525878

CD_RP14907

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

PROJET FRANCO-THAI BACTERIOCINES

Rapport final

Dr Didier MONTET

Cirad-Amis

18 Janvier 2005

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, UR Tropiqual, TA 40/16, 34398 Montpellier Cedex 5 didier.montet@cirad.fr, Tél : 04 67 61 57 28

Partenaire thaïlandais : Department of Biotechnology, Kasetsart University

AMIS n°48

UR Tropiqual

2005

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

CIRAD
000068350

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

Remerciements : Les scientifiques et les étudiants impliqués dans ce projet veulent remercier l'Ambassade de France à Bangkok, le Ministère des Affaires Etrangères Français et la Commission on Higher Education du Ministère de l'Education Thaïlandais pour leur soutien financier et le plaisir d'avoir travailler entre nos deux nations.

1. Rappels

Le Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis et le Département de Microbiologie de Kasetsart University (KU) 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 entre janvier 2002 et décembre 2004.

Ce projet a pu être mené à bien grâce en particulier à l'aide financière obtenue par le Cirad auprès de la région Languedoc-Roussillon pour le projet Cost-Trial en collaboration avec la société Probiotec et l'aide financière obtenue par Melle Korakoch Hamsupo auprès du consortium des universités Thaïlandaises pour son séjour d'un an au Cirad.

Le projet a été expertisé à mi-parcours le 18 septembre 2003 par Mr Marc Lalande de la Mission Technique et Pédagogique (DSPT 10) du Ministère de la Recherche lors d'un entretien avec Didier Montet qui a fournit un rapport sur le déroulement du projet.

2. Présentation du projet

La collaboration entre Kasetsart University et le Cirad a été proposée pour développer des compétences thaïlandaises pour produire des bactéries lactiques synthétisant des bactériocines pour le développement de nouveaux ingrédients probiotiques dans une démarche de transfert industriel dans le secteur de l'alimentation animale. Ces ingrédients 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 de l'utilisation de la totalité 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 productivité donc leur compétitivité.

Le complément que nous produisons contient plus particulièrement des germes lactiques probiotiques vivants à très haute concentration, de l'acide lactique, de l'acide acétique et des enzymes amylolytiques. Il contient en outre des molécules aux propriétés antimicrobiennes. Les caractéristiques du produit permettront de réduire les risques de contamination microbienne et en particulier par des souches de Salmonelles ou autres bactéries pathogènes, sans recourir à l'utilisation d'antibiotiques.

3. Programme d'activité du projet

Le programme s'est déroulé tout à fait normalement depuis 2002. Les activités 2002 et 2003 ont déjà été présentées dans deux rapports annuels. Une partie des résultats de l'année 2004 ont été cités dans un rapport intermédiaire fourni en juin 2004.

Ce présent rapport fait état de l'ensemble des résultats obtenus durant ces trois années par les deux équipes. Ces résultats sont présentés par actions comme cela était prévu dans le projet initial (*en italique*).

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

Ce travail a été réalisé majoritairement par Melle Korakoch Hamsupo à la fois en Thaïlande durant la première partie de sa thèse (2002) et au Cirad durant un séjour d'une année (04/2002-03/2003). Ce séjour a été financé par le consortium des universités thaïlandaises dans le cadre de la thèse de l'étudiante. Une publication a été soumise à une revue à comité de lecture en 2004 : Pilot Scale Spray Drying of Antimicrobial Substance-Producing *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 for Chicken Probiotic Adjuncts par Korakoch Hamsupo, Prakit Sukyai, Gérard Loiseau, Sunee Nitisinprasert, Didier Montet, Penkhae Wanchaitanawong.

Deux étudiants français Lucie Bourdet et Mathieu Nasseau (Ensia-Siarc/Cirad) ont réalisé leurs stages de Master of sciences à K.U sur la purification des bactériocines en 2003. les frais de ces deux stages ont été pris en charge par le laboratoire thaïlandais. Les étudiants ont financé les billets d'avions. Les titres des deux mémoires de master sont :

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

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

Une autre étudiante thailandaise Nuntaporn Pungsunvorn a réalisé une partie des travaux de sa thèse au Cirad du 06 mai au 06 novembre 2003.

Melle Korakoch Hamsupo a travaillé sur l'optimisation des paramètres de fermentation qui permettent d'augmenter la production de bactériocine. La préparation des concentrés des milieux de culture des bactéries lactiques exige des techniques appropriées de production et de stabilisation qui maximisent la viabilité et l'activité des cellules bactériennes. Elle a étudié également le séchage par atomisation qui permet de stabiliser la viabilité des bactéries lactiques (LAB). La stabilité au cours du séchage des bactériocines a été mesurée. Ces travaux ont permis de proposer une formulation adéquate pour stabiliser la viabilité des bactéries au cours du stockage (voir action 2).

En 2004, KU a continué à optimiser les conditions de culture des bactéries lactiques in vivo en travaillant plus particulièrement sur l'identité et la concentration des sources de carbone et la détermination de la valeur du pH optimum de croissance. Les résultats montrent que 20 g/L de saccharose sont optimum comme source de carbone. Les valeurs de pH initiales de 3.5, 4.5, 5.5 et 6.5 ont été étudiés. La valeur initiale de pH de 4.5 donne la meilleure production de cellules soit 1 x 10^9 UFC (unités formant colonie) /mL comparée à la valeur des niveaux de population de 10^8 UFC/mL avant cette phase d'amélioration.

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.*

Ce travail a été réalisé par Melle Korakoch Hamsupo durant son séjour de 1 an (04/2002-03/2003) au Cirad. Melle Aurélie Noguier (élève ingénieur de l'Université de Technologie de Compiègne) a travaillé sur cette thématique au Cirad du 13 août 2001 au 28 février 2002.

Etapes clés du procédé

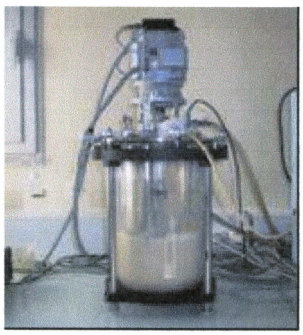
1. Fermentation en fermenteur de 10 litres

Le fermenteur utilisé, de marque Biolafite, a une capacité de 10 L. Des entrées et des sorties sont aménagées pour intervenir sur la composition du milieu de culture. Le fermenteur comporte un système d'agitation pour assurer un échange optimal entre les bactéries et les nutriments, ainsi qu'un système d'échangeurs thermiques afin de réguler la température du milieu.
Le milieu de croissance contient 750 g/L de farine dans 2,5 L de lait de soja (Tableau 1).

Grâce aux études menées sur la fermentation de farine dans les pays tropicaux, l'entreprise Probiotec a sélectionné trois souches pouvant entrer dans la composition de ce complément alimentaire. Ces souches sont utilisées en co-cultures pour leurs rôles différents :

- ✓ *Lb plantarum* A6 capable de se développer directement sur amidon grâce à la production d'α-amylase. Cette enzyme favorise l'hydrolyse des polysaccharides et libère donc les sucres nécessaires à la croissance des autres souches. Cette souche est résistante à la nisine,
- ✓ *Lb casei ssp casei* reconnu pour ses propriétés probiotiques tout en résistant à la nisine,
- ✓ *Lc lactis ssp lactis* souche productrice de nisine à activité anti-infectieuse contre les *Salmonelles* et les *Listeria*.

Toutes ces espèces sont productrices d'acide lactique, bactériostatique reconnu pour l'inhibition des pathogènes sensibles à l'acidité en particulier *Escherichia coli*.



Fermenteur de 10 litres

Les laits obtenus après fermentation contiennent d'importante quantité de nisine (2 mg/L) et 35 g/L acide lactique (Tableau 1) et une importante teneur en bactéries lactiques (10^9 CFU/mL par bactérie), ce qui en fait une préparation à activité probiotique et antibiotique.

Avant fermentation	*Après 24 h de fermentation*
Farine 750 g/L	15 g/L matière sèche
Lait de soja 2,5 L	35 g/L acide lactique
Lb plantarum,Lb casei, Lc lactis	10^9 CFU/mL par bactérie
	2 mg/L nisine
	Viscosité : 26 RVU

Tableau 1 : Caractéristiques du produit probiotique avant et après fermentation

2. Suivi des flores lactiques par galeries API

Le milieu API 50 CHL Medium, destiné à l'identification du genre *Lactobacillus* et des germes apparentés, est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50 CH. Cette dernière est constituée de 50 micro-tubes comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube) pour les études de fermentation et une zone d'aérobiose (la cupule) pour les études d'oxydation et d'assimilation.

Le micro-organisme à tester est mis en suspension dans un milieu spécifique (ampoule API 50 CHL Medium) puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus conditionnent le profil biochimique de la souche et servent à son identification ou à son typage.

Exemples de Galerie API

3. Séchage par atomisation

Les séchage ont eu lieu dans la halle de l'IUT de Montpellier avec un atomiseur Anhydro No.3 (Danemark) de capacité d'évaporation de 27 kg/h (1,6 m de diamètre, 4 m de haut).

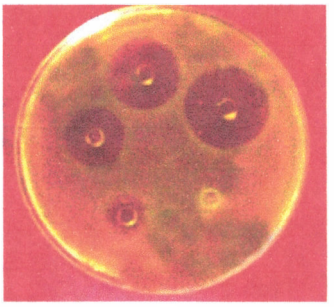
Atomiseur Anhydro

4. Mesure de l'activité antibiotiques des souches

Cette méthode consiste à inoculer en profondeur une souche de *Lactococcus cremoris* sensible à la nisine (10^5 bactéries / mL), sur boite de Pétri, dans un milieu M17 gélosé en surfusion à 50°C. Ce milieu est additionné d'un agent tensioactif : 2 % de tween 20 dilué au demi dans de l'eau distillée qui facilite la diffusion de la nisine.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

Les boîtes sont ensuite placées à 4°C pendant une nuit pour faciliter la diffusion de la nisine dans la gélose puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les diamètres des halos d'inhibition sont alors mesurés à 1 mm près. Une corrélation est établie entre les diamètres des zones d'inhibition et le logarithme des concentrations en nisine de la gamme étalon ; ceci permet de déterminer les concentrations en nisine des échantillons des milieux fermentés.



Boite de pétri avec halo de résistance à la nisine

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.*

Nuntaporn Pungsunvorn (thésarde KU) a mis au point une méthode de suivi par Gel d'Electrophorèse en Gradient Dénaturant (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 fin 2003.

KU a acheté l'appareil de DGGE sur fond propre en 2004. Les travaux sur le suivi des flores microbiennes dans l'intestin du poulet peuvent être réalisés maintenant directement en Thaïlande.

Essais sur animaux : Des essais de la préparation probiotique ont été réalisés en 2004 sur animaux en collaboration avec une ferme privée thaïlandaise. Le produit final pourra être mis sur le marché en Thaïlande.
Avant de proposer la préparation probiotique à la société privée, des essais ont été réalisés à l'échelle pilote à la ferme de l'université de Kasetsart sur des poulets.

180 poussins de 1 jour, moitié femelle - moitié male ont été placés par 30 dans 6 enclos. 6 traitements différents ont été appliqués : aliment seul, aliment avec antibiotique, aliment avec le probiotique de la société, aliment contenant *Lactobacillus* AC5 à 10^5 cfu/g, aliment contenant *Lactobacillus* AC5 à 10^6 cfu/g, et aliment contenant *Lactobacillus* AC5 à 10^7 cfu/g. Le rapport de conversion de l'aliment (FCR) obtenu est donné par la figure 1. Les résultats montrent que le traitement avec l'aliment additivé (antibiotique ou probiotique) n'améliore pas le FCR si on les compare à l'aliment de contrôle sans additif. Il est possible que la qualité sanitaire des expérimentations réalisées à l'université est faussé les résultats de façon trop positive.

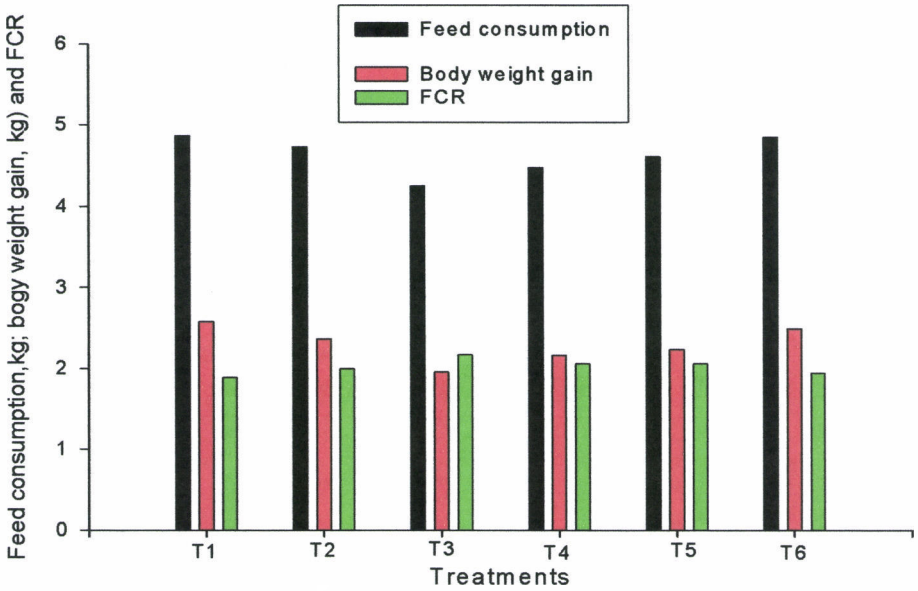


Fig. 1 Comparison on feed consumption, body weight gain and Feed conversion (FCR). T1, Control; T2, with antibiotic supplement T3, with commercial probiotic; T4, with AC5 of 10^5CFU/g; T5, with AC5 of 10^6 CFU/g and T6, with 10^7 CFU/g.

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

La Thaïlande a souffert ces dix dernières années de l'utilisation d'antibiotiques en alimentation animale en se voyant refuser des quantités importantes d'aliments exportés vers l'UE. Certains antibiotiques comme le chloramphenicol ou les furanes, interdits en UE depuis près de 10 ans sont régulièrement trouvés dans les produits alimentaires exportés de Thaïlande vers l'UE, en particulier les poulets et les crevettes. Le gouvernement thaïlandais est conscient de la perte de ces marchés (30 millions de bahts de perte sur la crevette en 2005) et a pris des mesures importantes comme le montage d'un laboratoire d'analyse des furanes qui contrôle les produits avant exports.

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

Une méthode innovante de quantification de la nisine produite par les Lactobacilles a été mise au point par Charlotte Valat en 2001 durant son stage de DEA Montpellier II. 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...*

L'objectif de Thomas Cornet durant son stage ingénieur ITC du 13 août 2001 au 28 février 2002 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.

Trois types de séchage (lyophilisation, séchage sous vide et séchage à l'étuve ventilée) ont donné des résultats satisfaisants en terme de quantité de flores lactiques et de nisine (pour les deux premiers).

Le séchage sur rouleaux ne permet pas dans les conditions où nous avons travaillé d'obtenir une flore lactique suffisante (de l'ordre de 10^3 à 10^4 CFU/g de produit sec) et de la nisine (aucune production). Il a donc été définitivement abandonné.

La lyophilisation s'impose comme une méthode de référence au niveau qualitatif : concentration en germes lactiques de l'ordre de 10^8 CFU/g de produit sec (avec 2 réductions décimales par rapport à la farine non séchée) et production de nisine (entre 0,65 et 6,03 mg/L).

Cependant, le séchage sous vide se révèle être une solution alternative attractive puisque son coût de revient est moindre que celui de la lyophilisation, et la qualité du produit séché est intéressante : flore lactique de l'ordre de 10^7 CFU/g de produit sec (avec environ 1 réduction décimale pour l'optimum du plan d'expérience) et production de nisine (non quantifiée).

Le séchage à l'étuve ventilée pourrait constituer une solution encore plus avantageuse puisque son coût est inférieur à celui du séchage sous vide et la concentration en germes lactiques des produits obtenus est satisfaisante (10^6 CFU/g de produit sec pour une perte de 1 logarithme par rapport à avant le séchage). Mais des essais supplémentaires sont nécessaires afin notamment de déterminer la production de nisine.

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).*

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.*

Korakoch Hamsupo a étudié l'effet d'agents protecteurs et de l'humidité des farines sur la survie de la bactérie *L. reuteri* KUB-AC5 lors de son séchage par atomisation (Figure 2). Elle a montré que les maltodextrines protégeait mieux les bactéries lactiques lors de leur séchage par atomisation avec un taux de survie de 16,7%. Le glycérol protége le moins du fait de sa capacité à retenir l'eau de la poudre. De plus, l'activité antimicrobienne est conservée après séchage et réhydratation.

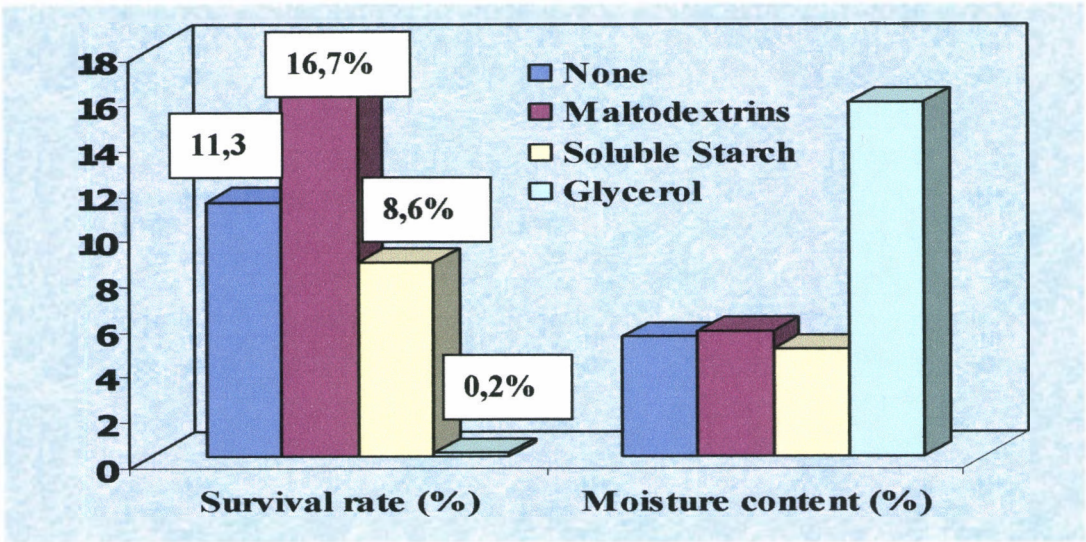


Figure 2 : Effet d'agents protecteurs et de l'humidité des farines sur la survie de la bactérie *L. reuteri* KUB-AC5 lors de son séchage par atomisation

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.*

La valeur alimentaire des farines fermentées 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 (Tableau 2). Ce résultat a pour effet de rendre cette préparation plus digestible pour les animaux.

	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

Tableau 2 : 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)

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

En résumé, *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 tolère une large gamme de pH allant de 2 à 9, 3% de sels biliaires et montre une bonne capacité d'adhésion de 21%, ce qui est similaire à celle de la bactérie considérée comme référence à la matière *L. acidophillus*. De plus, *L. reuteri* inhibe la croissance de *E. coli et de Salmonella* qui affectent la croissance des poulets. Des expériences *in vivo* ont donc été réalisées. L'effet des Lactobacilles sur la croissance des poulets, les performances de vieillissement et la diversité microbienne de l'intestin mesurée par DGGE sont en cours d'estimation.

Les microorganismes déshydratés ont été préparés à 10^6 cfu/g par atomisation en utilisant la méthode optimisée par Korakoch Hamsupo au Cirad puis mélangés à l'alimentation des poulets et extrudés. La température lors du conditionnement étant supérieure à 80-85° C, elle provoque la réduction du nombre de microorganismes à 10 cfu/g. Nous proposons donc d'étudier d'autres techniques de préparation de l'aliment final par encapsulation afin de préserver au mieux les bactéries lactiques.

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 privé 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

Le budget global pour la totalité du projet a été fixé à **8358,37 Euros** pour le côté français.

Budget détaillé du projet

	Kasetsart University *Aide Accordée (Bahts)*				**CIRAD** *Aide Accordée (Euros)*			
Années	**2002**	**2003**	**2004**	**Total**	**2002**	**2003**	**2004**	**Total**
Fonctionnement	3 900	85 000	4000	92 900	546,37	1741,01	1525,00	3813,00
Déplacements	40 000	40 000		80 000	885,37	1220,00	2440,00	4545,37
Coût Total TTC	**43 900**	**125 000**	**4 000**	**172 900**	**1432,36**	**2961.01**	**3965,00**	**8358,37**

Sommes exprimées en Euros ou en Bahts (1 Euros = 48 bahts environ)

Détails des dépenses

2002

- 1 mission courte chercheur réalisée par Samira Sarter à Bangkok du 14/06 au 21/06/2002,
- 2 accueils court séjour Thai Sunee Nitisinprasert du 14/10 au 18/10/2002 et Penkhae Wanchaitanawong du 2/09 au 30/09/2002 (les per diem de ces missions ont été versés directement au personne concernées par Egide),
- 1 accueil long séjour Thai de 1 an réalisé par Korakoch Hamsupo du 04/2002-03/2003.

2003

- 1 mission courte chercheur réalisée par Gérard Loiseau à Bangkok du 6 au 10/07/2003,
- 1 accueil long séjour Thai réalisé par Sunee Nitisinprasert du 1/10 au 14/11/2003,
- 1 accueil long séjour Thai 6 mois réalisé par Nuntaporn Pungsunvorn du 06/05/2003-06/11/2003,
- 1 séjour long séjour étudiant français non financé de 6 mois réalisé par Lucie Bourdet 23/01 au 30/05/2003.

2004

- 2 missions Montpellier-Bangkok réalisées par Didier Montet à Bangkok du 5 au 11 septembre 2004 et du 29 novembre au 8 décembre 2004,

La mission de septembre a permis à D.Montet de participer à un workshop sur la Food safety à Bangkok les 8 et 9 septembre où nos partenaires Dr Sunee Nitisinprasert et Korakoch Hamsupo sont également intervenues.

RAD-DIST
ité bibliothèque
valette

5. Conclusions

Malgré les financements très faibles des travaux de recherche, cette étude a permis de créer une collaboration durable entre le Cirad et l'université de Kasetsart. 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 cinq chercheurs ont bénéficié de missions d'appui (Sunee Nitisinprasert, Penkhae Wanchaitanawong, Samira Sarter, Gérard Loiseau, Didier Montet).

Les résultats scientifiques sont bons. Une publication est déjà parue en 2003 et une seconde déjà envoyée à un éditeur devrait paraître en 2005.

En 2004, les activités au sein du Cirad ont fortement baissé puisque les financements privés du projet se sont terminés. Les partenaires Thais par contre ont continué à produire des résultats grâce aux 2 thèses en cours et à une aide d'origine privée. D. Montet continue à encadrer les deux thèses et à valoriser les travaux par le travail sur les publications. Korakoch Hamsupo devait passer sa thèse en mars 2005.

Les partenaires présenteront un nouveau projet Franco-Thai en septembre sur un thème un peu différent : la traçabilité, mettant en ouvre les compétences de chacun. D. Montet souhaiterait obtenir une mission pour aller assister à la thèse de Korakoch Hamsupo.

6. 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.

. Montet Didier, Note de mission : Démarrage du projet Master Asia Link et suivi de projets en Asie du sud-est, 23 janvier 2003.

. Montet Didier, Note de mission : Création d'un réseau asiatique en sûreté des aliments. Organisation d'un congrès en Food safety à Bangkok en 2004. Suivi des projets Master Asia Link, Bactériocines et ATP, 6août 2003.

. Montet Didier, Cirad-Amis, Projet Franco-Thai Bacteriocines, Rapport annuel 2003 N°05, décembre 2003. Production et formulation de substances antimicrobiennes par des bactéries lactiques dans le but de protéger les aliments contre les microorganismes pathogènes.

Rapports 2004

. Montet Didier, Cirad-Amis, Projet Franco-Thai Bacteriocines, Rapport Etape, Juin 2004, Production et formulation de substances antimicrobiennes par des bactéries lactiques dans le but de protéger les aliments contre les microorganismes pathogènes.

. Montet Didier, Cirad-Amis, Projet Franco-Thai Bacteriocines, Rapport de mission du 5 au 11 septembre 2004.

. Montet Didier, Cirad-Amis, Projet Franco-Thai Bacteriocines, Rapport de mission du 29 novembre au 8 décembre 2004.

Conférences 2004

. Montet Didier, Production and formulation of antimicrobial substances by lactic acid bacteria to assure the food protection against microbial contaminations.

Food Safety and International Trade : The French - Thai Approach and EU regulation.

Ministry of Science and Technology (MOST), Thai Agro – Industry Academic council and French Embassy in Bangkok Thailand, Bangkok 8 et 9 Septembre 2004.

. Nitisinprasert Sunee, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria affecting the growth of pathogenic bacteria and fungi.

Food Safety and International Trade : The French - Thai Approach and EU regulation.

Ministry of Science and Technology (MOST), Thai Agro – Industry Academic council and French Embassy in Bangkok Thailand, Bangkok 8 et 9 Septembre 2004.

. Hamsupo Korakoch, Production of dry Lactic acid bacteria with high bacteriocin activity.

Food Safety and International Trade : The French - Thai Approach and EU regulation.

Ministry of Science and Technology (MOST), Thai Agro – Industry Academic council and French Embassy in Bangkok Thailand, Bangkok 8 et 9 Septembre 2004.

. Sunee Nitisinprasert, Nuntaporn Puangsungworn, Penkhae Wanchaithanawong, Gerard Loiseau and Didier Montet. 2004. *In vitro* adhesion assay of lactic acid bacteria as a probiotic and pathogenic bacteria by simple microbiological and genetic methods. The 10th World Congress on Clinical Nutrition. November 30 – December 3, 2004. Phuket, Thailand. P. 91.

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.

Publication 2004-2005

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

Prediction on the Stability of Spray Dried *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Arrhenius Equation for Long –Term Storage. Submitted to Journal of Microbiology and Biotechnology" (The Korean Society for Microbiology and Biotechnology) June, 2004.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette