que le composé chimique est lipophile. Et lorsque le $\log P$ égal à zéro, alors le composé chimique a tout autant d'affinité pour l'eau que pour l'octanol.

De manière générale, un alcaloïde pyrrolizidinique *N*-oxydé possède un $\log P$ diminué de 0,6 par rapport à sa forme classique. Dans la plupart des cas, la conséquence est une réduction de la lipophilie (sénécionine, $\log P = 1,1$ et *N*-oxyde de sénécionine, $\log P = 0,5$) ou un accroissement de l'hydrophilie (lycopsamine, $\log P = -0,4$ et *N*-oxyde de lycopsamine, $\log P = -1$). Mais ce peut

également être une inversion de l'affinité (riddelliine, $\log P = 0,2$ et *N*-oxyde de riddelliine, $\log P = -0,4$), voire plus rarement l'obtention d'un alcaloïde pyrrolizidinique amine-oxyde qui est tout autant affiné pour l'eau que pour l'octanol (rétrorsine, $\log P = 0,6$ et *N*-oxyde de rétrorsine, $\log P = 0$) (75) !

De surcroît, un autre paramètre diminue l'accès des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques à la circulation générale : le mécanisme d'efflux actif sensiblement développé au niveau des entérocytes et médié par les protéines de transport transmembranaire ABC (de l'anglais *ATP-Binding Cassette proteins*) (76,77).

Pour conclure sur l'absorption des alcaloïdes pyrrolizidiniques, l'administration *per os* de ces molécules — qu'elle soit volontaire ou pas — n'est pas la seule voie existante. En effet, la voie percutanée est certes bien plus rare mais demeure tout à fait possible. Néanmoins, la pénétration de la barrière cutanée par les alcaloïdes pyrrolizidiniques reste dérisoire car jamais plus de 10 % des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux ayant été appliqués sur la peau parviennent à franchir les nombreuses couches de protection que forment les cellules dermiques et donc à atteindre le système sanguin (78).

3.1.2. Distribution

Une fois la circulation générale atteinte, la répartition des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'organisme peut encore être influencée par leur lipophilie car suivant leur affinité pour les molécules hydrophobes, ils se retrouveront plus ou moins stockés au sein des tissus adipeux (75). Toutefois, il s'avère que le rapport de répartition des alcaloïdes pyrrolizidiniques entre les tissus adipeux et le plasma est globalement faible : pour la rétrorsine, il est par exemple de 0,18 environ. En réalité, les alcaloïdes pyrrolizidiniques se distribuent davantage dans les os, les muscles, la peau, le cerveau et les viscères thoraciques (cœur, poumons) ou abdominaux (foie, rate, intestins, reins...). Toujours avec l'illustration de la rétrorsine, leur rapport de répartition respectif avec le plasma oscille entre 0,60 (pour les os) et 1,05 (pour le foie), faisant ainsi du tissu hépatique la principale cible des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'organisme (79). L'affinité élevée des alcaloïdes pyrrolizidiniques envers cet organe est d'ailleurs en grande partie à l'origine de leur hépatotoxicité (cf. Section 3.2.1.) (3).

Cependant, la *N*-oxydation du cycle pyrrolizidinique influe là encore sur la distribution tissulaire de ces composés. Effectivement, précisons que seule la fraction libre des alcaloïdes pyrrolizidiniques diffuse au travers des tissus, tandis que leur fraction liée aux protéines

plasmatiques demeure dans la circulation sanguine. Lorsqu'un alcaloïde pyrrolizidinique est sous forme *N*-oxydée, sa fraction libre représente presque la totalité de la quantité plasmatique dudit composé (75).

3.1.3. Métabolisme

Une fois les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'hépatocyte, un processus de métabolisation se met donc en place et il se divise en deux étapes généralement successives : une étape de fonctionnalisation puis une éventuelle étape de conjugaison (2,3).

3.1.3.a). Phase de fonctionnalisation

La phase de fonctionnalisation (ou phase I) consiste à moduler l'édifice moléculaire de l'alcaloïde pyrrolizidinique pour le rendre plus hydrosoluble. Elle consiste principalement en des réactions d'oxydation (hydroxylations, désaturations, *N*-déméthylations, *N*-oxydations, etc.) (2,3,80).

Les enzymes responsables de ces modifications structurales appartiennent aux mono-oxygénases et plus précisément à la famille des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP450) (1–3,80–82). La plupart des isoformes des cytochromes P450 sont capables de prendre en charge les alcaloïdes pyrrolizidiniques ; mais il s'avère que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont majoritairement métabolisés par les cytochromes de la sous-famille 3A et plus particulièrement par les isoenzymes 4 et 5 (CYP3A4 et CYP3A5) (74,81,83). Par ailleurs, ce sont les seules isoformes de cytochromes P450 en mesure de prendre en charge les composés constitués d'une otonécine (comme la senkirine ou la clivorine), tandis que les alcaloïdes pyrrolizidiniques porteurs d'un autre type structurel de nécine sont également les substrats d'un plus large panel d'isoenzymes (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1...) mais généralement dans une moindre mesure (81).

Néanmoins, il apparaît que la monocrotaline n'est que très peu métabolisée par les cytochromes P450 hépatiques — de l'ordre de cinq fois moins environ — et lorsque celle-ci l'est, cela se déroule *via* des isoformes dont la cascade de dégradation ne représente qu'une voie minoritaire pour les autres alcaloïdes pyrrolizidiniques (CYP2A6, CYP2E1, etc.) (74,81,84).

Les réactions d'oxydation prédominantes des alcaloïdes pyrrolizidiniques médiées par les mono-oxygénases à cytochromes P450 sont des hydroxylations. De surcroît, ces dernières sont

localisées uniquement sur la nécine en α de l'azote cyclique avec néanmoins quelques spécificités suivant la structure du cycle pyrrolizidinique. En effet, les alcaloïdes pyrrolizidiniques avec une nécine 1,2-insaturée sont hydroxylés soit en C-3, soit en C-8 (Figure 35), tandis que les composés possédant une nécine totalement saturée subissent, eux, une hydroxylation sur leurs carbones C-5 ou C-8 (Figure 36) (80,85). Et enfin pour ce qui est des alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'une otonécine, c'est seulement le carbone du groupe méthyle porté par l'atome d'azote qui se retrouve oxydé en hydroxyméthyle (Figure 35) (2,80) !

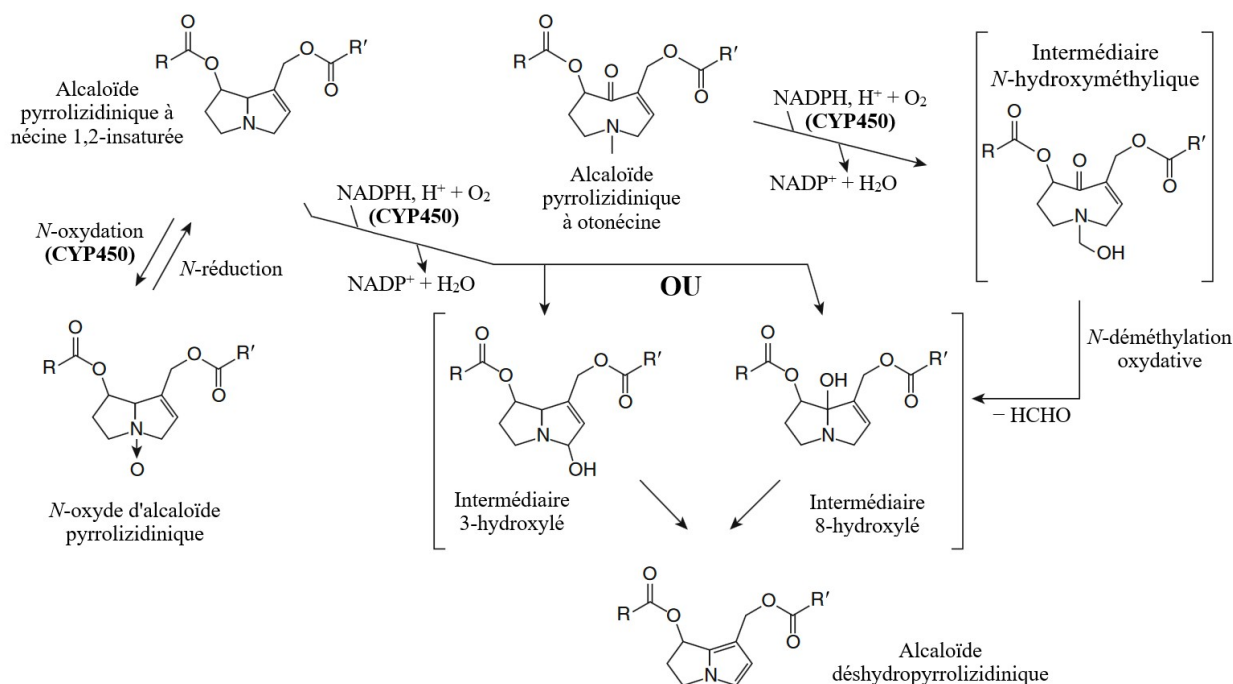


Figure 35 : Métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques à nécine 1,2-insaturée

(NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite ; NADP^+ , nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée ; CYP450, cytochrome P450 ; R, R', acide nécique quelconque) (N.B. : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques représentés ci-dessus pourraient tout aussi bien être des monoesters en C-7 comme en C-9.)

Toujours à propos des alcaloïdes otonéciques, l'hydroxylation réalisée par les cytochromes P450 n'est que la première étape de leur phase de fonctionnalisation car elle mène à un intermédiaire N-hydroxyméthylé qui réagit ensuite spontanément pour libérer une molécule de formaldéhyde (HCHO) et créer un dérivé hydroxylé en C-8 après un réarrangement électronique intramoléculaire (Figure 35) (2,3,80). Sans cette N-déméthylation oxydante, les alcaloïdes pyrrolizidiniques avec une otonécine ne pourraient pas former les dérivés métaboliques caractéristiques de cette classe d'alcaloïdes (2,80,81).

Enfin soulignons que l'hydroxylation des alcaloïdes pyrrolizidiniques est optimale lorsque la nécine est estérifiée en C-7 et en C-9 mais demeure toutefois possible pour des monoesters. De plus, les diesters à chaîne ouverte sont les alcaloïdes pyrrolizidiniques les plus rapidement hydroxylés du fait de leur encombrement stérique moindre par rapport aux diesters macrocycliques (86).

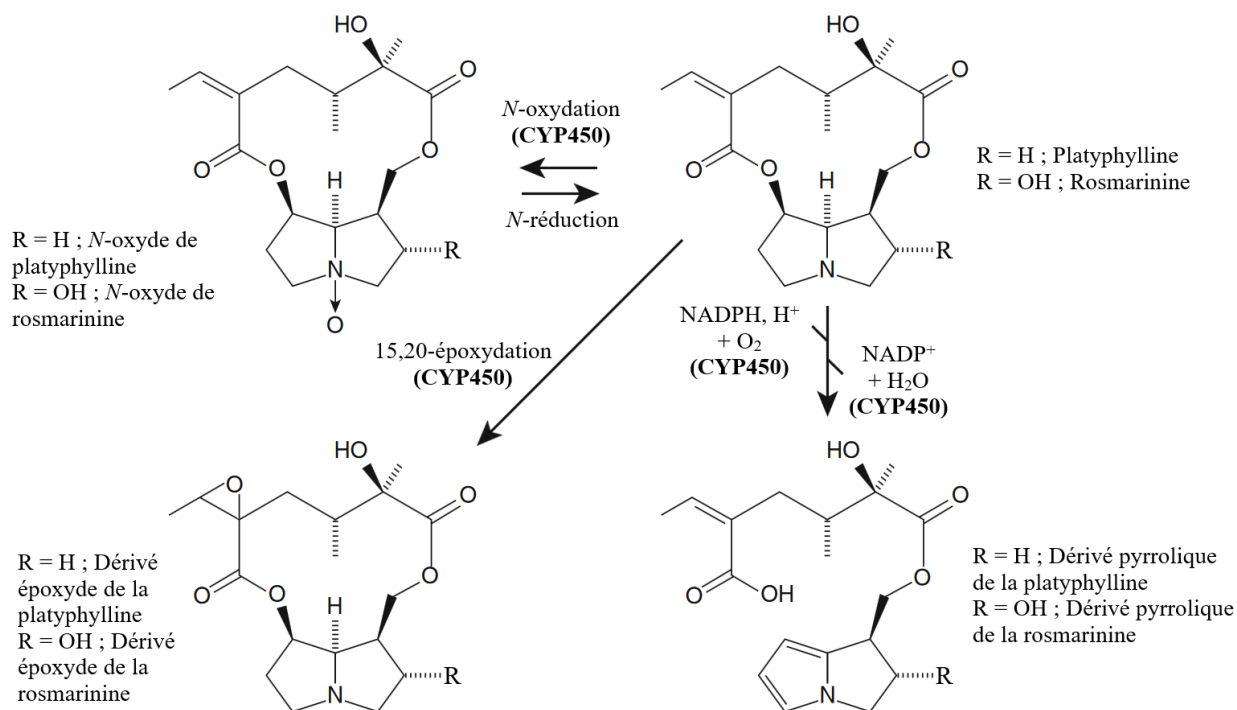


Figure 36 : Métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques à nécine saturée

(NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite ; NADP⁺, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée ; CYP450, cytochrome P450) (N.B. : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques représentés ci-dessus pourraient tout aussi bien être des monoesters en C-7 comme en C-9.)

Suite à l'oxydation de leur nécine, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont désormais devenus des intermédiaires hydroxylés hautement réactifs dont la déshydratation immédiate forme des dérivés pyrroliques, parfois également retrouvés sous le nom d'alcaloïdes déshydropyrrolizidiniques (Figures 35 et 36) (1,2,80,85,87). Précisons tout de même que la perte d'une molécule d'eau est rendue possible par la mobilité des électrons du doublet non liant de l'azote ; cependant la présence ou non d'une insaturation au sein de la pyrrolizidine influence grandement la structure du composé pyrrolique obtenu après la réaction de déshydratation spontanée ! Effectivement, la délocalisation des électrons du doublet non liant de l'azote dans une nécine 1,2-insaturée crée un système conjugué avec les électrons π déjà existants, tandis que dans un cycle pyrrolizidinique entièrement saturé, ce déplacement électronique n'en entraîne aucun (1,80,85).

La conséquence de ces mécanismes dichotomiques se retrouve dans le squelette final des différents métabolites déshydropyrrolizidiniques : soit le motif pyrrolique est retrouvé du côté de l'azote et des carbones C-1, C-2, C-3 et C-8 pour les nécines initialement 1,2-insaturées (Figure 35) ; soit le motif pyrrolique est retrouvé du côté de l'azote et des carbones C-5 à C-8 pour les nécines qui étaient au préalable saturées (Figure 36) (80,85). Par ailleurs, ces caractéristiques structurales sont aussi à l'origine de l'innocuité ou de la toxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques !

Hormis les réactions d'hydroxylation, les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent subir d'autres procédés d'oxydation tels que des *N*-oxydations ou plus rarement des époxydations et des désaturations (Figures 35 et 36) (3,85,87–90).

La *N*-oxydation d'un alcaloïde pyrrolizidinique lui octroie une plus grande solubilité et facilite donc son élimination par l'organisme (Figure 37) ; de surcroît, ce sont toujours les isoformes CYP3A4 et CYP3A5 qui réalisent principalement ce type d'oxydation même si la participation minoritaire d'autres isoenzymes (CYP2B6, CYP2C19 et CYP2D6) est également relevée (85). Toutefois, un autre genre de mono-oxygénase intervient aussi dans la *N*-oxydation des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Il s'agit des mono-oxygénases à flavine (FMO, de l'anglais *Flavin-containing MonoOxygenases*) dont le groupement prosthétique n'est pas une porphyrine couplée à un atome de fer ferrique (l'hème des CYP450) mais la FAD (87,89).

Quant à l'époxydation des alcaloïdes pyrrolizidiniques, celle-ci se déroule sur la double liaison entre les carbones C-15 et C-20 des acides en C₁₀ et est médiée par les CYP3A4 et CYP3A5 mais ne représente qu'une voie de fonctionnalisation plus que mineure (Figure 36) (85).

Bien entendu, les différentes réactions oxydantes (hydroxylations, désaturations, désalkylations) peuvent se produire sur les acides néciques et aboutir à un florilège de composés plus ou moins stables. Fort heureusement, ces multiples voies métaboliques ne sont qu'anecdotiques en comparaison de celles hydroxylant la nécine en α de l'azote (88,90).

Enfin, il existe d'autres réactions auxquelles sont sujets les alcaloïdes pyrrolizidiniques une fois qu'ils sont présents dans le cytoplasme des hépatocytes comme l'hydrolyse de leurs liaisons esters libérant, d'une part, le(s) acide(s) nécique(s), et d'autre part, la nécine (Figure 37) (2,3,80,89). L'hydrolyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques est effectuée par des hydrolases particulières : les carboxylestérases (CES) (89). Néanmoins, la rupture de la fonction ester par les CES est facilitée en présence d'un environnement stérique dégagé, autrement dit, les alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'un macrocycle sont moins sensibles au phénomène d'hydrolyse que les simples monoesters ou les diesters à chaîne ouverte. À la suite de leur séparation, les acides néciques et les

nécines — désormais bien plus hydrosolubles — sont aisément éliminés sans causer de quelconques dommages aux cellules ou à l'organisme (80).

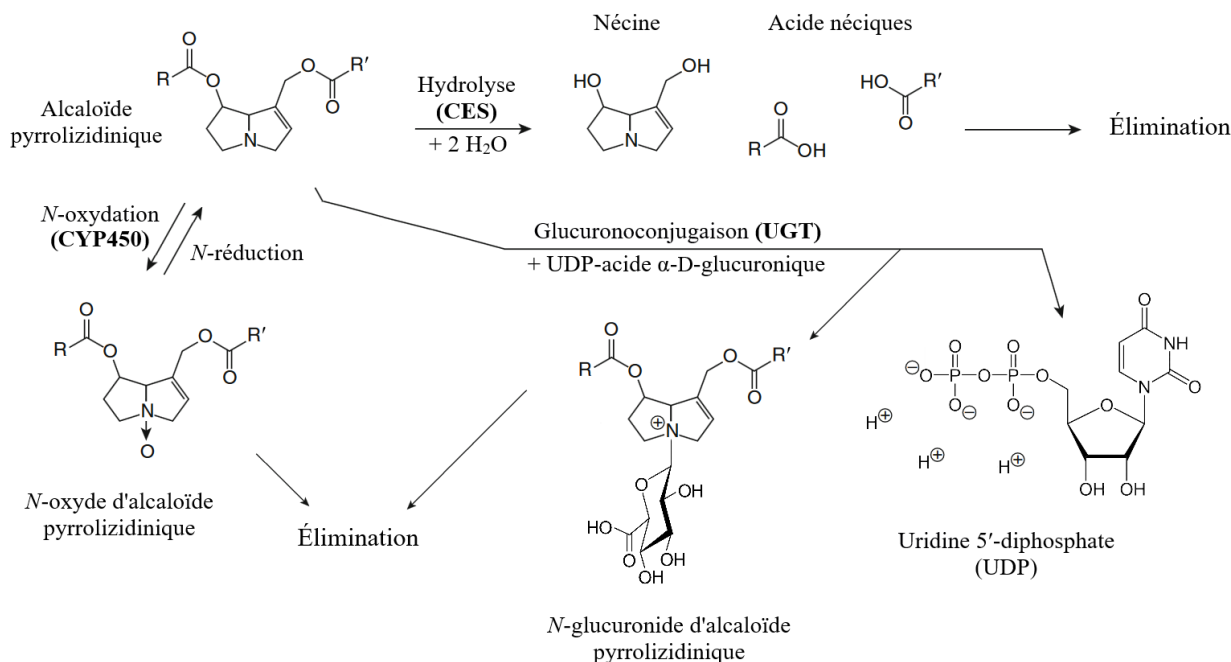


Figure 37 : Autres voies métaboliques des alcaloïdes pyrrolizidiniques

(CES, carboxylestérase ; CYP450, cytochrome P450 ; R/R', acide nécique quelconque ; UGT, uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase) (N.B. : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques représentés ci-dessus pourraient tout aussi bien être des monoesters en C-7 comme en C-9.)

3.1.3.b). Phase de conjugaison

La phase de conjugaison (ou phase II) a également pour but d'augmenter la solubilité des alcaloïdes pyrrolizidiniques mais son efficacité est bien meilleure que le simple ajout d'un groupe polaire (2,3,80). Il y a de nombreuses voies de conjugaison possibles pour détoxifier l'organisme des xénobiotiques, notamment la greffe d'une molécule soufrée (glutathion, cystéine, N-acétylcystéine) ou celle d'un sucre (acide glucuronique) (Figure 38) (80,87,91).

Dans notre cas, la différence majeure entre toutes ces réactions de conjugaison réside dans leur temporalité. En effet, la glucuroconjugaison s'opère très étonnamment avec les alcaloïdes pyrrolizidiniques intacts, avant que ceux-là ne subissent la moindre étape de la phase de fonctionnalisation (Figure 37), là où la formation de conjugués avec des molécules détentrices d'un groupe thiol ne se produit qu'en présence de dérivés déshydropyrrolizidiniques (Figures 39 et 40) (80,86,87,91–94) !

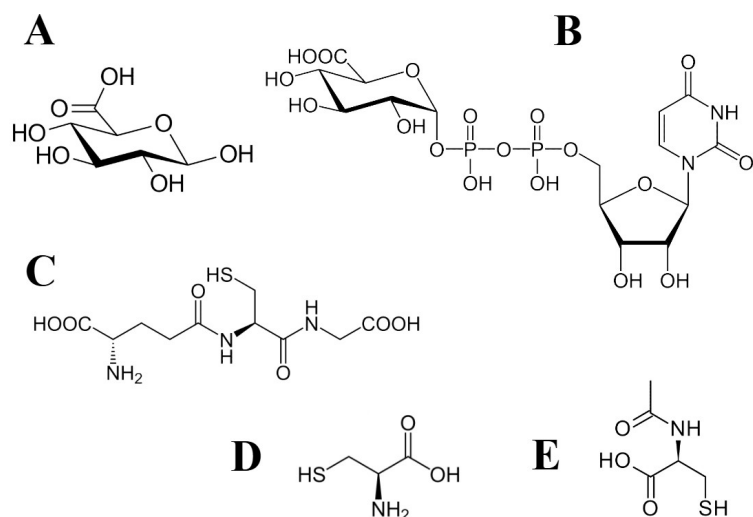


Figure 38 : Molécules impliquées dans la phase de conjugaison des alcaloïdes pyrrolizidiniques et de leurs métabolites déshydropyrrolizidiniques (A, acide β -D-glucuronique ; B, uridine 5'-diphosphate-acide α -D-glucuronique ; C, glutathion ; D, cystéine ; E, *N*-acétylcystéine)

Cette spécificité s'explique surtout par le fait que la glucuroconjugaison nécessite comme substrat un alcaloïde pyrrolizidinique classique sous forme base car l'addition osidique doit obligatoirement prendre place sur un atome d'azote possédant un doublet non liant libre et qui ne fait pas non plus partie d'un système conjugué, comme c'est le cas dans le cycle des métabolites déshydropyrrolizidiniques (92,93).

La *N*-glucuroconjugaison est réalisée par une famille de glycosyltransférases catalysant spécialement l'ajout de l'acide D-glucuronique : les uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférases (UGT) (Figure 37), et plus précisément par l'UGT1A4 qui est l'enzyme prenant principalement en charge les composés constitués d'une amine tertiaire (87,92,93). En outre, la particularité notable de cette classe enzymatique est qu'elle intègre l'ose en modifiant sa configuration spatiale. Effectivement, l'acide D-glucuronique utilisé lors de la réaction de conjugaison est présent sous la forme de l'anomère α — en plus d'être lié à l'uridine 5'-diphosphate (UDP) (Figures 37 et 38-B) — ; alors que le produit obtenu, un *N*-glucuronide d'alcaloïde pyrrolizidinique, est lui constitué de l'anomère β (Figures 37 et 38-A) (95).

La phase de conjugaison détoxifiante se déroule donc majoritairement sur les métabolites pyrroliques dont le caractère électrophile est sensiblement développé. Cela leur confère *de facto* une

réactivité intrinsèque très élevée avec les molécules contenant un groupe fonctionnel nucléophile telles que le glutathion (GSH) qui possède en l'occurrence un thiol, motif chimique parfois également retrouvé sous le nom de mercaptan (Figure 38-C) (2,3,80,91).

Ainsi l'addition nucléophile de l'atome de soufre du groupe thiol du glutathion se déroule soit sur le carbone C-7 de la déshydropyrrolizidine (DHP), soit sur le carbone C-9, soit sur les deux mais alors de façon successive (Figure 39) (2,86,96). Dans tous les cas, les liaisons esters des acides néciques avec la DHP sont rompues par le biais d'une hydrolyse simultanée au mécanisme réactionnel médiée par la glutathion *S*-transférase (GST) (96,97).

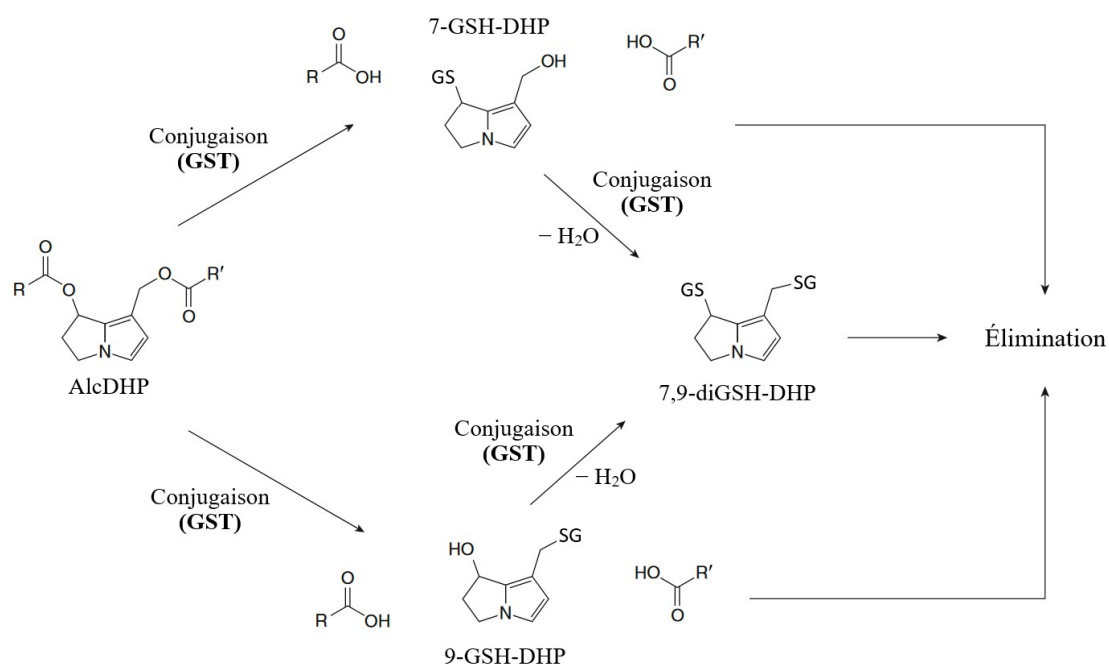


Figure 39 : Possibilités de conjugaison au glutathion des alcaloïdes déshydropyrrolizidiniques (AlcDHP, alcaloïde déshydropyrrolizidinique ; GST, glutathion *S*-transférase ; GS/SG, radical glutathionyle ; 7-GSH-DHP, 7-glutathionyl-déshydropyrrolizidine ; 7,9-diGSH-DHP, 7,9-diglutathionyl-déshydropyrrolizidine ; 9-GSH-DHP, 9-glutathionyl-déshydropyrrolizidine ; R,/R', acide néciq ue quelconque)
(N.B. : L'alcaloïde déshydropyrrolizidinique représenté ci-dessus pourrait tout aussi bien être un monoester en C-7 comme en C-9.)

La libération de l'acide néciq ue situé sur le carbone électrophile s'effectue logiquement suite à l'attaque nucléophile d'un des deux doublets non liants du soufre du glutathion ; mais le second — s'il y en a un — résulte de la déstabilisation électronique induite par l'ajout d'un pont thioéther dans la structure moléculaire du dérivé déshydropyrrolizidinique (96).

Les trois composés ainsi obtenus — la 7-glutathionyldéshydropyrrolizidine (7-GSH-DHP), la 9-glutathionyldéshydropyrrolizidine (9-GSH-DHP) et la 7,9-diglutathionyldéshydropyrrolizidine (7,9-diGSH-DHP) — permettent l'élimination des métabolites déshydropyrrolizidiniques produits précédemment lors de la phase de fonctionnalisation (Figure 39) (2,3,80). Pourtant, ces dérivés pyrroliques secondaires ne sont pas équivalents entre eux en termes de stabilité ou de formation (86,89,94). En effet, la 7,9-diGSH-DHP montre la meilleure inertie d'un point de vue chimique, tandis que la 7-GSH-DHP et la 9-GSH-DHP sont encore potentiellement réactives à cause de leur hydroxyle restant... Qui plus est, il semblerait également que pour les monoesters de DHP, une fonction ester en C-7 facilite grandement la réaction de conjugaison avec le glutathion par rapport à une fonction ester en C-9, d'où une production majoritaire de la 7-GSH-DHP (80,86).

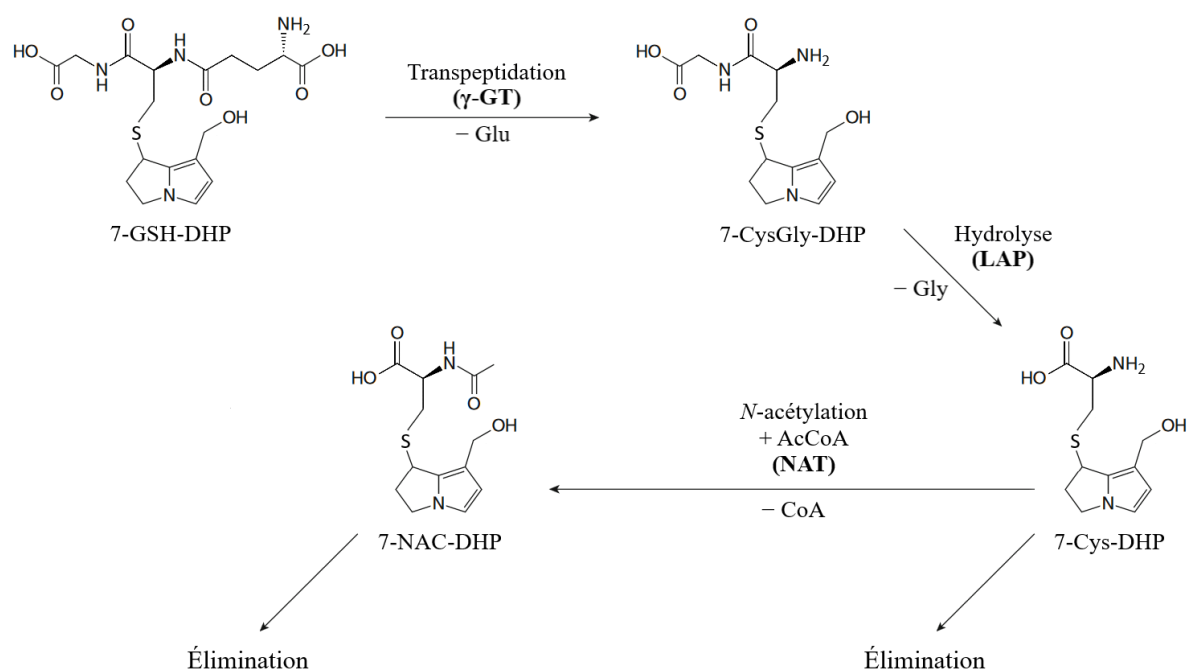


Figure 40 : Rôle de la voie de l'acide mercapturique dans le devenir des métabolites déshydropyrrolizidiniques *S*-conjugués au glutathion

(7-GSH-DHP, 7-glutathionyldéshydropyrrolizidine ; Glu, acide glutamique ; Gly, glycine ;

AcCoA, acétyl-coenzyme A ; CoA, coenzyme A ; γ -GT, γ -glutamyltransférase ;

LAP, leucyl-aminopeptidase ; NAT, *N*-acétyltransférase ; 7-CysGly-DHP, intermédiaire *S*-conjugué à la cystéinylglycine ; 7-Cys-DHP, 7-cystéinyldéshydropyrrolizidine ;

7-NAC-DHP, 7-(*N*-acétyl)cystéinyldéshydropyrrolizidine)

Parmi ces trois composés *S*-conjugués au glutathion, l'un d'entre eux (la 7-GSH-DHP) peut aussi se retrouver intégré dans une cascade métabolique subsidiaire : la voie de l'acide mercapturique (Figure 40). Cette dernière initie la dégradation de la molécule tripeptidique qu'est le

glutathion dès que celui-ci est lié au dérivé pyrrolique par un thioéther en C-7. La dislocation structurelle du groupement glutathionyle permet *in fine* la création de deux métabolites déshydropyrrolizidiniques thioconjugués contenant de plus petits substituants soufrés, plus faciles à déplacer jusqu'aux organes excréteurs (89,91,98,99). Nous les avons succinctement abordés plus haut, il s'agit de la cystéine (Cys) et de sa forme *N*-acétylée : la *N*-acétylcystéine (NAC) (Figures 38-D et 38-E) se retrouvant donc respectivement dans la 7-cystéinyldéshydropyrrolizidine (7-Cys-DHP) et la 7-(*N*-acétyl)cystéinyldéshydropyrrolizidine (7-NAC-DHP) (80,89,91,94).

3.1.4. Élimination

Nous avons donc vu que les alcaloïdes pyrrolizidiniques possèdent une forte affinité pour le foie qui, de surcroît, les métabolise majoritairement. L'association de ces deux caractéristiques confère ainsi aux alcaloïdes pyrrolizidiniques une demi-vie d'élimination relativement courte (100).

En premier lieu, les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent être excrétés sans avoir subi la moindre phase de métabolisation, soit au niveau hépatique par la voie biliaire avant d'être expulsés par le biais des fèces, soit au niveau des reins *via* l'urine (79,101,102). Par ailleurs, la filtration glomérulaire représente le mécanisme d'élimination rénal prédominant par rapport à la sécrétion tubulaire. Néanmoins, l'excrétion de ces composés intacts n'est que minoritaire car seuls 3 % des alcaloïdes pyrrolizidiniques absorbés se retrouvent dans la bile et environ 16 % dans l'urine (79).

À vrai dire, ce sont principalement les multitudes de métabolites découlant du métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques (acides néciques, nécines, *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, *N*-glucuronides d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, déshydropyrrolizidines *S*-conjuguées, etc.) qui sont éliminées de l'organisme dans les plus fortes proportions (2,3,80,92,101). Qui plus est toutes structures confondues, deux voies réalisent plus de 90 % de l'élimination des molécules issues du métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques et en l'occurrence, il s'agit de la voie rénale (> 80 %) et de la voie biliaire (> 10 %) (3,102).

En somme, les urines contiennent toute la richesse du métabolisme des alcaloïdes pyrrolizidiniques (nécines, acides néciques, *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, dérivés pyrroliques *S*-conjugués et *N*-glucuronides d'alcaloïdes pyrrolizidiniques) (98,101,103,104). Néanmoins concernant les déshydropyrrolizidines conjuguées, il y en a une dont la présence est formellement attestée mais qui ne provient pourtant pas des réactions de phase II... Il s'agit de la 9-histidyldéshydropyrrolizidine (9-His-DHP) qui, en outre, montre une élimination urinaire persistante bien après l'ingestion d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, et ce, à des concentrations significatives (104) ! Cette caractéristique s'explique par la propriété inhérente qu'ont les

métabolites pyrroliques de posséder des centres électrophiles (en C-7 et en C-9) et d'être ainsi attaqués par des groupes d'atomes nucléophiles — notamment par le biais du noyau imidazole de l'histidine — autres que le groupe thiol du glutathion. *In fine*, les déshydropyrrolizidines se comportent tels des agents alkylants et causent une cytotoxicité généralisée en se fixant aux macromolécules intracellulaires (protéines, ADN, ARNm, etc.). Plus particulièrement, les dérivés pyrroliques forment un nombre considérable d'adduits à l'ADN car ils se lient majoritairement aux bases nucléiques constituées d'une purine (guanine et adénosine), une affinité réactionnelle à l'origine de la toxicité nucléaire des alcaloïdes pyrrolizidiniques (1–3,80,105).

3.2. Toxicodynamie

La toxicité qu'engendrent les alcaloïdes pyrrolizidiniques est donc uniquement due à leurs métabolites pyrroliques ; toutefois, tous les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne sont pas égaux entre eux lorsqu'il est question de nocivité. En effet, la structure chimique joue une fois de plus un rôle prépondérant : un noyau pyrrolique formé par l'atome d'azote et les carbones C-5 à C-8 ne démontre aucune nocivité quelle qu'elle soit ; alors qu'un noyau pyrrolique formé par l'atome d'azote, les carbones C-1 à C-3 et le carbone C-8 est assurément le pourvoyeur des effets délétères sur l'organisme (1–3,80) !

Ainsi, il se dégage une hiérarchie au sein des alcaloïdes pyrrolizidiniques concernant leur réelle dangerosité pharmacologique, hiérarchie dont la gradation se calcule suivant la quantité d'adduits macromoléculaires (pyrroles-protéines) présents dans le sang circulant ou l'organe étudié (81,100). Mais ajoutons que le type d'acide nécique et le degré d'estérification de la nécine ont également une importance capitale dans la gradation des effets délétères (1–3,80,81).

En résumé, les alcaloïdes pyrrolizidiniques à nécine saturée (platynécine, thésinine, rosmarinécine, etc.) ne formant pas le moindre adduit pyrrolique, ils n'ont donc pas de conséquences toxicologiques avérées alors que les alcaloïdes pyrrolizidiniques porteurs d'une nécine 1,2-insaturée sont les véritables sources de toxicité cellulaire :

– les diesters macrocycliques en C₁₂ ou à chaîne ouverte (sénécionine, rétrorsine, usaramine, lasiocarpine, échimidine, échivulgarine...) sont les plus nocifs pour l'organisme (81) ;

– suivis des diesters macrocycliques en C₁₁ (monocrotaline, trichodesmine...) et des alcaloïdes pyrrolizidiniques constitués d'une otonécine (senkirkine, clivorine, florosénine, otosénine...) (80,81) ;

– et puis viennent enfin les monoesters (lycopsamine, héliotrine, intermédine, scorpioïdine, symphytine...) qui forment certes des adduits pyrroliques aux protéines, mais en bien plus faible proportion comparée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques diestérifiés (81).

Précisons que la baisse de toxicité des macrocycles en C₁₂ avec une otonécine par rapport à ceux qui en sont dépourvus est due à la configuration spatiale de cette nécine qui est nettement plus volumineuse suite à l'absence de liaison covalente entre l'atome d'azote et le carbone C-8. Cette caractéristique n'empêche pas la prise en charge des composés otonéciques par les CYP450 mais en diminue tout de même la métabolisation en dérivés pyrroliques, et donc par extension, le futur comportement alkylant de ces molécules électrophiles (80,81).

3.2.1. Hépatotoxicité

La plupart des mécanismes néfastes causés par les alcaloïdes pyrrolizidiniques se concentrent donc au niveau du foie pour la simple raison que c'est cet organe qui réalise majoritairement leur activation métabolique. De plus, les effets toxiques dépendent essentiellement de la dose de composés pyrrolizidiniques administrée ainsi que de la durée d'exposition à ces molécules (1–3,80,106). Grâce à la détermination de ces deux facteurs, les intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent ainsi se classer en trois niveaux distincts : aiguë, subaiguë et chronique (3,80,107).

D'un point de vue séméiologique, ces trois intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques entraînent un syndrome bien particulier : la maladie veino-occlusive hépatique (MVO ou VOD, de l'anglais *Veino-Occlusive Disease*) parfois retrouvée sous le nom de syndrome d'obstruction des sinusoides hépatiques (HSOS, de l'anglais *Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome* et plus rarement SOS) (1,3,80,107–110). Cette affection se caractérise par une évolution variable suivant que l'étiologie est une intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques aiguë, subaiguë ou chronique. Quoiqu'il en soit, la MVO se manifeste par un ensemble de signes cliniques typiques qui sont une hépatomégalie, des ascites, une distension abdominale et généralement un ictère ; parfois même ces signes physiques spécifiques s'accompagnent de divers symptômes quant à eux moins évocateurs comme des vomissements et des diarrhées sanglantes (3,80,107–111).

Précisons que les maladies veino-occlusives recensées dans les pays occidentaux (Europe, États-Unis d'Amérique, Australie, Nouvelle-Zélande...) sont en grande partie dues aux

transplantations de moelle osseuse (lignées cellulaires hématopoïétiques) ou aux traitements anticancéreux contenant de l'oxaliplatine. Cependant, les cas d'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques sont en nette recrudescence ces dernières années, que ce soit dans ces pays occidentaux, les pays en voie de développement sans contrôle sanitaire efficace des récoltes céréalières (Afghanistan, Irak, Tadjikistan, Éthiopie...) ou bien encore dans les provinces de Chine continentale, notamment à cause des nombreuses plantes autochtones contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques utilisées dans la médecine traditionnelle locale (108–110).

✱ Lors d'une intoxication aiguë, la MVO est si intense qu'elle engendre rapidement une nécrose tissulaire hémorragique puis une insuffisance hépatique pouvant alors entraîner le décès ! Mais précisons qu'heureusement l'intoxication aiguë aux alcaloïdes pyrrolizidiniques est extrêmement rare et qu'elle se retrouve presque exclusivement chez les nouveaux-nés et les nourrissons du fait de leur stock de glutathion détoxifiant et protecteur bien plus faible que celui des adultes ou des enfants (3,80,108). Du moins, cela était effectivement le cas avant le récent essor de l'automédication phytothérapeutique et l'engouement que celle-ci suscite auprès des populations de tous pays (cf. Partie 4.)...

✱ Les MVO subaiguës se diagnostiquent par la persistance de l'hépatomégalie, des ascites récurrentes et par le biais d'une biopsie hépatique dont l'histologie est caractéristique (80,111). En effet, à la différence de la MVO aiguë, la forme subaiguë présente *stricto sensu* une obstruction des veines hépatiques résultant d'une prolifération endothéliale. Plus précisément, cette multiplication anarchique cellulaire touche en premier lieu les endothéliums sinusoïdaux des acini hépatiques avant d'être détectée au niveau des cellules endothéliales des voies biliaires (Annexe VII) ; quoiqu'il en soit, les cellules endothéliales excédentaires se décollent et créent *in fine* des lésions sinusoïdales puis la dysfonction des cellules parenchymateuses (3,80,108–110).

✱ Une exposition prolongée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques conjuguée à ces mécanismes pernicieux conduit finalement à une MVO chronique. Tout d'abord, la congestion intrahépatique se propage à l'endothélium des veines centrolobulaires, où l'obstruction est telle que les cellules endothéliales deviennent nécrotiques. Suite à la dégradation de l'intégrité de l'intima des veines et des veinules hépatiques, une infiltration de leurs parois a lieu causant des œdèmes et une hypertension portale. La conjonction de tous ces phénomènes mène à l'extension de la nécrose dont l'inflammation locale entraîne, elle, une fibrose allant jusqu'à évoluer — au bout d'une exposition suffisamment longue aux alcaloïdes pyrrolizidiniques — en cirrhose ou en cancers hépatiques (1,3,80,107–109) ! Là encore, le stade développemental ultime de ce genre de maladie veino-occlusive est la mort par insuffisance hépatique (3).

D'un point de vue analytique à présent, une intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques conduit à la perturbation de plusieurs paramètres biochimiques (Tableau III) (109,112). Au niveau enzymatique, les concentrations sériques des alanine-aminotransférases (ALAT), des aspartate-aminotransférases (ASAT), des γ -glutamyltransférases (γ -GT) et des phosphatases alcalines (PAL) sont toutes augmentées (Tableau III) (109,112). Toutefois, ces élévations plasmatiques ne signifient pas pour autant une origine physiopathologique commune !

À vrai dire, les augmentations conjointes des PAL et des γ -GT sont plutôt évocatrices d'une forme cholestatique durant laquelle se retrouvent également une élévation de la bilirubine totale et l'apparition de la bilirubine conjuguée dans la circulation sanguine (Tableau III) (109,112). Pour rappel, la cholestase est la diminution voire l'interruption de la sécrétion biliaire par le foie, signifiant donc seulement une altération fonctionnelle du tissu hépatique mais qui peut néanmoins être accompagnée d'une augmentation légère à modérée des deux types de transaminases (ASAT et ALAT) (Tableau III).

Concernant les transaminases, leurs augmentations sont toutes deux caractéristiques d'une forme cytolitique sans pour autant provenir du même lysat. Les ALAT se trouvent normalement dans le milieu cytoplasmique tandis que les ASAT sont circonscrites au niveau mitochondrial. Ainsi, l'élévation de la concentration sérique des ALAT est clairement synonyme d'une lyse cellulaire — précisément celle des hépatocytes — là où l'élévation de la concentration sérique des ASAT représente, quant à elle, la lyse des mitochondries hépatocytaires (Tableau III) ! En d'autres termes, la proportion d'ASAT par rapport à celle d'ALAT permet d'avoir un léger aperçu de l'intensité des dégâts subis par les hépatocytes suite à une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. Dans un premier temps, les mitochondries se lysent puis, si les dommages cellulaires sont trop importants, c'est au tour de la cellule d'entrer dans un processus de lyse.

En somme, suivant le degré d'empoisonnement aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, il peut uniquement y avoir une atteinte fonctionnelle des hépatocytes (cholestase) ou additionnellement une cytolyse hépatique, elle-même plus ou moins délétère : soit se cantonnant à quelques cellules, soit irradiant une grande partie du sinusoïde hépatique...

Lorsque l'intensité de l'intoxication aux alcaloïdes est telle qu'elle engendre une cytolyse hépatocyttaire généralisée, cela atteint les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (HSEC, de l'anglais *Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells*) et perturbe leurs rôles histologique et fonctionnel (cf. Section 3.2.1.a). Ici cependant, nous ne nous attarderons que sur leur implication dans la coagulation, tout simplement parce que les altérations subies par l'endothélium sinusoidal sont la source du syndrome d'obstruction sinusoidal (87).

Paramètres biologiques	Valeurs usuelles	Exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques		
	Congestion sinusoidale (en %)			
	0	24,3	35,1	58,8
	Taux de survie (en %)			
	/	100	86	67
<i>Enzymologie</i>				
ALAT (en UI/L)	< 45	29	46	127
ASAT (en UI/L)	< 35	47	73	105
γ-GT (en UI/L)	< 55	186	92	87
<i>Biochimie</i>				
Bilirubine totale (en μmol/L)	< 17,0	19,2	36,9	56,8
Bilirubine conjuguée (en μmol/L)	0	11,7	22,2	33,8
<i>Hématologie</i>				
Thrombocytes (en 10 ⁹ /L)	∈ [150 ; 450]	121	97	75
Temps de Quick (en s)	∈ [11,0 ; 13,0]	12,7	14,5	18,1
Fibrinogène (en g/L)	∈ [2,0 ; 4,0]	2,6	2,2	1,2

Tableau III : Évolution de certaines valeurs biologiques en cas de syndrome d'obstruction sinusoidale suite à une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques

(ALAT, alanine-aminotransférase ; ASAT, aspartate-aminotransférase ;

γ-GT, γ-glutamyltransférase ; Vert, valeur normale ; Jaune, valeur légèrement anormale ;

Orange, valeur modérément anormale ; Rouge, valeur fortement anormale ; Violet, valeur excessivement anormale) [D'après (112)]

En effet lors de la MVO, les HSEC relarguent abondamment des facteurs prothrombotiques et enclenchent *de facto* la cascade de coagulation ; c'est donc tout logiquement que l'on relève durant cette pathologie une diminution du fibrinogène circulant, un allongement du temps de Quick ainsi qu'une thrombopénie, tous corrélés au taux d'obstruction sinusoidal observé (Tableau III) (109,112).

Les MVO reposent donc sur une somme de mécanismes néfastes induits par l'addition électrophile des métabolites pyrroliques aux protéines (3). Qui plus est, le degré de toxicité des métabolites pyrroliques dépend essentiellement de la structure originelle de l'alcaloïde pyrrolizidinique car l'addition électrophile aux macromolécules, qu'elles soient protéiques ou nucléiques, est permise si et seulement si l'alcaloïde pyrrolizidinique contient *a minima* un cycle monoestérifié — effectivement, rappelons que les nécines seules sont rapidement excrétées par les organes rénaux — (1,80).

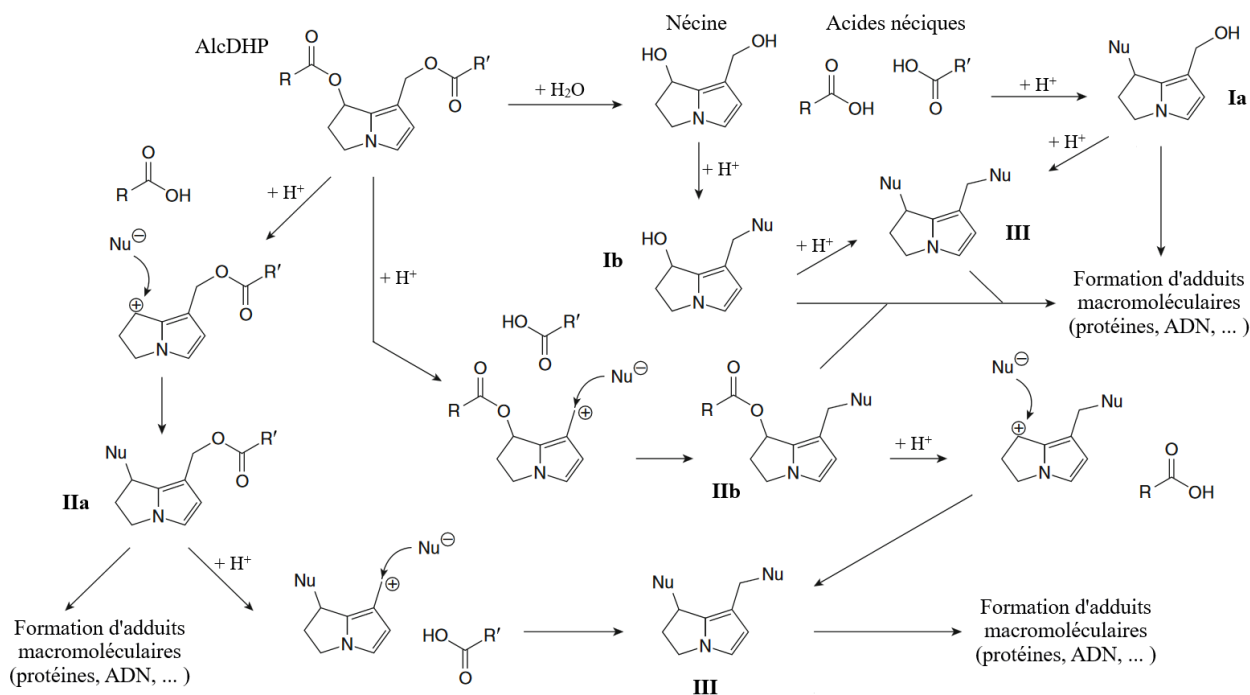


Figure 41 : Mécanismes d'additions électrophiles des métabolites pyrroliques

(AlcDHP, alcaloïde déshydropyrrolizidinique ; **Ia**, adduit pyrrolique en C-7 ; **Ib**, adduit pyrrolique en C-9 ; **IIa**, adduit pyrrolique en C-7 et monoestérifié en C-9 ; **IIb**, adduit pyrrolique en C-9 et monoestérifié en C-7 ; **III**, adduit pyrrolique en C-7 et C-9)

Précisons que la formation d'adduits pyrroliques macromoléculaires passe par un intermédiaire ionisé positivement en C-7 ou en C-9, autrement dit un ion carbonium à la réactivité largement exacerbée (Figures 41 et 42). Cependant, il existe une nette prédominance concernant la

régiosélectivité de la première addition électrophile car cette dernière se déroule majoritairement sur le carbone C-7, à condition que celui-ci soit impliqué dans une fonction ester (Figure 42) (80,106).

L'hétéroatome électrophile (azote, soufre, oxygène, phosphore...) — par ailleurs compris au sein d'une structure protéique — est en capacité d'attaquer la déshydropyrrolizidine grâce à l'existence d'un système conjugué au cœur du cycle pyrrolique. Le phénomène de déplacement électronique débute par la délocalisation des électrons du doublet non liant de l'azote, favorisée par un important effet inductif attracteur, forçant dès lors les électrons π du pyrrole à faire de même (Figure 42-I) (106).

Le mésomère obtenu perd immédiatement l'acide nécique estérifié en C-7 favorisant ainsi l'attaque du doublet libre de l'hétéroatome (Figure 42). Suite à cette addition électrophile, les électrons π se délocalisent à nouveau et reviennent sur leurs orbitales initiales à l'instar des électrons du doublet non liant de l'azote (Figure 42) (106).

Malgré la formation d'un premier adduit, la mésomérie inhérente au pyrrole demeure et peut, suivant le même principe, aboutir à une seconde addition électrophile. Ainsi, l'hydrolyse de deux fonctions esters permet aux dérivés pyrroliques qui en possèdent de se comporter comme des agents alkylants bifonctionnels et donc d'avoir une toxicité nettement supérieure à ceux n'ayant qu'un seul ester dans leur squelette (Figures 41 et 42-II) (1,106) !

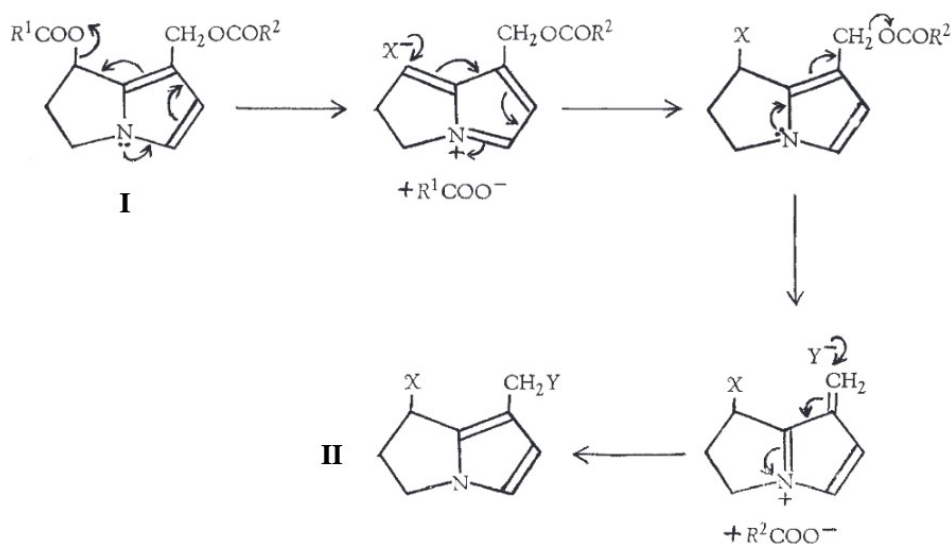


Figure 42 : Mécanisme réactionnel intramoléculaire des alcaloïdes déshydropyrrolizidiniques diestérifiés

(I, alcaloïde déshydropyrrolizidinique diestérifié ; II, adduit pyrrolique bifonctionnel ; R¹/R², radical d'acide nécique quelconque ; X/Y, hétéroatome nucléophile quelconque) [D'après (106)]

3.2.1.a). Mécanismes cytotoxiques

La cytotoxicité des adduits pyrroliques provient de deux mécanismes généraux à la fois distincts et complémentaires car ils conduisent *in fine* tous deux à la destruction de la cellule (107).

Le premier est dû à la modification de la configuration spatiale des protéines consécutivement à leur liaison aux métabolites pyrroliques ; ce changement de conformation empêche les protéines de se lier correctement à leurs récepteurs cellulaires et entraîne alors une déficience des cascades métaboliques ou fonctionnelles dans lesquelles celles-ci sont impliquées (107).

Le second découle aussi de l'addition des pyrroles aux protéines mais passe par une activation du système immunitaire. En effet, les chaînes peptidiques chimériques (pyrroles-acides aminés) ne sont plus reconnues par l'organisme et peuvent alors jouer le rôle d'haptènes si leur poids moléculaire est relativement faible. La prise en charge de ces nouveaux antigènes par les cellules de l'immunité innée déclenche les voies de signalisations immunologiques. Dans un premier temps, les cellules immunitaires enclenchent la production *de novo* d'anticorps spécifiques et de cytokines, puis dans un second temps, ce déluge de médiateurs chimiques facilite l'installation d'un état inflammatoire local, terreau de la fibrose ultérieure (107).

Additionnellement, la détoxification par le glutathion permet de saper les effets néfastes des métabolites pyrroliques mais une surconsommation de ce tripeptide annihile toutes les réserves cellulaires et engendre par la suite un stress oxydatif intensifiant un peu plus la vitesse de mise en place des cascades apoptotiques (87,107).

Les mécanismes cytotoxiques interfèrent ainsi avec de nombreux aspects de la biologie cellulaire mais ce sont assurément les mitochondries qui se trouvent être les clés de voûte du déroulement de la toxicité cytosolique des alcaloïdes pyrrolizidiniques et des pyrroles métaboliques. Effectivement, ces organites étant les centres de production de l'ATP, la molécule énergétique ubiquitaire, les mitochondries sont les intermédiaires d'une multitude de voies fonctionnelles pour la cellule. La moindre défaillance de ces organites indispensables entraîne donc nécessairement la perturbation des homéostasies métabolique et biochimique intracellulaires et dont la conséquence fatidique est la lyse de la cellule touchée. Rappelons que le déclenchement de l'apoptose repose sur deux voies différentes : la voie extrinsèque avec des récepteurs membranaires spécifiques, dits récepteurs de mort, et la voie intrinsèque qui sollicite les mitochondries, d'où son autre nom : la voie mitochondriale (77,87).

Malgré le fait que les mécanismes cytotoxiques causés par les alcaloïdes pyrrolizidiniques et leurs dérivés pyrroliques s'enchevêtrent dans un foisonnement de voies de signalisations fonctionnelles, il semble que la déplétion en glutathion intracellulaire soit le socle d'amorce de tous les futurs dérèglements que rencontrera la cellule (87,113). Le manque de glutathion exacerbe la production d'espèce réactives de l'oxygène (ROS, de l'anglais *Reactive Oxygen Species*) qui altèrent l'intégrité structurale des molécules intracellulaires (lipides, protéines, ADN...), provoquant des dégâts irrémédiables à la cellule (113,114).

L'augmentation de la concentration cytosolique des ROS ainsi que les dommages subis par les phospholipides mitochondriaux occasionnent une baisse du potentiel électrochimique membranaire des mitochondries (113). Or, la baisse du potentiel membranaire mitochondrial est l'un des premiers paramètres qui permet d'initier les médiateurs de la cascade apoptotique intrinsèque (114)... De surcroît, le dysfonctionnement de la membrane phospholipidique de ces organites dérègle leur activité métabolique intensifiant un peu plus la formation de ROS au sein de la cellule (87,113) !

Les signaux pro-apoptotiques induits par les alcaloïdes pyrrolizidiniques entraînent donc l'intervention de la famille protéique du BCL-2 (de l'anglais *B Cell Lymphoma-2*), dont les membres sont spécifiquement impliqués dans l'apoptose (Figure 43) (87,115,116). Et en l'occurrence, les stimuli nocifs oxydatifs activent en premier lieu les protéines seulement constituées du domaine homologue BH3, comme BID (de l'anglais *BH3 Interacting-Domain death agonist*). Puis le reste de la cascade apoptotique intrinsèque se déroule et mène *in fine* à l'activation par phosphorylation de la caspase 9 qui fait par ailleurs partie des caspases dites initiatrices (87,114–118).

Une fois phosphorylée, la caspase 9 recrute ensuite les principales caspases exécutrices : la caspase 3 et la caspase 7 (Figure 43) (87,114–120). L'activation des caspases 3 et 7 enclenche la phase finale de l'apoptose *via* le clivage de nombreux substrats, notamment celui de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) responsable de la réparation des dommages subis par l'ADN ou encore celui de la CAD (de l'anglais *Caspase-Activated Dnase*) qui, quant à elle, le fragmente et provoque additionnellement la condensation de la chromatine (114,116,118–120).

Là encore, les composés les plus néfastes pour la cellule, de par leur forte activation de la voie apoptotique intrinsèque, sont les diesters à chaîne ouverte (échimidine, lasiocarpine, héliosupine, etc.) ou macrocycliques en C₁₂ (sénécionine, sénéciphylline, etc.), à l'exception de ceux constitués d'un cycle otonécique (senkirkine...) dont la cytotoxicité est moins exacerbée que pour les autres alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques (119,120).

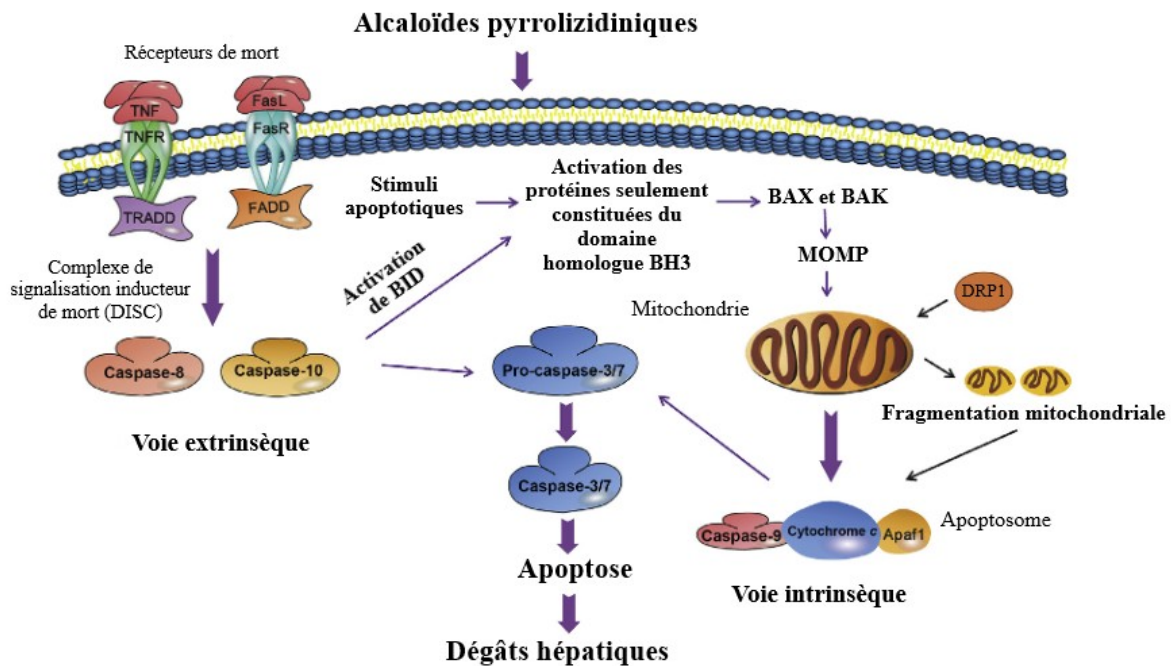


Figure 43 : Voies de l'apoptose

(TNF, facteur de nécrose tumorale ; TNFR, récepteur du TNF ; TRADD, protéine au domaine de mort associée au récepteur du TNF ; FasL, ligand de Fas ; FasR, récepteur Fas ; FADD, protéine au domaine de mort associée au récepteur Fas ; BID, agoniste de mort au domaine interactif BH3 ; BAX, protéine BCL-2 associée à X ; BAK, protéine tueuse BCL-2 antagoniste ; MOMP, perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ; DRP1, protéine liée à la dynamine 1 ; APAF1, facteur 1 d'activation de la peptidase apoptotique) [D'après (87)]

Mais certains substrats des caspases 3 et 7 n'ont pas un rôle à visée nucléaire mais structurelle comme la fodrine et la gelsoline, des protéines cytosoliques impliquées dans la modulation du cytosquelette. Le clivage de ces dernières par les caspases exécutrices engendre la fragmentation des filaments d'actine (actine F) en de plus petits polymères voire en de simples monomères d'actine G ! *In fine*, la modification de l'architecture du cytosquelette est telle que la cellule se disloque en plusieurs fragments cellulaires appelés corps apoptotiques avant d'être phagocytés puis dégradés (116,119).

Cependant si la dépolymérisation de l'actine F touche les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques, leur morphologie se voit être grandement altérée (incurvation cellulaire concave) de sorte que l'espace de Disse — le milieu extracellulaire entre les HSEC et les hépatocytes (Annexe VII) — entre en contact direct avec les cellules sanguines ! De plus, la dépolymérisation des filaments d'actine au sein des HSEC cause le relargage par ces cellules de métalloprotéases matricielles (MMP, de l'anglais *Matrix MetalloPeptidases*), précisément la

MMP-2 et la MMP-9, qui participent activement à la destruction de la matrice extracellulaire de l'espace de Disse et accroissent un peu plus la vitesse d'apparition de l'HSOS (87,107,110,121)...

Toujours au niveau des sinusoides hépatiques exposés aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, les monocytes circulants et les cellules endothéliales (HSEC) relâchent des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α , de l'anglais *Tumor Necrosis Factor α*) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) ; mais aussi des médiateurs propices à l'installation de la MVO : l'endothéline 1 (ET-1) aux propriétés vasoconstrictrices et des facteurs de la coagulation comme le facteur de von Willebrand (FvW), l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1, de l'anglais *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) et la thrombomoduline (TM) (Figure 44) (87,122,123).

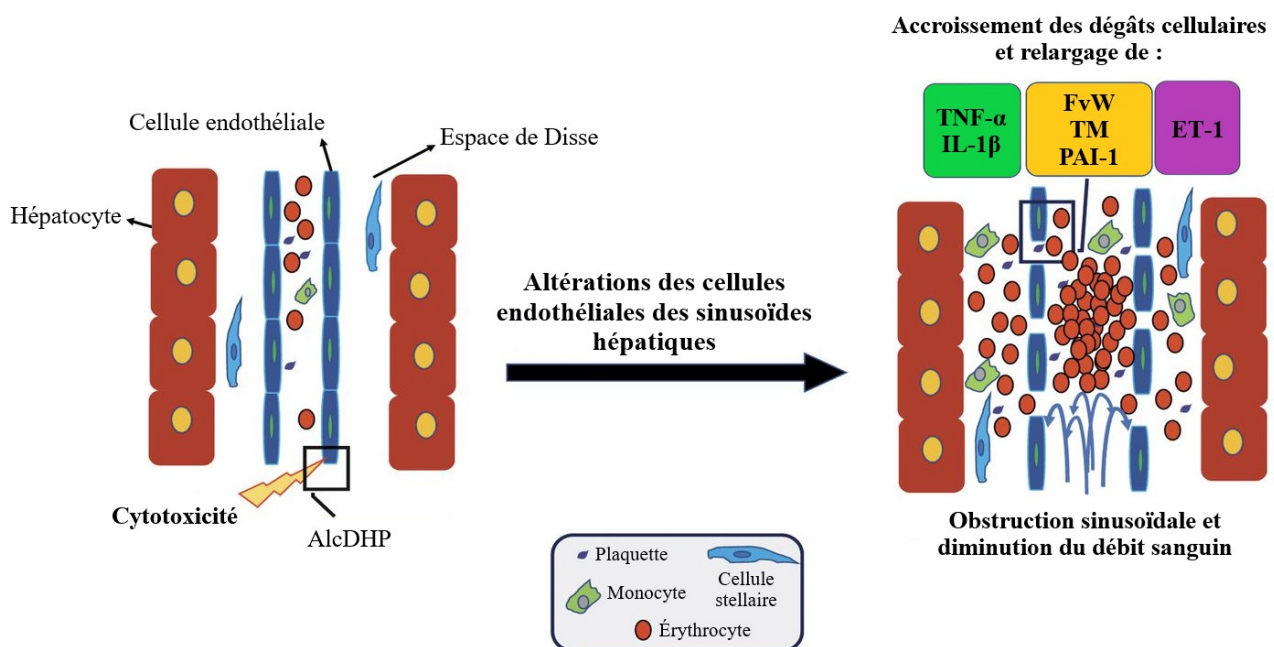


Figure 44 : Mécanismes de l'obstruction sinusoidale

(AlcDHP, alcaloïde déshydropyrrolizidinique ; TNF- α , facteur de nécrose tumorale α ; IL-1 β , interleukine-1 β ; FvW, facteur de von Willebrand ; TM, thrombomoduline ; PAI-1, inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène ; ET-1, endothéline 1 ; **Cadre à fond vert**, médiateurs inflammatoires ; **Cadre à fond jaune**, médiateurs thrombotiques ; **Cadre à fond violet**, médiateur vasoconstricteur) [D'après (123)]

L'orage cytokinique obtenu crée une inflammation locale et sollicite donc les cellules de l'immunité innée, notamment les lymphocytes T cytotoxiques (LT-CD8) dont l'activité de lyse

cellulaire peut emprunter la voie apoptotique extrinsèque, préalablement amorcée par le TNF- α . En effet lorsqu'il se lie à son récepteur, le TNF- α engendre la mise en place du complexe de signalisation inducteur de mort (DISC, de l'anglais *Death-Inducing Signaling Complex*) activant à son tour les caspases 8 et 10 qui, quant à elles, sollicitent les caspases exécutrices (caspases 3 et 7) (Figure 43) (116,119,120).

En somme, la cytotoxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques conduit les cellules à un unique destin : l'apoptose. Mais cela n'est pas aussi simple car si une trop grande quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques est initialement présente, alors le processus de suicide programmé est très vite dépassé, de sorte que l'inflammation locale s'emballe pour devenir prédominante et ainsi causer la lyse incontrôlée d'un trop grand nombre de cellules : c'est la nécrose (116) ! Et malheureusement, le rejet du contenu cytoplasmique des cellules nécrotiques ne fait qu'entretenir le contexte inflammatoire délétère...

3.2.1.b). Mécanismes génotoxiques

La majeure partie des effets toxiques provoqués par les alcaloïdes pyrrolizidiniques se font par l'intermédiaire de leurs métabolites pyrroliques qui affectionnent particulièrement les molécules constituées de sites nucléophiles. Au sein de la cellule, la principale structure moléculaire affectée par ces composés est l'ADN lui-même (1-3) ! Néanmoins, ces adduits aux bases nucléiques ne s'effectuent que sur les deux bases puriques : l'adénine et la guanine (89,124-126).

Concernant la formation de l'addition électrophile entre l'adénine et les DHP, elle a toujours lieu *via* le carbone C-7 ou C-9 de la DHP et cible uniquement l'azote du groupe amine primaire porté par le carbone C-6 du cycle purique, tandis que pour la guanine, c'est l'azote de l'amine primaire lié au carbone C-2 de la purine qui subit l'addition électrophile (89,124-126). Au vu des différentes configurations spatiales que peuvent présenter les atomes impliqués dans ce mécanisme additionnel, il peut y avoir quatre diastéréoisomères pour chaque base nucléique concernée par ce phénomène. Cette caractéristique n'influe pas la future toxicité de ces adduits nucléiques mais il est intéressant de noter qu'une prédominance diastéréoisomérique peut exister et dépend essentiellement de la structure originelle de l'alcaloïde pyrrolizidinique car celui-ci n'aura été métabolisé qu'en certains dérivés déshydropyrrolizidiniques (124,125).

Les adduits aux bases puriques sont les tout premiers dommages que subit l'ADN quel que soit l'édifice inhérent à la déshydropyrrolizidine (monohydroxylée, polyhydroxylées, estérifiée...); toutefois, le fait que le métabolite pyrrolique découle d'un diester exacerbe son caractère génotoxique! Cette spécificité s'explique par le fait que seul l'un des deux carbones est lié à l'adénine ou à la guanine, or la présence d'un second groupe fonctionnel (ester ou hydroxyle) octroie au dérivé pyrrolique la possibilité de réaliser une addition électrophile supplémentaire (Figure 41), ce qui conduit donc par la suite à des dégâts génétiques plus conséquents (127,128).

Les lésions causées par les déshydropyrrolizidines se classent ainsi en plusieurs types : adduits pyrroliques, pontages ADN-protéines, pontages inter- et intrabrin. Cependant, certains métabolites déshydropyrrolizidiniques bifonctionnels s'avèrent plus nocifs car ils entraînent également une synthèse de l'ADN inopinée, et ce, avant que ce dernier ne soit pris en charge par les systèmes de réparation génétique cellulaires (127).

Autre fait intéressant, les effets toxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques demeurent même à l'arrêt d'une ingestion chronique. Effectivement, leurs métabolites pyrroliques persistent dans l'organisme par le biais d'adduits durant une longue période, entre trois et dix semaines suivant les organes (129). Cette persistance maintient l'inflammation locale de la matrice extracellulaire favorisant ainsi le développement d'une fibrose *via* la prolifération des tissus conjonctifs mais promeut également l'apparition de cellules tumorales (notamment sous la forme d'un angiosarcome) (94).

3.2.1.c). Toxicité biliaire

De par sa grande interaction avec le tissu hépatique, le métabolisme biliaire est l'une des principales cibles secondaires affectées par la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. *A priori*, les effets des alcaloïdes pyrrolizidiniques sur le cycle entérohépatique et l'homéostasie des acides biliaires paraissent antagonistes car ils augmentent les taux plasmatiques des acides biliaires, toutes structures confondues (sels biliaires primaires et secondaires), tout en diminuant la production des protéines (enzymes, transporteurs, etc.) impliquées dans le métabolisme desdits acides biliaires (130–134).

En réalité, la compromission de l'homéostasie biliaire résulte de plusieurs mécanismes aux temporalités très différentes mais qui prennent tous place au cœur des sinusoides hépatiques. Qui plus est, précisons que la conséquence finale de ces effets dysfonctionnels est la cholestase évoquée précédemment (130,132).

Il apparaît que l'élément déclencheur de toutes les futures perturbations de ce cycle métabolique est l'arrêt de la sécrétion lumenale des sels biliaires par l'hépatocyte entraînant alors l'accumulation de ces molécules au sein de son cytosol (131–133). Malheureusement, cette surcharge intracellulaire en acides biliaires est très toxique et favorise voire entretient la cytotoxicité générée par les alcaloïdes pyrrolizidiniques (stress oxydatif, apoptose, inflammation, etc.) ! Concomitamment, l'excès d'acides biliaires cytosoliques force les hépatocytes à en relâcher une grande partie dans le milieu extracellulaire (130–133).

Néanmoins durant la phase d'adaptation sécrétoire, l'apoptose de nombreux hépatocytes se poursuit (161,162)... Associée au décollement des cellules endothéliales des sinusoides hépatiques, elle réduit drastiquement le maillage des jonctions serrées et ainsi le rôle de séparation histologique que celles-ci jouent. Autrement dit, les constituants du milieu extracellulaire de l'espace de Disse passent plus facilement dans la circulation sanguine suite à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (130–132). La conséquence directe n'est donc ni plus ni moins que l'élévation des concentrations sériques des acides biliaires, qu'ils soient libres ou conjugués à la glycine ou à la taurine ; or cela représente un réel problème pour l'organisme tout entier du fait du fort pouvoir détergent des sels biliaires (130,134) !

3.2.2. Toxicités secondaires

Les effets toxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques ne se cantonnent pas uniquement au foie mais irradiant l'ensemble de l'organisme (3). Cette distribution généralisée de la toxicité s'explique par la conjoncture synergique de deux facteurs : d'une part, certains alcaloïdes pyrrolizidiniques présentent un tropisme non dissimulé pour d'autres organes, et d'autre part, l'atteinte hépatique engendre de nombreuses altérations physiologiques affaiblissant *de facto* le bon fonctionnement du reste de l'organisme...

3.2.2.a). Entérotoxicité

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques possèdent une certaine entérotoxicité en entraînant des dérèglements non seulement structurels mais aussi fonctionnels de la muqueuse intestinale. Pour exercer cette toxicité, les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont besoin d'être métaboliquement activés par les cytochromes hépatiques. C'est en étant ensuite évacués par le canal cholédoque, en suivant donc le cycle entérohépatique des sels biliaires, que les métabolites révèlent leurs effets entérotoxiques (135).

D'un point de vue histologique, ces dérivés modifient l'aspect de l'épithélium, constitué en grande majorité d'entérocytes, ainsi que celui des cellules stromales, enfouies plus profondément dans le tissu entérique. En premier lieu, les cellules épithéliales intestinales perdent tout ou partie de leur cohésion suite à la diminution du nombre de leurs jonctions serrées (135). Il en résulte une infiltration légère à modérée des constituants de la lumière intestinale dans le tissu matriciel entérique sur laquelle nous reviendrons plus en détail (Figure 45).

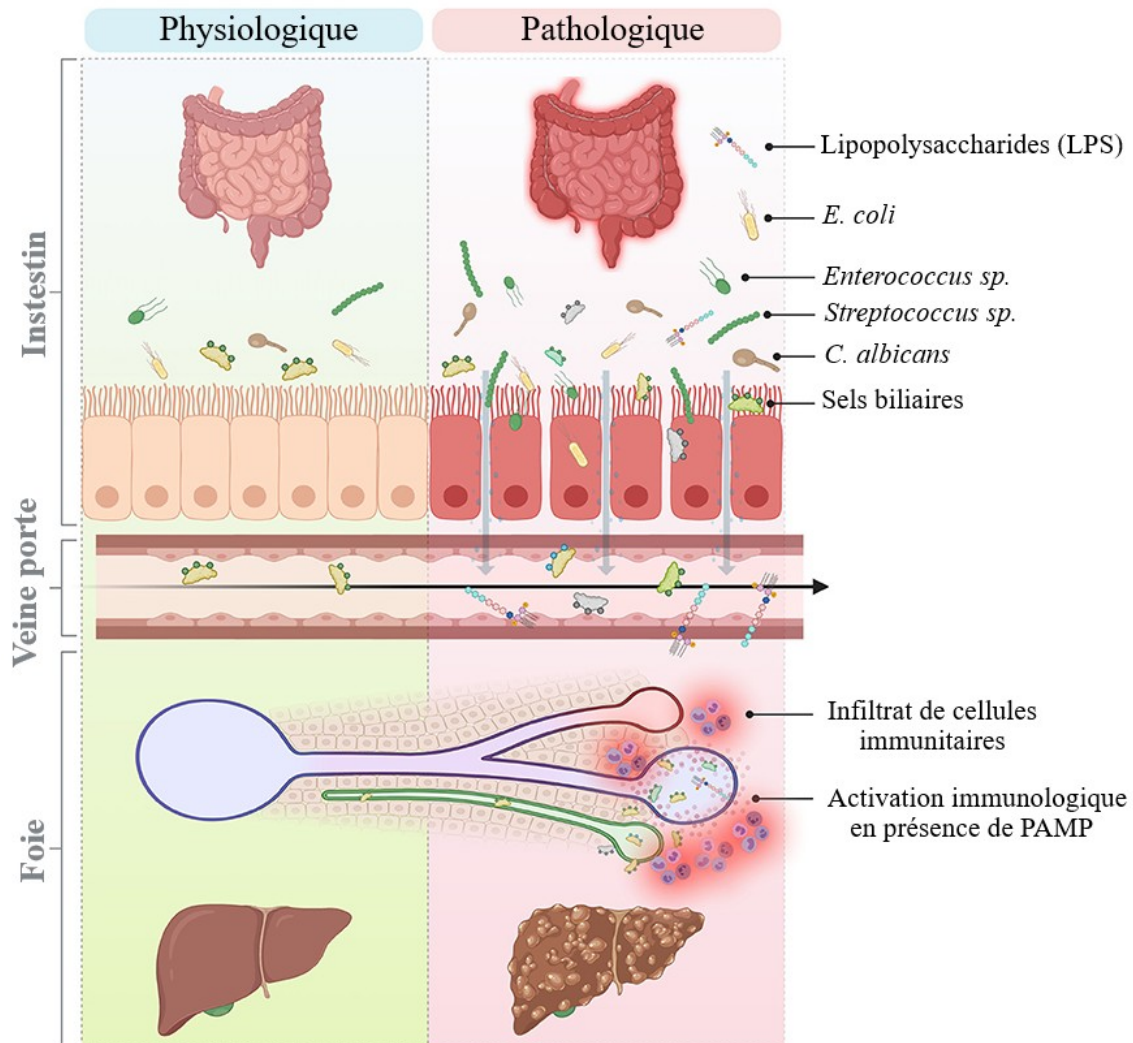


Figure 45 : Axe entérohépatique et relations immunologiques (PAMP, motif moléculaire associé aux pathogènes) [D'après (136)]

Quant aux cellules stromales, aussi dites cellules de soutien, elles se rétractent de sorte à ce qu'elles distordent les cryptes de Lieberkühn, les rendant *de facto* bien moins efficaces... Toujours concernant la morphologie générale de la muqueuse intestinale, une exposition chronique aux alcaloïdes pyrrolizidiniques dégrade les villosités entériques en les raccourcissant, d'une part, et en érodant la bordure en brosse des entérocytes, d'autre part (135). Au final, la dégradation des

villosités provoque une réduction significative de la superficie intestinale et donc une capacité d'absorption amoindrie.

Néanmoins, la véritable entérotoxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques naît de l'augmentation de la perméabilité épithéliale qui favorise l'entrée dans l'organisme de composés bactériens normalement circonscrits au niveau du mucus intestinal (Figure 45). Les molécules incriminées sont les lipopolysaccharides (LPS), des endotoxines naturellement produites par les bactéries à Gram négatif dont elles tapissent la membrane externe. L'infiltrat de LPS enclenche une réaction immunitaire car ces composés sont reconnus par les cellules de l'immunité innée comme étant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, de l'anglais *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (135,136).

Dans le foie, les cellules appartenant à ce système sont les cellules de Kupffer dont le rôle principal est de capter les pathogènes et les toxines ayant franchi la barrière entérique puis transité par la veine porte, à l'instar des LPS. La reconnaissance des LPS prend essentiellement place au sein des sinusoides hépatiques même si elle demeure tout à fait possible au niveau intestinal. Dans les deux cas, les LPS se lient spécifiquement au récepteur 4 de type Toll (TLR4, de l'anglais *Toll-Like Receptor 4*), un récepteur membranaire uniquement exprimé par les cellules du système phagocytaire mononucléé ou système réticulo-endothélial (135,136).

Une fois liées aux LPS, les cellules de Kupffer déclenchent une réaction immunitaire localisée grâce au relargage de nombreuses chimiokines ; or rappelons-nous qu'il y a déjà de nombreux acteurs immunologiques activés dans les sinusoides hépatiques suite aux effets cytotoxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Figure 45) (136)... L'inflammation pré-existante s'accroît donc davantage et devient vite incontrôlable au point de faciliter le développement d'une fibrose, d'aggraver l'obstruction sinusoidale et de favoriser l'apparition de cellules tumorales (Annexe VIII) (135).

En somme, les effets entérotoxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques ont, certes un impact direct sur le bon fonctionnement des tissus intestinaux, mais c'est bel et bien le foie qui s'avère finalement être l'organe le plus touché.

3.2.2.b). Pneumotoxicité

Les déshydropyrrolizidines générées par le tissu hépatique ne peuvent former des adduits toxiques qu'en son seul sein. Toutefois, une fraction d'entre elles diffuse assurément jusqu'au système sanguin puis circule dans le reste de l'organisme (103).

Ainsi, lorsque les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les DHP atteignent les poumons, une physiopathologie relativement similaire à celle du syndrome d'obstruction sinusoidale se met en place. Arrivés au niveau des artérioles pulmonaires, les métabolites pyrroliques altèrent la structure des cellules endothéliales de façon à diminuer leur fonction de barrière histologique mais exacerbent aussi le relargage des médiateurs au rôle inflammatoire, thrombotique ou vasoconstricteur (3,108).

Les conséquences sont donc identiques à celles que subissent les sinusoides hépatiques, il faut simplement les transposer aux poumons ; autrement dit : il y a une formation de thrombi dans les capillaires pulmonaires et une infiltration cellulaire dans la matrice parenchymateuse. D'une part, l'occlusion peut aller jusqu'à entraîner une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), si la diminution du débit sanguin est suffisamment importante ; et d'autre part, l'infiltrat cellulaire se composant en très grande majorité de cellules immunitaires, une inflammation locale se développe et s'entretient naturellement. Qui plus est, durant une exposition prolongée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et à leurs dérivés, leur pneumotoxicité continue de s'accroître. L'HTAP conduit *in fine* à une insuffisance ventriculaire droite, tandis que l'état inflammatoire favorise la collagénisation du parenchyme et donc la progression de la fibrose pulmonaire (3) !

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques les plus nocifs pour les poumons sont encore les diesters mais à des degrés différents. En effet, les diesters à chaîne ouverte (lasiocarpine, échimidine, etc.) sont plus rapidement métabolisés par le foie et donc exercent leur toxicité prioritairement sur les hépatocytes, alors que les diesters macrocycliques (monocrotaline, senkirkine, sénécionine...) mettent plus de temps à être dégradés et ont donc le temps nécessaire pour atteindre d'autres organes *via* la circulation sanguine. C'est pourquoi l'on relève, pour la plupart des alcaloïdes pyrrolizidiniques, une pneumotoxicité inversement proportionnelle à la vitesse du métabolisme par les CYP450 hépatiques (137).

Fait intéressant, l'âge est un facteur d'une importance capitale, en particulier selon que l'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques concerne un adulte ou un enfant. L'effet de l'âge sur la pneumotoxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques s'explique par le plus faible métabolisme

hépatique des enfants comparé à celui des personnes adultes. Chez les enfants, il y a *de facto* moins de dérivés pyrroliques produits à la fois, épuisant ainsi très peu voire pas du tout les réserves intracellulaires de glutathion. Or sans déplétion de glutathion, il n'y a qu'une hépatotoxicité mineure et aucunes prémices de MVO. Toutefois, le côté pernicieux et inévitable de cette faible prise en charge hépatique est alors la mise en place d'une pneumotoxicité à la progression fulgurante... Par conséquent, les enfants chroniquement exposés aux alcaloïdes pyrrolizidiniques ne développent pas en premier lieu une MVO, caractéristique d'un empoisonnement aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, mais bel et bien une HTAP (108) !

3.2.2.c). Néphrotoxicité

Les effets néphrotoxiques accentuent eux aussi la toxicité retrouvée dans un autre organe, sauf que ce n'est plus le foie qui est désormais visé mais les poumons (138–140).

Tout d'abord, souvenons-nous que les alcaloïdes pyrrolizidiniques hydrophiles sont principalement excrétés par les néphrons et précisons que les déshydropyrrolizidines thioconjuguées peuvent être dégradées par les enzymes rénales de la voie des mercapturates, en particulier les β -lyases, et ainsi former des dérivés néphrotoxiques. Quand on additionne cela avec le drainage continu du sang qu'effectuent les cellules rénales, on en vient très vite à réaliser que les reins sont finalement le deuxième organe le plus exposé aux alcaloïdes pyrrolizidiniques (138) !

Ainsi malgré une épuration rénale efficace, une surcharge tissulaire en alcaloïdes pyrrolizidiniques et en leurs métabolites est vite arrivée... Les cellules touchées subissent alors un mécanisme intracellulaire identique en tout point à celui retrouvé dans les hépatocytes, les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques et les cellules présentes au niveau pulmonaire : c'est-à-dire le déclenchement du processus d'apoptose. Histologiquement, les effets néphrotoxiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques et des adduits pyrroliques impactent majoritairement les cellules épithéliales des tubules rénaux (138,139).

Cependant, la destruction de l'épithélium tubulaire est bien moindre que celle retrouvée dans les sinusoides hépatiques ; et en réalité, la véritable interaction qu'ont les alcaloïdes pyrrolizidiniques avec les reins provient de leurs effets pneumotoxiques (139,140) ! L'altération des tissus pulmonaires engendre effectivement la perturbation de plusieurs systèmes de régulation et particulièrement ceux contrôlant la pression artérielle tel le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) dont l'activité est sensiblement accrue en présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (140).

Pour rappel, le SRAA permet entre autres d'adapter la réabsorption tubulaire ou de moduler le diamètre des vaisseaux sanguins en fonction de la pression artérielle.

Sans rentrer *in extenso* dans son déroulement, le SRAA induit une vasoconstriction couplée à une hypervolémie qui créent une hypertension artérielle, certes délétère pour les tissus rénaux, mais bien plus pour les tissus pulmonaires ou cardiaques. En effet, l'hypertension artérielle globale entretient l'HTAP, le socle physiopathologique de la fibrose des artérioles pulmonaires et du myocarde du ventricule droit. À cause de la suractivation du SRAA et de la vasopressine, c'est avec une plus grande célérité que se développe notamment l'insuffisance ventriculaire droite *via* le remodelage histologique du myocarde qui s'épaissit et perd finalement en force contractile (139,140)... C'est pourquoi, même si les alcaloïdes pyrrolizidiniques et leurs métabolites dérèglent allègrement le fonctionnement des cellules rénales et favorisent leur apoptose, c'est pourtant bien les poumons puis le cœur qui pâtissent le plus de ces perturbations physiologiques.

3.2.3. Effets pharmacologiques non toxiques

En dépit de leur toxicité, les alcaloïdes pyrrolizidiniques possèdent des propriétés potentiellement très intéressantes, et ce dans de multiples domaines (2,3,141). Malgré cela, le rapport entre les effets bénéfiques et les effets néfastes des alcaloïdes pyrrolizidiniques demeure largement en faveur des seconds, à n'en pas douter.

Néanmoins les effets bénéfiques pourraient tout à fait ouvrir la voie au développement de nouvelles substances actives dans la mesure où leur dégradation métabolique en déshydropyrrolizidines serait limiter.

3.2.3.a). Activité antimicrobienne

C'est notamment par le biais de l'usaramine et de la monocrotaline que des propriétés antimicrobiennes ont pu être attribuées aux alcaloïdes pyrrolizidiniques (3,141).

L'usaramine réduit drastiquement la prolifération de *Staphylococcus epidermidis* et de *Pseudomonas aeruginosa*, la première étant une bactérie commensale et la seconde ubiquitaire. Toutefois, ces bactéries n'en restent pas moins des germes opportunistes qui peuvent se révéler pathogènes si des conditions favorables se présentent à elles. Le mécanisme exact de l'usaramine n'est pas identifié avec certitude... Cette molécule interférerait soit avec la production du biofilm, soit avec les phospholipides membranaires (3,141).

La monocrotaline agit sur *Trichomonas vaginalis*, un organisme unicellulaire flagellé qui lui est d'ailleurs particulièrement sensible car suite à une exposition à la monocrotaline, le taux de létalité au sein de la population de *Trichomonas vaginalis* est compris entre 70 et 85 % ! Cette propriété est d'autant plus intéressante que la monocrotaline a montré *in vitro* une totale innocuité pour les cellules épithéliales de la muqueuse vaginale (3).

D'autres alcaloïdes pyrrolizidiniques détiennent des effets antimicrobiens prometteurs, que ce soit sur des espèces bactériennes ou fongiques, et à ce propos le genre *Heliotropium* est l'un des taxons qui en recèle le plus (141,142).

À titre d'exemple, *Heliotropium ellipticum* Ledeb. renferme de l'eupopéine, de l'héliotridine et de la lasiocarpine (sous forme amine tertiaire et *N*-oxydée). Ensemble, ces quatre molécules inhibent la croissance de deux bactéries de la flore intestinale potentiellement pathogènes : *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*. De plus, ces alcaloïdes pyrrolizidiniques possèdent un effet antifongique significatif, et ce sur des champignons ayant un impact important sur la production agricole ! C'est le cas d'*Aspergillus flavus*, le principal organisme producteur de l'aflatoxine B1 une mycotoxine hautement cancérigène ou de certains champignons infectant les cultures céréalières (maïs, riz, millet...) ou celles de canne à sucre : *Curvularia lunata*, *Curvularia spicifera* et *Fusarium fujikuroi* (141,142).

Quant aux alcaloïdes pyrrolizidiniques produits par *Heliotropium zeylanicum* (Burm.f.) Lam. (la rétronécine, l'héliotrine, la 7-angélylhéliotrine et le *N*-oxyde de subulacine), ils présentent une activité antibactérienne sur *Escherichia coli* et sur des germes bien plus vénéreux d'un point de vue sanitaire, tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus anthracis*. Ces quatre substances ont aussi des effets antifongiques marqués, majoritairement sur les espèces responsables des moisissures alimentaires et domestiques que sont *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*, ainsi que sur le genre *Rhizoctonia* regroupant bon nombre d'espèces phytopathogènes (141,142).

3.2.3.b). Activité antivirale

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques d'*Heliotropium zeylanicum* (Burm.f.) Lam. empêchent la multiplication des virus de la rougeole et de la poliomyélite entre autres (142). Néanmoins, cela demeure essentiellement anecdotique étant donné que des vaccins ont déjà pleinement montré leur efficacité pour lutter contre ces pathologies.

Un peu plus pertinent peut-être, l'alexine et ses diastéréoisomères, des nécines polyhydroxylées produites par deux espèces de *Fabaceae* tropicales, sont capables de bloquer la fusion entre les virions du VIH et les cellules cibles. Le mécanisme d'action de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques atypiques résulterait de l'inhibition de la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe indispensables à la réplication du VIH (3,142). Aussi excitant que cela puisse paraître, cette découverte date cependant du début des années 1990 lorsque l'épidémie de SIDA faisait rage et que l'arsenal thérapeutique pour limiter le développement de la maladie et endiguer la transmission du VIH était bien maigre... Aujourd'hui avec l'existence de trithérapies efficaces dans la réduction de la charge virale des personnes infectées, l'action antirétrovirale des alexines est devenue pour le moins caduque.

3.2.3.c). Activité anti-inflammatoire

Nous avons vu précédemment que l'inflammation était une pierre angulaire de la toxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques, et ce indépendamment des tissus atteints. Toutefois, certains alcaloïdes pyrrolizidiniques de *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. ont montré qu'ils avaient la capacité de réduire la libération de monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$), une espèce radicalaire impliquée dans la relaxation des muscles lisses ou l'immunomodulation, entre autres (3,77).

Dans notre cas, c'est explicitement la libération de $\cdot\text{NO}$ par les macrophages qui fut étudiée. Ces derniers furent mis en présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques appartenant tous au sous-type nervosine et extraits de *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. ; puis une endotoxine à laquelle les macrophages sont souvent confrontés en milieu entérique fut ajoutée : le lipopolysaccharide (LPS) O111 : B4 provenant de la membrane externe d'*Escherichia coli* (3,143).

En temps normal, la liaison d'un LPS quel qu'il soit avec les récepteurs des macrophages déclenche la libération de $\cdot\text{NO}$ et d'autres médiateurs pro-inflammatoires (77). Or en présence de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques, les macrophages ne relâchent pas ou alors très peu de $\cdot\text{NO}$ consécutivement à leur interaction avec le LPS O111 : B4 (143) !

Ajoutons que cette propriété anti-inflammatoire des alcaloïdes pyrrolizidiniques de *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. est d'autant plus intéressante que ces molécules sont constituées d'une nécine saturée, la (-)-lindélofidine (*alias* (-)-isorétronécanol) ou la (-)-laburnine (*alias* (-)-trachélanthamidine) et ne sont *de facto* pas métabolisables en dérivés pyrroliques.

3.2.3.d). Activité anticancéreuse

Une des propriétés les plus intéressantes des alcaloïdes pyrrolizidiniques est leur activité antitumorale. Elle repose sur l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules tumorales mais aussi sur la mise en place d'un procédé antimitotique (3,141,144).

Nous ne reviendrons pas sur le déroulement du premier mécanisme car nous l'avons déjà traité auparavant. Nous précisons cependant que l'action anticancéreuse des alcaloïdes pyrrolizidiniques n'a de grand intérêt si et seulement si ces derniers sont dépourvus de toxicité pour les cellules saines et en insistant tout particulièrement sur les hépatocytes qui sont les cellules les plus vulnérables à la cytotoxicité des déshydropyrrolizidines métaboliques, le déclenchement de la voie mitochondriale découlant de la surconsommation des stocks de glutathion par les dérivés pyrroliques.

C'est pourquoi les propriétés antitumorales d'un certain alcaloïde pyrrolizidinique de *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. sont les plus pertinentes à traiter ici en premier car ce composé est constitué d'une nécine saturée. Là encore, il s'agit d'un membre du groupe nervosine avec une caractéristique suffisamment rare pour être soulignée : cet alcaloïde pyrrolizidinique est détenteur d'un substituant halogéné ! L'halogène en question est un atome de chlore porté par un méthyle lui-même lié à l'azote cyclique, c'est donc pour cela que cet alcaloïde pyrrolizidinique porte tout simplement le nom de *N*-chlorométhylnerosine VII (144).

La *N*-chlorométhylnerosine VII interagit avec les cascades des MAP-kinases (MAPK, de l'anglais *Mitogen-Activated Protein Kinases*) induisant d'abord l'autophagie puis l'apoptose des cellules cancéreuses au bout de plusieurs heures d'exposition (entre 12 et 24 h) (144). Néanmoins une fois la voie mitochondriale activée, l'autophagie perdure au point que les deux mécanismes se confondent et agissent de concert (141). Les effets antitumoraux de la *N*-chlorométhylnerosine VII ont été testés sur une lignée cellulaire de cancer colorectal, un type de cancer dont la mortalité est l'une des plus élevées.

Certes, les perspectives qu'apporte cet alcaloïde pyrrolizidinique aux stratégies chimiothérapeutiques du cancer colorectal pourraient susciter l'intérêt de l'industrie pharmaceutique. Mais en réalité, la faible teneur de *N*-chlorométhylnerosine VII contenue dans *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. nécessiterait plus de produire des dérivés hémisynthétiques, comme ce fut le cas pour les taxanes ou les vinca-alcaloïdes ; car signalons que 14 kg de plante sèche permettent d'extraire à peine 18 mg de cette substance (144) ! Un rendement plus que dérisoire...

En poursuivant sur la brève allusion faite aux poisons du fuseau, le *N*-oxyde d'indicine s'assimile parfaitement à l'un d'entre eux grâce aux propriétés antimitotiques qu'il a montré *in vitro* (3,141,142,145). Effectivement, cet alcaloïde pyrrolizidinique stoppe le cycle des cellules cancéreuses étudiées (prostate, sein, col de l'utérus) à la phase de la mitose (phase M) en se liant aux hétérodimères de tubuline (145). Formés de deux sous-unités distinctes, la tubuline α et la tubuline β , les hétérodimères de tubuline se polymérisent spontanément et permettent ainsi de créer les microtubules indispensables à la division cellulaire (77).

D'une manière similaire aux autres poisons du fuseau, le *N*-oxyde d'indicine possède un site de liaison spécifique au sein du dimère et celui-ci se situe précisément au cœur de la tubuline β (145). En outre, le site de fixation du *N*-oxyde d'indicine se trouve être à proximité immédiate de résidus de tryptophane, les acides aminés catalysant la polymérisation des hétérodimères de tubuline. Or, la liaison du *N*-oxyde d'indicine à la tubuline β perturbe le bon fonctionnement des résidus de tryptophane et empêche *de facto* l'élongation des microtubules. Et lorsqu'il est administré à des concentrations élevées, le *N*-oxyde d'indicine va même jusqu'à dégrader les microtubules en favorisant leur dépolymérisation (141,142) !

Étant donné que cet alcaloïde pyrrolizidinique est un amine-oxyde monoestérifié, il ne présente qu'une très faible toxicité vis-à-vis des cellules saines, ce qui en fait alors un très bon candidat à recruter pour développer de futurs médicaments antimitotiques aux résultats prometteurs.

3.2.3.e). Activité cholinergique

Quelques alcaloïdes pyrrolizidiniques produits notamment par deux espèces de *Boraginaceae* originaires du bassin méditerranéen occidental exercent une activité cholinergique en inhibant les acétylcholinestérases (AChE) synaptiques (3,142).

Rappelons que l'immense majorité des AChE sont situées dans les synapses impliquant les neurones cholinergiques, que ces derniers appartiennent au système nerveux central ou périphérique. Le rôle des AChE est de dégrader *via* une hydrolyse l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique afin de réduire son activité par la simple réduction de sa demi-vie. L'arrêt de la dégradation de ce neuromédiateur engendre donc une plus longue stimulation de ses récepteurs post-synaptiques que ce soit les récepteurs muscariniques ou les récepteurs nicotiniens. Une fois stimulés, les récepteurs nicotiniens et muscariniques entraînent leurs effets respectifs que l'on regroupe au sein des effets cholinergiques (77).

Mais pour stimuler les transmissions cholinergiques de cette manière, les alcaloïdes pyrrolizidiniques doivent posséder des motifs moléculaires particuliers ! Effectivement, tous les

alcaloïdes pyrrolizidiniques inhibant l'AChE ont un atome d'azote ionisé (sous forme amine-oxyde) ou ionisable (sous forme base) pour interagir avec le site anionique, stabilisant normalement l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine, ainsi qu'un acide angélique estérifié en C-7 (échimidine, héliosupine, *N*-oxyde de 7-angélyllycopsamine, *N*-oxyde de 7-angélyléchinatine, etc.) pour se lier avec le domaine estérasique (3,142). Toutefois, le mécanisme d'action de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques n'est pas connu avec certitude... Dépend-il seulement de simples liaisons hydrogènes avec les domaines fonctionnels de l'enzyme ou nécessite-t-il une liaison covalente entre l'hydroxyle de la sérine du site catalytique et l'acide angélique, faite au détriment de la fonction ester en C-7 ? Nul ne l'a encore déterminé...

Quoiqu'il en soit, la stimulation indirecte des transmissions cholinergiques causée par les alcaloïdes pyrrolizidiniques permet de les assimiler aux inhibiteurs (pseudo-)réversibles de l'AChE. Cette classe thérapeutique est principalement utilisée contre les troubles des muscles squelettiques (myasthénie), des muscles lisses (atonie) et la maladie d'Alzheimer. La découverte des propriétés anticholinestérasiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques porteurs d'un acide angélique en C-7 pourrait ainsi étoffer l'arsenal médicamenteux à disposition contre ces pathologies dans les prochaines années !

3.2.3.f). Propriétés diverses

Enfin, les alcaloïdes pyrrolizidiniques extraits des parties aériennes de *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less., à savoir la sénécionine, l'intégerrimine, la rétrorsine, l'usaramine et la sénéciphylline, présentent des effets anti-ulcéreux notables. Une caractéristique d'autant plus captivante que ces composés agissent à la fois sur les troubles sécrétoires idiopathiques que sur ceux induits par la prise d'AINS (3,142,146) !

En effet, le mélange de ces cinq alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques réduit drastiquement la libération de la gastrine et favorise celle de la prostaglandine E2 (PGE2). En somme, la sénécionine, l'intégerrimine, la rétrorsine, l'usaramine et la sénéciphylline protègent la muqueuse gastrique et permettent sa régénération par l'exacerbation du rétrocontrôle négatif de la PGE2 sur la sécrétion acide (3,142,146). Cependant, une ombre persiste dans ce tableau élogieux car remémorons-nous que ces cinq alcaloïdes pyrrolizidiniques, de par leur motif macrocyclique, sont passablement délétères pour le foie...

Ainsi, avant de songer à employer de tels composés en tant qu'anti-ulcéreux, aussi efficaces soient-ils, il faudrait au préalable modifier leurs structures chimiques afin d'en atténuer voire d'en retirer la toxicité métabolique ; et cela tout en réussissant à maintenir les motifs moléculaires

essentiels à leur activité anti-sécrétoire ! Autant dire que la recherche pharmaceutique a encore beaucoup de défis à relever avant de pouvoir permettre une utilisation thérapeutique de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques.

4. Principales plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques

À l'heure actuelle, plus de 500 alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été identifiés de par le monde et l'on estime que plus de 6000 espèces de plantes à fleurs produiraient ces métabolites secondaires (2,41,142) ! Les principales familles d'Angiospermes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sont de loin les *Boraginaceae* et les *Asteraceae* même si les *Fabaceae*, les *Orchidaceae* ou les *Poaceae* ne sont pas en reste (2,41,42).

Ici, nous traiterons en priorité des plantes inscrites à la Pharmacopée française (listes A et B) (Annexes IX et X) ou traditionnellement employées dans les médecines européenne, chinoise ou ayurvédique et dont l'utilisation inconsidérée représente un réel danger sanitaire ; mais également des espèces les plus abondantes dans l'environnement représentant ainsi une importante source de contamination alimentaire. Rappelons succinctement que la liste A de la Pharmacopée française regroupe les plantes médicinales utilisées traditionnellement et que la liste B de la Pharmacopée française consigne quant à elles les plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation mais dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu (147,148).

4.1. *Boraginaceae*

En plus d'être la deuxième famille renfermant le plus grand nombre d'espèces élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, la famille des *Boraginaceae* est aussi une grande pourvoyeuse de plantes médicinales, que celles-ci se soient finalement avérées toxiques ou non (36,42,147–152).

Les plantes appartenant à cette famille sont facilement reconnaissables à leur inflorescence en cyme scorpioïde dont les fleurs changent généralement de teinte suivant leur maturité : classiquement du rose au bleu en passant quelquefois par le pourpre ou le violet. Une autre typicité des *Boraginaceae* est la présence de poils à cystolithes le long de leur appareil végétatif aérien (feuilles et tiges) leur conférant alors un aspect rugueux au toucher (153).

4.1.1. *Borago officinalis* L., la bourrache

☼ Description botanique :

Borago officinalis L., la bourrache, est une plante herbacée annuelle mesurant entre 20 et 40 cm de haut. Sa tige est dressée, hérissée et fortement rameuse. Ses feuilles sont ovales, velues et irrégulièrement dentées ; les inférieures ont un long pétiole alors que les supérieures sont embrassantes (Figure 46) (154,155).

Son inflorescence est une cyme scorpioïde de fleurs dont la corolle est étalée et l'extrémité des pétales pointue, la démarquant de celles des autres *Boraginaceae*. Les fleurs sont bleues ou blanches, parfois roses et leur floraison a lieu d'avril à septembre (Figure 46) (153–156).

Borago officinalis L. est une espèce largement cultivée et elle croît naturellement dans les milieux rudéraux faisant de cette espèce une plante assez commune (154,155).



Pl. 224. Bourrache officinale. Borrago officinalis L.

Figure 46 : *Borago officinalis* L.

[D'après (156)]

☼ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

La bourrache synthétise de nombreux alcaloïdes pyrrolizidiniques toxiques du type lycopsamine, tant des monoesters (amabiline, supinine, intermédiaire, lycopsamine) que des diesters (7-acétylintermédiaire et 7-acétyl-lycopsamine) Néanmoins, la principale spécificité du panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de la bourrache est la présence d'un composé non toxique : la thésinine libre et glycosylée (sous forme de thésinine-4'-O-β-D-glucoside) se concentrant uniquement au niveau des fleurs puis des graines une fois la fructification aboutie (1,42,153).

☼ Propriétés et utilisations :

La bourrache tire son nom de l'arabe *abû rach* « père de la sueur » évoquant l'une de ses nombreuses vertus. En plus d'être sudorifique, la fleur est diurétique et s'utilise comme adoucissant pectoral dans le cadre d'affections bronchiques (1,153,155). Mais traditionnellement, ce sont les

parties aériennes telles quelles qui entrent dans la composition des différents remèdes à base de bourrache (36,186,193)...

L'huile de graines de bourrache est émolliente grâce à sa forte teneur en acides gras insaturés : acide linoléique (30 à 40 %), acide oléique (15 à 20 %) et acide γ -linolénique (18 à 25 %) ; et se retrouve ainsi dans de nombreuses formulations cosmétologiques ou dermatologiques mais peut aussi se consommer par voie orale pour lutter contre le vieillissement cutané (153,155).

Et quelquefois, les fleurs et les jeunes feuilles de bourrache sont employées en tant que condiment ou bien pour embellir des préparations culinaires (36,153,155).

Il est vrai que *Borago officinalis* L. produit des alcaloïdes pyrrolizidiniques en faible quantité par rapport aux autres *Boraginaceae* (entre 2 et 8 mg/kg de plante fraîche). Cependant, ce sont les feuilles et de surcroît les plus jeunes qui contiennent les plus fortes teneurs en alcaloïdes pyrrolizidiniques toxiques de la plante tout entière. Et quant aux fleurs et aux graines, certes elles renferment en grande partie de la thésinine libre et de la thésinine-4'-O- β -D-glucoside, pourtant il n'en reste pas moins que des alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2-insaturés — et donc toxiques — sont également retrouvés (1,153,155) !

Les utilisations médicinales et alimentaires des feuilles et de fleurs de bourrache devraient donc être drastiquement réduites afin d'éviter une exposition chronique aux alcaloïdes pyrrolizidiniques hépatotoxiques. Or aussi paradoxal que cela puisse paraître, les parties aériennes et la fleur sont toujours inscrites sur la liste A de la Pharmacopée française tout en ayant vu leurs monographies de contrôle supprimées il y a de cela une dizaine d'années (Annexe IX) (1,147,155) !

Et plus étonnant encore, les fleurs de bourrache sont sorties du monopole pharmaceutique et ne sont plus seulement disponibles en officine mais se retrouvent *de facto* accessibles dans tout commerce sans pour autant que les conseils adéquats soient dispensés aux acheteurs (153,155)...

Enfin, les fleurs, les graines et l'huile de graines de bourrache sont autorisées dans la composition de compléments alimentaires, faisant ainsi de cette plante la seule espèce végétale élaboratrice d'alcaloïdes pyrrolizidiniques tolérée dans cette catégorie de produits, sous réserve néanmoins qu'il puisse être démontré que les parties utilisées détiennent une teneur en ces composés inférieure à 1 ppb, sauf pour l'huile (157). En effet signalons que le composé pyrrolizidinique majoritaire de l'huile de graines de bourrache, la thésinine libre ou glycosylée, est globalement présente à l'état de traces (< 0,2 ppb) rendant *a priori* cette huile exempte d'une quelconque toxicité (1,2). En outre, l'huile de graines de bourrache fait l'objet d'une monographie à la Pharmacopée européenne (155,158).

la France à l'exception du Midi. Dans le reste de l'Europe, elle se retrouve dans les régions aux climats océaniques ou continentaux, globalement des Îles Britanniques jusqu'aux confins de l'Oural (1,154,155,159,160).

⌘ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Tous les alcaloïdes pyrrolizidiniques produits par la grande consoude sont du type lycopsamine et de surcroît 1,2-insaturés. Nous y retrouvons des composés porteurs *a minima*, soit de l'acide (+)-trachélanthique (intermédiaire), soit de l'acide (-)-viridiflorique (lycopsamine). Les autres alcaloïdes pyrrolizidiniques dérivent métaboliquement de l'un des deux mentionnés ci-dessus et sont estérifiés avec un second acide nécique en C-7. Ce peut être avec l'acide acétique (7-acétylintermédiaire, 7-acétyllycopsamine), avec l'acide angélique (symlandine), avec l'acide tiglique (symphytine et myoscorpine) ou avec l'acide sénéciöïque (symviridine) (1,36,42,152,153).

⌘ Propriétés et utilisations :

Les noms français et latin de cette espèce ont un processus étymologique similaire car ils signifient originellement « réparer, consolider » ; d'où son nom vernaculaire d'herbe à la coupure. En effet, la racine de consoude officinale présente des propriétés cicatrisantes et émollientes possiblement due à l'allantoïne et aux polysaccharides (mucilages) qu'elle contient (1,153,155,162).

En usage externe, le rhizome frais s'emploie traditionnellement en pommades ou en compresses sur un grand nombre de blessures : les douleurs articulaires, les entorses, les contusions, les coupures, les piqûres d'insectes, les gerçures, les crevasses mammaires, etc. (36,152,155,162). D'un point de vue pharmacologique, l'extrait hexanique de rhizome inhibe l'activité des cyclo-oxygénases de type 1 et 2 (COX-1/2) (1). En usage interne, le rhizome frais soulagerait les ulcères, les diarrhées et les hémorroïdes et serait antitussif grâce à ses mucilages (36,152,162).

Les feuilles de *Symphytum officinale* L. sont, elles, parfois consommées en salade ou en potage ; et leur infusion est préconisée contre les mêmes maux que soigne la racine (36,152,153,155). Leur extrait aqueux augmente la synthèse de prostaglandines notamment vasoconstrictrices (PGF2 α) (1).

Ce sont dans les organes souterrains que nous rencontrons les plus fortes teneurs en alcaloïdes pyrrolizidiniques (entre 0,2 et 0,4 %, soit l'équivalent de 2 à 4 g/kg de drogue fraîche !). Dans une moindre mesure, les feuilles en stockent également (entre 0,03 et 0,2 ‰) ; et en particulier les plus jeunes qui sont les tissus foliaires les plus concentrées en ces substances (1,153).

La consoude officinale possède une monographie pour les préparations homéopathiques et est inscrite sur la liste A de la Pharmacopée française (Annexe IX) ; toutefois — et fort heureusement — , il y est précisé que toutes ses parties sont toxiques et que son usage est exclusivement cutané (147,163). La raison est simple : de très nombreux cas de syndromes veino-occlusifs ont été recensés suite à une consommation régulière et prolongée de préparations à base de consoude officinale au cours des dernières décennies de par le monde (1,153,155) !

Aujourd'hui, seule la racine peut prétendre à une indication thérapeutique (par voie locale), qu'elle soit commercialisée en vrac ou sous forme d'extraits aqueux ou hydro-alcooliques (1,153,155). Rappelons que l'absorption dermique des alcaloïdes pyrrolizidiniques étant très faible, le risque hépatotoxique et cancérigène associé à cette voie est, pour l'instant, considéré comme plus que dérisoire.

Il convient donc de ne réserver cette plante qu'à la seule voie cutanée, tout en veillant à ne pas dépasser deux applications quotidiennes, une durée de traitement consécutive de dix jours et une exposition annuelle de six semaines. En outre, l'application locale de remèdes à base de racine de consoude officinale doit uniquement s'utiliser chez l'adulte et est à bannir formellement chez la femme enceinte ou allaitante et lorsqu'il est question de plaies saignantes (1,153,155).

4.1.3. *Anchusa officinalis* L., la buglosse officinale

☼ Description botanique :

Anchusa officinalis L., la buglosse officinale parfois appelée langue-de-bœuf, est une plante herbacée bisannuelle ou vivace mesurant entre 20 et 50 cm de haut. Sa tige est dressée, hérissée et légèrement anguleuse. Ses feuilles sont toutes lancéolées, entières et très velues, mais les inférieures sont atténuées tandis que les supérieures sont sessiles (Figure 48) (154,159,160).

Son inflorescence est une grappe lâche de cymes scorpioïdes qui fleurit entre mai et août. Les fleurs sont toutes dans l'aisselle d'une spathe et leur corolle est en tube droit. D'abord d'une couleur rougeâtre, les fleurs tirent ensuite vers le bleu ou le violet à leur plein épanouissement (Figure 48) (153,154,159,160,164).

La buglosse officinale est une espèce rudérale mésoxérophile qui affectionne tout particulièrement les sols argileux pauvres en calcaire. Elle se retrouve majoritairement en Europe centrale, de la plaine jusqu'en moyenne montagne. Également présente en France et dans le reste du continent européen, elle y possède toutefois une répartition plus sporadique, demeurant donc une plante relativement rare à observer (154,159,160).

⌘ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Anchusa officinalis L. élabore principalement des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine, qu'ils soient 1,2-insaturés (intermédiine, lycopsamine, 7-acétyllycopsamine) ou non (curassavine), ainsi que de la (+)-laburnine et son dérivé *O*-acétylé, l'acétyllaburnine (36,42).

⌘ Propriétés et utilisations :

Les fleurs et les feuilles de buglosse officinale s'utilisaient traditionnellement comme traitement diurétique et antitussif. En usage externe, ces mêmes parties aériennes sont appliquées sur les plaies pour leur pouvoir cicatrisant (36,162). Évidemment compte tenu des alcaloïdes pyrrolizidiniques toxique qu'elle contient, la langue-de-bœuf est aujourd'hui inscrite sur la liste B de la Pharmacopée française et son emploi est à proscrire vivement (Annexe X) (148).



Figure 48 : *Anchusa officinalis* L.

[D'après (164)]

4.1.4. *Cynoglossum officinale* L., le cynoglosse officinal

⌘ Description botanique :

Cynoglossum officinale L., le cynoglosse officinal ou langue-de-chien, est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle mesurant entre 30 cm et 1 m de haut. Sa tige est dressée, pubescente et ramifiée au sommet. Ses feuilles sont entières, molles et recouvertes de poils non cotonneux sur les deux faces leur octroyant un aspect grisâtre. Les inférieures sont ovales-oblongues et pétiolées, celles de la tige lancéolées et demi-embrassantes (Figure 49) (154,160).

L'inflorescence est une grappe dense, les fleurs ont un pédoncule incliné et leurs pétales sont d'une teinte rouge vineux ou violacée. Les carpelles sont aplatis, épineux et à rebord saillant et le calice possède de nombreux poils. La floraison se déroule entre mai et juillet. Les fruits sont couverts d'aiguillons et dépourvus de tubercules, un élément discriminant pour la distinguer des autres espèces du genre *Cynoglossum* (Figure 49) (153,154,160,165).

La langue-de-chien pousse essentiellement en milieu rudéral planitiaire ou montagnard et apprécie les sols basiques mésoxérophiles. *Cynoglossum officinale* L. se distribue naturellement de l'Europe occidentale jusqu'aux steppes d'Asie centrale, c'est une plante commune mais qui tend malheureusement à se raréfier (154,160).

⚔ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Le cynoglosse officinal produit essentiellement des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine (36,42,149). Par ailleurs, chaque organe détient un panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques spécifique grâce aux multiples réactions subsidiaires que déploie chaque tissu. La diversification structurelle mise en jeu par la langue-de-chien se retrouve dans sa composition globale en alcaloïdes pyrrolizidiniques qui est d'une richesse incroyable (166,167) !

L'immense majorité des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont constitués d'une nécine 1,2-insaturée sur laquelle a été greffé un acide en C₇ (échinatine et son dérivé *N*-oxyde, rindérine, supinine, amabiline), un acide en C₅ (7-angélylhéliotridine et 7-tiglylhéliotridine) ou bien les deux (héliosupine et son dérivé *N*-oxyde, 7-angélyléchinatine, 7-angélylrindérine). En outre, l'acide acétique peut former un troisième ester avec le groupe alcool porté par le carbone C-3' de l'acide hydroxyisopropylbutanoïque (3'-acétylhéliosupine et 3'-acétyléchinatine) (36,42,149).

Enfin, deux autres alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine sont retrouvés dans *Cynoglossum officinale* L. avec la particularité d'être quant à eux totalement saturés et donc foncièrement inoffensifs (trachélanthamine et viridiflorine) (36,42,149).

Précisons toutefois que les alcaloïdes pyrrolizidiniques saturés jouent ici le rôle de précurseurs biosynthétiques des composés prépondérants que sont l'héliosupine, l'échinatine et leurs dérivés quels qu'ils soient. Il en est de même pour la supinine, l'amabiline, la rindérine, la 7-angélylrindérine et la 7-tiglylhéliotridine qui sont des intermédiaires anaboliques ; d'où une détection de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques uniquement à l'état de traces (149,166,167).



Figure 49 : *Cynoglossum officinale* L.

[D'après (165)]

✦ Propriétés et utilisations :

La langue-de-chien est traditionnellement utilisée dans les médecines chinoise et européenne. Ses racines sont préconisées pour leurs propriétés antidiarrhéiques mais aussi antitussives et mucolytiques en cas de toux, d'enrouement ou voire même d'hématémèse ! En application cutanée, l'extrait de ses sommités fleuries soulagerait les entorses (36,149,153).

Fort heureusement, la cynoglosse officinale est depuis longtemps inscrite sur la liste B de la Pharmacopée française pour sa toxicité notable (Annexe X) (148). Effectivement, ses organes contiennent une teneur extrêmement élevée en alcaloïdes (entre 0,7 et 1,5 %) et la catégorie des pyrrolizidiniques représente la faction structurelle majoritaire (36,153).

4.1.5. *Echium vulgare* L., la vipérine vulgaire

✦ Description botanique :

Echium vulgare L., la vipérine vulgaire, est une plante herbacée mesurant entre 20 cm et 1 m de haut. Sa tige est dressée, fortement rameuse et couverte de poils raides relativement espacés et cela même dans sa partie apicale. Ses feuilles sont toutes entières et hispides. Les inférieures sont oblongues-lancéolées et pétiolées avec une nervure centrale saillante et des nervures secondaires non visibles. Les supérieures sont quant à elles allongées aiguës et sessiles (Figure 50) (154,159,160).

L'inflorescence est une grappe de cymes scorpioïdes formant une panicule très garnie, feuillue et oblongue. La floraison prend place de mai à juillet, les jeunes fleurs sont roses ou rougeâtres puis deviennent violettes ou bleues peu avant leur éclosion, très rarement certaines sont blanches. Fait exceptionnel pour une *Boraginaceae*, la corolle est zygomorphe (car bilabiée), irrégulière et oblique. Les étamines sont de taille inégale mais très saillantes et rappellent la langue d'un serpent, d'où le nom vernaculaire d'*Echium vulgare* L. (Figure 50) (153,154,159,160,168).



Figure 50 : *Echium vulgare* L.

[D'après (168)]

La vipérine vulgaire se plaît dans les lieux incultes aux sols légers, secs à mi-secs et caillouteux. Elle est très commune en plaine et en moyenne montagne à condition d'être dans un endroit bien ensoleillé. Originnaire d'Eurasie, elle s'est répandue au fil du temps sur tous les continents et se retrouve désormais en Amérique du Nord et dans les régions australes d'Amérique du Sud, d'Afrique et d'Océanie (154,159,160).

☬ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

D'une manière similaire au cynoglosse officinal, *Echium vulgare* L. élabore une multitude d'alcaloïdes pyrrolizidiniques aux structures extrêmement proches. Les composés du type lycopsamine sont de loin la catégorie prédominante mais leur diversité est essentiellement permise par la synthèse adjuvante d'acides en C₅ (42,169,170).

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques produits par la vipérine vulgaire sont uniquement 1,2-insaturés — car porteurs d'une (+)-rétronécine — et l'immense majorité d'entre eux sont estérifiés à l'acide échimidinique sous forme de :

– monoesters en C-9 où l'acide échimidinique est intact (échimiplatine) ou lui-même estérifié avec l'acide angélique (vulgarine) (42,169,170) ;

– diesters comprenant l'acide échimidinique sur le carbone C-9 et sur le carbone C-7, un acide en C₅ (échimidine, tiglyléchimidine, échihumiline) ou bien l'acide acétique (uplandicine et 7-O-acétylvulgarine) (42,169,170) ;

– diesters avec un acide en C₅ en C-7, l'acide échimidinique en C-9 et un troisième acide sur le motif hydroxyisopropylbutanoïque, qu'il soit en C₂ (3'-acétyléchimidine, 5'-acétyléchimidine) ou en C₅ (échivulgarine) (42,169,170).

Enfin, des alcaloïdes pyrrolizidiniques exclusivement porteurs d'acides en C₅ sont également détectés néanmoins dans une moindre mesure, que ceux-ci soit des monoesters (7-angélylrétronécine, 7-tiglylrétronécine, 9-angélylrétronécine, 9-tiglylrétronécine) ou des diesters (7-angétyl-9-(2-méthylbutyryl)rétronécine et 7-tiglyl-9-(2-méthylbutyryl)rétronécine) (42,169,170). Ces alcaloïdes pyrrolizidiniques sont évidemment les précurseurs anaboliques des substances prédominantes et, fait remarquable, le précurseur direct des acides en C₅ se retrouve lui aussi incorporé à la nécine avant même que la réaction de désaturation stéréosélective n'ait eu lieu !

☬ Propriétés et utilisations :

Seulement composée d'alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2-insaturés, la vipérine vulgaire est à juste titre considérée comme une plante toxique (148). Cependant, ses parties aériennes continuent d'avoir une réputation de sudorifiques et de diurétiques, tandis que ses racines étaient

traditionnellement utilisées pour leurs propriétés calmantes mais toujours en association avec de l'aubépine et de la passiflore (162).

4.1.6. *Heliotropium europaeum* L., l'héliotrope commun

☼ Description botanique :

Heliotropium europaeum L., l'héliotrope commun ou héliotrope d'Europe, est une plante herbacée annuelle, à l'odeur fétide et mesurant entre 10 et 40 cm de haut. Sa tige est dressée ou étalée et quoiqu'il en soit très rameuse et poilue. Ses feuilles sont pubescentes sur les deux faces, pétiolées, aux nervures convergentes et de forme elliptique ou ovale (les feuilles du sommet étant légèrement plus pointues) (Figure 51) (154).



Figure 51 : *Heliotropium europaeum* L.
[D'après (171)]

Son inflorescence est un racème de cymes scorpioïdes, ses fleurs sont dépourvues de pétiole et de bractées. De couleur blanche, elles fleurissent entre juillet et septembre. Leur corolle est marquée de cinq plis ; leur calice est velu et s'ouvre lorsque le fruit est à maturité (Figure 51) (154,171).

L'héliotrope commun est une espèce champêtre thermophile qui affectionne les sols xérophiles, basiques et suffisamment pierreux. Elle se distribue principalement le long du pourtour méditerranéen mais son aire de répartition s'étend de l'Europe occidentale à l'Asie Mineure faisant ainsi d'*Heliotropium europaeum* L. une espèce assez commune (154).

☼ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Hormis l'héleurine et la supinine qui sont des précurseurs biosynthétiques, l'héliotrope d'Europe élabore seulement des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine à base de (+)-héliotridine. Les acides héliotrique et lasiocarpique sont les acides néciques les plus fréquemment intégrés dans les fonctions esters avec parfois une seconde estérification en C-7 incluant l'acide angélique. Ainsi, le panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de l'héliotrope commun est en grande proportion constitué de monoesters (europine, 5'-acétyleuropine, héliotrine) et de diesters (lasiocarpine, 2'-acétyllasiocarpine, 5'-acétyllasiocarpine, 7-angélylhéliotrine). Précisons tout de même que l'O-acétylation de l'europeine peut avoir lieu sur le second hydroxyle de la nécine (7-acétyleuropine) (42).

⌘ Propriétés et utilisations :

Heliotropium europaeum L. est inscrit sur la liste B de la Pharmacopée française car ses parties aériennes étaient autrefois utilisées dans la médecine populaire avant d'être considérées bien trop toxiques (Annexe X) (148). Aujourd'hui, son utilisation est surtout malencontreuse suite à la consommation de récoltes céréalières contaminées (153). Il est assez surprenant de voir qu'une espèce voisine, *Heliotropium indicum* L., est considérée comme une plante aux vertus médicinales dans de nombreuses pharmacopées de par le monde (africaine, ayurvédique, chinoise, mongole...) alors qu'elle est tout autant hépatotoxique que sa cousine européenne (149–152) !

4.1.7. *Lithospermum officinale* L., le grémil officinal

⌘ Description botanique :

Lithospermum officinale L., le grémil officinal aussi appelé herbe aux perles, est une plante herbacée vivace mesurant entre 20 et 70 cm de haut. Sa tige est dressée, couverte de poils raides et extrêmement rameuse et feuillée. À ce propos, ses feuilles sont lancéolées acuminées, rudes, sessiles et aux nervures secondaires saillantes (Figure 52) (154).

Son inflorescence est une grappe de cymes scorpioïdes. Ses fleurs sont petites, régulières, campanulées, à cinq lobes bien définis, d'un blanc jaunâtre. La floraison se déroule entre mai et août. Ses fruits sont des schizocarpes blancs, lisses et très robustes et c'est à eux que le grémil officinal doit son nom de genre dont l'étymologie signifie littéralement « graine de pierre » (Figure 52) (153,154,172).

Lithospermum officinale L. est une espèce sylvestre appréciant les sols alcalins assez ensoleillés. On la retrouve donc majoritairement en lisières de bois ou dans de vastes clairières. C'est une plante relativement commune, présente sur l'ensemble du continent européen (154).

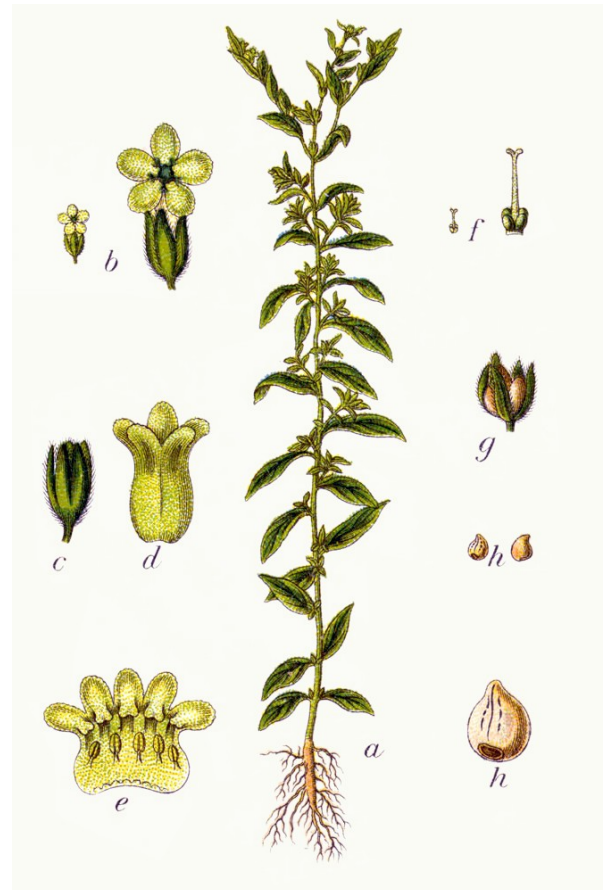


Figure 52 : *Lithospermum officinale* L.
[D'après (172)]

⌘ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Le grémil officinal ne synthétise que deux alcaloïdes pyrrolizidiniques (la lithosénine et son dérivé *O*-acétylé) — par ailleurs porteurs de la (+)-rétronécine — et qui se démarquent des autres molécules du type lycopsamine pour de nombreuses raisons (42,151).

La première est l'utilisation de l'acide (-)-viridiflorique pour obtenir l'acide échimidinique, ou plus précisément son diastéréoisomère au carbone C-3 de configuration *S* (numéroté en tant que carbone C-3' dans le squelette de l'alcaloïde pyrrolizidinique) (42).

La seconde est l'emploi d'un acide en C₅ provenant probablement de la leucine : l'acide 3-hydroxy-3-méthylbutanoïque (42).

En somme, le radical 3-hydroxy-3-méthylbutyryle s'estérifie avec le carbone C-7 et l'isomère de l'acide échimidinique avec le carbone C-9 (lithosénine) qui peut se retrouver lié à l'acide acétique en C-3' (3'-actéyllithosénine) (42).

⌘ Propriétés et utilisations :

Lithospermum officinale L. est traditionnellement utilisé dans les médecines européenne et indienne. La théorie des signatures attribue à ses graines des pouvoirs lithontriptiques, en cas de lithiase biliaire, de goutte ou encore de calcul rénal. En outre, les feuilles fraîches du grémil officinal détiennent des propriétés antigonadotropes de par les acides phénols poly-oxydés qu'elles contiennent (36,151,153,162). Cette plante étant inscrite sur la liste B de la Pharmacopée française (Annexe X), ses graines sont évidemment à proscrire (148). Et quant aux feuilles, leur utilisation actuelle relèverait tout autant de l'aberration que de la folie.

4.1.8. Autres espèces

De nombreuses autres espèces des *Boraginaceae* élaborent des alcaloïdes pyrrolizidiniques et sont encore fréquemment employées dans divers domaines. Néanmoins compte tenu du caractère hépatotoxique des molécules qu'elles produisent, leurs utilisations devraient être évitées, du moins toutes celles ayant trait à la voie interne (36,151,153).

✿ *Alkanna tinctoria* (L.) Tausch., l'orcanette des teinturiers, est une plante herbacée vivace, entièrement velue et mesurant généralement entre 10 et 20 cm de haut. Ses feuilles sont lancéolées, ses fleurs sont bleues ou purpurines à la corolle régulière, et ses racines sont recouvertes d'une écorce rougeâtre. Sa floraison a lieu entre mai et juin. C'est une espèce autant xérophile

qu'héliophile qui croît exclusivement dans les milieux sablonneux et rocaillieux du pourtour méditerranéen (154).

À la grande différence des autres *Boraginaceae*, *Alkanna tinctoria* (L.) Tausch. synthétise seulement des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type triangularine. Quelques monoesters sont retrouvés (7-angélylrétronécine, 7-tiglylrétronécine, 9-tiglylrétronécine) mais ce sont les diesters qui prédominent nettement le panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (triangularine, triangularicine, dihydroxytriangularine et dihydroxytriangularicine) (42).

Les médecines folkloriques des peuples européens et indiens recommandent la racine d'orcanette contre les diarrhées et les affections cutanées tel l'érysipèle car elles lui attribuent des effets astringents et antimicrobiens (36,151). Cependant, la principale utilisation de cette racine provient des naphthoquinones qu'elle contient. La substance majoritaire, l'alkannine, est un pigment rouge violacé dont les propriétés tinctoriales sont utilisées pour colorer certaines denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques (36,188). Aujourd'hui prohibée dans les pays occidentaux pour sa toxicité avérée, la racine d'*Alkanna tinctoria* (L.) Tausch. est malheureusement encore employée sans mégarde dans le sous-continent indien (148,151)...

✿ *Myosotis scorpioides* L., le myosotis des marais, est une plante herbacée vivace, entièrement velue et mesurant entre 10 et 70 cm de haut. Sa tige est ascendante, anguleuse, rameuse et ses poils sont apprimés sauf ceux de la base qui sont étalés. Ses feuilles sont lancéolées, sessiles, à poils apprimés rugueux (Figure 53) (154,159,160).

Son inflorescence est un racème de cymes scorpioïdes nues aux extrémités et fleurissant entre mai et juillet. Ses fleurs ont une corolle rotacée et un calice à poils apprimés et sans crochets, une caractéristique distinguant le myosotis des marais de l'immense majorité des membres de son genre. Qui plus est, ses pétales changent de couleur au fur et à mesure que la fleur s'épanouit passant du rose pâle (bourgeon) au bleu clair (fleur éclos) ; néanmoins, il est possible d'observer des spécimens dont les fleurs ont conservé leur teinte rose ou sont devenues blanches (Figure 53) (153,154,159,173).

Le myosotis des marais est une plante hygrophile et héliophile qui affectionne les sols riches en nutriments, qu'ils soient argileux ou limoneux. Nous le retrouvons donc communément sur les berges des étangs ou des cours d'eau et dans les lieux marécageux, mais aussi dans ceux à eaux souterraines, qu'il s'agisse de prairies ou de forêts. En somme, *Myosotis scorpioides* L. est un excellent indicateur d'humidité latente. Originaire d'Europe occidentale et centrale, il est

aujourd'hui cultivé comme plante d'ornement dans les régions pourvues d'un climat tempéré, sans lequel il ne peut croître (153,154,159).

Le myosotis des marais produit des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine assez particuliers car tous ses composés sont en plus porteurs de l'acide tiglique, et ce en des endroits parfois inattendus. Effectivement, il peut être classiquement estérifié à la nécine en C-7 (myoscorpine et symphytine), mais c'est surtout à l'acide (-)-viridiflorique en C-3' que cet acide en C₅ est combiné (scorpioïdine et 7-acétylscorpioïdine) (42) !

Autrefois indiquées contre l'asthénie, les parties aériennes de *Myosotis scorpioides* L. auraient également des effets sédatifs. En usage externe, elles étaient traditionnellement appliquées en compresses pour calmer les inflammations oculaires d'origine infectieuse, en particulier la conjonctivite (36). Bien évidemment, ces indications médicales sont devenues désuètes mais sont encore mises en avant par certains adeptes des médecines douces... Son utilisation est tout simplement à éviter.

Enfin pour terminer sur les espèces des *Boraginaceae* constituant les principales sources d'intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, nous allons brièvement aborder le genre *Trichodesma*. Jusque-là peu documenté, il est cependant pourvoyeur d'espèces considérées comme des plantes médicinales dans plusieurs cultures (150–152,174). Mais ici nous ne nous intéresserons qu'à leur pouvoir de contamination alimentaire.

Les *Trichodesma* sp. sont des plantes herbacées vivaces et hispides. Leurs fleurs sont principalement bleues ou blanches et leur périanthe est géciculé ; quant à leurs étamines, elles sont typiquement enroulées en torsades. Selon les espèces, elles croissent dans les milieux humides ou xériques des régions subtropicales et tropicales, mais toujours sur des sols thermophiles (175).



Figure 53 : *Myosotis scorpioides* L.

[D'après (173)]

* Trichodesma incanum (Bunge) A.DC. est une plante montagnarde qui se distribue dans les plateaux désertiques rocailloux de l'Asie centrale dont les milieux s'apparentent à des steppes arides ou à des toundras alpines (175,176).

Cette espèce synthétise seulement des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques du type monocrotaline, comprenant l'acide trichodesmique (trichodesmine) ou l'acide incanique (incanine). L'acide incanique est structurellement très proche de l'acide trichodesmique si ce n'est qu'il n'est pas hydroxylé en C-13 (42). *N.B. : le carbone C-13 correspond au carbone C-3 de l'acide nécique libre.*

Trichodesma incanum (Bunge) A.DC. est considérée comme une plante médicinale par les peuples kirghiz et ouzbek. En cataplasmes, les racines servent traditionnellement à soigner les plaies infectieuses et les furoncles (176). Mais en réalité, cette espèce est surtout connue pour être une source d'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. En effet durant l'administration soviétique, de multiples épisodes de syndromes veino-occlusifs ont été répertoriés dans les républiques kirghize, ouzbèke, tadjike, kazakhe et turkmène. Ces derniers faisaient suite à la contamination de récoltes céréalières par des plants de *Trichodesma incanum* (Bunge) A.DC. et leur issue était souvent tragique... Par exemple dans les années 1950 en Ouzbékistan, plus de 44 personnes moururent parmi les 200 ayant consommé du pain contaminé par les graines de cette *Boraginaceae* (175) !

4.2. Asteraceae

La famille des *Asteraceae* n'est pas seulement la plus large famille de tous les Angiospermes avec plus de 23 000 espèces comprises dans 1530 genres ; elle est aussi la première famille à renfermer en son sein des plantes élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, avec à ce jour déjà 336 espèces identifiées comme telles ! Toutes les plantes de cette famille possèdent des feuilles dépourvues de stipules et pour la plupart des espèces, les organes foliaires présentent un limbe profondément découpé. Mais les typicités générales des *Asteraceae* sont surtout retrouvées dans leur appareil reproducteur : une inflorescence en capitule, des fleurs changeant de morphologie suivant leur site d'insertion, des étamines concrescentes et des akènes coiffés d'un pappus (41,153).

⌘ Propriétés et utilisations :

Le tussilage doit son nom au latin *tussis agere* « chasser la toux » car depuis des temps immémoriaux, les Hommes utilisent cette plante contre la toux et les affections respiratoires. Si bien qu'aujourd'hui encore, le pas-d'âne fait partie des sept espèces pectorales majeures (1,153,162).

Les capitules et les feuilles sont les drogues les plus employées dans les médecines traditionnelles chinoise et européenne. Ils sont reconnus comme antitussifs, béchiques et expectorants et sont prescrits non seulement contre la toux mais aussi en cas d'asthme, de bronchite, de laryngite, de rhume, de grippe... Également utilisés comme adoucissants, ils protégeraient les muqueuses irritées lors d'épisodes de gastrite, d'entérite ou de gastro-entérite. Toujours en usage interne, le tussilage serait un excellent tonique général et fumées comme du tabac, ses feuilles soulageraient la crise asthmatique. Cependant, il est quand même légitime de se demander si l'inhalation de produits de combustion n'est pas devenue un remède archaïque pour soigner un état inflammatoire bronchique (36,149,162) ?

Par voie externe, les capitules et les feuilles du tussilage sont vulnérables et s'emploient sous forme de cataplasmes pour guérir toute sorte de plaies (brûlures, ulcères, plaies chroniques, etc.) (36,149,153,162).

Les propriétés thérapeutiques du pas-d'âne proviendraient probablement d'une lactone sesquiterpénique, la tussilagone, et du mucilage qu'il contient en très grande quantité (de 6 à 10 % dans les feuilles !). D'une part, les expériences menées sur la tussilagone ont montré qu'elle inhibe la production de la PGE₂ et la libération macrophagique du monoxyde d'azote causée par les LPS et qu'il s'agit d'un puissant stimulant respiratoire. D'autre part, le mucilage abondamment présent serait à l'origine des effets adoucissants, calmants et émoullients attribués au tussilage (1,153).

Précisons que *Tussilago farfara* L. renferme des alcaloïdes pyrrolizidiniques à des concentrations globalement faibles (teneur maximale de 160 ppm) mais avec plusieurs disparités qualitatives et quantitatives à prendre réellement en compte (1,36,149). Tout d'abord, la tussilagine et ses diastéréoisomères sont les seuls alcaloïdes pyrrolizidiniques non toxiques et se détectent uniquement à l'état de traces (< 2 ppm pour le total des quatre isomères) ; faisant dès lors des deux autres alcaloïdes pyrrolizidiniques hépatotoxiques (sénécionine et senkirkine), les substances prédominantes même si celles-ci ne se retrouvent en réalité qu'à des concentrations minimales (36,149). De surcroît, les teneurs en alcaloïdes pyrrolizidiniques sont également sujettes à des paramètres développementaux et géographiques. Effectivement suivant le stade de floraison, la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux varie de manière importante au sein de la plante tout

entière : de 150 ppm juste avant l'épanouissement du capitule à 50 ppm durant son flétrissement. Qui plus est, les individus extrême-orientaux synthétisent davantage d'alcaloïdes pyrrolizidiniques que les individus européens (1,36,149,153).

Ces variations nécessitent donc de prendre certaines précautions lors de l'utilisation du tussilage : privilégier les plantes d'origine européenne ; limiter la durée de traitement au strict minimum (trois à cinq jours par voie orale) ; ne pas excéder quatre semaines de traitement par an si l'utilisation se fait par voie orale ou six semaines si celle-ci se fait par voie cutanée. À cela s'ajoute aussi que toute utilisation chez la femme enceinte ou allaitante est contre-indiquée.

Certes, la dangerosité de *Tussilago farfara* L. n'est dans un premier temps que dérisoire compte tenu de son faible taux d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, elle n'en reste pas moins probable lors d'une exposition démesurée ou prolongée... Pour cette simple raison, le tussilage demeure inscrit sur la liste A de la Pharmacopée française mais avec la remarque bienvenue que tous ces organes présentent une toxicité (Annexe IX) (147).

4.2.2. *Jacobaea vulgaris* Gaertn., le séneçon jacobée

☼ Description botanique :

Jacobaea vulgaris Gaertn., le séneçon de Jacob, le séneçon jacobée, sous forme d'ellipse : la jacobée ou sous son nom vernaculaire : herbe de Saint-Jacques, est une plante herbacée vivace ou bisannuelle mesurant entre 30 et 80 cm de haut mais pouvant parfois atteindre le mètre. Sa tige est dressée, anguleuse et seulement ramifiée au sommet ; elle est généralement teintée d'un brun rougeâtre. Ses feuilles sont normalement glabres mais quelquefois laineuses, profondément pennatifidées et divisées en segments presque égaux. Les segments sont oblongs ou obovales et leurs contours sont soit lobés, soit crénelés. Les feuilles basales sont pétiolées et lyrées ; tandis que les feuilles caulinaires sont sessiles, laciniées et à oreillettes embrassantes. Son organe souterrain est un rhizome court et tronqué, à l'orientation verticale et générant des racines fibreuses (Figure 55) (153,154,159,160).

Son inflorescence est un corymbe ombelliforme de capitules. Toutes ses fleurs sont jaunes : les intérieures sont tubulées ; les extérieures sont ligulées et constituées d'une longue languette à trois dents terminales. Les bractées formant l'involucre des capitules sont tachetées de brun à leur apex. La floraison a lieu de juin à octobre. Tous ses fruits sont surmontés d'une aigrette : ceux de l'intérieur sont pubescents ; ceux de l'extérieur sont glabres (Figure 55) (153,154,159,160,165).

La jacobée est une espèce que l'on retrouve tout autant en plaine qu'en moyenne montagne, de préférence sur des sols peu caillouteux et légèrement humides. Elle se plaît particulièrement dans les prairies, en lisières des champs ou des bois et aux bords des chemins. En Europe, c'est une plante tout ce qu'il y a de plus fréquent à observer (153,154,159,160).

⚔ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Jacobaea vulgaris Gaertn. n'élabore que des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂ mais rappelons tout de même que la composition qualitative du panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques est propre à chaque chimiotype. Tous chimiotypes confondus, ce sont les composés de stéréochimie Z qui prédominent largement d'un point de vue structurel (sénécionine, rétrorsine, sénéciphylline, riddelliine, éruciflorine...) même si ceux de stéréochimie E ne sont pas inexistant pour autant (intégerrimine, usaramine, spartioïdine...). Relevons également la présence d'une molécule atypique, dépourvue d'isoméries *cis* et *trans* (sénécivernine) (41).

Cependant, la caractéristique biosynthétique majeure que réalise la jacobée dans la diversification structurelle de ses alcaloïdes pyrrolizidiniques réside dans l'époxydation de leur acide nécique : que celle-ci soit localisée sur les carbones C-15 et C-20 (jacobine, jaczine, jacoline et jaconine) ou sur les carbones C-13 et C-19 (érucifoline et acétylérucifoline) (41).

⚔ Propriétés et utilisations :

Traditionnellement employées pour leurs effets antispasmodiques, emménagogues ou anti-inflammatoires, les parties aériennes du séneçon de Jacob sont surtout toxiques à cause des alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'elles contiennent. En effet, la plante tout entière en renferme une quantité non négligeable (entre 0,2 et 0,3 %, une fois desséchée !) (36,153).



Figure 55 : *Jacobaea vulgaris* Gaertn.

[D'après (165)]

Aujourd'hui logiquement inscrite sur la liste B de la Pharmacopée française, la jacobée ne doit plus être utilisée, et ce sous aucun prétexte (Annexe X) (148).

De plus, *Jacobaea vulgaris* Gaertn. n'est pas seulement toxique pour les humains, elle l'est aussi pour les animaux et plus précisément pour les herbivores domestiqués (bovins, ovins, caprins, équins, etc.) dont les pâtures sont facilement colonisées par cette *Asteraceae*. En la broutant par mégarde, les animaux s'empoisonnent jour après jour... Les symptômes qu'ils développent suite à leur intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques divergent en partie de ceux des humains : une anorexie, une constipation, un ictère et des œdèmes. La conséquence physiopathologique ultime est une encéphalopathie hépatique pouvant conduire à la mort de l'animal (153).

4.2.3. *Petasites hybridus* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb., le pétasite officinal

☼ Description botanique :

Petasites hybridus (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb., le pétasite officinal ou pétasite vulgaire, est une plante herbacée vivace mesurant entre 20 et 60 cm de haut. Sa tige est dressée, simple, très écaillée et souvent maculée de violet. Les feuilles basales sont disposées en rosette, munies d'un long pétiole et leur limbe est arrondi, denté et légèrement velu. Ce sont les feuilles caulinaires qui s'apparentent à des écailles, elles sont toutes de forme allongée et les plus basses possèdent une gaine (Figure 56) (154,159,160).

Son inflorescence est une grappe condensée de capitules qui s'étirera au fur et à mesure de la fructification. La floraison se déroule de mars à mai avec une certaine caractéristique : les hampes florales apparaissent avant les feuilles *stricto sensu* ! Les fleurs sont blanches, roses ou pourprées et sont soit tubulées, soit ligulées (Figure 56) (154,159,160,172).



Figure 56 : *Petasites hybridus* (L.)
G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.
[D'après (172)]

Le pétasite officinal se retrouve principalement dans les mégaphorbiaies montagnardes aux sols limoneux et basiques : typiquement le long des torrents et autres cours d'eau d'altitude. Mais il croît aussi aisément dans d'autres milieux des reliefs montagneux, telles les lisières de bois ou les prairies humides. Sa distribution dans tous les différents massifs européens en fait une espèce relativement commune (153,154,159,160).

☼ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Petasites hybridus (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. synthétise majoritairement des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂ dont la nécine est soit 1,2-insaturée : de type rétronécine (sénécionine, intégerrimine) ou de type otonécine (senkirkine, pétasiténine, néopétasiténine) ; soit totalement saturée et donc inoffensive (néoplatyphylline) (41).

Deux autres alcaloïdes pyrrolizidiniques non toxiques sont également retrouvés au sein de cette espèce (tussilagine et isotussilagine) (41).

☼ Propriétés et utilisations :

Les médecines traditionnelles européennes recommandent la racine du pétasite officinal pour le traitement des douleurs spasmodiques d'origine intestinale, hépatique ou biliaire, ainsi que ses feuilles pour leurs propriétés antimigraineuses et pectorales (36). Malgré une faible teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques hépatotoxiques, *Petasites hybridus* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. fait partie de la liste B de la Pharmacopée française par mesure de précaution (Annexe X) (148).

4.2.4. *Senecio vulgaris* L., le séneçon commun

☼ Description botanique :

Senecio vulgaris L., le séneçon commun ou séneçon vulgaire, est une espèce herbacée annuelle mesurant entre 10 et 30 cm de haut. Sa tige est dressée et rameuse. Ses feuilles sont pubescentes et pennatifides à lobes égaux et dentés ; les inférieures sont atténuées en pétiole alors que les supérieures sont sessiles, embrassantes et auriculées (Figure 57) (154,159).

Son inflorescence est une panicule de capitules dont les fleurs sont toutes tubulées et colorées d'un jaune pâle. La floraison se produit de janvier à décembre car le séneçon commun est une plante thérophyte dont la croissance extrêmement rapide lui permet de fleurir toute l'année ! En outre, les bractées formant l'involucre sont tachées de noir au sommet (Figure 57) (153,154,159,165).

Senecio vulgaris L. est une espèce héliophile des zones champêtres et rudérales riches en nutriments. Elle pousse ainsi facilement dans les cultures sarclées ou le long des sentiers. C'est une plante très fréquente se distribuant dans le monde entier (153,154,159).

☼ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Senecio vulgaris L. produit uniquement des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂ porteurs d'un acide nécique insaturé. À ce propos, les composés majoritaires sont de configuration Z (sénécionine, rétrorsine, sénéciphylline et riddelliine) et s'accompagnent de leurs équivalents à la stéréochimie E (intégerrimine, usaramine et spartioïdine). Dans une moindre mesure, on détecte un alcaloïde pyrrolizidinique pourvu d'une double liaison entre les carbones C-15 et C-20 sans aucune isomérisation (sénécivernine) (41).



Figure 57 : *Senecio vulgaris* L.
[D'après (165)]

☼ Propriétés et utilisations :

Selon les médecines ancestrales, les parties aériennes du séneçon commun détiendraient les mêmes vertus que celles de la jacobée : emménagogue et anti-inflammatoire ; elles auraient en plus un effet expectorant. Néanmoins, cette espèce renferme uniquement des alcaloïdes pyrrolizidiniques grandement hépatotoxiques, et ce en une teneur conséquente (près de 0,2 % après dessiccation) (36,151,153,162) ! De nos jours, toute utilisation de cette espèce représenterait un réel danger sanitaire. C'est pourquoi, *Senecio vulgaris* L. et tous les autres *Senecio sp.* se retrouvent à présent inscrits sur la liste B de la Pharmacopée française (Annexe X) (148).

4.2.5. *Eupatorium cannabinum* L., l'eupatoire chanvrine

☼ Description botanique :

Eupatorium cannabinum L., l'eupatoire chanvrine ou chanvre d'eau, est une plante herbacée vivace mesurant entre 60 cm et 1,5 mètre de haut. Sa tige est dressée, pubescente, parfois simple

mais surtout rameuse et généreusement feuillue. Ses feuilles sont opposées, majoritairement tripartites mais parfois pentapartites et aux folioles lancéolées et dentées (Figure 58) (154,159,160).

Son inflorescence est un corymbe compact de capitules, eux-mêmes composés de fleurs purpurines ou vineuses ou exceptionnellement blanches. De plus, toutes les fleurs sont tubulées et à cinq lobes : une caractéristique de l'édifice floral de la tribu des *Eupatorieae*. Enfin, la floraison prend place entre juillet et septembre (Figure 58) (153,154,159,160,168).

L'eupatoire chanvrine est une espèce principalement retrouvée dans les mégaphorbiaies eutrophiles, autrement dit dans les friches humides riches en nutriments. Mais étant avant tout une plante hygrophile comme le rappelle un de ses noms vernaculaires, *Eupatorium cannabinum* L. investit également les bords des eaux douces, les marais et les forêts humides clairsemées, qu'elles soient formées de feuillus ou d'essences mixtes, du moment que ces milieux répondent à toutes ses exigences car c'est en outre une espèce appréciant les sols alcalins de type argilo-calcaire. Ses préférences environnementales font ainsi du chanvre d'eau une plante très commune dans l'ensemble de l'Europe, présente à la fois en plaine et en montagne (153,154,159,160).



Figure 58 : *Eupatorium cannabinum* L.
[D'après (168)]

☼ Composition en alcaloïdes pyrrolizidiniques :

Tous les alcaloïdes pyrrolizidiniques du panel d'*Eupatorium cannabinum* L. appartiennent au type lycopsamine. Cette espèce synthétise en grande partie des substances 1,2-insaturées qui grâce à leur nécine se révèlent être soit des composés finaux (échinatine, lycopsamine, rindérine, intermédiine), soit des intermédiaires métaboliques (amabiline et supinine). Dans une moindre mesure, des alcaloïdes pyrrolizidiniques saturés sont présents (viridiflorine et cynaustaline), vestiges de la diversification structurale réalisée par l'eupatoire chanvrine (36,149,151,152).

⌘ Propriétés et utilisations :

L'eupatoire chanvrine est une des plantes majeures des médecines traditionnelles européenne, chinoise et ayurvédique. Les drogues les plus utilisées sont les sommités fleuries et les parties aériennes florifères dont les infusions seraient immunostimulantes en cas de grippe ou de rhume, hypocholestérolémiantes et diurétiques (36,149,151,162).

Les feuilles et la racine sont quant à elles employées pour leurs propriétés apéritives, cholagogues, cholérétiques, laxatives, stimulantes et toniques. Précisons néanmoins que la racine est plus puissante que les feuilles, notamment lorsqu'il est question de constipation où son effet s'assimile plus à celui d'un cathartique qu'à celui d'un simple laxatif (151,153,162).

Malgré sa grande réputation de plante médicinale, *Eupatorium cannabinum* L. est en premier lieu une plante éminemment toxique ; non seulement elle renferme de nombreux alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2-insaturés mais aussi des lactones sesquiterpéniques connues pour leur nocivité (153).

Les utilisations thérapeutiques d'*Eupatorium cannabinum* L. sont donc évidemment à proscrire. Surtout lorsqu'il est question de traitement continu comme le sous-entend son action hypocholestérolémiante et qui augmenterait en réalité de manière significative le risque cancérigène intimement lié à la consommation chronique d'alcaloïdes pyrrolizidiniques non saturés !

Enfin, il est assez ironique de voir qu'une espèce produisant des alcaloïdes pyrrolizidiniques hépatotoxiques soit affublée de propriétés hépatoprotectrices...

4.2.6. Autres espèces

Une multitude d'autres espèces des *Asteraceae* produisent des alcaloïdes pyrrolizidiniques et pourtant ces dernières sont encore considérées comme des plantes médicinales ou alimentaires dans de nombreuses contrées... Seules deux tribus (*Eupatorieae* et *Senecioneae*) regroupent la totalité de ces espèces élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dont le squelette moléculaire type diverge d'ailleurs d'une tribu botanique à l'autre. De plus, ces motifs structuraux confèrent à ces molécules une hépatotoxicité parmi les plus marquées qui soit chez les alcaloïdes pyrrolizidiniques ! Ainsi, les emplois traditionnels de ces espèces sont tout simplement à proscrire et en particulier ceux impliquant la voie interne (36,149–152).

✱ *Adenostyles alliariae* (Gouan) A.Kern., l'adénostyle à feuilles d'alliaire, est une plante herbacée vivace mesurant entre 60 cm et 1,2 m de haut. Sa tige est dressée et rameuse. Ses feuilles sont cordiformes ou arrondies, velues (*a minima* sur leur face inférieure) et leur bord est irrégulièrement denté (Figure 59) (154).

Son inflorescence est un corymbe de capitules, eux-mêmes constitués d'une poignée de fleurs (généralement entre 2 et 8) de couleur rose ou rougeâtre. La floraison a lieu entre juillet et septembre (Figure 59) (154,177).

L'adénostyle à feuilles d'alliaire est une plante caractéristique des mégaphorbiaies mésohygrophiles montagnardes, principalement subalpines. Cette espèce croît donc essentiellement dans les milieux d'altitude à la fois frais et humides tout en privilégiant les sols rocailloux. Elle est endémique des massifs montagneux d'Europe de l'Ouest (Massif Central, Pyrénées, Alpes...). En Auvergne comme dans le reste de reliefs français, *Adenostyles alliariae* (Gouan) A.Kern. est une plante relativement commune (153,154).



Figure 59 : *Adenostyles alliariae* (Gouan) A.Kern.

[D'après (177)]

L'adénostyle à feuilles d'alliaire produit exclusivement des alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂ qui sont soit constitués de la (+)-rétronécine, soit de la (-)-platynécine. En outre, ils sont tous porteurs d'une insaturation entre les carbones C-15 et C-20 ; d'isomérisation *Z* (sénécionine, sénéciphylline, platyphylline) ou d'isomérisation *E* (intégerrimine, spatioïdine, néoplatyphylline). Notons également, la présence du dérivé *O*-acétylé de la sénéciphylline (sénéciphyllinine) (41).

Les parties aériennes d'*Adenostyles alliariae* (Gouan) A.Kern. sont traditionnellement utilisées en infusion pour leurs propriétés pectorales. Toutefois, cette plante contient une quantité d'alcaloïdes totaux (0,2 %) à prendre en compte car les alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2-insaturés

représentent la fraction majoritaire. À première vue, la teneur d'alcaloïdes totaux pourrait sembler insignifiante ; or celle-ci suffit pour induire une maladie veino-occlusive hépatique, notamment chez l'enfant comme ce fut le cas il y a de cela une trentaine d'année suite à la confusion des feuilles de l'adénostyle à feuilles d'alliaire avec celles du tussilage (36)...

Pour terminer sur les *Asteraceae*, le terme générique « séneçon » regroupe indistinctement des espèces des genres *Senecio* et *Jacobaea*. Il n'en reste pas moins que ces végétaux extrêmement répandus et fréquents sont des sources importantes d'intoxications aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, concernant tout autant les animaux d'élevage (*via* le fourrage, l'ensilage, les grains alimentaires, etc.) que les humains (*via* la phytothérapie, l'alimentation, une confusion botanique, etc.) (1,36).

✠ *Jacobaea erucifolia* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb., le séneçon à feuilles de roquette, est une plante herbacée bisannuelle ou vivace quasi identique à la jacobée et fleurissant aux mêmes mois que ce dernier (154,159).

Les principales différences botaniques permettant de distinguer les deux espèces s'observent au niveau des organes foliaires. Les feuilles de *Jacobaea erucifolia* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. sont profondément pennatifidées aux lobes oblongs parfois crénelés mais souvent entiers. Leur face supérieure est glabre et verte ; leur face inférieure est cotonneuse et grisâtre. De plus, son rhizome est rampant alors que celui de la jacobée est droit. (154,159).

Le séneçon à feuilles de roquette apprécie les sols argileux ou caillouteux, basiques et mésoxérophiles. Il se retrouve très fréquemment sur le continent européen dans les prés, en lisières de bois ou sur le bord des chemins (154,159).

Jacobaea erucifolia (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. produit un véritable florilège d'alcaloïdes pyrrolizidiniques macrocycliques en C₁₂ dont la composition exacte varie entre les différents chimiotypes existants. Ici, nous dresserons la liste de toutes les molécules ayant été recensées dans au moins l'un d'entre eux (41).

Les macrocycles peuvent être de stéréochimie *Z* (sénécionine, rétrorsine, sénéciphylline, sénéciphyllinine, senkirkine...), de stéréochimie *E* (intégerrimine, éruciflorine, spartioïdine...) ou tout simplement sans aucune isomérisation (sénécivernine). Additionnellement, certains présentent une époxydation (érucifoline, jacobine, otosénine...) ou une *O*-acétylation (acétylérucifoline et acétyl-senkirkine) (41).

En France, cette espèce est surtout connue pour les cas d'intoxication qu'elle cause au bétail ; mais en Mongolie, cette plante est utilisée de manière ancestrale pour soulager les piqûres et les morsures d'animaux venimeux (abeilles, serpents, scorpions, etc.) ainsi que les laryngites et les pharyngites (150). Actuellement, ce sont tous les séneçons qui sont inscrits sur la liste B de la Pharmacopée française (Annexe X) (148). Malheureusement comme seul le nom latin binomial permet de s'assurer du statut d'une espèce et que *Jacobaea erucifolia* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. ne fait plus partie du genre *Senecio* depuis seulement peu de temps, la législation inhérente à cette espèce demeure pour le moins assez floue... Évidemment, cela ne dispense pas d'exclure toute utilisation du séneçon à feuilles de roquette dont tous les organes sont remplis d'alcaloïdes pyrrolizidiniques hautement toxiques pour le foie.

✠ *Jacobaea maritima* (L.) Pelsler & Meijden, le séneçon cinéraire ou cinéraire maritime, est une espèce herbacée vivace mesurant entre 30 et 70 cm de haut. Sa tige est dressée, rameuse et ligneuse à la base, conférant ainsi à la plante une forme suffrutescente. Ses feuilles sont blanches et velues et semblent dès lors recouvertes d'une teinte argentée. D'un aspect cotonneux sur leur face supérieure et d'un aspect tomenteux sur leur face inférieure, elles sont pennatifidées presque pennatiséquées et leurs segments sont oblongs-ovales au bord entier ou lobé. Se situant à l'apex de la tige, son inflorescence est un corymbe très compact de capitules aux fleurs jaunes qui s'épanouissent entre juin et août (Figure 60) (154,178).



Figure 60 : *Jacobaea maritima* (L.) Pelsler & Meijden
[D'après (178)]

Le séneçon cinéraire se plaît particulièrement sur les sols rocheux ou sableux des zones littorales. Originaire du pourtour méditerranéen, cette espèce est de nos jours cultivée comme plante ornementale et se distribue donc bien au-delà de ses milieux de prédilection (36,154).

Jacobaea maritima (L.) Pelsler & Meijden détient une large palette de réactions de diversification structurale car, en plus de synthétiser des macrocycles en C₁₂ relativement courants (sénécionine, rétrorsine, sénéciphylline, intégerrimine, usaramine et sénécivernine), elle est capable

de réaliser une multitude de réactions additionnelles que peu d'espèces sont en mesure d'effectuer toutes à la fois (époxydation, désaturation, hydratation, halogénéation, *O*-acétylation) (41) !

Mais l'aspect de loin le plus fascinant de cette richesse biosynthétique réside dans le fait que ces modifications se déroulent tout autant sur les alcaloïdes pyrrolizidiniques formés de la (+)-rétronécine (jacobine, jaczine, jacoline et jaconine) que sur ceux étant détenteurs de l'otonécine (otosénine, florosénine, floridanine, doronine et désacétyldoronine) (41) !

L'extrait hydro-alcoolique des sommités fleuries du cinéraire maritime est traditionnellement utilisé dans les pays d'Europe méridionale sous forme de collyres contre de nombreuses affections oculaires (conjonctivites, cataracte, opacification cornéenne, etc.) (36). En France, le séneçon maritime est inscrit à la Pharmacopée nationale, précisément sur la liste B et une monographie lui est dédié pour ses préparations homéopathiques (Annexe X) (148,179).

Jacobaea maritima (L.) Pelsler & Meijden contient une quantité conséquente d'alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux (jusqu'à 0,9 % dans les capitules) ; mais au regard des dilutions hahnemanniennes pratiquées, la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les préparations homéopathiques semble plus qu'improbable et celles-ci sont donc dépourvues d'une quelconque nocivité (36).

✿ *Senecio doronicum* (L.) L., le séneçon doronic, est une espèce herbacée vivace mesurant entre 20 et 60 cm de haut. Il présente plusieurs disparités morphologiques (feuilles et fleurs) avec les autres *Senecio sp.* permettant alors de l'identifier assez aisément. Ses feuilles sont épaisses, plus ou moins pubescentes et irrégulièrement dentées ; les inférieures sont oblongues, obtuses, décurrentes et longuement pétiolées ; tandis que les autres sont sessiles, lancéolées et demi-embrassantes (154).

Son inflorescence est un grand capitule apical et chaque plante n'en a qu'un seul, deux ou trois. Son involucre est cotonneux et les bractées extérieures le dépassent allègrement en longueur. Ses fleurs sont jaunes ou orangées et contiennent uniquement des ligules en grand nombre. La floraison se déroule entre juin et août (154).

Le séneçon doronic est une espèce montagnarde héliophile croissant de préférence sur les sols basiques et mésoxérophiles des régions subalpines, même s'il colonise tout aussi bien celles de moyenne montagne ou de l'étage alpin. Appréciant ainsi les milieux calcaires, frais et dégagés, le séneçon doronic se retrouve dans les prés, les prairies et les pâturages d'altitude. Endémique d'Europe, cette espèce se distribue dans les massifs montagneux les plus méridionaux (Massif Central, Alpes, Pyrénées, Abruzzes...) (154).

Se démarquant sensiblement des autres membres de son genre, *Senecio doronicum* (L.) L. produit deux alcaloïdes pyrrolizidiniques avec un macrocycle en C₁₃ (doronénine et bulgarsénine) dans lequel est incluse la double liaison de l'acide nécique ! Cette spécificité doit certainement s'expliquer par la présence d'un autre intermédiaire insaturé que la β-méthylènenorvaline lors du mécanisme réactionnel liant les deux précurseurs biosynthétiques (36,41).

Et encore plus étonnant pour une *Senecioneae*, le séneçon doronic élabore des substances du type triangularine (macrophylline et pétasinine) et la majorité de ses alcaloïdes pyrrolizidiniques sont entièrement saturés (macrophylline, pétasinine et bulgarsénine) (41) !

Traditionnellement, les populations des régions montagneuses où croit le séneçon doronic utilisent ses capitules en infusion pour calmer les crises d'asthme. Mais cet emploi est à présent désuet sans oublier que la présence d'un composé hépatotoxique (doronénine) rend la consommation orale de *Senecio doronicum* (L.) L. plus que dangereuse (36).

D'autres séneçons sont utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques supposées : *Senecio nemorensis* L., *Senecio ovatus* (G.Gaertn., E.Mey. & Scherb.) Willd., *Senecio scandens* Buch.-Ham. ex D.Don (36,149,150)... Cependant, l'immense majorité des *Senecio sp.* sont toxiques par le biais des aliments qu'ils contaminent (thés, tisanes, miels, épices, etc. ; cf. Partie 5.) car ce sont des espèces extrêmement fréquentes, voire même pour certaines invasives ! Pour n'en citer que quelques-unes : *Senecio inaequidens* DC., *Senecio sylvaticus* L., *Senecio vernalis* Waldst. & Kit., *Senecio viscosus* L., etc. (3,36,153).

4.3. Autres familles botaniques

Dans une moindre mesure, d'autres familles botaniques renferment également des espèces élaborant des alcaloïdes pyrrolizidiniques : *Apocynaceae*, *Celastraceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Orchidaceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Santalaceae*, *Sapotaceae* et *Scrophulariaceae*. La plupart des espèces synthétisant des alcaloïdes pyrrolizidiniques n'ont pas d'intérêt médicinal ou alimentaire et ne représentent donc qu'une dangerosité théorique ; mais restent toutefois toxiques en cas d'exposition prolongée, du moins celles qui contiennent des molécules aux nécines 1,2-insaturées (141,153,180).

4.3.1. Fabaceae

La famille des *Fabaceae* est la troisième famille la plus richement dotée en espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qui font d'ailleurs presque toute partie du genre *Crotalaria* (141,175,180). Certaines *Crotalaria sp.* utilisées comme plantes médicinales sont parfois à l'origine de syndromes veino-occlusifs ; mais la majorité des intoxications imputées à ce genre ressemblent à celles dues aux *Trichodesma sp.*, c'est-à-dire par la contamination de récoltes céréalières dans les régions rurales les plus défavorisées des pays en voie de développement (153,175).

Le genre *Crotalaria* regroupe des espèces tropicales et subtropicales principalement distribuées sur le continent africain. Son nom provient du grec ancien κρόταλον « castagnette, grelot » en référence au son caractéristique qu'émettent ses gousses lorsqu'elles s'agitent. Les fleurs sont typiques des *Fabaceae*, autrement dit zygomorphes, à l'étendard recouvrant et comportant dix étamines soudées. De plus, la plupart des *Crotalaria sp.* se parent de fleurs de couleur jaune (Figure 61) (153,175).

**Crotalaria retusa* L., aux noms vernaculaires créoles évocateurs : sonnette, tcha-tcha ou encore pois-zombi, est une espèce herbacée annuelle suffrutescente très commune aux Antilles ; mais son aire de répartition s'étend bien au-delà : elle se retrouve dans toutes les régions aux latitudes tropicales ou subtropicales, qu'elles soient situées en Afrique, aux Amériques, en Asie ou en Océanie (Figure 61) (151–153,181).

Crotalaria retusa L. élabore de nombreux alcaloïdes pyrrolizidiniques d'une grande toxicité. La majorité sont des macrocycles en C₁₁ porteurs de la (+)-rétronécine (monocrotaline, spectabiline) ou de l'otonécine (rétusamine et crosempérine) ; mais un composé non toxique, à la nécine saturé, est également détecté (rétusine) (151,152,180).



Figure 61 : *Crotalaria retusa* L.

[D'après (181)]

Malgré la présence de substances délétères, les médecines ayurvédique et antillaise attribuent plusieurs vertus à *Crotalaria retusa* L. et utilisent l'intégralité de la plante. En usage externe, elle guérirait les infections cutanées (gale, impétigo...) ; et par voie orale, elle calmerait la toux, la fièvre, les crises d'asthme, la dyspepsie ou les stomatites (151,152).

4.3.2. *Orchidaceae*

Avec plus de 20 000 espèces en son sein, la famille des *Orchidaceae* est la deuxième famille la plus importante des Angiospermes et la première des Monocotylédones (153). Mais pour ce qui est de la production des alcaloïdes pyrrolizidiniques, peu d'entre elles sont pourvues de l'arsenal biosynthétique nécessaire (41). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques élaborés par les *Orchidaceae* présentent quelques spécificités structurales telles qu'une prédominance d'acides néciques aromatiques, des *O*-glycosylations et une nécine systématiquement saturée (2,180).

Parmi les espèces d'*Orchidaceae* élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, nous retrouvons *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. et *Vanda cristata* Wall. ex Lindl., deux orchidées croissant dans les régions montagneuses tropicales et subtropicales (Figure 62) (143,144,150,182).

Liparis nervosa (Thunb.) Lindl. synthétise uniquement des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type phalænopsine morphologiquement très proches (nervosines I à VII, nervosines X à XV, paludosine et auriculine) dont les différences reposent essentiellement sur le type de nécine (la (-)-lindélofidine ou la (-)-laburnine) et l'ose *O*-glycosylé à l'acide nécique aromatique (143,144).

Tandis que *Vanda cristata* Wall. ex Lindl. ne produit qu'un unique alcaloïde pyrrolizidinique à la structure peu courante : une simple nécine saturée seulement estérifiée à l'acide acétique en C-9 (acétyllaburnine) (150,180).



Figure 62 : *Vanda cristata* Wall. ex Lindl.
[D'après (182)]

4.3.3. Poaceae

Toujours dans les Monocotylédones, la famille des *Poaceae* renferme deux espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques appartenant au genre *Lolium* qui se démarque des autres membres de ce taxon (2). Soulignons effectivement que les *Lolium sp.* concentrent dans leurs tissus une catégorie d'alcaloïdes pyrrolizidiniques très particuliers : les lolines, des pyrrolizidines dont le carbone C-1 porte un groupe amine et dont les carbones C-2 et C-7 sont reliés par un pont éther-oxyde formant dès lors un troisième cycle ! En réalité, la plupart des *Lolium sp.* ne sont pas en mesure de synthétiser les lolines, ce sont des champignons parasites endophytes du genre *Epichloe* (*Clavicipitaceae*) qui s'en chargent pour elles (2).

✿ *Lolium perenne* L., l'ivraie vivace (Figure 63), et *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh., la fétuque élevée, se distinguent ainsi des autres *Lolium sp.* par le simple fait qu'elles élaborent elles-mêmes leurs alcaloïdes pyrrolizidiniques (2,165,183) !

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques en question n'appartiennent pas à la catégorie des lolines et sont des dérivés *O*-glycosylés de la thésinine ((*E/Z*)-thésinine-4'-*O*- α -L-rhamnoside) que les deux espèces synthétisent, mais précisons que *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh. accumule également de la thésinine sous forme libre (2,183).

Quoiqu'il en soit, ces alcaloïdes pyrrolizidiniques sont constitués d'une nécine saturée : la (+)-lindélofidine, et donc ne représentent vraisemblablement aucun danger lors d'éventuelles contaminations alimentaires (2).



Figure 63 : *Lolium perenne* L.

[D'après (165)]

En conclusion, les alcaloïdes pyrrolizidiniques produits par les Monocotylédones représentent un risque sanitaire insignifiant comparés à ceux retrouvés au sein des Dicotylédones ; cependant, la prudence reste tout de même de rigueur lors d'un quelconque emploi de ces végétaux.

5. Présence résiduelle environnementale, recommandations et législations sanitaires

Depuis quelques années, les alcaloïdes pyrrolizidiniques suscitent un intérêt croissant de la part de nombreux scientifiques ; non pas pour leurs effets thérapeutiques, qui sont rappelés inexistantes, mais plutôt pour leur grande capacité à se disséminer dans l'environnement et leur fâcheuse tendance à se retrouver dans bon nombre de produits, notamment à visée alimentaire.

5.1. Voies de contamination

La large distribution de par le globe des espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques explique logiquement l'immense capacité de contamination de ces substances ; quant aux mécanismes par lesquels elle se produit, ils sont pour leur part multiples et variés.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent en effet contaminer les denrées alimentaires par quatre voies de transmission plus ou moins prépondérantes :

- la contamination des cultures végétales destinées à la consommation humaine qui est de loin la voie majoritaire et qui se divise par ailleurs en plusieurs mécanismes complémentaires (184) ;

- la contamination du miel et de ses dérivés par des grains de pollen d'espèces élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qui est aussi une source conséquente d'exposition involontaire à ces composés (184) ;

- la contamination tout simplement directe par la consommation de végétaux renfermant des alcaloïdes pyrrolizidiniques, que ce soit dans un but médicinal, alimentaire ou qu'elle fasse suite à une confusion botanique (184) ;

- la contamination fourragère impactant dans un premier temps les animaux d'élevage puis dans un second temps les populations humaines (184).

La détection d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les récoltes agricoles s'explique en grande partie par la présence de plants ou de graines d'espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. Toutefois, un phénomène de transmission horizontale existe également et permet aux molécules synthétisées par certaines plantes de se retrouver dans le faisceau cribro-vasculaire et dans les tissus d'autres plantes (184) !

Le transfert horizontal n'est pas propre aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et concerne presque toutes les substances du métabolisme secondaire des végétaux. Il se déroule de manière passive par la diffusion des molécules dans le sol, qu'elles s'échappent d'un organisme vivant ou mort. Une fois

présents dans le sol, les métabolites secondaires peuvent être absorbés par les plantes avoisinantes *via* leur système racinaire (185).

Concernant les alcaloïdes pyrrolizidiniques, leur absorption est possible par les végétaux qui croissent à proximité de la plante émettrice. Des teneurs significatives d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sont même retrouvées dans les végétaux situés à moins de 50 cm de la source d'émission ! En réalité, la diffusion terrestre des alcaloïdes pyrrolizidiniques se propage *a minima* dans un rayon de 4 m autour de la source d'émission mais dans une moindre mesure car lesdits composés ne se détectent alors qu'en quantité minime voire à l'état de traces dans les plantes les ayant absorbés. Autre fait intéressant, les organes aériens des plantes acceptrices concentrent davantage les alcaloïdes pyrrolizidiniques que les organes racinaires. Cela s'explique par le rôle de transporteur qu'effectue le xylème avec malheureusement comme conséquence un accroissement du risque d'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques étant donné que la plupart des aliments d'origine végétale proviennent des organes aériens (fruits, feuilles, etc.) (186).

Qui plus est, seuls les composés biosynthétiques finaux se retrouvent excrétés dans l'environnement souterrain ; or ce sont généralement les structures moléculaires les plus toxiques... Par exemple, *Jacobaea vulgaris* Gaertn. ne libère dans le sol que de la jacobine, de l'érucifoline, de la sénéciphylline ou des composés apparentés, et en aucun cas ses racines ne sécrètent le précurseur original : la sénécionine (185) !

À titre indicatif, la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le sol conduit également à retrouver ces molécules dans les milieux aquatiques, néanmoins à des concentrations dérisoires : généralement moins de 150 ng/L ; même si la proximité directe de plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques avec les cours d'eau peut faire grimper ces concentrations aquatiques bien au-delà (jusqu'à 500 mg/L !) (187).

5.2. Contamination alimentaire

À l'heure actuelle, on dénombre plusieurs catégories d'aliments sujets à la contamination par les alcaloïdes pyrrolizidiniques :

- les thés et les plantes pour infusions (188–190) ;
- les compléments alimentaires à base de plantes (188–190) ;
- les épices, les plantes aromatiques et les autres plantes culinaires (188,190) ;
- les produits à base de miel, de propolis ou de pollen (188–190) ;
- et les produits d'origine animale (viandes, laits, œufs...) (188–190).

En général, les alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés dans les plus grandes proportions appartiennent au type lycopsamine ou au type sénécionine, malgré le fait qu'il existe d'immenses variabilités qualitatives et quantitatives suivant le produit analysé. Quoiqu'il en soit, les alcaloïdes pyrrolizidiniques principalement présents dans les aliments forment un mélange plus ou moins équilibré de molécules sous la forme base et de molécules sous la forme amine-oxyde car il se peut quelquefois que les composés *N*-oxydés représentent jusqu'à plus de 90 % des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux détectés (94,191) ! Outre le fait d'être présents dans bon nombre de produits destinés à la consommation humaine et d'autant plus à des teneurs souvent préjudiciables, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont désormais à considérer comme des phytotoxines de premier ordre.

5.2.1. Thés et plantes pour infusions

Bien qu'aucune des principales plantes commercialisées dans le marché de l'infusion ne produit naturellement des alcaloïdes pyrrolizidiniques, les thés et les plantes pour infusions sont de très loin les premières sources d'exposition à ces phytotoxines pour la population générale qui en est d'ailleurs largement inconsciente (192). Effectivement sur un panel de 168 échantillons de thés et de plantes pour infusions vendus au sein de l'Union Européenne, 91 % d'entre eux contenaient au moins un alcaloïde pyrrolizidinique (189) ! Les plantes les plus fréquemment contaminées sont le rooibos, le thé noir et la menthe poivrée (Tableau IV) (191).

Quant aux alcaloïdes pyrrolizidiniques les plus détectés, ce sont la lycopsamine, l'intermédiaire, la sénécionine, la sénéciphylline et la rétrorsine, que ces composés soient sous leur forme de base ou de *N*-oxyde. De plus à elles seules, ces cinq molécules représentent régulièrement la quasi intégralité des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux quantifiés dans les plantes pour tisanes ! Dans la camomille, la menthe poivrée et le thé vert, la proportion de ces cinq alcaloïdes pyrrolizidiniques est respectivement de 90 %, 83 % et 78 %. Dans le thé noir, ces cinq mêmes substances constituent 95 % des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux mais avec une large prédominance des monoesters (intermédiaire et lycopsamine) qui valent à ce propos 71 % du panel total. Enfin dans le rooibos, ce sont les diesters macrocycliques en C₁₂ (sénécionine, sénéciphylline et rétrorsine) qui dominent le panel représentant 92 % des alcaloïdes pyrrolizidiniques totaux (193).

Produit	Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques			
		Moyenne (en µg/kg)	95 ^{ème} centile (en µg/kg)	Maximum (en µg/kg)	Médiane (en µg/kg)
Camomille	86	285	869	1394	136
Fenouil	57	48	528	904	1,4
Mélange de plantes	95	449	1694	1929	192
Menthe poivrée	93	506	2090	4401	204
Rooibos	96	609	1656	4805	253
Thé noir	94	585	2893	4062	132
Thé vert	85	438	1384	3917	40

Tableau IV : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des thés et des autres plantes pour infusions (dans la matière sèche avant infusion)

[D'après (94,191)]

La différence qualitative du panel d'alcaloïdes pyrrolizidiniques entre ces plantes qui n'en produisent pas s'explique seulement par le type de milieu dans lequel elles sont cultivées et donc par les différentes espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques qu'elles côtoient durant leur croissance. C'est le cas, par exemple, du rooibos dont les cultures se trouvent principalement en Afrique du Sud, une contrée réputée pour ses vastes et nombreuses populations de *Senecio sp.* dont notamment l'envahissant séneçon du Cap, *Senecio inaequidens* DC. (153,191).

Précisons que lors de l'infusion, l'extraction des alcaloïdes pyrrolizidiniques n'est pas totale et une grande partie de ces molécules reste emprisonnée au sein de la matière sèche. Il est donc important de noter qu'après infusion, les alcaloïdes pyrrolizidiniques se retrouvant dans la tisane sont présents à des concentrations largement plus faibles mais qui restent toutefois toujours significatives d'un point de vue sanitaire et notamment pour les grands amateurs de thés et autres tisanes (Tableau V) (191).

Produit	Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques			
		Moyenne (en µg/L)	95 ^{ème} centile (en µg/L)	Maximum (en µg/L)	Médiane (en µg/L)
Camomille	86	3,8	12	19	1,8
Mélange de plantes	95	6,0	23	26	2,6
Menthe poivrée	93	6,8	28	59	2,7
Rooibos	96	8,1	22	64	3,4
Thé noir	94	7,8	39	54	1,8
Thé vert	85	5,8	19	52	0,5

Tableau V : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des thés et des autres plantes pour infusions (dans le liquide après infusion)
[D'après (191)]

5.2.2. Compléments alimentaires et médicaments à base de plantes

Concernant les compléments alimentaires et les médicaments à base de plantes, leur composition végétale permet de les classer en deux catégories : ceux renfermant des plantes qui produisent naturellement des alcaloïdes pyrrolizidiniques et ceux constitués de plantes qui en sont métaboliquement incapables. Pour information et malgré cette dichotomie, environ 60 % des compléments alimentaires toute composition végétale confondue contiennent des alcaloïdes pyrrolizidiniques avec parfois quelques surprises constitutives (189).

La première catégorie est logiquement la plus riche en ces phytotoxines ; cependant suivant la plante, le type de drogue et la forme galénique, la concentration en ces composés varie énormément (Tableau VI) (189,191). S'agissant des produits uniquement constitués de matière végétale à infuser ou en poudre, leur concentration en alcaloïdes pyrrolizidiniques est excessivement élevée ; par exemple :

- dans *Arnebia euchroma* (Royle ex Benth.) I.M.Johnst., elle frôle les 25,6 mg/kg (194) ;
- dans *Borago officinalis* L., elle dépasse les 31,1 mg/kg (191) ;
- dans *Eupatorium cannabinum* L., elle atteint aisément plus de 2,4 g/kg (soit l'équivalent de 0,24 % du poids total de la matière sèche !) (191) ;

- dans *Lithospermum officinale* L., elle frôle les 14,6 mg/kg (191) ;
- dans *Symphytum officinale* L. (feuilles seules), elle atteint 17,6 mg/kg (191) ;
- et dans *Tussilago farfara* L., elle est presque à 5,6 mg/kg (pour les spécimens européens) voire à plus de 17,6 mg/kg (pour les spécimens asiatiques) (191,194).

À vrai dire, seuls les produits à base de matière sèche de *Petasites hybridus* (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. semblent contenir des alcaloïdes pyrrolizidiniques en faible quantité (à peine 27,1 µg/kg) (191).

Enfin, certaines formulations obtenues à partir de plantes élaboratrices d'alcaloïdes n'en contiennent tout simplement aucun ou au minimum en deçà du seuil de détectabilité, comme c'est le cas pour les huiles issues des graines de *Borago officinalis* L. ou encore d'*Echium vulgare* L. (Tableau VI) (191).

La seconde catégorie de compléments alimentaires et de médicaments à base de plantes est évidemment moins contaminée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques ; toutefois selon l'espèce végétale, la concentration de ces molécules peut parfois s'avérer être conséquente. Ces variations trouvent leur origine dans les préférences environnementales et phytosociologiques des espèces végétales analysées ; les plantes les plus à même de stocker des alcaloïdes pyrrolizidiniques en grande quantité dans leurs tissus croissent en réalité dans des milieux qui sont concomitamment peuplés d'espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ou du moins facilement colonisés par ces dernières (191).

Fort heureusement, seules quelques plantes médicinales sont particulièrement sujettes au transfert horizontal des alcaloïdes pyrrolizidiniques et parmi celles-ci, une dizaine environ possèdent un ou plusieurs de leurs organes inscrits à la Pharmacopée européenne :

- les parties aériennes d'alchémille, *Alchemilla vulgaris* L. (195) ;
- la fleur de matricaire (ou camomille allemande), *Matricaria chamomilla* L. (195) ;
- la feuille de mélisse, *Melissa officinalis* L. (195) ;
- la feuille de menthe poivrée, *Mentha × piperita* L. (195) ;
- les sommités fleuries de millepertuis, *Hypericum perforatum* L. (195) ;
- les parties aériennes de passiflore, *Passiflora incarnata* L. (195) ;
- les parties aériennes et souterraines de pissenlit, *Taraxacum officinale* Weber ex F.H.Wigg. (195) ;
- la racine de réglisse, *Glycyrrhiza glabra* L. (195) ;
- la feuille de sauge officinale, *Salvia officinalis* L. (195) ;
- et les parties aériennes de thym, *Thymus vulgaris* L. (195).

Ces dix plantes médicinales bénéficient donc en principe d'une surveillance sanitaire renforcée, du moins lorsque ces végétaux sont vendus tels quels ou entrent dans la composition de médicaments à base de plantes, car soulignons que les contrôles qualitatifs sont presque inexistantes lorsqu'il s'agit des compléments alimentaires...

Produits à base :		Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques		
			Moyenne (en µg/kg)	Maximum (en µg/kg)	Médiane (en µg/kg)
De millepertuis (<i>Hypericum perforatum</i> L.)		87	924	6176	722
De valériane (<i>Valeriana officinalis</i> L.)		28	32	444	0 †
D'une seule autre plante non productrice d'alcaloïdes pyrrolizidiniques		60	113	1926	5,1
D'un mélange de plantes non productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques		78	713	8488	73
De plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques	Pour infusion*	100	6438	31 101	1626
	En poudre ou en extrait	78	196 534	2 410 275	39
	En complexe huileux	0	/ ‡	/ ‡	/ ‡

Tableau VI : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des compléments alimentaires et des médicaments à base de plantes

(* sur matière sèche ; † valeur nulle car taux de positivité < 50 % ; ‡ valeur non calculable)

[D'après (189)]

Outre ces dix espèces végétales, notons également que la pulmonaire officinale (*Pulmonaria officinalis* L.) et le séné d'Alexandrie (*Senna alexandrina* Mill.) contiennent régulièrement des alcaloïdes pyrrolizidiniques à des concentrations non négligeables : respectivement à une moyenne de 842 µg/kg et 199 µg/kg (191,194). À ce propos, il est d'ailleurs important de signaler que *Pulmonaria officinalis* L. est l'une des très rares *Boraginaceae* à ne pas pouvoir synthétiser d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et pourrait ainsi passer de prime abord pour une plante médicinale exempte de toute hépatotoxicité, mais il n'en est rien (36)... Et comble de l'ironie, la pulmonaire

officinale est contaminée par des mono- et des diesters du type lycopsamine, le motif structurel par excellence des alcaloïdes pyrrolizidiniques élaborés par les *Boraginaceae* (191) !

Quoiqu'il en soit, la plante médicinale la plus préoccupante est assurément *Hypericum perforatum* L. car, non seulement contaminé par les alcaloïdes pyrrolizidiniques quasi systématiquement (près de 90 % des échantillons analysés), il l'est en plus à de très fortes concentrations pour une plante non productrice de ces molécules (moyenne de 924 µg/kg et médiane de 722 µg/kg) (Tableau VI) (189) ! Déjà que l'utilisation du millepertuis devait être grandement limitée compte tenu de son effet inducteur sur le CYP3A4, et en particulier chez les personnes ayant un traitement médicamenteux dit conventionnel, que la ou les substances actives le constituant soient directement métabolisées par cette isoforme de cytochromes P450 ou non, l'emploi d'*Hypericum perforatum* L. devient aujourd'hui presque inopportun. En effet, la consommation de millepertuis à visée thérapeutique (dépression et autres troubles apparentés) entraîne, d'une part, une chronicité de traitement et donc potentiellement une exposition prolongée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et, d'autre part, l'induction du CYP3A4 causée par le millepertuis accroît théoriquement le métabolisme de ces composés en déshydropyrrolizidines, certes hépatotoxiques dans un premier temps mais génotoxiques dans un second temps et même tumorigènes sur le long terme...

Enfin pour conclure sur les plantes majoritairement retrouvées dans les compléments alimentaires et les médicaments à base de plantes, la valériane (*Valeriana officinalis* L.) est l'une des moins souvent contaminée par les alcaloïdes pyrrolizidiniques car son taux de positivité et sa teneur moyenne sont relativement bas (28 % et 32 µg/kg) (Tableau VI) (189).

5.2.3. Épices, plantes aromatiques et autres plantes culinaires

Les plantes culinaires *lato sensu* représentent une source d'exposition quotidienne aux alcaloïdes pyrrolizidiniques largement insoupçonnée et pourtant bel et bien réelle. Effectivement, bon nombre des végétaux employés dans l'assaisonnement subissent une contamination horizontale de la part de ces phytotoxines ; mais pour la plupart d'entre eux, la fréquence et la teneur de cette contamination sont globalement faibles ou modérées. Les espèces végétales condimentaires emmagasinant les alcaloïdes pyrrolizidiniques à de très fortes concentrations ne sont en réalité qu'une poignée et appartiennent à deux familles botaniques grandes pourvoyeuses de plantes

culinaires : le cumin et la livèche pour les *Apiaceae* et l'origan et la marjolaine pour les *Lamiaceae* (Tableau VII) (196).

Produit	Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques			
		Moyenne (en µg/kg)	95 ^{ème} centile (en µg/kg)	Maximum (en µg/kg)	Médiane (en µg/kg)
Aneth	35	52	/ †	681	0 ‡
Basilic	32	12	68	142	0 ‡
Carvi	35	0,6	2,4	8,5	0 ‡
Ciboulette	30	56	/ †	540	0 ‡
Cumin	100	641	/ †	4307	348
Curry*	100	20	/ †	89	2,8
Gingembre	69	3,9	/ †	18	0,5
Livèche	82	1710	/ †	6256	1073
Marjolaine	97	58	152	524	24
Mélange d'herbes	76	648	/ †	3818	86
Origan	87	3140	17 021	24 621	163
Persil	66	189	694	3297	14
Poivre	10	0,1	0,7	1,8	0 ‡
Romarin	10	3,2	6,8	122	0 ‡
Sarriette	79	150	799	1109	7,0
Thym	62	49	191	254	4,3

Tableau VII : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des épices, des plantes aromatiques et des autres plantes culinaires

(*mélange plus ou moins variable d'épices mais très régulièrement composé de cumin ; † valeur non déterminée ; ‡ valeur nulle car taux de positivité < 50 %) [D'après (94,196)]

À l'instar des autres denrées végétales contaminées par cette catégorie de phytotoxines, les épices, les plantes aromatiques et les autres plantes culinaires concentrent les alcaloïdes pyrrolizidiniques émis par les espèces productrices vivant dans le même environnement qu'elles. C'est pourquoi l'origine géographique des plantes culinaires *lato sensu* influe assurément sur leur composition qualitative en alcaloïdes pyrrolizidiniques. D'une manière générale, celles provenant du bassin méditerranéen oriental (Grèce, Turquie...) ou des Balkans (Albanie, Croatie...) sont riches en molécules du type lycopsamine (ou ses sous-types structurels dérivés), synonymes d'une contamination essentiellement imputable aux *Boraginaceae* ; tandis que celles originaires d'Europe centrale (Allemagne, Pologne...) ont un panel principalement constitué de composés du type sénécionine (ou ses sous-types structurels dérivés), témoin d'une contamination majoritairement médiée par des *Senecioneae*. Enfin, les plantes condimentaires cultivées dans les régions de Méditerranée occidentale (Espagne, Maroc, Tunisie...) comportent, quant à elles, des panels d'alcaloïdes pyrrolizidiniques foncièrement mixtes car les proportions entre les types lycopsamine et sénécionine sont quasi semblables (196).

De plus, l'origine géographique semble *a priori* également impacter l'intensité de la contamination des aromates aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. À titre d'exemples, l'origan polonais est bien moins concentré en ces substances que les origans grecs ou turcs : moyenne respective de 642 µg/kg (Pologne), de 6407 µg/kg (Grèce) et de 4407 µg/kg (Turquie) ; de même pour la sarriette dont la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques est extrêmement variable d'un pays de production à l'autre : concentration moyenne de 0,3 µg/kg (Allemagne), de 17 µg/kg (Pologne), de 390 µg/kg (Croatie) et de 892 µg/kg (Albanie) (196) !

Ceci étant dit, rien ne permet de déterminer avec certitude les causes exactes de ces variations quantitatives... En effet, le climat ne peut expliquer à lui seul ces écarts importants. Peut-être sont-ils dus à la composition du sol ou à la capacité d'absorption du système racinaire de chaque espèce végétale ? Cependant une chose est sûre, le type d'agriculture (conventionnelle ou biologique) n'a aucun impact sur le niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des végétaux destinés à l'alimentation humaine car des concentrations élevées en ces phytotoxines se détectent indistinctement dans les plantes issues de l'agriculture conventionnelle ou de l'agriculture biologique. Autrement dit, le mode de production agricole n'est nullement un garant de la réduction de l'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques (196).

Fort heureusement, les plantes condimentaires sont par essence vouées à être ingérées en faible quantité ; ainsi malgré le fait que nombre d'entre elles atteignent parfois des teneurs

dépassant le milligramme par kilogramme, la portion journalière des épices, des plantes aromatiques ou des autres plantes culinaires ne représentent que quelques grammes. Néanmoins suivant le type d'aromates, la quantité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques peut parfois s'avérer non négligeable... Par exemple, l'origan se retrouve dans de nombreuses préparations aux saveurs méditerranéennes (pesto, sauce tomate, etc.) ; le cumin fait quant à lui partie de plusieurs mélanges plus ou moins épicés (curry, chili, etc.) ; et n'oublions pas non plus la bourrache qui s'emploie quelquefois en gastronomie, notamment en sauce comme dans la fameuse *Frankfurter Grüne Soße* « la sauce verte de Francfort ».

In fine, l'ubiquité alimentaire des plantes culinaires emmagasinant des alcaloïdes pyrrolizidiniques accroît potentiellement l'exposition quotidienne cumulée d'une frange conséquente de la population à ces molécules et représente donc une source de contamination à ne pas prendre à la légère (94,190,196).

5.2.4. Miels et produits à base de pollen ou de propolis

Comme nous l'avons déjà vu, les plantes élaborant des alcaloïdes pyrrolizidiniques privilégient leur stockage au niveau des tissus en développement et en particulier ceux des organes reproducteurs ; si bien que ces composés se retrouvent finalement jusque dans les grains de pollen (197) ! Même si tous les produits de la ruche sont contaminés par les alcaloïdes pyrrolizidiniques (Tableau VIII), le miel est la principale source d'exposition à ces substances pour cette catégorie alimentaire mais aussi le produit le plus préoccupant d'un point de vue sanitaire, toutes denrées confondues, compte tenu de sa portion quotidienne moyenne étant parmi l'une des plus élevées (190,193).

En principe, les produits à base de pollen, de gelée royale ou de propolis contiennent une majorité d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme d'amine-oxyde (entre 70 et 95 %) ; là où le miel en est très souvent dépourvu et ne comporte presque que des alcaloïdes pyrrolizidiniques sous la forme base (> 99 %) (189,190). Cette absence pourrait s'expliquer par une plus forte dégradation des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques durant le stockage des échantillons à -20 °C ou bien par l'activité des enzymes digestives présentes dans le miel et sécrétées par les abeilles dans leur salive (198).

Produit	Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques			
		Moyenne (en µg/kg)	95 ^{ème} centile (en µg/kg)	Maximum (en µg/kg)	Médiane (en µg/kg)
Pollen (complément alimentaire)	100	576	/ †	1911	330
Propolis ou gelée royale (complément alimentaire)	47	7,6	/ †	48	0 ‡
Miel	93	28	72	273	20

Tableau VIII : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des produits à base de miel, de pollen ou de propolis

(† valeur non déterminée ; ‡ valeur nulle car taux de positivité < 50 %) [D'après (189,190)]

Bref quoiqu'il en soit, les alcaloïdes pyrrolizidiniques les plus fréquemment retrouvés dans le panel des échantillons de miel testés sont l'échimidine (84 %), la lycopsamine (64 %) et l'échiumine (55 %) mais la composition qualitative des produits apicoles est en réalité intrinsèquement dépendante du lieu et de la saison de récolte (190). D'une part, il est vrai que les *Boraginaceae* (notamment les *Echium sp.*) sont d'importantes plantes mellifères attirant *de facto* davantage les pollinisateurs (dont les abeilles domestiques) et il est donc tout à fait logique de retrouver dans le miel des teneurs élevées en alcaloïdes pyrrolizidiniques ayant une structure caractéristique de cette famille botanique (190). Mais d'autre part, le taux de ces alcaloïdes pyrrolizidiniques n'est maximal que durant le printemps puis diminue pendant l'été avec l'apogée de la floraison des *Asteraceae* (197,199).

Certes, les *Eupatorieae* produisent également des alcaloïdes pyrrolizidiniques du type lycopsamine mais en aucun cas ils ne synthétisent de l'échimidine, ce qui permet de distinguer assez vaguement par quel taxon le miel a été contaminé et à quelle période. En outre au cours de l'été, un accroissement des molécules du type sénécionine s'observe généralement mais n'atteint jamais les concentrations maximales que peuvent atteindre les composés du type lycopsamine. Bien évidemment suivant les conditions climatiques et l'environnement de butinage des abeilles, la composition qualitative du miel récolté peut diverger de ces généralités (197,199).

5.2.5. Produits laitiers, viandes et œufs

Les aliments d'origine animale sont certainement les moins enclins à contenir des alcaloïdes pyrrolizidiniques et lorsque cela est le cas, ce n'est alors qu'à de très faibles concentrations (≈ 100 ng/kg ou ≈ 100 ng/L) (Tableau IX) (189,191). Ce niveau minime de contamination trouve son explication dans la toxicocinétique de ces phytotoxines qui sont métabolisées par le tissu hépatique et n'arrivent donc intactes qu'en infime quantité dans les autres organes des animaux. Toutefois, le revers de la médaille est — à l'instar des humains — une hépatotoxicité en cas de trop forte ingestion de plants d'espèces productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ou de fourrage contaminé par celles-ci (200–202). À ce propos, la luzerne, plante alimentaire très riche en protéines utilisée dans l'alimentation du bétail, peut contenir jusqu'à 637 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (203). Fort heureusement, cette concentration semble plutôt inoffensive pour les bovins dont le mécanisme de digestion les protège de l'hépatotoxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques. En effet, la rumination dégrade une bonne partie de ces composés dans le tractus digestif avant que ceux-là ne puissent être absorbés puis métabolisés par les CYP450 hépatiques, limitant alors grandement les conséquences délétères pour les cellules des sinusoides hépatiques comparées aux espèces monogastriques (201).

Dans les échantillons laitiers positifs, les alcaloïdes pyrrolizidiniques prédominants sont du type sénécionine et plus précisément du sous-type senkirkine (senkirkine et otosénine) certainement en raison de leur lipophilie accrue, même si la jacoline et la rétrorsine ne sont pas non plus en reste. Les *Senecioneae* étant naturellement des espèces plus champêtres que les autres clades élaborant des alcaloïdes pyrrolizidiniques, il est normal et surtout attendu que le type structurel propre à cette tribu représente la principale source de contamination du bétail, et par extension, les denrées en étant issues. Indubitablement, quelques métabolites du type lycopsamine des *Boraginaceae* et des *Eupatorieae* se retrouvent aussi dans les laits mais dans une moindre mesure (191).

Et quant aux rares échantillons d'œufs s'avérant positifs, les molécules du type lycopsamine et celles du type sénécionine sont détectées en quantité presque équivalente (191).

Les procédés de fabrication des produits laitiers analysés nécessitent une perte importante de la matière première : soit par le caillage du lait (coagulation) et l'éviction du petit-lait en ce qui concerne les fromages ou par l'action des micro-organismes (fermentation) indispensable au processus d'obtention des yaourts. En somme, ces étapes altèrent nécessairement la concentration

initiale du lait en alcaloïdes pyrrolizidiniques sans forcément les ôter en totalité mais elles les font au moins passer en-deçà des seuils de détectabilité (Tableau IX).

Produit	Positivité (en %)	Teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques		
		Moyenne (en µg/kg ou en µg/L)	Maximum (en µg/kg ou en µg/L)	Médiane (en µg/kg ou en µg/L)
Lait de vache	6	/*	0,17	/*
Laite de chèvre	7	/*	0,11	/*
Yaourt	0	/*	/*	/*
Fromage à pâte pressée cuite ou non †	0	/*	/*	/*
Fromage à pâte molle et à croûte fleurie ‡	0	/*	/*	/*
Œufs frais	1	/*	0,12	/*
Viande de bœuf	0	/*	/*	/*
Viande de porc	0	/*	/*	/*
Viande de volaille	0	/*	/*	/*
Foie de bœuf	0	/*	/*	/*
Foie de porc	0	/*	/*	/*
Foie de volaille	0	/*	/*	/*

Tableau IX : Quantification du niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des aliments d'origine animale

(*valeur non déterminable ; † emmental et gouda ; ‡ brie et camembert) [D'après (189,191)]

D'une manière similaire, la prise en charge des alcaloïdes pyrrolizidiniques par le foie des espèces animales en ayant consommé conduit à des concentrations tissulaires indétectables lors des analyses des viandes des différentes espèces (Tableau IX). Ainsi, le transfert d'alcaloïdes pyrrolizidiniques de l'animal à l'Homme est théoriquement possible mais demeure invérifiable avec les outils analytiques actuels. En conclusion, les produits alimentaires d'origine animale ne sont pas

forcément tous exempts d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ; cependant, ils ne représentent aucun danger sanitaire au vu de l'infime quantité qu'ils renferment potentiellement.

5.3. Cas d'intoxication notables et rôle de prévention du pharmacien officinal

Même si les alcaloïdes pyrrolizidiniques réussissent à contaminer un grand nombre d'aliments divers et variés, le risque d'intoxication aiguë à ces toxines végétales réside quasi uniquement dans l'emploi de plantes médicinales en synthétisant naturellement. Pour pallier cela le pharmacien et l'équipe officinale jouent un rôle majeur auprès du patient tant dans l'information que dans la prévention car de nombreux cas d'intoxication aux alcaloïdes pyrrolizidiniques sont imputables à une automédication ou à la prescription d'un thérapeute peu compétent.

Par exemple, un adolescent de 13 ans atteint de la maladie de Crohn développa, suite à la prescription de la part d'un naturopathe de feuilles de consoude, un syndrome veino-occlusif après trois années de traitement ! Fort heureusement pour lui, il put se rétablir (204).

Une femme enceinte consomma pendant toute sa grossesse une tasse d'une préparation pour infusion (contenant entre autres du tussilage) qu'elle avait achetée en pharmacie (hic !) ; cinq semaines après sa naissance, son nouveau-né décéda d'une maladie veino-occlusive hépatique... La mère, elle, ne souffrit pas de l'exposition prolongée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques (204).

Sur les recommandations de son homéopathe, une femme consomma des infusions et des compléments alimentaires à base de consoude mais exacerba les posologies (une dizaine de tasses par jour et une poignée de comprimés par-ci, par-là !) ; si bien qu'en un an, elle fut atteinte d'un syndrome veino-occlusif. Elle recouvra par la suite un état de santé convenable tout en conservant néanmoins d'importantes séquelles hépatiques (204)...

Toujours aussi irresponsable, un jeune homme se prescrivit quatre à cinq jeunes feuilles de consoude quotidiennes durant une dizaine de jours et développa ainsi une maladie veino-occlusive hépatique aiguë qui conduisit à son décès (204).

Enfin, une femme enceinte friande d'aromates utilisa au quotidien et en abondance un mélange de plantes culinaires originaires de Turquie pour la préparation de ses plats, malheureusement celui-ci contenait énormément d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. Au bout de trente-et-une semaines d'aménorrhées, la mère fut atteinte d'une cholestase et d'un prurit ; quant à son fœtus, il développa une ascite et une hépatomégalie. Après une semaine de traitement, les soignants déclenchèrent l'accouchement mais le nouveau-né ne survécut pas et mourut en une douzaine d'heures (204)...

Ces événements tragiques nous rappellent tous l'importance d'une utilisation raisonnée des plantes médicinales qui sont certes naturelles mais pas pour autant inoffensives, un paradigme bien trop souvent avancé de nos jours. Ainsi, il est indispensable de systématiquement prodiguer des conseils lors de la délivrance de plantes médicinales, sous n'importe quelle forme qu'elles puissent être, et nous nous attarderons ici sur ceux à dispenser lorsqu'il s'agit des produits composés de végétaux producteurs d'alcaloïdes pyrrolizidiniques :

- **limiter la durée de traitement** au strict minimum :
 - **cinq jours** d'affilée maximum par **voie orale** (pour les plantes dont une telle utilisation est tolérée) et ne pas excéder **quatre semaines** de traitement cumulées **par an** ;
 - **quatorze jours** d'affilée maximum par **voie cutanée** et ne pas excéder **six semaines** de traitement cumulées **par an** ;
- **contre-indication** pour les **femmes enceintes** ou **allaitantes** ;
- à cela s'ajoute des conseils plus généraux :
 - privilégier l'achat de produits commercialisés en officine car ils sont soumis en règle générale à des contrôles plus poussés ;
 - respecter les posologies indiquées par le professionnel de santé ;
 - consulter un professionnel de santé en cas de persistance des symptômes après la fin du traitement afin d'avoir un nouvel avis diagnostique et si besoin une prise en charge réactualisée ;
 - appliquer les règles hygiéno-diététiques relatives à une alimentation saine et équilibrée et à la pratique d'une activité physique régulière ;
 - ...

5.4. Législations en vigueur et recommandations sanitaires

Grâce à l'incroyable capacité de diffusion des alcaloïdes pyrrolizidiniques vers les tissus d'espèces végétales qui n'en produisent pas, les types d'aliments contaminés par ces substances se révèlent finalement être légion. Les produits alimentaires d'origine végétale sont particulièrement concernés par ce transfert horizontal, obligeant ainsi les autorités sanitaires nationales ou supranationales à émettre des recommandations voire même à légiférer, il y a quelques années, quant aux teneurs maximales en alcaloïdes pyrrolizidiniques autorisées dans certaines catégories de denrées alimentaires.

5.4.1. Chronologie et évolution des recommandations sanitaires

Dès 1992, l'agence sanitaire fédérale allemande (*Bundesgesundheitsamt*) préconisa une ingestion d'alcaloïdes pyrrolizidiniques inférieure à 1 µg/j lors d'une consommation de plantes en contenant ne dépassant pas six semaines cumulées sur l'année ; et si l'utilisation dépassait cette durée, alors l'apport en alcaloïdes pyrrolizidiniques se réduisait à 0,1 µg/j (1,205).

En 1994, l'Autriche imposa aux fabricants de démontrer que les produits finaux issus de préparations médicinales confectionnées à partir de plantes élaboratrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques n'en contenaient aucun (1,205).

En 2000, la Belgique interdit tout bonnement la commercialisation des produits à base de plantes renfermant des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'attente d'une législation à l'échelle européenne (1,205).

En 2001, l'agence sanitaire australienne et néo-zélandaise (*Food Standards Australia New Zealand*) conseilla de ne pas excéder une exposition à ces phytotoxines supérieure à 1 µg/kg de poids corporel/j (ou µg/kg.pc/j) dans l'attente de données supplémentaires (205).

En 2008, un comité scientifique britannique indépendant (*Committee On Toxicity*) ayant l'oreille de l'agence sanitaire du Royaume-Uni établit deux valeurs d'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques, chacune rattachée à une conséquence oncologique : 0,1 µg/kg.pc/j (absence de cancer peu probable) et 0,007 µg/kg.pc/j (apparition d'un cancer peu probable) (1,205).

En 2011, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, de l'anglais *European Food Safety Authority*) décida de retenir la BMDL₁₀ (de l'anglais *BenchMark Dose Lower confidence limit of 10 %*) de la lasiocarpine (BMDL₁₀ = 70 µg/kg.pc/j) pour évaluer le risque d'exposition chronique aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et lui appliqua une marge d'exposition (MOE, de l'anglais *Margin Of Exposure*) de 10 000. Elle obtint ainsi la même valeur de référence que les agences sanitaires allemande et britannique, à savoir : 0,007 µg/kg.pc/j. Qui plus est, l'EFSA estima comme préoccupante l'exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques des bambins et des enfants gros consommateurs de miel (1,190,193,205).

Toutefois, certains auteurs relativisent quant à cette dangerosité potentielle en avançant que la portion de miel calculée par l'EFSA est quelque peu surestimée ; tout en considérant que la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques du miel ne devrait pas dépasser 71 µg/kg (pour les adultes) et 24 µg/kg (pour les enfants) (206).

En 2015, l'agence sanitaire néerlandaise (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*) limita à 1 µg/kg (ou 1 µg/L) la teneur dans toutes les préparations à base de plantes (1,205).

En 2016, le Comité pour les médicaments à base de plantes (HMPC, de l'anglais *Herbal Medicinal Products Committee*), par ailleurs rattaché à l'Agence européenne du médicament (EMA, de l'anglais *European Medicines Agency*), jugea qu'une harmonisation au sein de l'Union Européenne serait opportune et plus que bienvenue. En outre, l'HMPC considéra également comme acceptable, d'un point de vue de santé publique, une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques atteignant 1 µg/j (toutes origines confondues) durant une période de trois ans, le temps que les instances européennes légifèrent sur ces toxines végétales. Passé ce délai, le seuil serait abaissé à 0,35 µg/j — en s'appuyant sur les recommandations allemandes, anglo-saxonnes et européennes (0,007 µg/kg.pc/j) — et fut calculée pour une personne d'une masse corporelle de 50 kg (1,193,205).

En 2017, l'EFSA revit sa copie et se basa alors sur la BMDL₁₀ de la riddelliine (BMDL₁₀ = 237 µg/kg.pc/j), aux données plus complètes que pour la lasiocarpine, pour déterminer le point de référence de l'accroissement du risque cancérigène d'une exposition aux alcaloïdes pyrrolizidiniques. Celui-ci fut ensuite ajusté grâce à une MOE de 10 000 et aussi calculé pour une personne faisant 50 kg ; l'EFSA en conclut ainsi qu'une ingestion d'alcaloïdes pyrrolizidiniques équivalant à 1 µg/j serait tolérable (193,203,205,207).

En 2019, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) estima qu'il était nécessaire de renforcer la surveillance des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans certaines catégories de denrées alimentaires (thés et plantes pour infusions, produits à base de miel et compléments alimentaires) (193). Cette même année, l'HMPC accorda deux années supplémentaires à la période transitoire déjà octroyée afin que les débats et l'harmonisation européenne puissent se poursuivre sereinement (205).

En somme de par leur origine botanique et leurs conséquences sur la santé humaine, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont donc aujourd'hui considérés par les agences sanitaires nationales et supranationales comme des phytotoxines de premier ordre à surveiller étroitement. Suite à cela, les alertes sanitaires signalant les taux supérieurs aux normes fixées pour chaque produit permirent de quantifier le degré de non-conformité et ainsi d'estimer plus précisément les expositions aux alcaloïdes pyrrolizidiniques jusqu'alors insoupçonnées mais ayant pourtant des conséquences pernicieuses sur la santé des individus... Par exemple, plus de la moitié des alertes sanitaires relatives aux alcaloïdes pyrrolizidiniques recensées sur dix années (entre 2012 et 2021) se rapportaient à la catégorie des épices, herbes aromatiques et culinaires (57 %), venaient ensuite les produits à base de végétaux : thés (15 %), compléments alimentaires à base de plantes (13 %) puis

les plantes pour infusions (8 %) et enfin les produits à base de miel ou de pollen qui représentaient la part la plus faible ($\approx 7\%$) (188).

Malgré ces alertes sanitaires, des chercheurs constatèrent que depuis le rapport de l'HMPC, une nette diminution de la teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques s'était tout de même amorcée et que les catégories de denrées alimentaires soumises au seuil accordé par l'HMPC en 2016 respectaient de plus en plus la limite maximale fixée par ce dernier à $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$. Malheureusement, ils conclurent également qu'il sera impossible d'atteindre la valeur de $0,35\ \mu\text{g}/\text{j}$ souhaitée *in fine* par l'HMPC (208–210).

5.4.2. Législation de l'Union Européenne

C'est donc seulement le 18 décembre 2020 qu'un premier règlement fut pris par le Parlement européen pour imposer une teneur maximale en alcaloïdes pyrrolizidiniques à certains types de produits alimentaires (le règlement (UE) n° 2020/2040) et qui s'est appliqué à partir du 1^{er} juillet 2022. Par ailleurs, ce règlement spécifique fut rattaché juridiquement au règlement général relatif aux divers contaminants des denrées alimentaires (le règlement (CE) n° 1881/2006) (211).

Néanmoins, ce dernier texte juridique fut abrogé le 25 avril 2023 au profit d'un tout nouveau règlement général (le règlement (UE) n° 2023/915) et découlant d'une révision élargie de l'ancien règlement devenu depuis quelques temps obsolète : il datait effectivement de 2006... Prenant désormais en compte les très nombreux contaminants retrouvés dans les denrées alimentaires (mycotoxines, phytotoxines, métaux lourds, polluants organiques persistants fluorés...), le tout nouveau texte de loi est entré en vigueur au 1^{er} janvier 2024 pour ce qui est des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Leurs concentrations maximales actuellement tolérées au sein du territoire de l'Union Européenne varient suivant la catégorie de denrées alimentaires, dépendant entre autres du niveau de contamination inhérent à chaque produit et à son risque sanitaire imputable lors d'une consommation chronique (Tableau X) (212).

Enfin lors de la rédaction de la 11^{ème} édition de la Pharmacopée européenne, une monographie de contrôle relative à l'identification de vingt-huit alcaloïdes pyrrolizidiniques fut ajoutée (Annexe XI) pour définir une méthode d'analyse uniformisée au sein de l'Union Européenne (158).

2	Toxines végétales		
2.4	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Teneur maximale* (en µg/kg)	Remarques
2.4.1	Feuilles de bourrache (fraîches, congelées) mises sur le marché pour le consommateur final	750	†
2.4.2	Herbes séchées, à l'exception des produits énumérés au point 2.4.3	400	†
2.4.3	Bourrache, livèche, marjolaine et origan (produit séché) et mélanges composés exclusivement de ces herbes séchées	1000	†
2.4.4	Thé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) et thé aromatisé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) (produit séché), à l'exclusion du thé et du thé aromatisé visés au point 2.4.5	150	<i>Dans le cas des thés aux fruits séchés et aux herbes séchées, l'article 3 s'applique.</i> ‡,*
2.4.5	Thé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze), thé aromatisé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) et infusions (produit séché) et ingrédients destinés à être utilisés dans des infusions (produits séchés) pour nourrissons et enfants en bas âge	75	<i>Dans le cas des thés aux fruits séchés et aux herbes séchées, l'article 3 s'applique.</i> *
2.4.6	Thé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze), thé aromatisé (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) et infusions (produit liquide) pour nourrissons et enfants en bas âge	1,0	<i>Dans le cas des thés aux fruits séchés et aux herbes séchées, l'article 3 s'applique.</i> *

Tableau X : Denrées visées par le règlement (UE) 2023/915 de la Commission européenne du 25 avril 2023 relatif aux teneurs maximales en alcaloïdes pyrrolizidiniques autorisées dans les produits alimentaires
[D'après (212)]

2.4.7	Infusions (produit séché) et ingrédients destinés à être utilisés dans des infusions (produits séchés), à l'exclusion des produits énumérés aux points 2.4.5 et 2.4.8	200	†, ‡
2.4.8	Infusions (produit séché) et ingrédients destinés à être utilisés dans des infusions (produits séchés) de rooibos, d'anis vert (<i>Pimpinella anisum</i> L.) de mélisse, de camomille, de thym, de menthe poivrée, de verveine citronnée et des mélanges composés exclusivement de ces herbes séchées, à l'exclusion des infusions visées au point 2.4.5	400	‡
2.4.9	Cumin	400	
2.4.10	Compléments alimentaires contenant une préparation de plante, y compris les extraits, à l'exclusion des produits énumérés au point 2.4.11	400	<i>La teneur maximale s'applique aux compléments alimentaires tels que mis sur le marché.</i> †, **
2.4.11	Compléments alimentaires à base de pollen, pollen et produits de pollen	500	<i>La teneur maximale s'applique aux compléments alimentaires tels que mis sur le marché.</i>

Tableau X (suite) : Denrées visées par le règlement (UE) 2023/915 de la Commission européenne du 25 avril 2023 relatif aux teneurs maximales en alcaloïdes pyrrolizidiniques autorisées dans les produits alimentaires

{*}: Dans le cas des alcaloïdes pyrrolizidiniques, les teneurs maximales se rapportent aux concentrations inférieures, que l'on calcule en supposant que toutes les valeurs inférieures à la limite de quantification sont égales à zéro.

La teneur maximale correspond à l'estimation inférieure de la somme des 21 alcaloïdes pyrrolizidiniques suivants :

– échimidine, *N*-oxyde d'échimidine, europine, *N*-oxyde d'europine, héliotrine, *N*-oxyde d'héliotrine, intermédiaire, *N*-oxyde d'intermédiaire, lasiocarpine, *N*-oxyde de lasiocarpine, lycopsamine, *N*-oxyde de lycopsamine, rétrorsine, *N*-oxyde de rétrorsine, sénécionine, *N*-oxyde de

sénécionine, sénéciphylline, *N*-oxyde de sénéciphylline, sénécivernine, *N*-oxyde de sénécivernine, senkirkine ;

– et des 14 autres alcaloïdes pyrrolizidiniques suivants connus pour coéluer avec avec un ou plusieurs des 21 alcaloïdes pyrrolizidiniques identifiés ci-dessus, en utilisant certaines méthodes d'analyse utilisées actuellement :

– échinatine, indicine, rindérine (possible coélution avec l'intermédiaire et la lycopsamine) ;

– *N*-oxyde d'échinatine, *N*-oxyde d'indicine, *N*-oxyde de rindérine (possible coélution avec le *N*-oxyde d'intermédiaire et le *N*-oxyde de lycopsamine) ;

– intégerrimine (possible coélution avec la sénécionine et la sénécivernine) ;

– *N*-oxyde d'intégerrimine (possible coélution avec le *N*-oxyde de sénécionine et le *N*-oxyde de sénécivernine) ;

– héliosupine (possible coélution avec l'échimidine) ;

– *N*-oxyde d'héliosupine (possible coélution avec le *N*-oxyde d'échimidine) ;

– spartioïdine (possible coélution avec la sénéciphylline) ;

– *N*-oxyde de spartioïdine (possible coélution le *N*-oxyde de sénéciphylline) ;

– usaramine (possible coélution avec la rétrorsine) ;

– *N*-oxyde d'usaramine (possible coélution avec le *N*-oxyde de rétrorsine).

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques, qui peuvent être identifiés individuellement et séparément avec la méthode d'analyse utilisée, sont quantifiés et inclus dans la somme.

† : Sans préjudice de règles nationales plus restrictives dans certains États membres en ce qui concerne la mise sur le marché de végétaux contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

‡ : Le thé (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (produit séché) désigne :

– le thé (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (produit séché) à partir de feuilles, tiges et fleurs séchées (en sachets ou en vrac) utilisées pour la préparation d'un thé (produit liquide) ;

– et les thés instantanés. Dans le cas des extraits de thé en poudre, un facteur de concentration de 4 doit être appliqué.

* : On entend par « thé aromatisé » un thé possédant un « arôme » ou un « ingrédient alimentaire possédant des propriétés aromatisantes » au sens de l'article 3 du règlement (CE) n° 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinés à être utilisés dans et sur les

denrées alimentaires et modifiant le règlement (CEE) n° 1601/91 du Conseil, les règlements (CE) n° 2232/96 et (CE) n° 110/2008 et la directive 2000/13/CE (Journal Officiel L 354 du 31 décembre 2008, p. 34).

‡ : Les infusions (produit séché) désignent :

– les infusions (produit séché) de fleurs, de feuilles, de tiges, de racines et de toute autre partie de la plante (en sachets ou en vrac) utilisées pour la préparation d'une infusion (produit liquide) ;

– et les infusions instantanées. Dans le cas des extraits en poudre, un facteur de concentration de 4 doit être appliqué.

‡* : Les préparations de plantes pour compléments alimentaires sont obtenues à partir de substances botaniques (par exemple des plantes entières, parties de plantes, plantes fragmentées ou coupées) au moyen de divers procédés (par exemple le pressage, l'extraction, le fractionnement, la distillation, la concentration, le séchage et la fermentation). Les préparations botaniques comprennent les végétaux concassés ou pulvérisés, les parties de plantes, les algues, les champignons, les lichens, les teintures, les extraits, les huiles essentielles [autres que les huiles et les graisses végétales (à l'exclusion du beurre et de l'huile de coco) destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires], les jus obtenus par pression et les exsudats traités.} [D'après (212)]

5.4.3. Législation de la République Française

Un arrêté datant du 24 juin 2014 relatif aux plantes autorisées dans les compléments alimentaires interdit aux produits contenant de la bourrache d'être commercialisés s'il ne peut être démontré qu'ils renferment tout au plus 1 ppb d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, exception faite des préparations à base d'huile de graines de bourrache qui rappelons-le est naturellement exempte d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (< 0,2 ppb) (157).

Hormis donc l'arrêté précédent, il n'y a actuellement pas de textes législatifs qui se veulent être complémentaires ou plus restreignants que le règlement (UE) n° 2023/915. Cependant, l'entrée en vigueur au début de l'année 2024 de cette nouvelle législation européenne suscita grandement l'inquiétude des producteurs de plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM) qui s'alarmèrent déjà quelques années auparavant de l'impact qu'aurait l'augmentation des restrictions d'utilisation des pesticides sur le niveau de contamination aux alcaloïdes pyrrolizidiniques de leur

production (213). C'est ainsi que le 29 février 2024, un sénateur socialiste attira l'attention du Ministre de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire sur les conséquences qu'entraînait le nouveau règlement européen (entre 20 et 30 % de lots refusés) et lui demanda par quelles mesures il envisageait de pallier le manque pécuniaire auquel été soumis les producteurs de PPAM ; la réponse du Ministre est toujours attendue mais pourrait consister à accroître les investissements dans la recherche et le développement de nouvelles technologies de désherbage (214).

En somme, les alcaloïdes pyrrolizidiniques ne constituent donc pas seulement un enjeu sanitaire mais bel et bien un réel enjeu global impliquant tout autant les domaines de la santé publique, de l'agriculture, de l'économie et de l'environnement ! Malheureusement, ces derniers sont bien trop souvent difficiles à concilier simultanément...

Conclusion

En somme, les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des métabolites secondaires fascinants à bien des égards. D'abord de par leur richesse structurelle inouïe grâce à la grande diversité de nécines et d'acides néciques les constituant, mais également par le fait que les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont synthétisés par les principales familles botaniques faisant finalement de ceux-ci des molécules incontournables du monde végétal.

Malheureusement, l'omniprésence des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'environnement rend extrêmement difficile la totale éviction de ces composés des denrées alimentaires sujettes à leur contamination et maintient ainsi un risque constant et non négligeable d'exposition chronique à ces phytotoxines... Aux conséquences sanitaires désastreuses sur le long terme, ce type d'intoxication n'est pourtant pas le seul imputable aux alcaloïdes pyrrolizidiniques qui peuvent aussi causer des intoxications aiguë et subaiguë résultant quant à elles quasi exclusivement d'un mésusage de plantes réputées thérapeutiques dans une ou plusieurs médecines traditionnelles.

Le rôle de prévention, d'information et de conseil du pharmacien officinal est donc plus que jamais essentiel afin d'éviter notamment tout abus posologique des médicaments à base de plantes renfermant des alcaloïdes pyrrolizidiniques (tant dans le dosage que dans la durée) ou encore de rappeler les dangers de l'achat de ces produits hors du circuit pharmaceutique et de ceux de la cueillette amatrice, trop régulièrement propice à des confusions dues à un manque de connaissance botanique des participants.

Enfin, en complément des préconisations des pharmaciens officinaux s'ajoutent depuis peu de nouvelles réglementations émises par l'Union Européenne vis-à-vis des contaminants alimentaires (dont les alcaloïdes pyrrolizidiniques) dans l'objectif de réduire drastiquement la quantité de substances toxiques à laquelle la population est inconsciemment exposée.

Le Doyen de l'UFR de Pharmacie,
Christiane FORESTIER

La Présidente du Jury,
Catherine FELGINES

Bibliographie

1. Bruneton J, Poupon E. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 5e éd. Paris: Lavoisier Tec & doc; 2016.
2. Schramm S, Köhler N, Rozhon W. Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules*. 2019;24(3):498.
3. Moreira R, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1668.
4. Polisset M, Salles L. Chimie: chimie générale, chimie organique rappels de cours, exercices corrigés & annales. Paris: Ellipses; 2003. (PCEM).
5. Pomeroy AR, Raper C. Pyrrolizidine alkaloids: actions on muscarinic receptors in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol*. 1971;41(4):683-90.
6. A pKa Values Compilation by Dave Evans and D. H. Ripin [Internet]. [cité 3 janv 2023]. Disponible sur: https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/pka_data/evans_pKa_table.pdf
7. Craig A, Sheggeby G, Wicks C. Large scale extraction of pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobaea*). *Vet Hum Toxicol*. 1984;26:108-11.
8. Huxtable RJ, Yan CC, Wild S, Maxwell S, Cooper R. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. *Neurochem Res*. 1996;21(2):141-6.
9. Yu L, Li SFY. Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine. *Electrophoresis*. 2005;26(22):4360-7.
10. Kopp T, Abdel-Tawab M, Mizaikoff B. Extracting and Analyzing Pyrrolizidine Alkaloids in Medicinal Plants: A Review. *Toxins*. 2020;12(5):E320.
11. Cao K, Xu Y, Mu X, Zhang Q, Wang R, Lv J. Sensitive determination of pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* L. by field-amplified, sample-stacking, sweeping micellar electrokinetic chromatography. *J Sep Sci*. 2016;39(21):4243-50.
12. Herrmann M, Joppe H, Schmaus G. Thesinine-4'-O-β-D-glucoside the first glycosylated plant pyrrolizidine alkaloid from *Borago officinalis*. *Phytochemistry*. 2002;60(4):399-402.

13. Ehmann A. The van URK-Salkowski reagent — a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J Chromatogr A*. 1977;132(2):267-76.
14. Mattocks AR, Jukes R. Improved Field Tests for Toxic Pyrrolizidine Alkaloids. *J Nat Prod*. 1987;50(2):161-6.
15. Jork H, éditeur. *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*. Weinheim (Federal Republic of Germany) ; New York, NY (USA): VCH; 1990.
16. National Institute of Justice [Internet]. [cité 18 oct 2023]. Color Test Reagents/Kits for Preliminary Identification of Drugs of Abuse. Disponible sur: <https://nij.ojp.gov/library/publications/color-test-reagentskits-preliminary-identification-drugs-abuse-nij-standard>
17. Sailaja B, Sulthana BS, Sumanjali P. Development of novel identification tests for alkaloids. *J Glob Trends Pharm Sci*. 2017;8(4):4297-310.
18. Chemistry and Reaction Mechanisms of Rapid Tests for Drugs of Abuse and Precursors Chemicals [Internet]. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.unodc.org/pdf/scientific/SCITEC6.pdf>
19. Zhang F, Wang C hong, Xiong A zhen, Wang W, Yang L, Branford-White CJ, et al. Quantitative analysis of total retronecine esters-type pyrrolizidine alkaloids in plant by high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2007;605(1):94-101.
20. Hendriks H, Malingré TM, Elema ET. Pyrrolizidine alkaloids, flavonoids and volatile compounds in the genus *Eupatorium*: *Eupatorium cannabinum* L., an ancient drug with new perspectives. *Pharm Weekbl Sci*. 1983;5(6):281-6.
21. Janeš D, Kreft S. TLC densitometric method for screening of lycopsamine in comfrey root (*Symphytum officinale* L.) extracts using retrorsine as a reference compound. *Acta Pharm*. 2014;64(4):503-8.
22. Hall HKJr. Correlation of the Base Strengths of Amines. *J Am Chem Soc*. 1957;79(20):5441-4.
23. Lichman BR. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep*. 2021;38(1):103-29.
24. Robins DJ, Sweeney JR. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Derivation of retronecine from L-arginine and L-ornithine. *Phytochemistry*. 1983;22(2):457-9.
25. Ober D, Harms R, Witte L, Hartmann T. Molecular Evolution by Change of Function: Alkaloid-specific Homospermidine synthase retained all properties of Deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12805-12.

26. Ober D, Kaltenecker E. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 2009;70(15):1687-95.
27. Kaltenecker E, Eich E, Ober D. Evolution of Homospermidine Synthase in the *Convolvulaceae*: A Story of Gene Duplication, Gene Loss, and Periods of Various Selection Pressures. *Plant Cell*. 2013;25(4):1213-27.
28. Prakashrao AS, Beuerle T, Simões ARG, Hopf C, Çiçek SS, Stegemann T, et al. The long road of functional recruitment—The evolution of a gene duplicate to pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in the morning glories (*Convolvulaceae*). *Plant Direct*. 2022;6(7):e420.
29. Gill GP, Bryant CJ, Fokin M, Huege J, Fraser K, Jones C, et al. Low pyrrolizidine alkaloid levels in perennial ryegrass is associated with the absence of a homospermidine synthase gene. *BMC Plant Biol*. 2018;18:56.
30. Reimann A, Nurhayati N, Backenköhler A, Ober D. Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid–Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages. *Plant Cell*. 2004;16(10):2772-84.
31. Livshultz T, Kaltenecker E, Straub SCK, Weitemier K, Hirsch E, Koval K, et al. Evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Apocynaceae*: revisiting the defence de-escalation hypothesis. *New Phytol*. 2018;218(2):762-73.
32. Dreger M, Stanisławska M, Krajewska-Patan A, Mielcarek S, Mikołajczak PŁ, Buchwald W. Pyrrolizidine alkaloids – chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. 2009;55(4).
33. Zakaria MM, Stegemann T, Sievert C, Kruse LH, Kaltenecker E, Girreser U, et al. Insights into polyamine metabolism: homospermidine is double-oxidized in two discrete steps by a single copper-containing amine oxidase in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell*. 2022;34(6):2364-82.
34. Mydy LS, Chigumba DN, Kersten RD. Plant Copper Metalloenzymes As Prospects for New Metabolism Involving Aromatic Compounds. *Front Plant Sci* [Internet]. 2021 [cité 27 janv 2023];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.692108>
35. Johnson BJ, Yukl ET, Klema VJ, Klinman JP, Wilmot CM. Structural Snapshots from the Oxidative Half-reaction of a Copper Amine Oxidase: Implications for O₂ activation. *J Biol Chem*. 2013;288(39):28409-17.
36. Röder E. Medicinal Plants in Europe Containing Pyrrolizidine Alkaloids. *Pharm*. 1995;50:83-98.
37. Binder S. Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. 2010;8:e0137.

38. Schertl P, Danne L, Braun HP. 3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase Is Involved in Both, Valine and Isoleucine Degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 2017;175(1):51-61.
39. McGaw BA, Woolley JG. The biosynthesis of angelic acid in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry.* 1979;18(10):1647-9.
40. Culvenor CCJ, Geissman TA. The Alkaloids of *Senecio mikanioides* Otto. Sarracine and Sarracine *N*-Oxide. *J Org Chem.* 1961;26(9):3045-50.
41. Langel D, Ober D, Pelsler P. The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the *Senecioneae*. *Phytochem Rev.* 2011;10:3-74.
42. El-Shazly A, Wink M. Diversity of Pyrrolizidine Alkaloids in the *Boraginaceae* Structures, Distribution, and Biological Properties. *Diversity.* 2014;6(2):188-282.
43. Weber S, Eisenreich W, Bacher A, Hartmann T. Pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. *Phytochemistry.* 1999;50(6):1005-14.
44. Crout DHG. Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of echimidinic acid. *J Chem Soc C Org.* 1966;(0):1968-72.
45. Chipman DM, Duggleby RG, Tittmann K. Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(5):475-81.
46. Chipman D, Barak Z, Schloss JV. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol.* 1998;1385(2):401-19.
47. Jin MY, Kim SM, Han H, Ryu DH, Yang JW. Switching Regioselectivity in Crossed Acyloin Condensations between Aromatic Aldehydes and Acetaldehyde by Altering *N*-Heterocyclic Carbene Catalysts. *Org Lett.* 2011;13(5):880-3.
48. Tittmann K, Golbik R, Uhlemann K, Khailova L, Schneider G, Patel M, et al. NMR Analysis of Covalent Intermediates in Thiamin Diphosphate Enzymes. *Biochemistry.* 2003;42(26):7885-91.
49. Kaluzna IA, David Rozzell J, Kambourakis S. Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron Asymmetry.* 2005;16(22):3682-9.
50. Caffrey P. The Stereochemistry of Ketoreduction. *Chem Biol.* 2005;12(10):1060-2.
51. Keatinge-Clay AT, Stroud RM. The Structure of a Ketoreductase Determines the Organization of the β -Carbon Processing Enzymes of Modular Polyketide Synthases. *Structure.* 2006;14(4):737-48.
52. Noey EL, Tibrewal N, Jiménez-Osés G, Osuna S, Park J, Bond CM, et al. Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(51):E7065-72.

53. Robins DJ, Bale NM, Crout DHG. Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of monocrotalic acid, the necic acid component of monocrotaline. *J Chem Soc Perkin 1*. 1974;(0):2082-6.
54. Devlin JA, Robins DJ. Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of trichodesmic acid. *J Chem Soc Perkin 1*. 1984;(0):1329-32.
55. Crout DHG, Davies NM, Smith EH, Whitehouse D. Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of senecic acid. *J Chem Soc Perkin 1*. 1972;(0):671-80.
56. Crout DHG, Davies NM, Smith EH, Whitehouse D. Biosynthesis of the C₁₀ necic acids of the pyrrolizidine alkaloids. *J Chem Soc Chem Commun*. 1970;(11):635-6.
57. Hartmann T, Dierich B. Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta*. 1998;206(3):443-51.
58. Crout DHG, Benn MH, Imaseki H, Geissman TA. Pyrrolizidine alkaloids: The biosynthesis of seneciphylllic acid. *Phytochemistry*. 1966;5(1):1-21.
59. Bale NM, Cahill R, Davies NM, Mitchell MB, Smith EH, Crout DHG. Biosynthesis of the necic acids of the pyrrolizidine alkaloids. Further investigations of the formation of senecic and isatinecic acids in *Senecio* species. *J Chem Soc Perkin 1*. 1978;(2):101-10.
60. Robins DJ. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chem Soc Rev*. 1989;18(0):375-408.
61. Dong L, Liu Y. Catalytic Mechanism of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Aminodeoxychorismate Lyase: A Computational QM/MM Study. *J Chem Inf Model*. 2023;63(4):1313-22.
62. Hirayama A, Miyanaga A, Kudo F, Eguchi T. Mechanism-Based Trapping of the Quinonoid Intermediate by Using the K276R Mutant of PLP-Dependent 3-Aminobenzoate Synthase PctV in the Biosynthesis of Pactamycin. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2015;16(17):2484-90.
63. Cahill R, Crout DHG, Gregorio MVM, Mitchell MB, Muller US. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: stereochemistry of the formation of isoleucine in *Senecio* species and of its conversion into necic acids. *J Chem Soc Perkin 1*. 1983;(0):173-80.
64. Hartmann T, Ehmke A, Eilert U, von Borstel K, Theuring C. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*. 1989;177(1):98-107.
65. Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav*. 2009;4(6):493-6.
66. Li Y, Li J, Qian B, Cheng L, Xu S, Wang R. De Novo Biosynthesis of *p*-Coumaric Acid in *E. coli* with a *trans*-Cinnamic Acid 4-Hydroxylase from the *Amaryllidaceae* Plant *Lycoris aurea*. *Molecules*. 2018;23(12):3185.

67. Ritter H, Schulz GE. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell*. 2004;16(12):3426-36.
68. D'Auria JC. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol*. 2006;9(3):331-40.
69. Ma X, Koepke J, Panjekar S, Fritsch G, Stöckigt J. Crystal Structure of Vinorine Synthase, the First Representative of the BAHD Superfamily. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13576-83.
70. Ehmke A, von Borstel K, Hartmann T. Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta*. 1988;176(1):83-90.
71. Sander H, Hartmann T. Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1989;18(1):19-31.
72. Hartmann T, Ober D. Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. In: Leeper FJ, Vederas JC, éditeurs. *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2000 [cité 2 oct 2023]. p. 207-43. (Topics in Current Chemistry). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/3-540-48146-X_5
73. Zakaria MM, Schemmerling B, Ober D. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Comfrey (*Symphytum officinale*) Hairy Roots Results in the Complete Eradication of Pyrrolizidine Alkaloids. *Molecules*. 2021;26(6):1498.
74. Buchmueller J, Kaltner F, Gottschalk C, Maares M, Braeuning A, Hessel-Pras S. Structure-Dependent Toxicokinetics of Selected Pyrrolizidine Alkaloids In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9214.
75. Widjaja F, Alhejji Y, Rietjens IMCM. The Role of Kinetics as Key Determinant in Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids and Their *N*-Oxides. *Planta Med*. 2021;88(2):130-43.
76. Yang M, Ma J, Ruan J, Zhang C, Ye Y, Pi-Cheng Fu P, et al. Absorption difference between hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides – Mechanism and its potential toxic impact. *J Ethnopharmacol*. 2020;249:112421.
77. Landry Y, Gies JP. *Pharmacologie: des cibles à la thérapeutique cours et fiches thérapeutiques*. 3e éd. Paris: Dunod; 2014. (Sciences sup).
78. Plaza A, Toner F, Harris J, Ottersbach P, Roper C, Mahony C. Support for Regulatory Assessment of Percutaneous Absorption of Retronecine-type Pyrrolizidine Alkaloids through Human Skin. *Planta Med*. 2022;88(02):144-51.
79. Lehmann A, Geburek I, These A, Hessel-Pras S, Hengstler JG, Albrecht W, et al. PBTK modeling of the pyrrolizidine alkaloid retrorsine to predict liver toxicity in mouse and rat. *Arch Toxicol*. 2023;97(5):1319-33.

80. Wiedenfeld H. Alkaloids Derived From Ornithine: Pyrrolizidine Alkaloids. In: Ramawat KG, Mérillon JM, éditeurs. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 [cité 6 avr 2023]. p. 359-79. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_9
81. Ruan J, Yang M, Fu P, Ye Y, Lin G. Metabolic Activation of Pyrrolizidine Alkaloids: Insights into the Structural and Enzymatic Basis. *Chem Res Toxicol.* 2014;27(6):1030-9.
82. Kolrep F, Numata J, Kneuer C, Preiss-Weigert A, Lahrssen-Wiederholt M, Schrenk D, et al. In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species. Part I: Microsomal degradation. *Arch Toxicol.* 2018;92(3):1089-97.
83. Tu M, Li L, Lei H, Ma Z, Chen Z, Sun S, et al. Involvement of organic cation transporter 1 and CYP3A4 in retrorsine-induced toxicity. *Toxicology.* 2014;322:34-42.
84. Nascimento RP, Oliveira JL, Carvalho JLC, Santos WA, Pires TRC, Batatinha MJM, et al. Involvement of astrocytic CYP1A1 isoform in the metabolism and toxicity of the alkaloid pyrrolizidine monocrotaline. *Toxicol.* 2017;134:41-9.
85. Ruan J, Liao C, Ye Y, Lin G. Lack of Metabolic Activation and Predominant Formation of an Excreted Metabolite of Nontoxic Platynecine-Type Pyrrolizidine Alkaloids. *Chem Res Toxicol.* 2014;27(1):7-16.
86. Geburek I, Preiss-Weigert A, Lahrssen-Wiederholt M, Schrenk D, These A. In vitro metabolism of pyrrolizidine alkaloids – Metabolic degradation and GSH conjugate formation of different structure types. *Food Chem Toxicol.* 2020;135:110868.
87. Xu J, Wang W, Yang X, Xiong A, Yang L, Wang Z. Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism. *Liver Res.* 2019;3(3):176-84.
88. Guengerich FP. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(1):70-83.
89. Fu PP. Pyrrolizidine Alkaloids: Metabolic Activation Pathways Leading to Liver Tumor Initiation. *Chem Res Toxicol.* 2017;30(1):81-93.
90. Geburek I, Schrenk D, These A. In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species: part II—identification and quantitative assessment of the metabolite profile of six structurally different pyrrolizidine alkaloids. *Arch Toxicol.* 2020;94(11):3759-74.
91. He X, Ma L, Xia Q, Fu PP. 7-*N*-Acetylcysteine-pyrrole conjugate—A potent DNA reactive metabolite of pyrrolizidine alkaloids. *J Food Drug Anal.* 2016;24(4):682-94.
92. He YQ, Yang L, Liu HX, Zhang JW, Liu Y, Fong A, et al. Glucuronidation, a New Metabolic Pathway for Pyrrolizidine Alkaloids. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(3):591-9.

93. Chen Y, Tang Y, Liu P, Wang J, Wang W, Wang C, et al. Species difference in toxicokinetics and safety assessment of senecionine *N*-oxide in a UDP-glucuronosyltransferase 1A4 humanized mouse model. *Chem Biol Interact.* 2023;380:110505.
94. Schrenk D, Fahrler J, Allemang A, Fu P, Lin G, Mahony C, et al. Novel Insights into Pyrrolizidine Alkaloid Toxicity and Implications for Risk Assessment: Occurrence, Genotoxicity, Toxicokinetics, Risk Assessment—A Workshop Report. *Planta Med.* 2022;88(02):98-117.
95. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J Mol Biol.* 2003;328(2):307-17.
96. Chen M, Li L, Zhong D, Shen S, Zheng J, Chen X. 9-Glutathionyl-6,7-dihydro-1-hydroxymethyl-5*H*-pyrrolizine Is the Major Pyrrolic Glutathione Conjugate of Retronecine-Type Pyrrolizidine Alkaloids in Liver Microsomes and in Rats. *Chem Res Toxicol.* 2016;29(2):180-9.
97. Yan X, Kang H, Feng J, Yang Y, Tang K, Zhu R, et al. Identification of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their Common Hepatotoxicity Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):318.
98. Cooper AJL, Hanigan MH. Enzymes Involved in Processing Glutathione Conjugates. In: McQueen CA, éditeur. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2010 [cité 11 déc 2023]. p. 323-66. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004176>
99. Hanna PE, Anders MW. The mercapturic acid pathway. *Crit Rev Toxicol.* 2019;49(10):819-929.
100. To YC, Pan Y, Yan X, He Y, Lin G. The toxicokinetic and metabolism of structurally diverse pyrrolizidine alkaloids in rats. *J Ethnopharmacol.* 2024;321:117390.
101. Chu PS, Segall HJ. Species difference in the urinary excretion of isatineic acid from the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol.* 1991;100(3):683-6.
102. Williams L, Chou MW, Yan J, Young JF, Chan PC, Doerge DR. Toxicokinetics of riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, and metabolites in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;182(2):98-104.
103. Estep JE, Lamé MW, Jones AD, Segall HJ. *N*-Acetylcysteine-conjugated pyrrole identified in rat urine following administration of two pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and senecionine. *Toxicol Lett.* 1990;54(1):61-9.
104. Zhu L, Zhang C, Zhang W, Xia Q, Ma J, He X, et al. Developing urinary pyrrole–amino acid adducts as non-invasive biomarkers for identifying pyrrolizidine alkaloids-induced liver injury in human. *Arch Toxicol.* 2021;95(10):3191-204.

105. Mattocks AR, Bird I. Alkylation by dehydroretronecine, a cytotoxic metabolite of some pyrrolizidine alkaloids: An in vitro test. *Toxicol Lett.* 1983;16(1):1-8.
106. Mattocks AR. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Nature.* 1968;217(5130):723-8.
107. Ma J, Xia Q, Fu PP, Lin G. Pyrrole-protein adducts – A biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. *J Food Drug Anal.* 2018;26(3):965-72.
108. Edgar JA, Molyneux RJ, Colegate SM. Pyrrolizidine Alkaloids: Potential Role in the Etiology of Cancers, Pulmonary Hypertension, Congenital Anomalies, and Liver Disease. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(1):4-20.
109. Zhang W, Liu L, Zhang M, Zhang F, Peng C, Zhang B, et al. Validation of the Nanjing Criteria for Diagnosing Pyrrolizidine Alkaloids-induced Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome. *J Clin Transl Hepatol.* 2021;9(3):345-52.
110. Yang XQ, Ye J, Li X, Li Q, Song YH. Pyrrolizidine alkaloids-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2019;25(28):3753-63.
111. Stuart KL, Bras G. Veno-occlusive disease of the liver. *Q J Med.* 1957;26(103):291-315.
112. Li R, Li L, Cai Z, Chen J, Zhang H, Zhao S, et al. Histological evaluation of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome: Correlation with Drum Tower Severity Scoring. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2023 [cité 5 févr 2024]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865823010964>
113. Zheng P, Xu Y, Ren Z, Wang Z, Wang S, Xiong J, et al. Toxic Prediction of Pyrrolizidine Alkaloids and Structure-Dependent Induction of Apoptosis in HepaRG Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8822304.
114. Wang Z, Han H, Wang C, Zheng Q, Chen H, Zhang X, et al. Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloid Compound Intermedine: Comparison with Other Pyrrolizidine Alkaloids and Its Toxicological Mechanism. *Toxins.* 2021;13(12):849.
115. Vringer E, Tait SWG. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ.* 2023;30(2):304-12.
116. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
117. Yang X, Wang H, Ni HM, Xiong A, Wang Z, Sesaki H, et al. Inhibition of Drp1 protects against senecionine-induced mitochondria-mediated apoptosis in primary hepatocytes and in mice. *Redox Biol.* 2017;12:264-73.
118. Wang Z, Qiao L, Zheng Q, Han H, Li Z, Zhang X, et al. Combined Hepatotoxicity and Toxicity Mechanism of Intermedine and Lycopsamine. *Toxins.* 2022;14(9):633.

119. Waizenegger J, Braeuning A, Templin M, Lampen A, Hessel-Pras S. Structure-dependent induction of apoptosis by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the human hepatoma cell line HepaRG: Single versus repeated exposure. *Food Chem Toxicol.* 2018;114:215-26.
120. Glück J, Waizenegger J, Braeuning A, Hessel-Pras S. Pyrrolizidine Alkaloids Induce Cell Death in Human HepaRG Cells in a Structure-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):E202.
121. Panwar A, Das P, Tan LP. 3D Hepatic Organoid-Based Advancements in Liver Tissue Engineering. *Bioengineering.* 2021;8:185.
122. Neuman MG, Cohen LB, Steenkamp V. Pyrrolizidine alkaloids enhance alcohol-induced hepatocytotoxicity in vitro in normal human hepatocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(1 Suppl):53-68.
123. Nassereddine S, Alsubait S, Tabbara I. Sinusoidal Obstruction Syndrome (Veno-occlusive Disease) Following Hematopoietic Stem Cell Transplant: Insights and Therapeutic Advances. *Anticancer Res.* 2018;38(5):2597-605.
124. Lester C, Troutman J, Obringer C, Wehmeyer K, Stoffolano P, Karb M, et al. Intrinsic relative potency of a series of pyrrolizidine alkaloids characterized by rate and extent of metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2019;131:110523.
125. He X, Xia Q, Woodling K, Lin G, Fu PP. Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides. *J Food Drug Anal.* 2017;25(4):984-91.
126. Xia Q, He X, Shi Q, Lin G, Fu PP. Quantitation of DNA reactive pyrrolic metabolites of senecionine – A carcinogenic pyrrolizidine alkaloid by LC/MS/MS analysis. *J Food Drug Anal.* 2020;28(1):167-74.
127. Chen T, Mei N, Fu PP. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J Appl Toxicol.* 2010;30(3):183-96.
128. Louisse J, Rijkers D, Stoop G, Holleboom WJ, Delagrangé M, Molthof E, et al. Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2019;131:110532.
129. Chen Y, Xiong F, Wang W, Jiang K, Ye X, Deng G, et al. The long persistence of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts in vivo: Kinetic study following multiple exposures of a pyrrolizidine alkaloid containing extract of *Gynura japonica*. *Toxicol Lett.* 2020;323:41-7.
130. Xiong A, Yang F, Fang L, Yang L, He Y, Wan YYJ, et al. Metabolomic and Genomic Evidence for Compromised Bile Acid Homeostasis by Senecionine, a Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloid. *Chem Res Toxicol.* 2014;27(5):775-86.

131. Waizenegger J, Glück J, Henricsson M, Luckert C, Braeuning A, Hessel-Pras S. Pyrrolizidine Alkaloids Disturb Bile Acid Homeostasis in the Human Hepatoma Cell Line HepaRG. *Foods* Basel Switz. 2021;10(1):161.
132. Vinken M, Landesmann B, Goumenou M, Vinken S, Shah I, Jaeschke H, et al. Development of an Adverse Outcome Pathway From Drug-Mediated Bile Salt Export Pump Inhibition to Cholestatic Liver Injury. *Toxicol Sci.* 2013;136(1):97-106.
133. Glück J, Henricsson M, Braeuning A, Hessel-Pras S. The Food Contaminants Pyrrolizidine Alkaloids Disturb Bile Acid Homeostasis Structure-Dependently in the Human Hepatoma Cell Line HepaRG. *Foods.* 2021;10(5):1114.
134. Xiong A, Fang L, Yang X, Yang F, Qi M, Kang H, et al. An application of target profiling analyses in the hepatotoxicity assessment of herbal medicines: comparative characteristic fingerprint and bile acid profiling of *Senecio vulgaris* L. and *Senecio scandens* Buch.-Ham. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(29):7715-27.
135. He Y, Ma J, Fan X, Ding L, Ding X, Zhang QY, et al. The key role of gut-liver axis in pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity and enterotoxicity. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(12):3820-35.
136. Bruneau A, Hundertmark J, Guillot A, Tacke F. Molecular and Cellular Mediators of the Gut-Liver Axis in the Progression of Liver Diseases. *Front Med [Internet].* 2021 [cité 9 févr 2024];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.725390>
137. Buchmueller J, Sprenger H, Ebmeyer J, Rasinger JD, Creutzenberg O, Schaudien D, et al. Pyrrolizidine alkaloid-induced transcriptomic changes in rat lungs in a 28-day subacute feeding study. *Arch Toxicol.* 2021;95(8):2785-96.
138. Yao J, Li C gang, Gong L kun, Feng C chen, Li C zhu, Gao M, et al. Hepatic cytochrome P450s play a major role in monocrotaline-induced renal toxicity in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35(2):292-300.
139. Ouyang S, Chen W, Zeng G, Lei C. Aquaporin-2 expression in the kidney and urine is elevated in rats with monocrotaline-induced pulmonary heart disease. *J Int Med Res.* 2020;48(1):300060519894448.
140. Liu Q, Song J, Lu D, Geng J, Jiang Z, Wang K, et al. Effects of renal denervation on monocrotaline induced pulmonary remodeling. *Oncotarget.* 2017;8(29):46846-55.
141. Jayawickreme K, Świstak D, Ozimek E, Reszczyńska E, Rysiak A, Makuch-Kocka A, et al. Pyrrolizidine Alkaloids—Pros and Cons for Pharmaceutical and Medical Applications. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23):16972.

142. Wei X, Ruan W, Vrieling K. Current Knowledge and Perspectives of Pyrrolizidine Alkaloids in Pharmacological Applications: A Mini-Review. *Mol Basel Switz.* 2021;26(7):1970.
143. Huang S, Zhou X li, Wang C juan, Wang Y song, Xiao F, Shan L hai, et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Liparis nervosa* with inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages. *Phytochemistry.* 2013;93:154-61.
144. Chen L, Huang S, Li CY, Gao F, Zhou XL. Pyrrolizidine alkaloids from *Liparis nervosa* with antitumor activity by modulation of autophagy and apoptosis. *Phytochemistry.* 2018;153:147-55.
145. Appadurai P, Rathinasamy K. Indicine *N*-oxide binds to tubulin at a distinct site and inhibits the assembly of microtubules: A mechanism for its cytotoxic activity. *Toxicol Lett.* 2014;225(1):66-77.
146. Toma W, Trigo JR, Paula ACB de, Brito ARMS. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (*Asteraceae*) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2004;95(2):345-51.
147. Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement [Internet]. [cité 5 mars 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2024/01/02/liste-a-des-plantes-medicinales-utilisees-traditionnellement-janvier-2024.pdf>
148. Liste B des plantes médicinales utilisées traditionnellement [Internet]. [cité 5 mars 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2022/12/30/liste-b-des-plantes-medicinales-utilisees-traditionnellement-janvier-2023.pdf>
149. Röder E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharm.* 2000;55:711-26.
150. Röder E, Wiedenfeld H. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Mongolia, Nepal and Tibet. *Pharm - Int J Pharm Sci.* 2009;64(11):699-716.
151. Röder E, Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the Traditional Indian medicine - Including Ayurveda. *Pharm.* 2013;68:83-92.
152. Röder E, Wiedenfeld H. Pyrrolizidine alkaloids in plants used in the traditional medicine of Madagascar and the Mascarene islands. *Pharm - Int J Pharm Sci.* 2011;66(9):637-47.
153. Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris: Éd. Tec & doc-Lavoisier; 2010.
154. Bonnier G, de Layens G. Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique : pour trouver facilement les noms des plantes sans mots techniques. Rééd. Paris: Belin; 1995. (Collection des nouvelles flores).

155. Botineau M. Guide des plantes médicinales. Paris: Belin; 2011. (L'indispensable guide des... Fous de nature !).
156. Masclef A. Atlas des plantes de France, utiles, nuisibles et ornementales. Vol. 3. Paris: Klincksiek; 1891.
157. Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.
158. Pharmacopée européenne. 11e éd. Strasbourg: Direction européenne de la qualité du médicament et des soins de santé; 2022.
159. Aichele D. Quelle est donc cette fleur ? Paris: Nathan; 1975.
160. Felix J, Toman J, Hisek K. Guide du promeneur dans la nature. Paris: France-Loisirs; 1983.
161. Köhler HA, Pabst G, Müller WO, Schmidt CF. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte [Internet]. Vol. 1. Gera: Franz Eugen Köhler; 1887. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/10836>
162. Mulot MA. Secrets d'une herboriste. 22e éd. Paris: Éditions du Dauphin; 2015.
163. Consoude pour préparations homéopathiques [Internet]. [cité 24 mars 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2024/01/02/symphytum-officinale-pph.pdf>
164. Sturm J. Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur [Internet]. Vol. 5. Nürnberg: Jacob Sturm; 1806. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/148204>
165. Thomé OW. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz [Internet]. Vol. 4. Gera: Franz Eugen Köhler; 1889. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/194858>
166. van Dam NM, Witte L, Theuring C, Hartmann T. Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. Phytochemistry. 1995;39(2):287-92.
167. El-Shazly A, Sarg T, Ateya A, Abdel Aziz E, Witte L, Wink M. Pyrrolizidine alkaloids of *Cynoglossum officinale* and *Cynoglossum amabile* (family *Boraginaceae*). Biochem Syst Ecol. 1996;24(5):415-21.
168. Lindman CAM. Billeder af Nordens flora [Internet]. Vol. 1. København: G.E.C. Gad; 1901. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/39908>
169. El-Shazly A, Sarg T, Ateya A, Abdel Aziz A, El-Dahmy S, Witte L, et al. Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. J Nat Prod. 1996;59(3):310-3.
170. Boppré M, Colegate SM, Edgar JA. Pyrrolizidine Alkaloids of *Echium vulgare* Honey Found in Pure Pollen. J Agric Food Chem. 2005;53(3):594-600.
171. Petibon MF. *Heliotropium europaeum* L. [Internet]. [cité 26 févr 2024]. Disponible sur: <https://api.tela-botanica.org/img:000264006O.jpg>

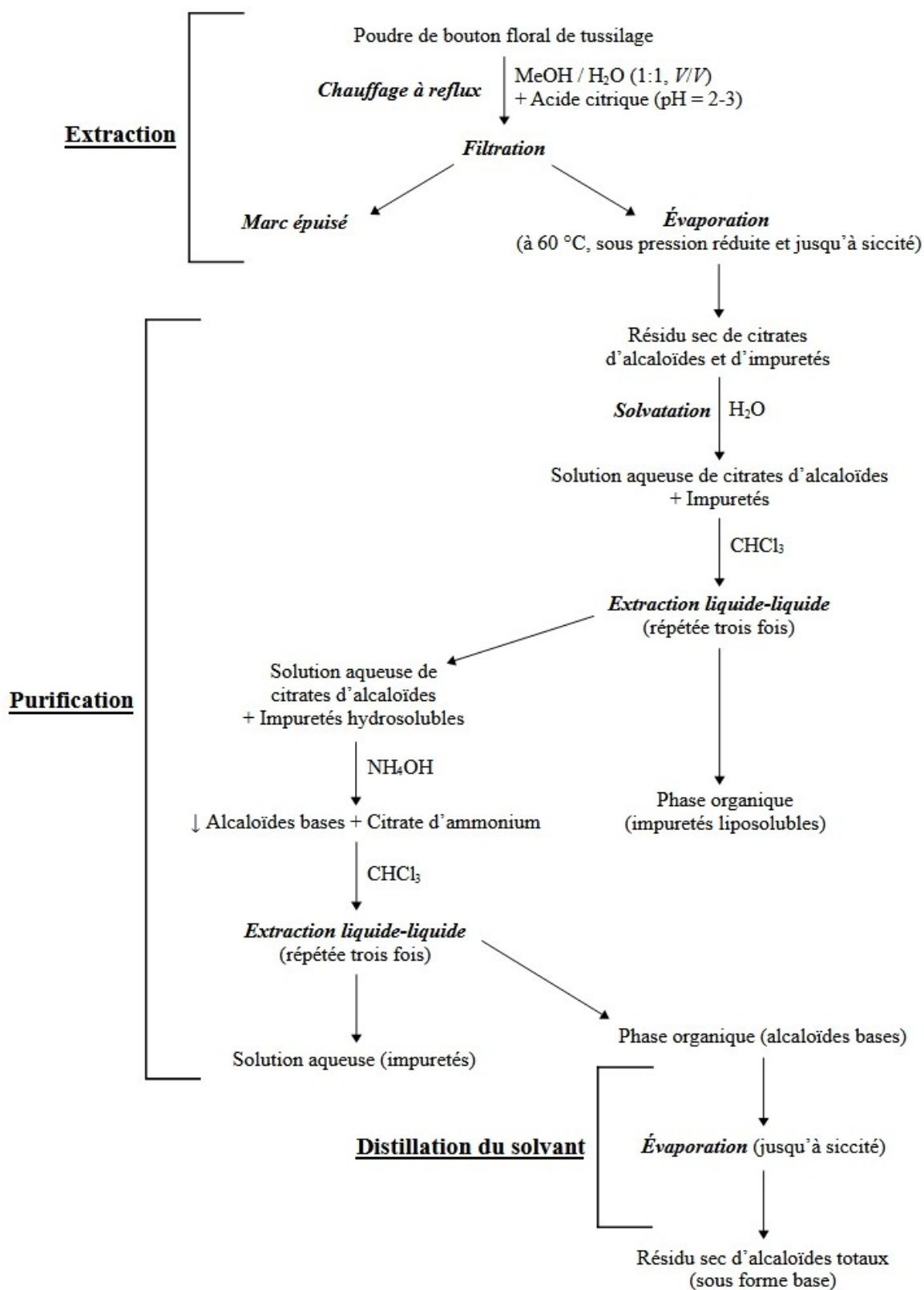
172. Sturm J. Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur [Internet]. Vol. 2. Nürnberg: Jacob Sturm; 1800. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/148190>
173. Sturm J. Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur [Internet]. Vol. 11. Nürnberg: Jacob Sturm; 1825. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/148279>
174. Omar M, De Feo J, Youngken HWJr. Chemical and Toxicity Studies of *Trichodesma africanum* L. *J Nat Prod.* 1983;46(2):153-6.
175. Huxtable RJ. Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: Cheeke PR, Chemical Rubber Company, éditeurs. *Toxicants of Plant Origin : Alkaloids.* Boca Rotan, Florida, USA: CRC Pr; 1989. p. 41-86.
176. Zaurov DE, Belolipov IV, Kurmukov AG, Sodombekov IS, Akimaliev AA, Eisenman SW. The Medicinal Plants of Uzbekistan and Kyrgyzstan. In: Eisenman SW, Zaurov DE, Struwe L, éditeurs. *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan* [Internet]. New York, NY: Springer; 2013 [cité 12 mars 2024]. p. 15-273. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3912-7_5
177. Sturm J. Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur [Internet]. Vol. 10. Nürnberg: Jacob Sturm; 1817. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/148133>
178. Plessier C. *Jacobaea maritima* (L.) Pelsler & Meijden [Internet]. [cité 26 févr 2024]. Disponible sur: <https://api.tela-botanica.org/img:000006595O.jpg>
179. Cinéraire maritime pour préparations homéopathiques [Internet]. [cité 24 mars 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2020/10/22/cineraria-maritima-cineraire-maritime-pph.pdf>
180. Smith LW, Culvenor CCJ. Plant Sources of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids. *J Nat Prod.* 1981;44(2):129-52.
181. Roubaudi L. *Crotalaria retusa* L. [Internet]. [cité 26 févr 2024]. Disponible sur: <https://api.tela-botanica.org/img:000103052O.jpg>
182. Edwards S, Lindley J, Ridgway J. Edwards's botanical register [Internet]. Vol. 28. London: James Ridgway; 1842. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/9065>
183. Koulman A, Seeliger C, Edwards PJB, Fraser K, Simpson W, Johnson L, et al. *E/Z*-Thesinine-*O*-4'- α -rhamnoside, pyrrolizidine conjugates produced by grasses (*Poaceae*). *Phytochemistry.* 2008;69(9):1927-32.
184. Habs M, Binder K, Krauss S, Müller K, Ernst B, Valentini L, et al. A Balanced Risk-Benefit Analysis to Determine Human Risks Associated with Pyrrolizidine Alkaloids (PA)-The Case of Herbal Medicinal Products Containing St. John's Wort Extracts (SJW). *Nutrients.* 2018;10(7):E804.

185. Selmar D, Wittke C, Beck-von Wolfersdorff I, Klier B, Lewerenz L, Kleinwächter M, et al. Transfer of pyrrolizidine alkaloids between living plants: A disregarded source of contaminations. *Environ Pollut.* 2019;248:456-61.
186. Chmit MS, Horn G, Dübecke A, Beuerle T. Pyrrolizidine Alkaloids in the Food Chain: Is Horizontal Transfer of Natural Products of Relevance? *Foods Basel Switz.* 2021;10(8):1827.
187. Günthardt BF, Wettstein FE, Hollender J, Singer H, Härrli J, Scherlinger M, et al. Retrospective HRMS Screening and Dedicated Target Analysis Reveal a Wide Exposure to Pyrrolizidine Alkaloids in Small Streams. *Environ Sci Technol.* 2021;55(2):1036-44.
188. Casado N, Morante-Zarcero S, Sierra I. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends Food Sci Technol.* 2022;120:123-39.
189. Mulder PPJ, López P, Castelari M, Bodi D, Ronczka S, Preiss-Weigert A, et al. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across Europe. *Food Addit Contam Part A.* 2018;35(1):118-33.
190. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA J.* 2011;9(11):2406.
191. Mulder PPJ, Sánchez PL, These A, Preiss-Weigert A, Castellari M. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *EFSA Support Publ.* 2015;12(8):859.
192. Habs M, Binder K, Krauss S, Müller K, Ernst B, Valentini L, et al. A Balanced Risk-Benefit Analysis to Determine Human Risks Associated with Pyrrolizidine Alkaloids (PA)-The Case of Tea and Herbal Infusions. *Nutrients.* 2017;9(7):E717.
193. Optimisation des plans de surveillance et de contrôles officiels de la contamination chimique des denrées alimentaires à toutes les étapes de la chaîne alimentaire (hors alimentation pour animaux et eau) [Internet]. [cité 3 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2015SA0187Ra.pdf>
194. Wang J, Zhang M, Chen L, Qiao Y, Ma S, Sun D, et al. Determination of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids in Traditional Chinese Herbal Medicines by UPLC-MS/MS and Accompanying Risk Assessment for Human Health. *Mol Basel Switz.* 2021;26(6):1648.
195. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids [Internet]. European Medicines Agency (EMA); 2016 juin p. 11. Report No.: EMA/HMPC/328782/2016. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-contamination-herbal-medicinal-productstraditional-herbal-medicinal-products-pyrrolizidine-alkaloids_en.pdf

196. Kaltner F, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Occurrence and Risk Assessment of Pyrrolizidine Alkaloids in Spices and Culinary Herbs from Various Geographical Origins. *Toxins*. 2020;12(3):155.
197. Kast C, Kilchenmann V, Reinhard H, Droz B, Lucchetti MA, Dübecke A, et al. Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. *Food Addit Contam Part A*. 2018;35(2):316-27.
198. Brugnerotto P, Seraglio SKT, Schulz M, Gonzaga LV, Fett R, Costa ACO. Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review. *Food Chem*. 2021;342:128384.
199. Gottschalk C, Kaltner F, Zimmermann M, Korten R, Morris O, Schwaiger K, et al. Spread of *Jacobaea vulgaris* and Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in Regionally Produced Honeys from Northern Germany: Inter- and Intra-Site Variations and Risk Assessment for Special Consumer Groups. *Toxins*. 2020;12(7):E441.
200. Ohlsen S, Ganter M, Wohlsein P, Reckels B, Huckauf A, Lenzewski N, et al. Grazing Ecology of Sheep and Its Impact on Vegetation and Animal Health on Pastures Dominated by Common Ragwort (*Senecio jacobaea* L.)-Part 2: Animal Health. *Anim Open Access J MDPI*. 2022;12(10):1289.
201. Taenzer J, Gehling M, Klevenhusen F, Saltzmann J, Dänicke S, These A. Rumen Metabolism of *Senecio* Pyrrolizidine Alkaloids May Explain Why Cattle Tolerate Higher Doses Than Monogastric Species. *J Agric Food Chem*. 2022;70(33):10111-20.
202. Brown AW, Stegelmeier BL, Colegate SM, Gardner DR, Panter KE, Knoppel EL, et al. The comparative toxicity of a reduced, crude comfrey (*Symphytum officinale*) alkaloid extract and the pure, comfrey-derived pyrrolizidine alkaloids, lycopsamine and intermedine in chicks (*Gallus gallus domesticus*). *J Appl Toxicol*. 2016;36(5):716-25.
203. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, et al. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA J*. 2017;15(7):4908.
204. Avila C, Breakspear I, Hawrelak J, Salmond S, Evans S. A systematic review and quality assessment of case reports of adverse events for borage (*Borago officinalis*), coltsfoot (*Tussilago farfara*) and comfrey (*Symphytum officinale*). *Fitoterapia*. 2020;142:104519.
205. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) including recommendations regarding contamination of herbal medicinal products with PAs [Internet]. [cité 4 avr 2024]. Disponible sur:

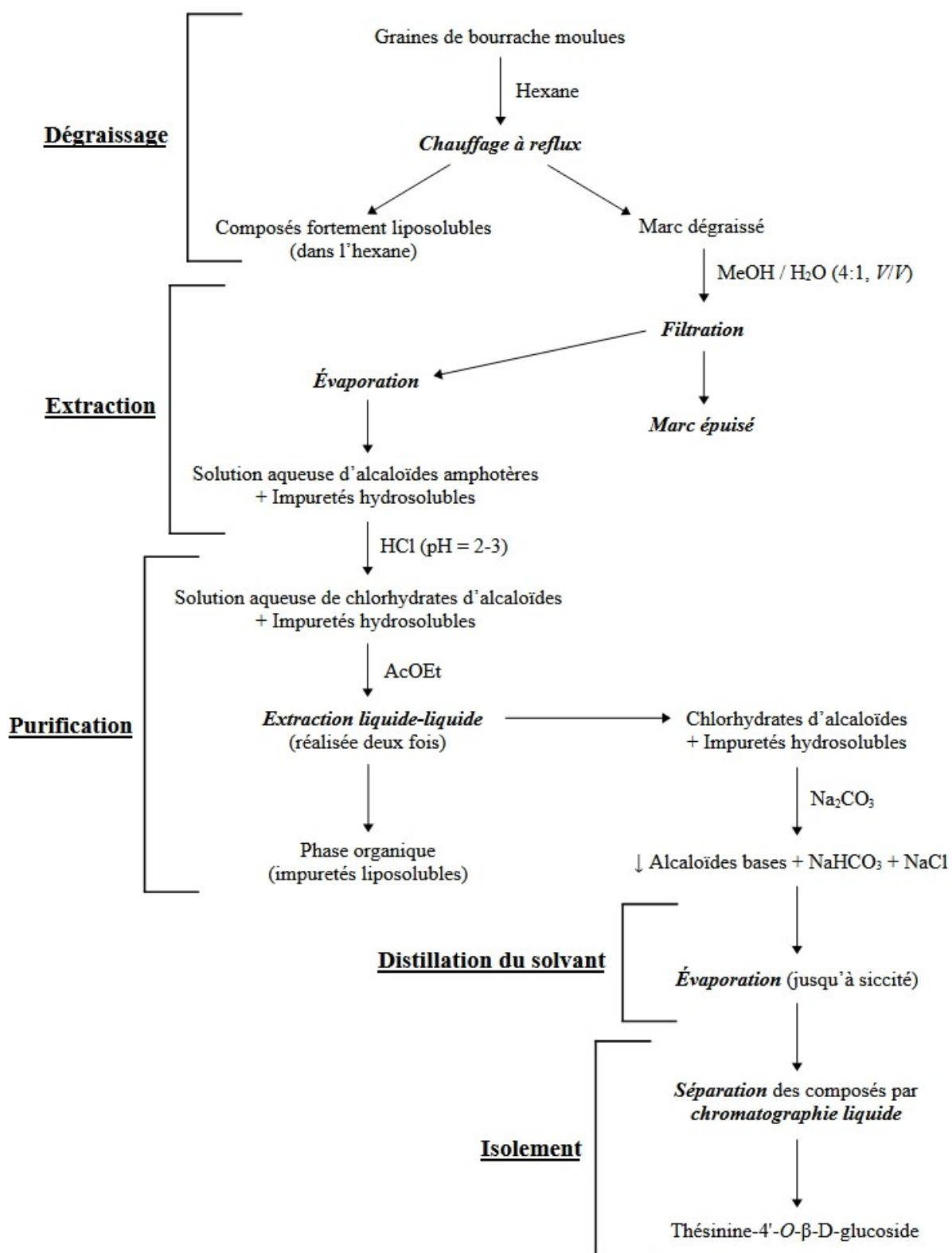
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-toxic-unsaturated-pyrrolizidine-alkaloids-pas-including-recommendations-regarding-contamination-herbal-medicinal-products-pyrrolizidine_en.pdf
206. Kowalczyk E, Kwiatek K. Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Determination with Liquid Chromatography-mass Spectrometry Method. *J Vet Res.* 2018;62(2):173-81.
207. Wiesner J. Regulatory Perspectives of Pyrrolizidine Alkaloid Contamination in Herbal Medicinal Products. *Planta Med.* 2022;88(2):118-24.
208. Steinhoff B. Review: Quality of herbal medicinal products: State of the art of purity assessment. *Phytomedicine.* 2019;60:153003.
209. Steinhoff B. Pyrrolizidine alkaloid contamination in herbal medicinal products: Limits and occurrence. *Food Chem Toxicol.* 2019;130:262-6.
210. Steinhoff B. Pyrrolizidine Alkaloid Contamination in Medicinal Plants: Regulatory Requirements and Their Impact on Production and Quality Control of Herbal Medicinal Products. *Planta Med.* 2022;88(2):125-9.
211. Règlement (UE) 2020/2040 de la Commission du 11 décembre 2020 modifiant le règlement (CE) no 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en alcaloïdes pyrrolizidiniques dans certaines denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. OJ L déc 11, 2020. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2020/2040/oj/fra>
212. Règlement (UE) 2023/915 de la Commission du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) no 1881/2006 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. OJ L avr 25, 2023. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj/fra>
213. Évaluation technico-économique de l'impact de la disparition des herbicides pour les productions des plantes à parfum, aromatiques et médicinales [Internet]. [cité 12 oct 2022]. Disponible sur: https://www.franceagrimer.fr/content/download/69206/document/Etude_disparition_herbicide_PPA_M.PDF
214. Sénat [Internet]. 2024 [cité 28 avr 2024]. Alcaloïdes pyrrolizidiniques et désarroi des producteurs. Disponible sur: <https://www.senat.fr/questions/base/2024/qSEQ24021120S.html>
215. Gibert-Ramos A, Sanfeliu-Redondo D, Aristu-Zabalza P, Martínez-Alcocer A, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, et al. The Hepatic Sinusoid in Chronic Liver Disease: The Optimal Milieu for Cancer. *Cancers.* 2021;13(22):5719.

Annexe I : Extraction des alcaloïdes du bourgeon floral de *Tussilago farfara* L.¹



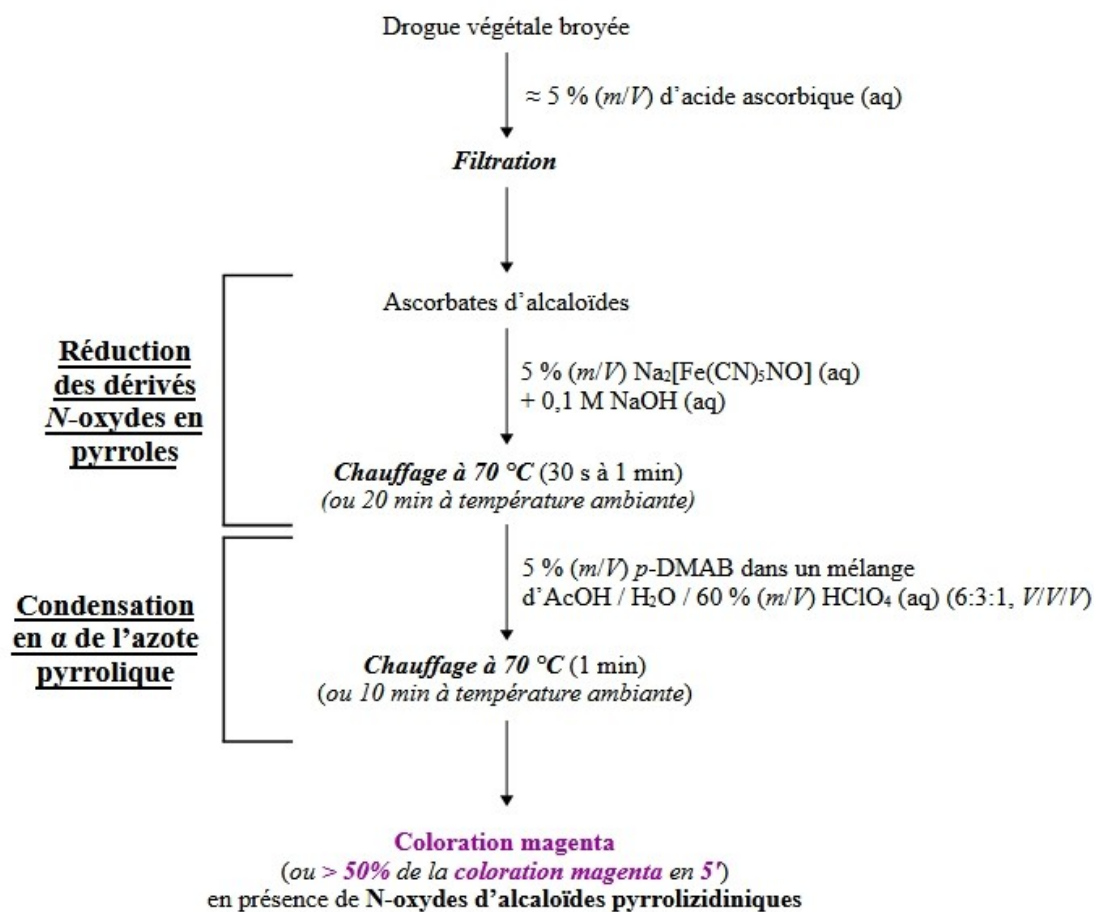
¹ La procédure est issue de la référence (11).

Annexe II : Extraction de la thésinine-4'-O-β-D-glucoside de la graine de *Borago officinalis* L.²



² La procédure est issue de la référence (12).

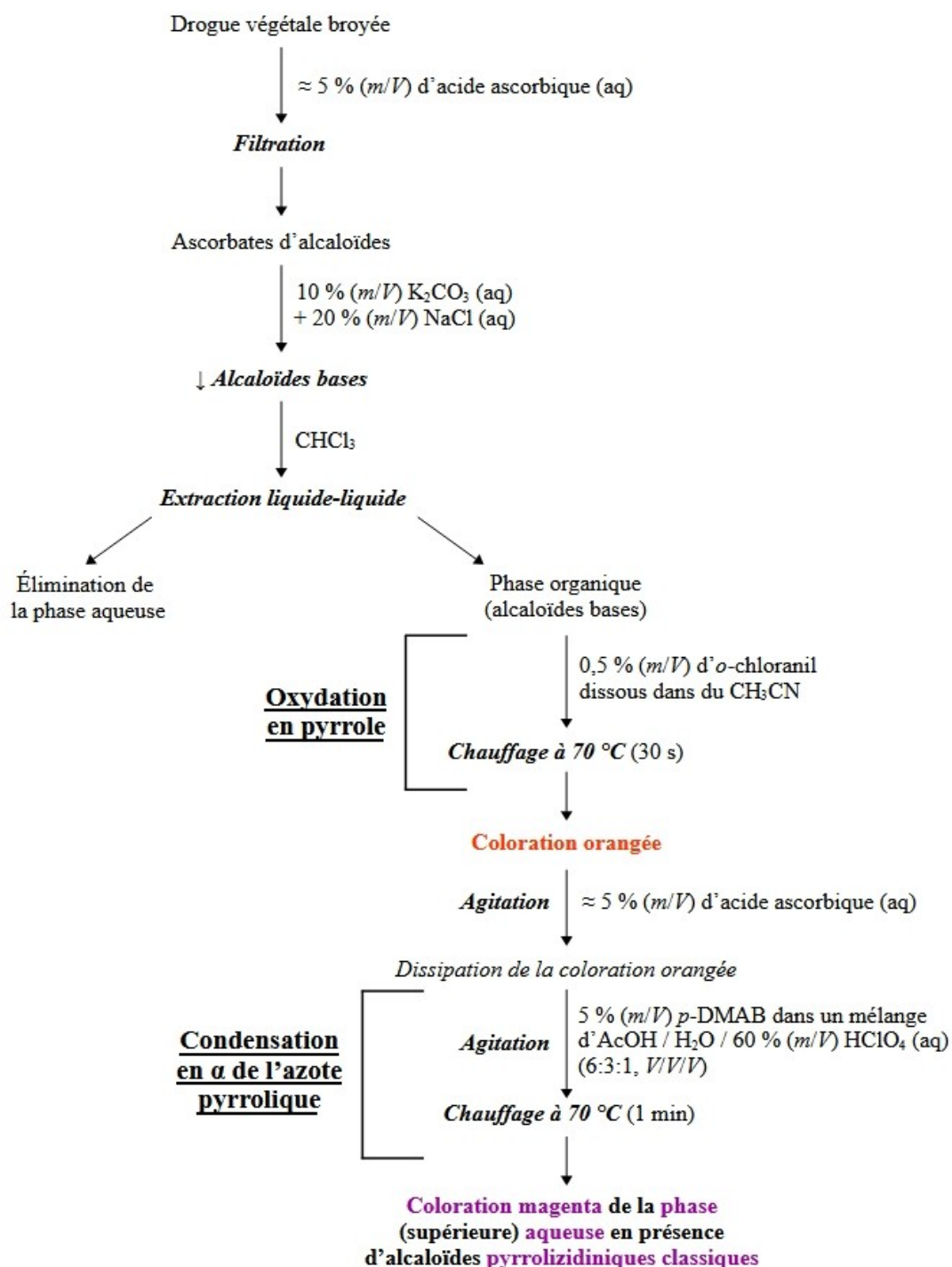
Annexe III : Caractérisation par le réactif de Mattocks des *N*-oxydes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques³



p-DMAB : *para*-diméthylaminobenzaldéhyde

³ La procédure est issue de la référence (14).

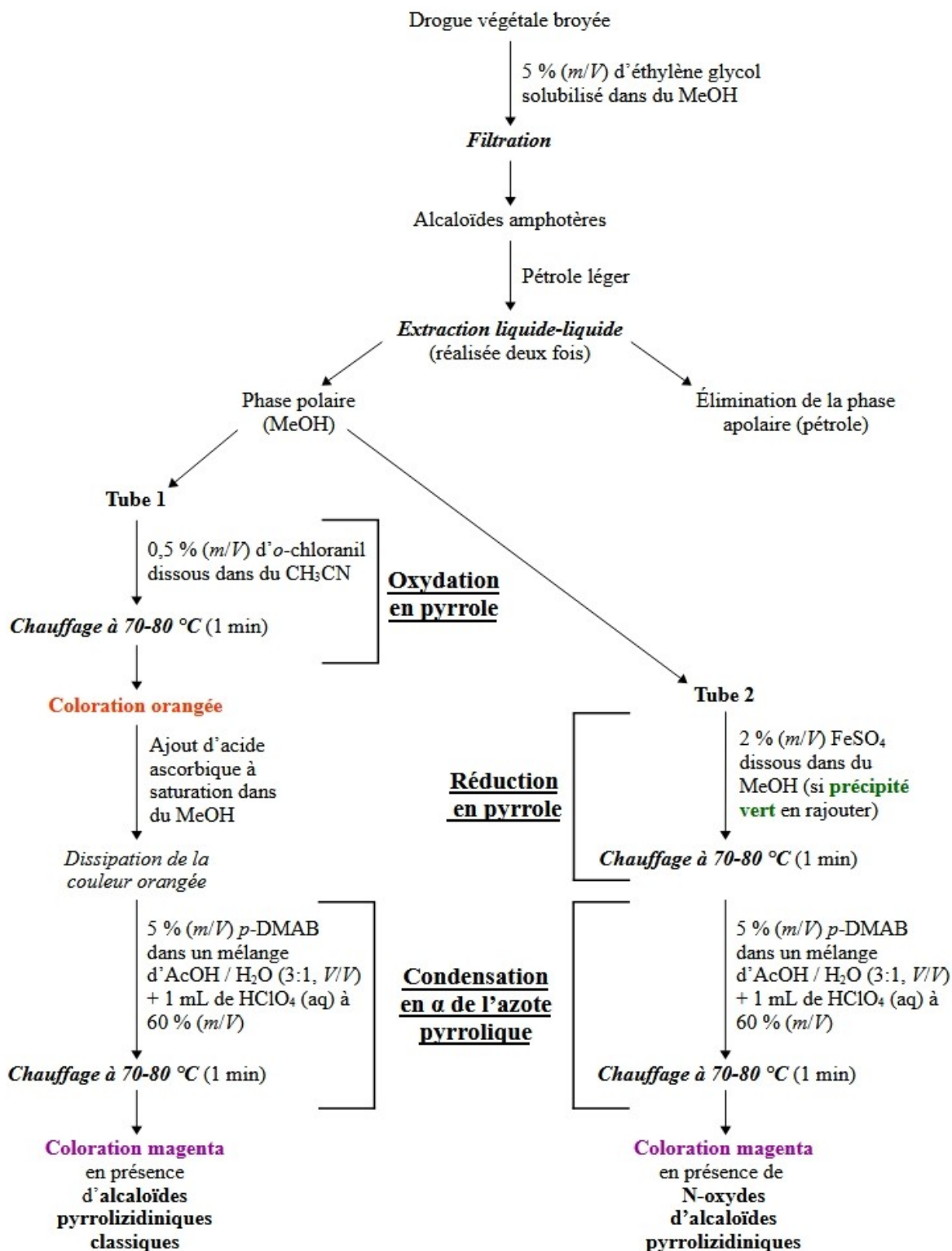
Annexe IV : Caractérisation par le réactif de Mattocks des alcaloïdes pyrrolizidiniques dits classiques⁴



p-DMAB : *para*-diméthylaminobenzaldéhyde

⁴ La procédure est issue de la référence (14).

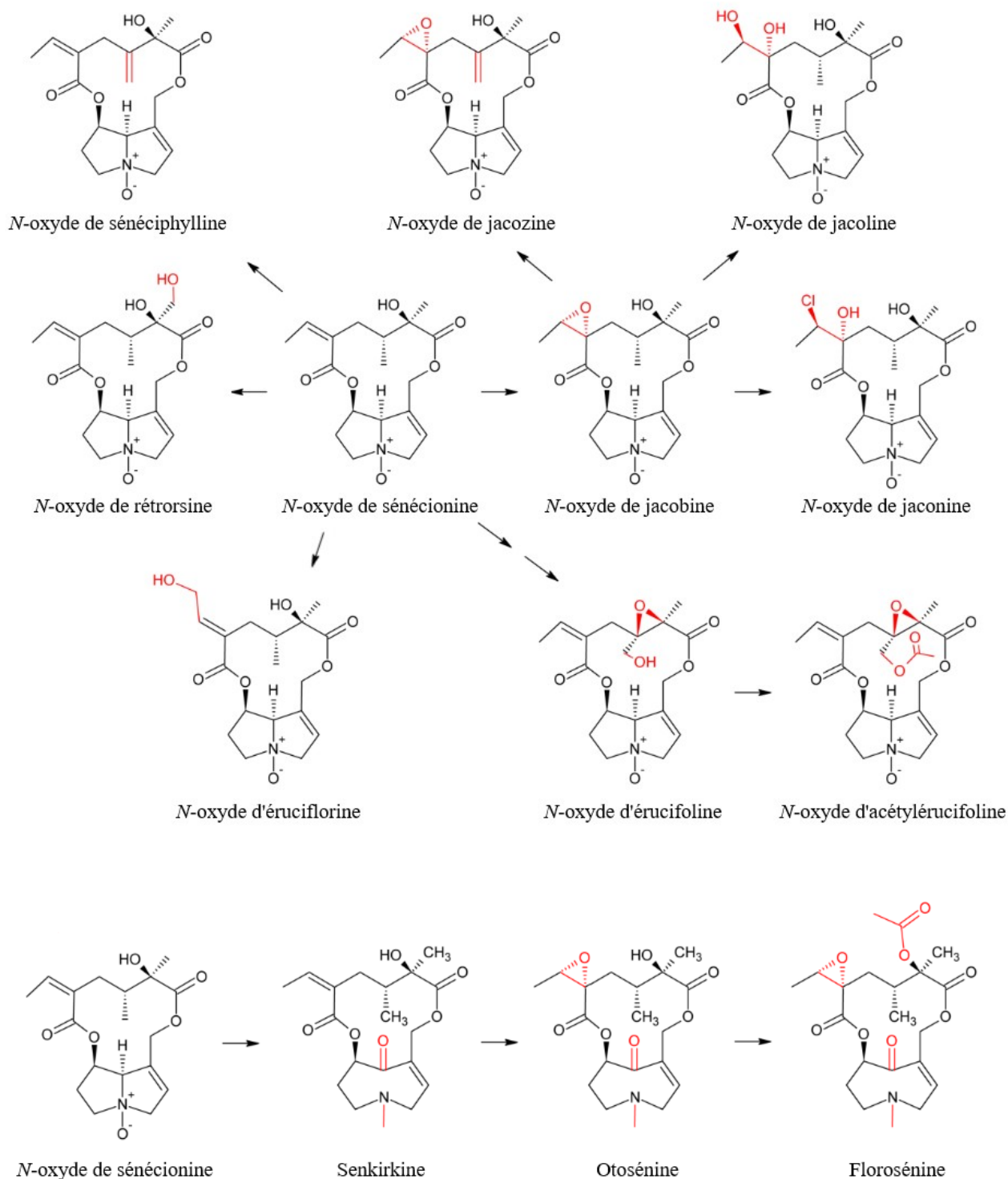
Annexe V : Caractérisation simultanée par le réactif de Mattocks des alcaloïdes pyrrolizidiniques et de leurs dérivés *N*-oxydes⁵



p-DMAB : *para*-diméthylaminobenzaldéhyde

⁵ La procédure est issue de la référence (14).

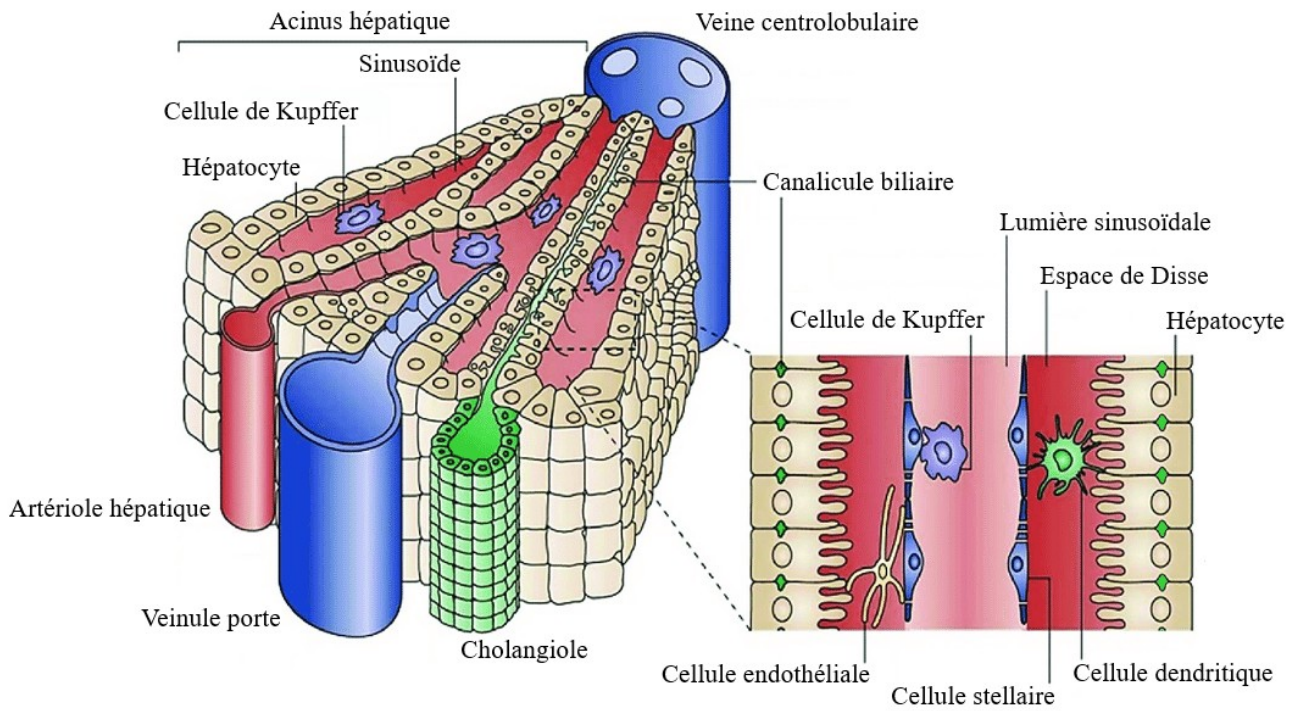
Annexe VI : Principales réactions de diversification structurelle du *N*-oxyde de sénécionine dans la tribu des *Senecioneae* (*Asteraceae*)⁶



N.B. : Les modifications chimiques apportées sont surlignées en rouge.

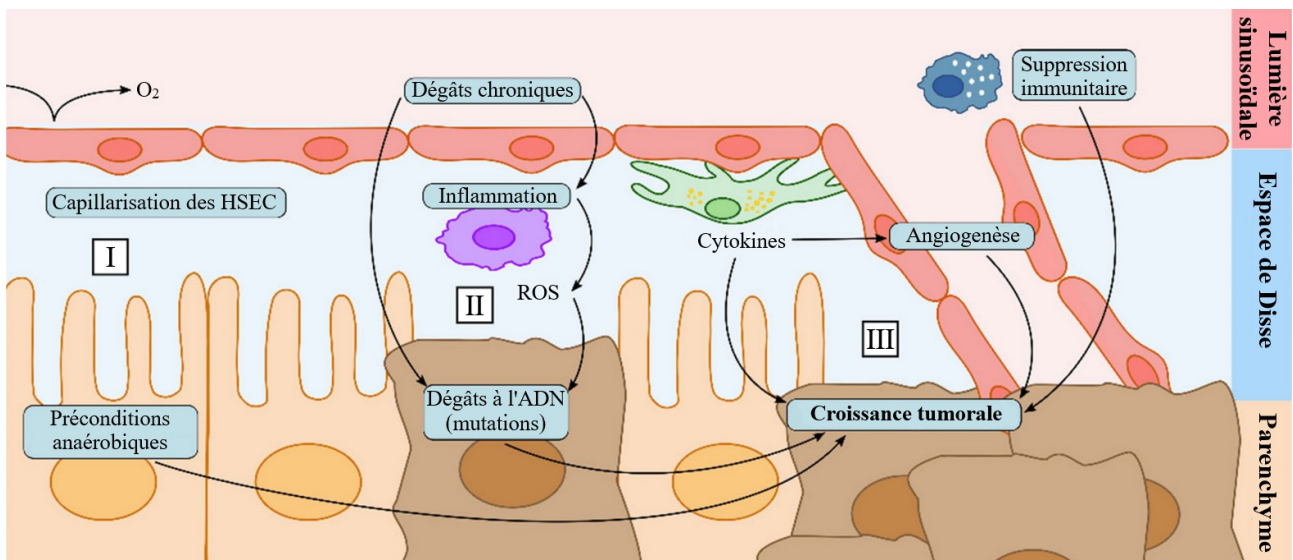
6 La figure est adaptée de la référence (2).

Annexe VII : Architecture du sinusøide hépatique⁷



⁷ La figure est adaptée de la référence (121).

Annexe VIII : Développement de la tumorigénicité⁸



ROS : Espèces réactives de l'oxygène

⁸ La figure est adaptée de la référence (215).

Annexe IX : Plantes productrices d'alcaloïdes pyrrolizidiniques inscrites à la liste A
de la Pharmacopée française⁹

Nom scientifique	Nom français	Famille	Parties utilisées de la plante	Parties toxiques de la plante
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Agérate faux conyze, Herbe à femme	<i>Asteraceae</i>	Feuille ^{*, †}	
<i>Arnebia euchroma</i> (Royle ex Benth.) I.M.Johnst.	Arnebia euchroma	<i>Boraginaceae</i>	Racine [‡]	
<i>Borago officinalis</i> L.	Bourrache	<i>Boraginaceae</i>	Partie aérienne [†]	
			Fleur [†]	
<i>Symphytum officinale</i> L.	Consoude (grande)	<i>Boraginaceae</i>	Racine ^{*, †}	Tous les organes
<i>Tussilago farfara</i> L.	Tussilage, Pas-d'âne	<i>Asteraceae</i>	Capitule [†]	Tous les organes

(* usage cutané uniquement ; † usage en médecine traditionnelle européenne ou ultramarine ; ‡ usage en médecine traditionnelle chinoise)

⁹ D'après (147).

Annexe X : Plantes productrices d’alcaloïdes pyrrolizidiniques inscrites à la liste B de
la Pharmacopée française¹⁰

Nom scientifique	Nom français	Famille	Parties utilisées de la plante
<i>Alkanna tinctoria</i> (L.) Tausch.	Orcanette (des teinturiers)	<i>Boraginaceae</i>	Racine †
<i>Anchusa officinalis</i> L.	Buglosse (officinale), Langue-de-bœuf	<i>Boraginaceae</i>	Feuille †
			Fleur †
<i>Cynoglossum officinale</i> L.	Cynoglosse (officinale), langue-de-chien	<i>Boraginaceae</i>	Partie aérienne †
<i>Echium vulgare</i> L.	Vipérine (commune)	<i>Boraginaceae</i>	Partie aérienne †
<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.	Eupatorium fortunei	<i>Asteraceae</i>	Partie aérienne ‡
<i>Lithospermum officinale</i> L.	Grémil (officinal), Herbe aux perles	<i>Boraginaceae</i>	Graine †
<i>Heliotropium europaeum</i> L.	Héliotrope (d’Europe), Herbe aux verrues	<i>Asteraceae</i>	Partie aérienne †
<i>Petasites hybridus</i> (L.) G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.	Pétasite (officinal)	<i>Asteraceae</i>	Feuille †
<i>Senecio</i> sp. * dont :	Séneçons* dont :	<i>Asteraceae</i>	Partie aérienne †
<i>Senecio vulgaris</i> L.	Séneçon commun		
<i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn.	Séneçon jacobée, Herbe de Saint-Jacques		
<i>Jacobaea maritima</i> (L.) Pelser & Meijden	Séneçon cinéraire, cinéraire maritime		

(*classification non révisée depuis le schisme taxonomique du genre *Jacobaea* avec le genre *Senecio* ; † usage en médecine traditionnelle européenne ou ultramarine ; ‡ usage en médecine traditionnelle chinoise)

10 D’après (148).

Annexe XI : Alcaloïdes pyrrolizidiniques ciblés par la procédure analytique de la monographie générale relative aux alcaloïdes pyrrolizidiniques contaminants présente dans la 11^{ème} édition de la Pharmacopée européenne¹¹

Édifice moléculaire		Alcaloïde pyrrolizidinique
Monoester (à nécine dihydroxylée)		Échimidine / <i>N</i>-oxyde d'échimidine
		Europine / <i>N</i>-oxyde d'eupopine
		Héliotrine / <i>N</i>-oxyde d'héliotrine
		Intermédiaire / <i>N</i>-oxyde d'intermédiaire
		Lycopsamine / <i>N</i>-oxyde de lycopsamine
Diester	À chaîne ouverte	Lasiocarpine / <i>N</i>-oxyde de lasiocarpine
	Macrocyclique en C ₁₁	Monocrotaline / <i>N</i>-oxyde de monocrotaline
		Trichodesmine
	Macrocyclique en C ₁₂	Érucifoline / <i>N</i>-oxyde d'érucifoline
		Jacobine / <i>N</i>-oxyde de jacobine
		Rétorsine / <i>N</i>-oxyde de rétorsine
		Sénécionine / <i>N</i>-oxyde de sénécionine
		Sénéciphylline / <i>N</i>-oxyde de sénéciphylline
		Sénécivernine / <i>N</i>-oxyde de sénécivernine
		Senkirkine

¹¹ Au chapitre 2.8.26 : « Alcaloïdes pyrrolizidiniques contaminants » ; d'après (158).

Serment de Galien

En présence des Maîtres de cette Faculté et de mes Condisciples,

Je promets et je jure :

*D'être fidèle dans l'exercice de la Pharmacie
aux lois de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt
de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité
et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;*

*De ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état
pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés
ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes
de mon art et de rester digne de leurs enseignements.*

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

Que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.

Résumé :

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont une classe de molécules à la structure hétérocyclique particulière synthétisées par seulement quelques genres botaniques. Malgré cet apanage métabolique restreint nécessitant par ailleurs des enzymes spécifiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques se retrouvent en réalité dans un très grand nombre d'écosystèmes différents car les végétaux qui en élaborent se répartissent sur l'ensemble de la planète.

En outre, la distribution quasi ubiquitaire de ces composés contribue grandement à leur dangerosité en contaminant notamment plusieurs catégories de denrées alimentaires (infusions, miel, aromates, compléments alimentaires...) mais aussi en étant tout simplement produits par certaines plantes médicinales traditionnellement utilisées (bourrache, consoude, tussilage...). Or, une exposition prolongée aux alcaloïdes pyrrolizidiniques engendre un type d'intoxication caractéristique : la maladie veino-occlusive hépatique !

Pouvant évoluer jusqu'à un stade cirrhotique ou tumoral, ce syndrome suscite désormais l'inquiétude des instances sanitaires étatiques, si bien qu'au cours des dernières années, de nombreux textes de loi ont été promulgués afin de limiter le pouvoir contaminant des substances hépatotoxiques que sont les alcaloïdes pyrrolizidiniques. C'est ainsi qu'au sein de l'Union Européenne, les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par ces phytotoxines sont aujourd'hui soumises à des teneurs maximales précises.

Mots-clés :

- Alcaloïdes de type pyrrolizidine
- Intoxication
- *Boraginaceae*
- Contamination des aliments
- Métabolisme secondaire
- Maladie veino-occlusive hépatique
- *Asteraceae*
- Législation sur les aliments