Département amélioration des méthodes pour l'innovation scientifique Cirad-amis

PROJET FRANCO-THAI BACTERIOCINES

Rapport annuel 2003

Didier MONTET

Cirad-Amis

Production et formulation de substances antimicrobiennes par des bactéries lactiques dans le but de protéger les aliments contre les microorganismes pathogènes

Coordinateur : Didier Montet, Cirad-Amis, TA 40/16, 34032 Montpellier Cedex 5 didier.montet@cirad.fr, Tél : 04 67 61 57 28

Date de rédaction : 2 février 2004

Partenaire thaïlandais : Department of Biotechnology, Kasetsart University

AMIS n° 05

décembre 2003

Projet Franco-Thai Bactériocines

Rapport annuel 2003

Didier MONTET

Cirad-Amis

Coordinateur : Didier Montet, Cirad-Amis, TA 40/16, 34032 Montpellier Cedex 5 didier.montet@cirad.fr, Tél : 04 67 61 57 28

Date de rédaction : 2 février 2004

Partenaire thaïlandais : Department of Biotechnology, Kasetsart University

Titre du projet : Production et formulation de substances antimicrobiennes par des bactéries lactiques dans le but de protéger les aliments contre les microorganismes pathogènes.

1. Rappels

Le Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis et le Département de Microbiologie de Kasetsart University dirigé par le Professeur Penkhae Wanchaitanawong collaborent sur ce projet depuis janvier 2002. Ce projet Franco-Thai prend en charge les missions et séjours des étudiants et des professeurs impliqués dans le projet. Le Dr Sunee Nitisinprasert coordonne ce projet en Thaïlande et le Dr Didier Montet en France. Le présent rapport retrace les résultats obtenus durant l'année 2003.

Le projet a été expertisé à mi-parcours par Marc Lalande de la Mission Technique et Pédagogique (DSPT 10) du Ministère de la Recherche. Un dossier a été rédigé et un entretien a eu lieu à Paris le 18 septembre 2003.

2. Présentation du projet

Nous avions proposé cette collaboration entre Kasetsart University et le CIRAD pour développer des compétences thaïlandaises sur les conditions de production de bactéries produisant des substances bactériocines pour le développement de nouveaux ingrédients probiotiques dans une démarche de transfert industriel dans le domaine des aliments pour animaux. Ces produits visent notamment à remplacer l'utilisation d'antibiotiques ou d'antifongiques en alimentation animale et à améliorer la conservation des aliments complets. L'interdiction proche des antibiotiques dans l'alimentation animale incite à développer de nouvelles alternatives qui permettront aux fabricants d'aliments et aux éleveurs de respecter les réglementations sans diminuer leur compétitivité.

Le complément que nous produisons contient plus particulièrement des germes lactiques probiotiques vivants à très haute concentration, de l'acide lactique et acétique et de l'amylase. Il contient en outre des composés qui permettront de réduire les risques de contamination par des Salmonelles ou autres pathogènes, tout en évitant l'utilisation d'antibiotiques.

3. Programme d'activité du projet

Le programme s'est déroulé tout à fait normalement cette deuxième année. Il a eu quelques difficultés au démarrage liés à des retards d'attribution des budgets de déplacement coté thaïlandais. Les premiers échanges ont été réalisés sur fonds propres afin de maintenir la programmation scientifique et surtout les dates des stages d'étudiants.

En reprenant point par point les activités proposées lors du dépôt du projet, nous obtenons les résultats suivants :

Note : Les activités 2002 ont déjà été présentées dans le rapport annuel 2002. Seules les apports de 2003 dont développés ici.

Kasetsart University (KU)

Action 1 (12 mois) : *KU optimisera les conditions de culture des bactéries lactiques.*

Réalisé : Ce travail a été réalisé en grande part par Korakoch Hamsupo à la fois en Thaïlande durant la première partie de sa thèse (2002) et au Cirad durant un séjour de 1 an (04/2002-03/2003) financé par le consortium des universités thaïlandaises. Une publication est en cours de rédaction.

De plus, une étudiante française Lucie Bourdet (Ensia-Siarc/Cirad) a réalisé son stage de Master à KU sur la purification des bactériocines. Son billet d'avion a été pris en charge par l'Ensia et ses frais de vie par le Cirad. Un autre étudiant de l'Ensia-Siarc Mathieu Nasseau a bénéficié d'un stage de Master dans le même laboratoire sur un thème similaire (voir Rapports). Son billet a également été financé par l'Ensia et il a pris en charge ses frais de vie.

L'utilisation croissante des antibiotiques a causé le développement de bactéries résistantes. Une des solutions pour éviter le développement de ces résitances est d'équilibrer la flore intestinale à l'aide de probiotique. Des cultures microbiennes, appelées probiotiques peuvent être administrées aux animaux pour renforcer les protections vis à vis des flores pathogènes et renforcer le système immunitaire.

Les bactéries probiotiques doivent être un hôte normal de l'intestin, elles doivent pouvoir adhérer à l'épithélium intestinal pour surmonter le pH bas de l'estomac, la présence des acides biliaires et la concurrence d'autres microorganismes. Les bactéries lactiques (LAB) ont déjà été employées comme produit probiotique chez l'animal tel que le poulet et le porc. Elles produisent des substances antimicrobiennes qui ont des effets bénéfiques sur la santé : des acides, des alcools, l'anhydride carbonique, le péroxyde d'hydrogène et d'autres métabolites. Les bactériocines font parties de ces métabolites.

Notre partenaire de KU, Nitisinprasert *et al.* (2000) ont montré les effets de certaines bactériocines sur des microorganismes pathogènes. La souche testée, *Lactobacillus reuteri* est un entérolactobacillus hétérofermentaire. Son écosystème naturel est l'appareil gastro-intestinal des humains et de beaucoup d'animaux. *Lactobacillus reuteri* est une espèce d'entérolactobacillus capable de produire et de sécréter un intermédiaire métabolique qui confère une activité antimicrobienne efficace à son environnement. *Lactobacillus reuteri* KUB-AC16, KUB-AC5 et KUB-AC20 ont été étudiées.

Korakoch Hamsupo a travaillé sur l'optimisation des paramètres de fermentation qui permettent d'augmenter la production des bactériocines. La préparation des concentrés de culture de bactéries lactiques exige des techniques appropriées de production et de stabilisation qui maximisent la viabilité et l'activité des cellules bactériennes.

K.Hamsupo a étudié également le séchage par atomisation qui permet de stabiliser les LAB. La stabilité au cours du séchage des bactériocines a été mesurée. Une formulation adéquate a été proposée qui permet de stabiliser l'activité de la bactérie au cours du temps de stockage.

Action 2 (12 mois) : *KU étudiera la formulation et l'optimisation du séchage par atomisation des bactéries lactiques ainsi que la viabilité des bactéries lactiques après séchage.*

Réalisé : Ce travail a été réalisé par Korakoch Hamsupo durant son séjour de 1 an (04/2002-03/2003) au Cirad. Il avait été abordé également par Aurélie Noguier lors de son stage ITC au Cirad du 13 août 2001 au 28 février 2002.

Action 3 (6 mois) : *KU mettra au point une méthode de quantification des bactéries lactiques dans l'intestin de poulet, des essais sur animaux seront réalisés.*

Réalisé : Nuntaporn Pungsunvorn (thésarde KU) a mis au point une méthode de suivi par DGGE de l'effet des bactériocines sur les bactéries pathogènes du poulet durant son séjour au Cirad en 2003. Des travaux sur l'adhésion des bactéries aux parois intestinales du poulet ont été réalisés par Sunee Nitisinprasert lors de son séjour au Cirad en 2003.

Toutes les LAB testées : L.*reuteri* KUB-AC5, *L. reuteri* KUB-AC16, *L. acidophilus* and *L. sarivarious* KUB-AC21 proviennent de la collection du Department of Biotechnology, Kasetsart University. Les souches cibles *Escherichia coli* et *Salmonella* sp. proviennent de Betagro Co. company.

Le mucus a été préparé à partir d'intestin de poulet puis lyophilisé. Les bactéries LAB ont été ajoutées à la solution de mucus et incubées 1 h à 37° C. Les puits ont été lavés pour éliminer les bactéries non attachées. Les bactéries adhérées au mucus ont été directement analysées par PCR. L'extraction des ADN a été optimisée.

Les gels ont été scannés et quantifiés par analyse d'images. L'adhésion a été mesurée en comparant l'intensité des cellules adhérées à celle de la totalité des cellules mises en contact.

Action 4 (6 mois) : *KU étudiera le marché des antibiotiques et probiotiques en Thaïlande. Reste à faire.*

CIRAD

Action 5 (6 mois) : *le CIRAD étudiera une méthode de dosage performante de la nisine.*

Réalisé : stage de DEA Montpellier II de Charlotte Valat en 2001. Une méthode innovante de quantification de la nisine produite par les Lactobacilles a été mise au point. Elle utilise une méthode de bioluminescence indirecte qui met en évidence les ATP libérés par les parois cellulaires d'une bactérie cible lors de sa lyse par la nisine.

Ces travaux ont donné lieu à une publication : Charlotte Valat, Dominique Champiat, Thi Thanh Thuy N'Guyen, Gérard Loiseau, Maurice Raimbault, Didier Montet. Use of ATP bioluminescence to determine the bacterial sensitivity threshold to a bacteriocin, Luminescence Vol. 18, Issue 5, 2003.

Action 6 (12 mois) : *le CIRAD réalisera des études de séchage des farines fermentées selon les différentes techniques de lyophilisation, séchage en étuve ventilée, atomisation, déshydratation osmotique...*

Réalisé : stage d'ingénieur ITC de Thomas Cornet du 13 août 2001 au 28 février 2002.

L'objectif était de définir les conditions de séchage pour stabiliser les compléments alimentaires afin de préserver les propriétés probiotiques et la nisine : lyophilisation, séchage sur rouleaux, séchage à l'étuve sous vide, séchage à l'étuve ventilée, puis analyser les produits issus de ces séchages (mesure de l'activité de l'eau, matières sèches, dénombrement de la flore lactique, dosage de la nisine et mesure de la viscosité), afin de déterminer le séchage le plus approprié aussi bien au niveau qualitatif qu'économique.

Action 7 (6 mois) : *Sur ces farines fermentées et séchées, le CIRAD déterminera la composition biochimique finale (amylase, acide lactique et acétique, viabilité des germes lactiques avant et après séchage).*

Réalisé : stage d'ingénieur ITC de Aurélie Noguier du 13 août 2001 au 28 février 2002.

L'étude a porté sur la préparation et l'analyse de fermentations de farine de maïs crue à forte concentration en germes lactiques. Trois souches bactériennes ont été cultivées : une souche amylolytique, une souche à activité probiotique et une souche productrice de nisine. Les échantillons fermentés présentent une teneur en matière sèche maximale de 314 g/L, une population en germes lactiques de 10^{10} CFU/g de matière sèche, une concentration maximale en nisine de 6 mg/L. La concentration moyenne en acide lactique varie de 20 à 53 g/L. Les recherches se sont ensuite axées sur l'étude physiologique et la différenciation des souches dans les milieux fermentés par l'observation macroscopique et microscopique, les tests de recherche de l'oxydase et de la catalase et l'identification sur galerie API 50 CHL.

Action 8 (4 mois) : *le CIRAD étudiera la réhydratation des produits et la viabilité des souches au cours de cette réhydratation.*

Réalisé : stage d'ingénieur ITC de Aurélie Noguier du 13 août 2001 au 28 février 2002.

Action 9 (4 mois) : *En complément de l'évaluation du pouvoir bactéricide ou antifongique des compléments, réalisés par Kasetsart University sur des tests in vitro, la valeur alimentaire des produits obtenus sera déterminée par le laboratoire de nutrition animale du Cirad-Emvt.*

Réalisé : La valeur alimentaire des farines fermentées (Tableau ci-dessous) ne diffère pas beaucoup de celle du maïs standard. On remarque cependant la diminution de la teneur en amidon due à son hydrolyse par les bactéries utilisées qui ont un fort potentiel amylolytique.

	maïs farine fermentée (après étuve sous vide)	Riz Cargo standard	Maïs standard
Matière sèche	96,42	88	88
Matières minérales	2,21	0,71	1,45
Matières azotées totales	11,20	9,17	10,2
Matières grasses sans hydrolyse	4,5	1,34	4,7
CBW	3,22	0,52	2,4
NDF	9,53	0,97	10,5
Amidon (polarimétrie)	64,9	86,8	72,5
Sucres totaux	2,0	2,4	2,4
ED porc calculée (Kcal / kg MS)	3450	4000	3820
EM volaille calculée (Kcal / kg MS)	4020	4480	4180

Valeur alimentaire de la farine de maïs fermentée déterminée par le laboratoire de nutrition animale du Cirad-Emvt (Résultats exprimés en % de la matière sèche)

Action 10 (4 mois) : *le CIRAD étudiera le marché des antibiotiques et probiotiques en Europe. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la société Probiotec (34) qui était notre partenaire en 2002-2003.*

Les antibiotiques facteurs de croissance

Des substances médicamenteuses, particulièrement les antibiotiques, ont été utilisées pendant longtemps avec succès en tant que facteurs de croissance pour améliorer les performances zootechniques et sanitaires des animaux d'élevage.

L'emploi des antibiotiques à faibles doses améliore la production animale à l'échelle industrielle en favorisant l'élévation du taux de croissance avec des conditions d'élevage souvent inférieures à celles nécessaires pour obtenir une bonne production sans ces facteurs de croissance (ration alimentaire plus faible, moins riche, conditions générale de vie des animaux) (Gournier *et al*, 1994).

La distribution d'antibiotiques aux animaux par les aliments est autorisée par la réglementation communautaire sous deux types de statuts :

- en tant qu'additifs dans un aliment supplémenté : pour un effet de facteur de croissance (catégorie « antibiotiques ») ou en vue d'une prophylaxie anticoccidienne chez certains groupe d'animaux ;
-
- en tant que médicament vétérinaire dans un aliment médicamenteux : pour un traitement préventif (le plus fréquent) ou curatif.

Dans les deux cadres réglementaires, les antibiotiques sont autorisés selon le principe d'une liste positive. Leur innocuité pour l'animal et pour le consommateur, ainsi que leur efficacité, doivent être démontrées. Des garanties de constance de composition et de pureté sont également exigées (Directive 70/524/CEE).

Effets zootechniques des antibiotiques facteurs de croissance
L'addition en doses minimes d'antibiotiques aux aliments des animaux améliore les performances zootechniques de ces derniers :
- Le gain moyen quotidien (GMQ) en vitesse de croissance s'améliore de +3 à +7% ;
- Il faut moins d'aliment (-2 à -9%) pour produire plus de viande ;
- Les animaux sont plus homogènes ce qui permet aux éleveurs de vendre en une seule fois l'ensemble des animaux.

Il faut donc aux éleveurs moins d'aliments pour produire autant de viande, et moins de temps pour élever un groupe d'animaux. Par ailleurs les animaux antibio-supplémentés consomment moins pour produire autant. Ils utilisent mieux les protéines de la ration. De plus, l'ajout d'antibiotique permet de réduire la quantité d'azote dans les effluents, notamment dans les lisiers en sortie d'élevage porcin.

Utilisation des facteurs de croissance antibiotiques
On estime que la supplémentation des aliments avec un additif facteur de croissance (antibiotique ou chimique) concerne en France (AFSSA, 2000) : porcelets (98%), dindons (96%), poulets de chair (68%), pintades (81%), porcs (70%), poules pondeuses (20%), lapins (17%), bovins à l'engrais (28%). Tous les aliments pour les poulets standards sont ainsi supplémentés, alors qu'ils ne le sont pas pour les poulets labels.

Ces promoteurs de croissance étaient et sont encore ajoutés volontairement en concentrations faibles : environ 20 ppm, de 5 à 100 g/t dans l'aliment « normal » c'est à dire pendant de longues périodes.

Les antibiotiques facteurs de croissance en termes de volume de marché
D'après le dossier 15 du *Animal health* (European Federation of Animal Health), 10 493 tonnes de produits actifs d'antibiotique ont été consommées en France en 1997 avec approximativement 15% en alimentation animale.
Pour cette même année, les ventes totales du marché animal représentaient 3,3 milliards de dollars, se répartissant pour 37% pour les promoteurs de croissance. Le marché des facteurs de croissance représenterait 24% des ventes de l'ensemble des antimicrobiens. La participation de quelques pays européen sur ce marché : Europe de l'Ouest (25%), Europe centrale (9%), France (6%), Allemagne (5%), Grande Bretagne (3%), Espagne (3%), Italie (3%).

Changement de la réglementation : Interdiction programmée des antibiotiques en tant que facteurs de croissance

Une liste positive décrite pour l'union européenne les molécules antibiotiques autorisées, les doses d'additifs, les espèces animales. Jusqu'en 1996, les molécules suivantes étaient autorisées: avilamycine, avoparcine, bacitracine, carbodox, flavomycine, monensine, olaquindox, salinomycine, spiramycine, tylosine, virgiamycine.

En raison des conséquences liées à l'usage des antibiotiques dont la principale est l'antibiorésistance des bactéries, la législation est de plus en plus restrictive quant à leur utilisation comme facteurs de croissance. Suite à ces différentes études, la législation a évoluée en interdisant, sur le principe de précaution, la majorité des molécules utilisées depuis 1973. En 1997 et 1999, une nouvelle série de molécules a été interdite réduisant au nombre de 4 les molécules autorisées : avilamycine, virgiamycine, flavomycine, salinomycine.

Ce changement de politique n'est pas sans poser de problème dans les relations internationales. En effet, l'Europe est la seule à avoir pris une telle mesure sur le principe de précaution.

4. Mise en œuvre du budget, Date effective du début des travaux

Le budget alloué pour 2003 au Cirad était de 2961,01 Euros. Il prenait en compte 1 voyage France-Thaïlande (1220,00 Euros) et 1741,01 Euros de frais de documentation. Le billet d'avion a été utilisé par Gérard Loiseau.

Nous savions dès le départ qu'aucun budget n'était alloué pour les frais de laboratoires mais il serait nécessaire de prévoir à l'avenir un peu de fonctionnement pour les équipes de recherche. Nous restons toutefois très favorables à la collaboration scientifique avec la Thaïlande.

Lucie Bourdet (Ensia-Siarc) a réalisé son stage de Master à KU Bangkok du 23 janvier au 30 mai 2003. Mathieu Nasseau également en 2003. Les professeurs Sunee Nitisinprasert et Penkhae Wanchaitanawong (KU) ont bénéficié respectivement d'un séjour de trois mois (2003) et d'une semaine à Montpellier (2002).

Le Cirad a reçu deux thésardes thaïlandaises Korakoch Hamsupo en 2002-2003 et Nuntaporn Pungsunvorn en 2003 financées par le consortium des universités thaïlandaises.

Prévu	**Financés**	**Réalisés par**	**Dates**
1 mission courte chercheur	oui	Samira Sarter	14/06 au 21/06/2002
1 séjour étudiant 6 mois	non	Lucie Bourdet	23/01 au 30/05/2003
Bibliographie	oui	Didier Montet	2002-2003
1 accueil court séjour Thai	non	Sunee Nitisinprasert	14/10 au 18/10/2002
1 accueil court séjour Thai	non	Penkhae Wanchaitanawong	2/09 au 30/09/2002
		Korakoch Hamsupo	04/2002-03/2003
1 accueil long séjour Thai	non	Nuntaporn Pungsunvorn	06/05/2003-06/11/2003
1 accueil long séjour Thai	oui	Gérard Loiseau	6 au 10/07/2003
1 mission courte chercheur	oui	Sunee Nitisinprasert	1/10 au 14/11/2003
1 accueil long séjour Thai	oui		

Tableau 1 : Actions prévues et réalisées en 2002-2003

Conclusions

Malgré quelques imperfections sur les financements au lancement du projet certainement dus à la jeunesse du système et à sa mise en place, cette étude a permis de créer une collaboration durable entre le Cirad et Kasetsart University. La collaboration a très bien fonctionnée et nous avons de plus bénéficié d'autres opportunités financières pour favoriser l'échange d'étudiants (billets d'avion Ensia-siarc, bourse du consortium des universités thaïlandais, missions MAE).

Sept étudiants ont réalisé leur stage sur ce projet et trois chercheurs ont bénéficié de missions d'appui (Sunee Nitisinprasert, Penkhae Wanchaitanawong, Samira Sarter). Deux autres chercheurs du Cirad ont également participé à ce projet Didier Montet comme coordinateur et Gérard Loiseau pour l'encadrement en microbiologie.

Il est regrettable que ce programme de coopération fort intéressant et que nous aimerions bien voir reconduire, ne parvienne à financer que les échanges de personnes et pas le fonctionnement des laboratoires. Nous aimerions que ce programme à l'avenir soutienne même de façon minimale les équipes de recherche.

Les résultats scientifiques sont très bons. Une publication est déjà parue en 2003 et une seconde devrait paraître en 2004. Des partenaires industriels ont été contactés afin de valoriser les résultats (groupe agro-alimentaire CP).

Ce programme va se terminer dans un an environ et la suite de cette collaboration va s'avérer difficile. L'équipe de Kasetsart a pourtant trouvé un industriel thaïlandais intéressé à tester les produits de la recherche : antibiotiques naturels à pouvoir inhibiteur sur les pathogènes du poulet. Les industriels thaïlandais n'ont pas l'habitude de financer la recherche qu'ils considèrent être déjà financée par leurs impôts. Le Cirad travaillait avec un industriel qui a eu des difficultés financières et a disparu du marché. Ces compléments lactiques ont pourtant un avenir certain et proche dès que la législation européenne aura décidé d'arrêter l'usage des antibiotiques de synthèse en alimentation des volailles.

Rapports 2003

. Bourdet Lucie, Purification partielle d'une bactériocine produite par *Lactobacillus reuteri KUB-AC 16.* Ensia-Siarc 29/09/2003.

. Nasseau Mathieu, Purification partielle d'une bactériocine produite par *Lactobacillus reuteri* KUB 20. Ensia-Siarc 20/02/2003.

. Nitisinprasert Sunee, Pungsungvorn Nuntaporn, Adhesion study by PCR technique and microbiological method, Cirad Montpellier, France du 1 octobre au 14 novembre 2003.

Publication 2003 :

. Charlotte Valat, Dominique Champiat, Thi Thanh Thuy N'Guyen, Gérard Loiseau, Maurice Raimbault, Didier Montet.

Use of ATP bioluminescence to determine the bacterial sensitivity threshold to a bacteriocin, Luminescence Volume 18 Issue 5, 2003.

. Korakoch Hamsupo, Prakit Sukyai, Gérard Loiseau, Sunee Nitisinprasert, Didier Montet, Penkhae Wanchaitanawong.

Preservation of the anti-microbial activity of spray-dried *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5.

En rédaction 2004.