Organisé avec le soutien financier de :

Intérêt des plantes chez les volailles :

comment passer de la croyance à la science ?

INTRODUCTION

De **l'ANTIBIORÉSISTANCE**



Réduction de l'usage des ATB en favorisant les
stratégies de préservation et renforcement de la santé des animaux

à la recherche d'alternatives… aux antibiotiques…



INTERET DES PRODUITS A BASE DE PLANTES

Des outils complémentaires d'une approche de dé-médication

LE CONTEXTE

DES PRODUITS A BASE DE PLANTES : une offre importante et en croissance



Problème d'évaluation de leur efficacité = prévention ?



> absence de références robustes et de bases méthodologiques solides
> résultats peu reproductibles et parfois contradictoires

Sachant que les extraits végétaux sont des produits :

- de composition complexe
- potentiellement (très) variables en fonction de nombreux facteurs (partie de plante, saison, stade de récolte, procédé de préparation de l'extrait, région, …) et
- qui requièrent des compétences spécifiques pour les caractériser de façon fiable

Aucune **méthodes claire et standardisée d'évaluation** de l'efficacité de ces extraits sur les animaux de rente

INTRODUCTION





CASDAR MEXAVI 2017 – 2020

Méthodologie permettant d'évaluer la capacité des extraits végétaux à renforcer les défenses naturelles des espèces avicoles

Vetopole 26, Institut Polytechnique La salle, Anses, Coop de France, SNIA, DGAL, SNGTV

INTRODUCTION



Aide à la sélection des extraits végétaux, du choix jusqu'à la mesure de leur efficacité biologique :

Le renforcement des défenses naturelles des volailles !

Mise à disposition d'un panel d'outils, méthodes, démarches pour identifier les extraits de plantes d'intérêt et objectiver les effets chez l'animal pour disposer d'une vision globale

Ce que n'est pas ce projet :

- L'outil de sélection de principes actif pour soigner les animaux
- Les prémices d'un nouveau cadre réglementaire

Une démonstration que Naturel ≠ Bon pour la santé des volailles !

L'innocuité des produits a été une préoccupation constante du projet

INTRODUCTION

Une journée de restitution de projet mais pas uniquement !

« Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les extraits de plantes en alimentation animale sans jamais avoir osé le demander »

Réglementation, caractérisation, sélection et évaluation des effets
Témoignage de praticiens….

Des réactions en présentielle, Des questions sur le tchat.
N'hésitez pas à partager vos questions.

Intérêt des plantes chez les volailles :

comment passer de la croyance à la science ?

Bon Colloque mexavi à tous

Organisé avec le soutien financier de :

Les extraits végétaux en alimentation animale : Aspects réglementaires

Géraldine CHANU

Docteur vétérinaire – Directrice

AFCA CIAL

Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale

Sommaire

- Contexte réglementaire en alimentation animale
  - Secteur très encadré
  - Limites de ce cadre
- Statut réglementaire des produits à base de plantes en alimentation animale
- Listes d'exclusions de plantes en alimentation animale

Contexte réglementaire

- Secteur très encadré sur le plan réglementaire
  - Règlementation sanitaire : R178/2002, R183/2005
  - Substances indésirables : Dir 2002/32
  - Mise sur le marché et étiquetage des produits :
    - R767/2009 : matières premières et aliments composés
    - R 1831/2003 : additifs et prémélanges
  - Autorisation des additifs : R429/2008 et règlements d'autorisation

- Extraits végétaux utilisés/utilisables en alimentation animale doivent répondre à ce cadre
  - Difficultés d'interprétation : statut des produits, plantes utilisables, allégations….

Rôle de la nutrition dans la santé et le bien-être des animaux

- Reconnaissance de la contribution de la nutrition à l'amélioration de la santé et du bien-être des animaux
  - Rapport sur le plan d'action européen fondé sur le principe « One health » pour combattre la résistance aux antimicrobiens (Parlement Européen (rapport du 10 juillet 2018))

« utiliser des aliments pour animaux sûrs et équilibrés du point de vue nutritionnel constitue une mesure de prévention efficace pour aider les animaux à combattre les pathogènes en améliorant leur état de santé et de bien-être général grâce à des stratégies spécifiques en matière d'alimentation et de composition, de formulation ou de transformation des aliments ».

Allégations en alimentation animale

- Allégations nutritionnelles ou fonctionnelles autorisées, à conditions :
  - Allégation objective, vérifiable et compréhensible
  - Justification basée sur : libellé, socle, dossier de preuve

- Frontière entre l'aliment et le médicament :
  - Prévention, traitement ou guérison d'une maladie → **Médicament**
  - Prévention des déséquilibres nutritionnels dès lors qu'il n'est pas établi de lien avec des symptômes pathologiques → **Aliment**

Règlement 767/2009 – article 13

3. L'étiquetage ou la présentation des matières premières pour aliments des animaux et des aliments composés pour animaux ne comporte pas d'allégations selon lesquelles:

a) **l'aliment possède des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'une maladie**, à l'exception des coccidiostatiques et des histomonostatiques autorisés en vertu du règlement (CE) no 1831/2003; toutefois, le présent point **ne s'applique pas aux allégations concernant la prévention des déséquilibres nutritionnels dès lors qu'il n'est pas établi de lien avec des symptômes pathologiques;**

b) l'aliment vise un objectif nutritionnel particulier prévu dans la liste des destinations visée à l'article 9, sauf s'il satisfait aux prescriptions qui y sont énoncées.

Frontières du cadre réglementaire

NUTRITION ANIMALE		MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES		
Produits de Nutrition de Base	Produits de Nutrition Fonctionnelle	Produits de Réduction d'un Risque Sanitaire et/ou Métabolique	Produits de Prévention ou Curatifs d'une Pathologie	Vaccins, Réactifs, Diagnostics médicaux…

- Périmètre = NUTRITION ANIMALE

- **Les produits à base de plantes sont une solution quant à l'amélioration de la santé et du bien-être des animaux.**

Statuts des produits à base de plantes en alimentation animale

- Définition de extrait (Norme ISO 9235:2013)
  - Produit obtenu par le traitement d'une matière première naturelle par un ou plusieurs solvants
  - Le terme « extrait » est un terme générique
  - Produits sur le marché très variables (non concentré à purifié), de statuts différents

- **→ Utilisation du terme « produit à base de plantes »**

Statuts des produits à base de plantes en alimentation animale

- Pour être utilisables en alimentation animale, les produits à base de plantes doivent avoir le statut :
  - Matière première
  - Additif
  - Mélange (prémélange / aliment composé complet et complémentaire)

Produit	Définition
Matière première (MP)	*Produits d'origine végétale ou animale et dérivés de transformation et substances organiques ou inorganiques* *Objectif : satisfaire les besoins nutritionnels des animaux* *Pour l'alimentation directe des animaux ou pour la fabrication d'aliment composé ou comme support de prémélange* *Catalogue MP non exhaustif, registre MP*
Additif	*Substances, micro-organismes, préparations* *Ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions* *Règlements d'autorisation / conditions d'utilisation – Registre Additifs*

Statuts des produits à base de plantes en alimentation animale

Produits à base de plantes

Matières premières
(Catalogue MP – Règl. 68/2013 modifié)

- Entrée 13.1.9 (produits de la transformation de plantes)
- Partie 7 (Autres plantes, algues et produits dérivés)
- …

Produits à base de plantes dont le statut est à déterminer

= comparer avec les critères proposés pour les matières premières et les additifs

Registre MP
- ✓ Pas de valeur règlementaire
- ✓ À notifier au registre (si pas déjà inscrite)

Additifs
(Registre communautaire des additifs – Additifs déjà autorisés)

2b Substances aromatiques
- Oléorésine de Caspicum annuum
- 2b161 Teinture de cumin

Additifs zootechniques
- 4d15 Huile de thym, huile de badiane synthétique et poudre d'écorce de quillaja

Additif
- ✓ Dossier à déposer

Critères à prendre en compte pour déterminer statut MP/additif

- Recommandations de la Commission Européenne

Commission Européenne. Recommandation du 14 janvier 2011 arrêtant des lignes directrices pour la distinction entre les matières premières pour aliments des animaux, les additifs pour l'alimentation animale, les produits biocides et les médicaments vétérinaires. 2011/25/UE

- La méthode de fabrication et de transformation
- La sécurité et le mode d'utilisation
- La fonctionnalité

- Recommandations de l'AFCA-CIAL pour les produits à base de plantes basées sur ces critères :

Procédés	Types d'apport	Usages et présentation
Procédés mis en œuvre pour la fabrication du produit Complexité du procédé	Apport nutritionnel Niveau de caractérisation du produit Niveau de purification Standardisation	Mode de présentation Dénomination Destination/mode d'emploi Quantité utilisée Fonctionnalité

Critères cumulatifs et non exhaustifs

Plantes interdites en alimentation animale

- Plantes = base de l'alimentation des animaux

  - À l'exception des plantes interdites par la règlementation (**impuretés botaniques**, *Directive 2002*/32)

- Interdiction de mettre sur le marché des aliments pour animaux dangereux

  - qui ont un effet néfaste sur la santé humaine ou animale ou
  - qui rendent dangereuses pour la consommation humaine les denrées alimentaires dérivées des animaux producteurs de denrées alimentaires

  (Règlement (CE) 178/2002)

Plantes non utilisables en alimentation animale

➢ Plantes toxiques : extrapolation des listes alimentation humaine

- Substances vénéneuses : Code la santé publique, à l'exception des plantes explicitement autorisées dans le catalogue MP
- Plantes médicinales dont le risque est supérieur au bénéfice Pharmacopée – Liste B

➢ Cas particuliers risques de dopage

- Plantes reconnues comme dopantes interdites dans les aliments à destination des chevaux/animaux sportifs

Plantes médicinales

- Pharmacopée française – Liste A : Plantes médicinales utilisées traditionnellement en allopathie et pour certaines d'entre elles, en homéopathie
  - Plantes à usage alimentaire/condimentaire
    - → Libérées du monopole pharmaceutique
    - → **Utilisables en alimentation animale**, dans les mêmes conditions qu'en alimentation humaine
  - Plantes utilisables dans les compléments alimentaires en humaine (liste DGCCRF et/ou arrêté « plantes »)
    - → **Utilisables en alimentation animale**, si respect des conditions d'emploi (parties de plantes, procédés)
  - /!\ Si substances, produits ou mélanges similaires à médicament autorisé : **« médicament par fonction »** : **non autorisés en alimentation animale**

Plantes médicinales

- Pharmacopée – Liste A : Plantes médicinales utilisées traditionnellement en allopathie et pour certaines d'entre elles, en homéopathie

  - Plantes non libérées du monopole pharmaceutique
    - → **Interdites en alimentation animale**

Conclusions

- Difficultés d'interprétation de la règlementation
  - Statut des produits
  - Plantes autorisées en alimentation animale
- Besoin de connaissance des produits et des procédés
- → Guide AFCA-CIAL : **Guide de bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et produits à base de plantes en alimentation animale**



MERCI DE VOTRE ATTENTION

geraldine.chanu@afca-cial.org

AFCA CIAL

Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

Usage des plantes en santé animale : une évaluation et une réglementation à adapter aux usages

Catherine Experton, ITAB

Usage des plantes en santé animale

1. Cadre réglementaire pour les plantes en santé animale

2. Etat des lieux des usages en volaille de chair bio

3. Travaux en cours

   Pour évaluer l'intérêt des plantes en santé

   Pour faire évoluer la règlementation

   Pour acquérir des références : efficacité / sécurité

Les plantes : des utilisations diverses

Des formes : usage en frais, sec, poudre, macérat huileux, extraits, huiles essentielles, …



Des utilisations

- Cosmétique: lavande
- Répulsif: ail, géranium, lavandin
- Immunostimulant: échinacées, ravintsara
- Métabolique: drainage hépatique et rénal,
- Correction des carences: ortie, prêle
- Préventif: situations de stress, contexte parasitaire
- Curatif
- Alimentaire

En fonction de l'utilisation, statut réglementaire

Soigner : « administrer en vue de corriger ou modifier des fonctions organiques »



Soigner : allégation thérapeutique

Usage des plantes avec allégation thérapeutique

Soigner : « administrer en vue de corriger ou modifier des fonctions organiques »



Prescription :
- Médicament
- Spécialité pharmaceutique
Préparations magistrales
=> Cascade (Les temps d'attente forfaitaires … et doublés en AB).

Usage des plantes avec allégation thérapeutique

Soigner : « administrer en vue de corriger ou modifier des fonctions organiques »







Prescription :
- Médicament
- Spécialité pharmaceutique
Préparations magistrales
=> Cascade (Les temps d'attente forfaitaires … et doublés en AB).

Substances actives des plantes :
-AMM
-Etre inscrite au tableau 1 du règlement LMR
- AMM allégée (décret)

Substances actives des plantes : LMR (Limite Maximale de Résidus)

Toute substance pharmacologiquement active destinée à des animaux dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine doit avoir fait l'objet d'une évaluation du risque de résidus.

Liste LMR : règlement UE 37/2010

- Tableau 1 substances autorisées
  - Avec restriction d'usage
  - Aucune LMR requise

- Tableau 2 substances interdites

  Aucune LMR ne peut être fixée

- Liste out of scope

Excipients ou de substances naturellement présentes dans l'organisme

Très peu de plantes avec un statut réglementaire pour la santé

- Seulement 50 plantes sont inscrites au tableau 1 LMR sans aucune restriction - Absence statut LMR pour la majorité des plantes utilisées pour la santé des élevages.

- LMR pour 1 substance, une espèce et un tissu ou denrée => une plante = plusieurs substances

- Nombre très restreint de médicaments à base de plantes avec AMM (8 médicaments)

- Détournement avec l'aliment complémentaire : liste additif (règlement (CE) n°1831/2003)

Statut réglementaire en fonction de l'utilisation-destination

- S'il y a allégation thérapeutique : *statut de médicament vétérinaire*

  => La substance à base de plantes ne peut être utilisée que sur prescription vétérinaire (*pas d'automédication*)

- S'il n'y a pas d'allégation thérapeutique : *statut d'aliment*

  => La substance à base de plantes ne peut être utilisée que si elle figure dans le registre des *additifs*

Ambiguïté de positionnement pour un usage en santé



Thym saturéoïdes

- Propriétés anti bactérienne
- Aucun statut LMR tableau 1 et 2.
- Pas de statut additif animal (uniquement vulgaris)
- Présent liste compléments alimentaires homme

Eucalyptus citriodora

- Propriétés anti inflammatoires
- Aucun statut LMR tableau 1 et 2.
- Statut additif animal
- Présente liste compléments alimentaires homme

Trait'bio : un état des lieux des méthodes de traitements alternatifs utilisés en production de poulet de chair biologique

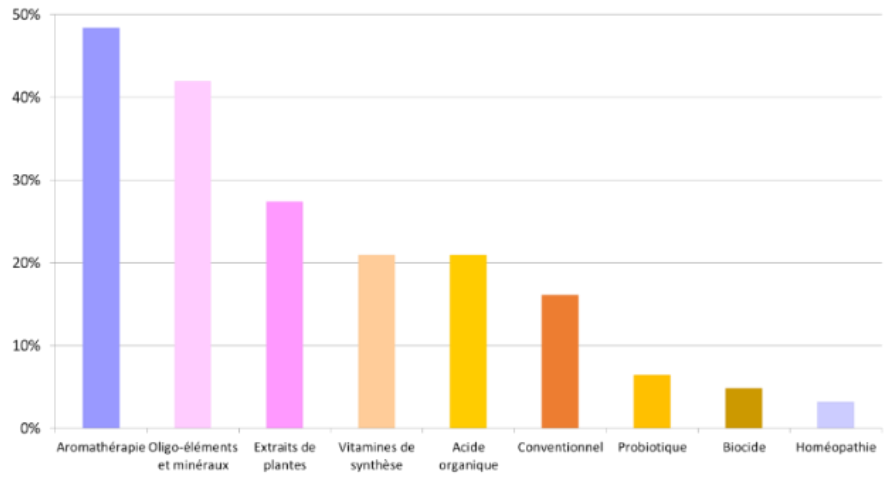
- 85 lots suivis

- 62 produits différents utilisés,

pour 203 usages recensés

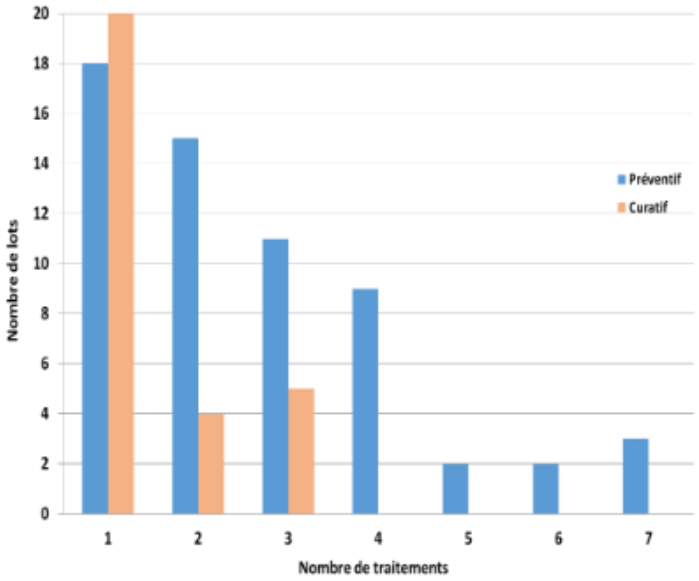
Famille
Extraits de plantes
Aromathérapie
Homéopathie
Oligoéléments
Vitamines de synthèse
Probiotiques
Acides organiques
Traitements conventionnels
Biocides

Répartition des 62 produits selon leur catégorie



- *L'aromathérapie* = principale famille utilisée (dans 48,4% des produits)
- *Aromathérapie + Extraits de plantes* = dans *75,8*% des produits
- Essentiellement des *produits simples* composés d'une seule famille (47%)

Trait'bio : un état des lieux des méthodes de traitements alternatifs utilisés en production de poulet de chair biologique



Répartition des 203 usages de produits parmi les 70 lots utilisateurs

- 15/85 lots sans aucune utilisation de produits
- Utilisation *préventive : 79%* des usages
- Utilisation *curative : 21 %* des usages (34% des lots /un seul produit administré).

Travaux / expertises

- *Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective, février 2016 « Évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires à base de plantes, »*

= > « ….. Peu de publications scientifiques avec un niveau de preuve élevé »

- *Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective , février 2018 « État des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage. Élaboration d'une méthode d'évaluation des publications scientifiques et résultats »*

=> « ….Pluralité de statut règlementaire …. Amorcé une réflexion dans un contexte européen….. »

- *Groupe de travail DGAL / ANMV : Phytothérapie*

⇒ Contexte européen / listes

- *Plan éco Antiblo*

=> REPASS : réseau (Afvac, Avef, SNGTV) sur la phyto-aromathérapie vétérinaire.

- *Plan Ambition Bio*

⇒ axe 6 : adapter la réglementation / phytothérapie

Des travaux R & D

Des projets de R&D

- *RELACS / Plantes et Santé / TRANSATT / AROMAM / PEI Pays de La Loire*

- *INRA SAEB : Quelles formes d'expérimentation pour étudier les effets des huiles essentielles en élevage ?(2018)*

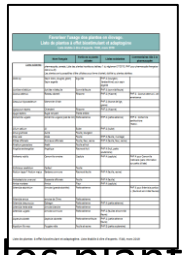
Collectif « plantes en élevage »

http://www.plantesenelevage.fr/

- *Des organisations fédératives*
  - FNAB, réseau CIVAM, FNGDS, TRAME, FEVEC, FADEAR, Confédération Paysanne, N&P, CR, Syndicat Caprin, SIMPLES
- *Des instituts techniques*
  - ITAB
  - ITEPMAI
- *Des praticiens vétérinaires*
  - Antikor, FEVEC, GIE Zone Verte, Philippe Labre, Gilles Grosmond, …
- *Des praticiens botanistes*
  - Florence Lardet, Michel Thouzery, Éric Darley, …
- *Des structures économiques*
  - BIOLAIT, …

Une liste de plantes élaborée à dire d'experts

- *Des facteurs d'inclusion raisonnés:*
  - Plantes à usage alimentaire chez l'homme
  - Plantes à usage alimentaire chez l'animal
  - Plantes d'usage libre et courant chez l'homme en soins par les plantes



- *Des facteurs d'exclusions:*
  - Plantes toxiques
  - Plantes de la liste B de la pharmacopée française



- *Exemple du Canada: liste de plante utilisable en élevage (et de plantes interdites)*
- *Les modalités d'entrée* dans cette liste représente une *garantie* vis-à-vis des risques pour les consommateurs.

Une reconnaissance de l'usage spécifique des plantes

A la différence des médicaments de synthèse, de nombreuses plantes entrent d'une manière ou d'une autre dans la chaine alimentaire:

- Notion de PNPP: **préparation naturelle peu préoccupante**
- Une catégorie juridique à part entre complément alimentaire et médicament vétérinaire
- Sortir de l'instrumentalisation du complément alimentaire
- N'est pas contradictoire avec le dépôt de dossier d'AMM allégé pour des mélanges spécifiques ou des présentations spécifiques.

MERCI DE VOTRE ATTENTION

catherine.experton@itab.asso.fr

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

Caractérisation des extraits

Denis BELLENOT
Iteipmai

En collaboration avec Hanh DUFAT
Produits Naturels, Analyse et Synthèse / CiTCoM – UMR 8038 CNRS/Univ. de Paris

Colloque MEXAVI, 22 Octobre 2020, Nouzilly

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Définition des extraits végétaux :**

NORME INTERNATIONALE **ISO 9235:2013(E/F)**

Matières premières aromatiques naturelles — Vocabulaire

EXTRAIT	EXTRACT	
extrait	extract	2.13
concrète	concrete	2.7
résinoïde	resinoid	2.26
pommade florale	pomade	2.22
oléorésine d'extraction	extracted oleoresin	2.21
extrait par fluide supercritique	supercritical fluid extract	2.27
extrait non concentré	non-concentrated extract = single fold extract	2.20
teinture et infusion	tincture and infusion	2.31
alcoolat	alcoholate	2.2
distillat	distillate	2.8
eau aromatique = hydrolat	aromatic water = hydrolate	2.3
concentré volatile	volatile concentrate	2.32
absolue	absolute	2.1

Document de travail

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Définition des extraits végétaux :

➢ Pharmacopée Européenne

Les extraits sont des préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes et oléorésines) ou solide (extraits secs), **obtenues à partir de drogues végétales** ou de matières animales généralement à l'état sec.

Remarque : Une poudre de plante n'est pas un extrait. Mais c'est une « préparation à base de plante » (Ph Eur)

Mélisse (feuille de)	DÉFINITION : Feuille séchée *de Melissa officinalis* L. Teneur : **au minimum 1,0 pour cent d'acide rosmarinique** ($C_{18}H_{16}O_8$; Mr 360,3) (drogue desséchée).
Mélisse (feuille de) Extrait sec	DÉFINITION : Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447). Teneur : **au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique** ($C_{18}H_{16}O_8$; Mr 360,3) (extrait sec). **PRODUCTION :** L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau chaude (au minimum 70 °C) ou un solvant hydroalcoolique au plus équivalent en concentration à l'éthanol à 70 pour cent V/V.

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Pourquoi caractériser ? :**

Exigences réglementaires :

- REACH
- EFSA règlement additif (voir présentations AFCACIAL) dossiers d'enregistrement

Exigences de qualité :

- Composition identique ➔ effets identiques

Nécessité industrielle :

- Suivre le produit au cours des étapes d'élaboration

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Doc. Ref. EMEA/HMPC/253629/2007

CONSTITUANTS	caractéristiques	substances ou groupes de substances chimiquement définies, **spécifiques d'une plante** et pouvant être utilisés à des fins d'identification	
	ayant une activité thérapeutique connue	substances ou groupes de substances chimiquement définies, **généralement acceptés pour contribuer de façon substantielle à l'activité thérapeutique** […]	Principe actif
	toxiques	substances ou groupes de substances chimiquement définies présentant une **toxicité avérée**	
MARQUEURS	substances ou groupes de substances chimiquement définies, […] **présentant un intérêt en termes de contrôle**, qu'ils aient ou non une activité thérapeutique. Les marqueurs servent à calculer la quantité de […] de plante dans un (produit à base de plante).	actifs	Constituants ou groupes de constituants généralement reconnus pour contribuer à l'activité thérapeutique.
		analytiques	Constituants ou groupes de constituants utilisés à des fins analytiques

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare | Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé

COUNCIL OF EUROPE



- [ ] Drogues végétales : introduction
- [ ] Abelmoschus (corolle d')
- [ ] Absinthe
- [ ] Acanthopanax (écorce d')
- [ ] Achillée millefeuille
- [ ] Achyranthes bidentata (racine d')
- [ ] Actée à grappes
- [ ] Agar-agar
- [ ] Agripaume
- [ ] Aigremoine
- [ ] Ail (poudre d')
- [ ] Akebia (tige d')
- [ ] Alchémille
- [ ] Aloès des Barbades
- [ ] Aloès du Cap
- [ ] Aloès (extrait sec titré d')
- [ ] Amomum (fruit d')
- [ ] Amomum (fruit rond d')
- [ ] Andrographis (partie aérienne d')
- [ ] Anemarrhena asphodeloides (rhizom...
- [ ] Angelica archangelica (racine d')
- [ ] Angelica dahurica (racine d')
- [ ] Angelica pubescens (racine d')
- [ ] Angelica sinensis (racine d')
- [ ] Anis (fruit d')
- [ ] Anis (huile essentielle d')

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

edqm
European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare | Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé
COUNCIL OF EUROPE

01/2011:1447 corrigé 10.0
Mélisse (feuille de)
Melissae folium
DÉFINITION
Feuille séchée de *Melissa officinalis* L.
Teneur : au minimum 1,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (drogue desséchée)

01/2010:2524
Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).
PRODUCTION
L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau chaude (au minimum 70 °C) ou un solvant hydroalcoolique au plus équivalent en concentration à l'éthanol à 70 pour cent *V/V*.

CARACTERISATION DES EXTRAITS

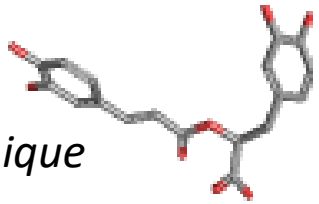
❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

edqm
European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare | Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé
COUNCIL OF EUROPE

acide rosmarinique



"it ../.. exerts powerful antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and even antidepressant, anti-aging effects. …/… anticancer activities

Nadeem, M. et al. « Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review ». Applied Sciences 9, n° 15 (janvier 2019): 3139. https://doi.org/10.3390/app9153139.



iteipmai

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).

CARACTERISATION DES EXTRAITS

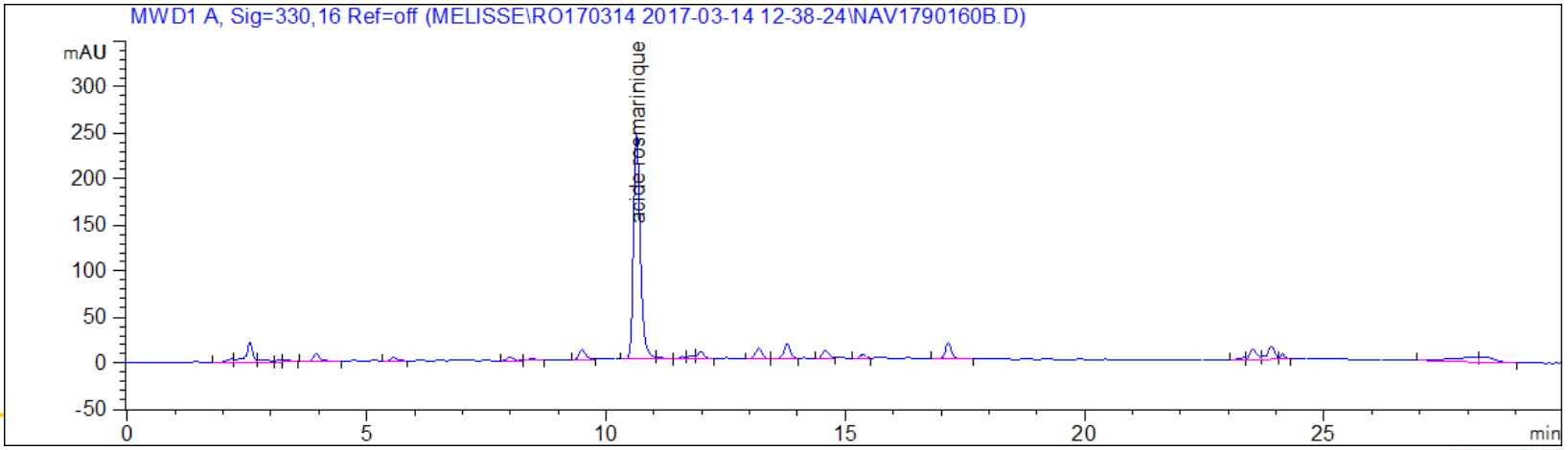
❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement



Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).



CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).

MEXAVI	AR %
Ech 1	0,92
Ech 2	0,92
Ech 3	3,30
Ech 4	4,94

historique iteipmai AR % :
83 extraits entre 2009 - 2014

min	1,02
max	10,97
moyenne	6,35
médiane	6,81
CMV %	29,5%

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

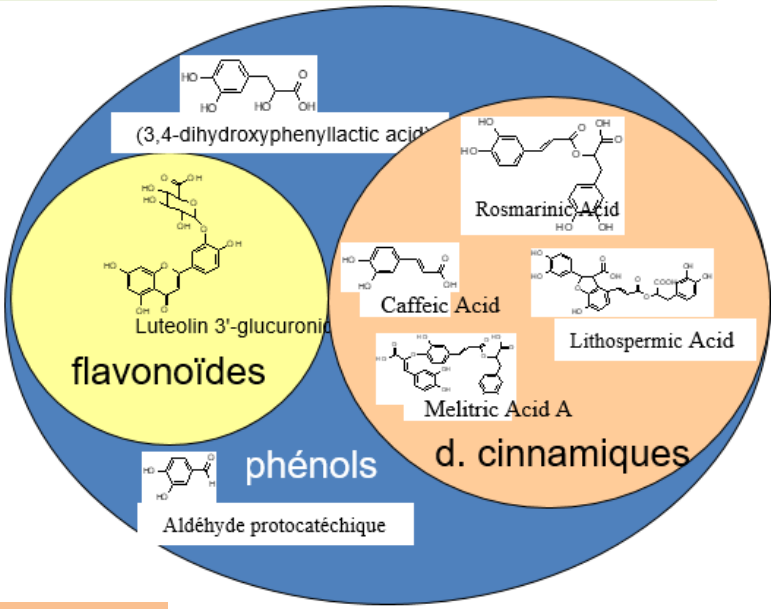
Choix des méthodes :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

Méthodes internes,

- Mélisse
  - Phenols
  - D. cinnamiques
  - Ac rosmarinique CLHP



Réactif de Folin	15% phénols en pyrrogalol
Réactif d'Arnow	9% de d.cinnamiques en ac.rosmarinique
Réactif $AlCl_3$	1,5 % de flavonoïdes en luteolin glc
CLHP	3,5 % d'acide rosmarinique

CARACTERISATION DES EXTRAITS

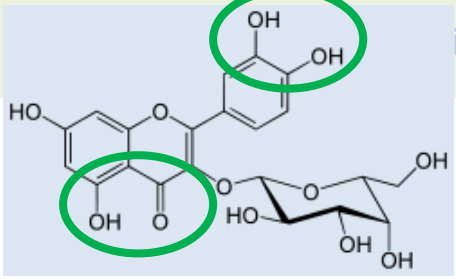
❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des méthodes :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

iers d'enregistrement



hyperoside

Réactif $AlCl_3$ (Flavonoïdes Ph Eur)

Complexation avec 2 Hydroxyles en *ortho* ou 1 hydroxyle et un carbonyle voisin

➔ non spécifique des flavonoïdes

Markham K.R. & Mabry T.J.;
A Procedure for the Ultra-Violet spectral Detection of Ortho-dihydroxyl groups in Flavonoids; Phytochem; 1968; 7; 1197-2000

CARACTERISATION DES EXTRAITS

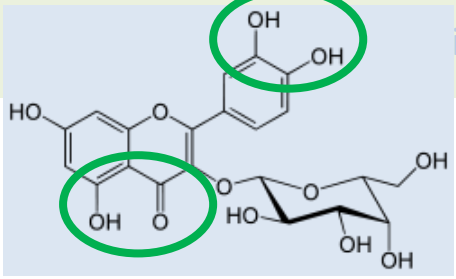
❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des méthodes :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

iers d'enregistrement



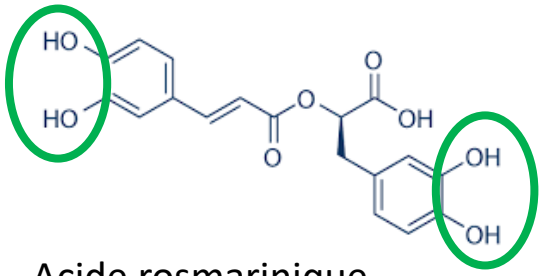
hyperoside

Réactif $AlCl_3$ (Flavonoïdes Ph Eur)

Complexation avec 2 Hydroxyles en *ortho* ou 1 hydroxyle et un carbonyle voisin

➔ non spécifique des flavonoïdes

Markham K.R. & Mabry T.J.;
A Procedure for the Ultra-Violet spectral Detection of Ortho-dihydroxyl groups in Flavonoids; Phytochem; 1968; 7; 1197-2000



Acide rosmarinique

CARACTERISATION DES EXTRAITS

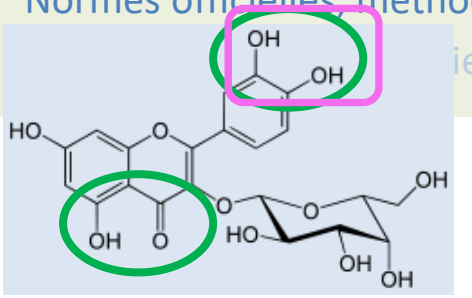
❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des méthodes :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

iers d'enregistrement



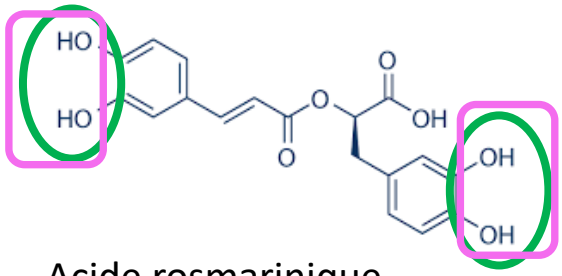
hyperoside

Réactif $AlCl_3$ (Flavonoïdes Ph Eur)

Complexation avec 2 Hydroxyles en *ortho* ou 1 hydroxyle et un carbonyle voisin

➔ non spécifique des flavonoïdes

Markham K.R. & Mabry T.J.;
A Procedure for the Ultra-Violet spectral Detection of Ortho-dihydroxyl groups in Flavonoids; Phytochem; 1968; 7; 1197-2000



Acide rosmarinique

Réactif d'**Arnow (d. o-di hydroxy cinnamiques Ph Eur)** :

En présence d'**ortho-diphénols** en milieu chlohydrique, il se forme un complexe nitromolybdique coloré en jaune qui devient rose en milieu alcalin

Spécificité de certaines méthodes officielles ?

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

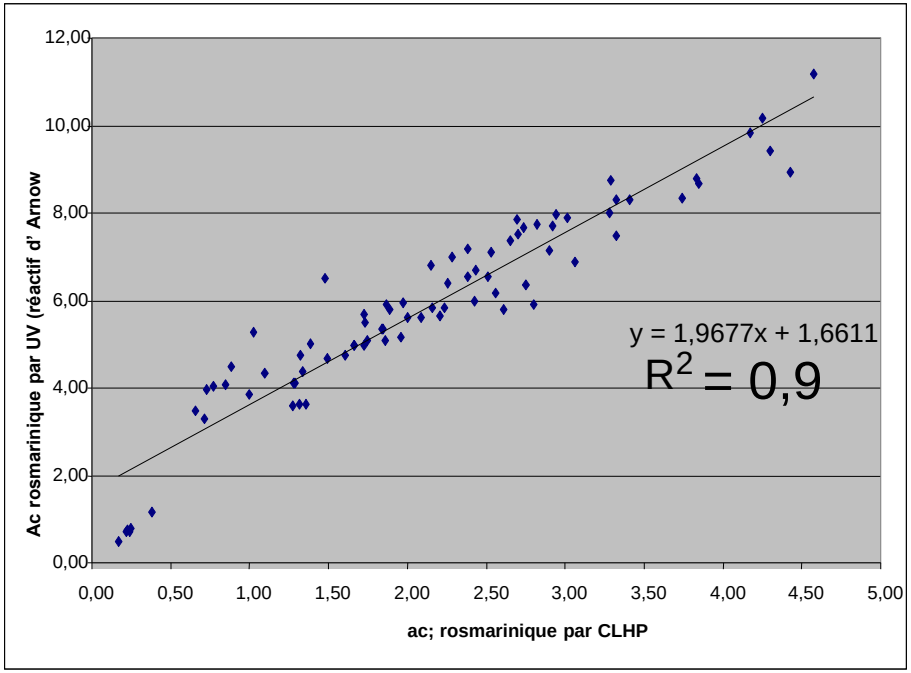
Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Entre 2004 et 2012, 81 échantillons de feuilles de mélisse ont été analysés selon les 2 méthodes : CLHP (Ph Eur) et UV (Arnow)



CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Expression du résultat :

Dosage des phénols : Le réactif de Folin :

Le réactif Folin-Ciocalteu (1927) est un mélange de molybdate de sodium, de tungstate sodium et d'autres réactifs. En présence de phénol, il se développe une coloration bleue par formation d'un complexe avec le Mo(V).

Les méthodes d'analyse

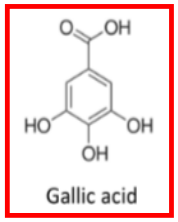
Dosage des phénols

- Le réactif de Folin

J Agric Food Chem. 2010

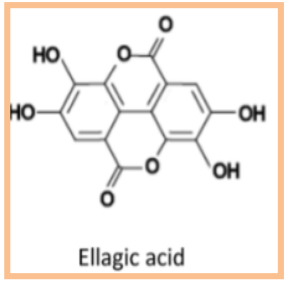
Phenolic compounds	Molar Mass (g/mol)	MM_x / MM_{GAE}	GAE (molar)	GAE (mass)
salicylic acid	138,1	0,73	0,26	0,36
caffeic acid	180,2	0,96	0,96	1,00
gallic acid	**188,1**	1,00	**1,00**	**1,00**
ferulic acid	194,2	1,03	1,08	1,05
resveratrol	228,3	1,21	1,23	1,01
ellagic acid	302,2	1,61	2,12	1,32
quercetin	338,0	1,80	2,08	1,16
chlorogenic acid	354,3	1,88	1,36	0,72
curcumin	368,4	1,96	1,41	0,72
rutin	610,5	3,25	1,53	0,57
tannic acid	1701,0	9,04	9,04	0,88

Le réactif Folin-Ciocalteu (1927) est un mélange de molybdate de sodium, de tungstate sodium et d'autres réactifs. En présence de phénol, il se développe une coloration bleue par formation d'un complexe avec le Mo(V).



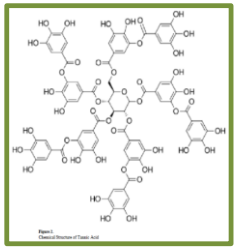
Gallic acid

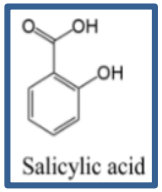
X 2



Ellagic acid

X 10





Salicylic acid

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

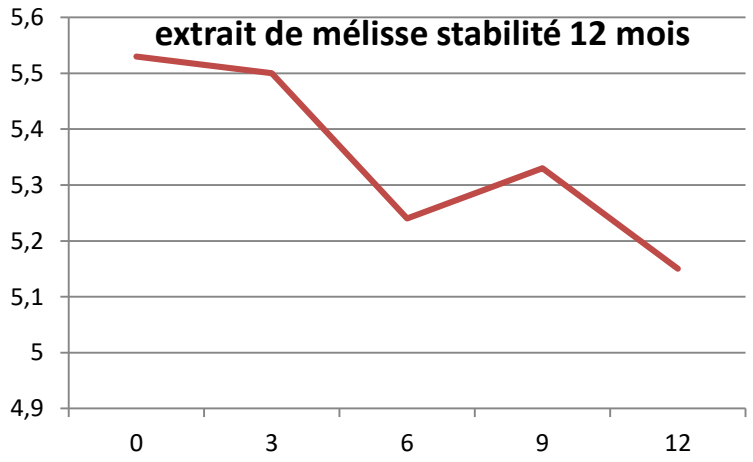
Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Stabilité de la teneur en AR d'un extrait de mélisse



Extrait = Produit stable

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

- Comment procéder, quelles définitions ?
- Normes officielles, méthodes de références,
- Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

01/2010:2524
Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).
ESSAI
Perte à la dessiccation (eau + comp. Volatils**)** (2.8.17) : au maximum 6,0 pour cent.

Que sont les 92% restant ?

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Comment caractériser un extrait ? :

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

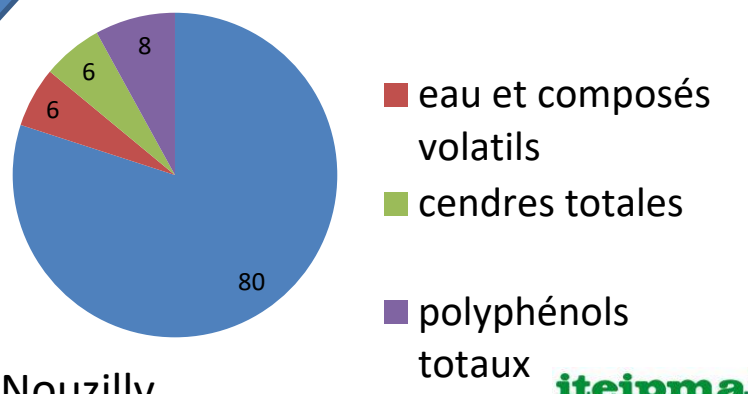
Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

01/2010:2524
Mélisse (feuille de), extrait sec de
Melissae folii extractum siccum
DÉFINITION
Extrait sec produit à partir de Feuille de mélisse (1447).
Teneur : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (extrait sec).
ESSAI
Perte à la dessiccation (eau + comp. Volatils**)** (2.8.17) : au maximum 6,0 pour cent.

Que sont les 92% restant ?

Analyses iteipmai

	valeur %	%
eau et composés volatils	6	
Il reste		94
cendres totales (SiO_2)	6	
Il reste		88
polyphénols totaux	8	
Il reste		**80**



CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

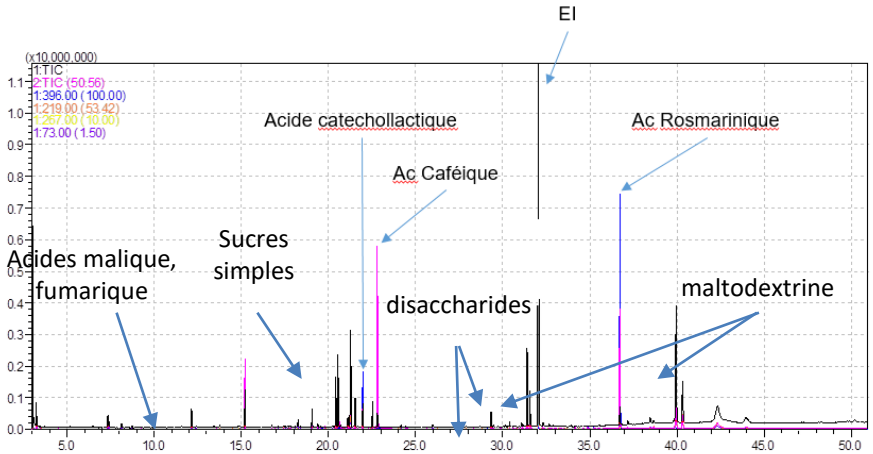
Normes officielles, méthodes de références,

Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Que sont les 92% restant ? → Que sont les 80% restant ?

Profils GCMS TMS

Oses 10-15 % + Maltodextrine



CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

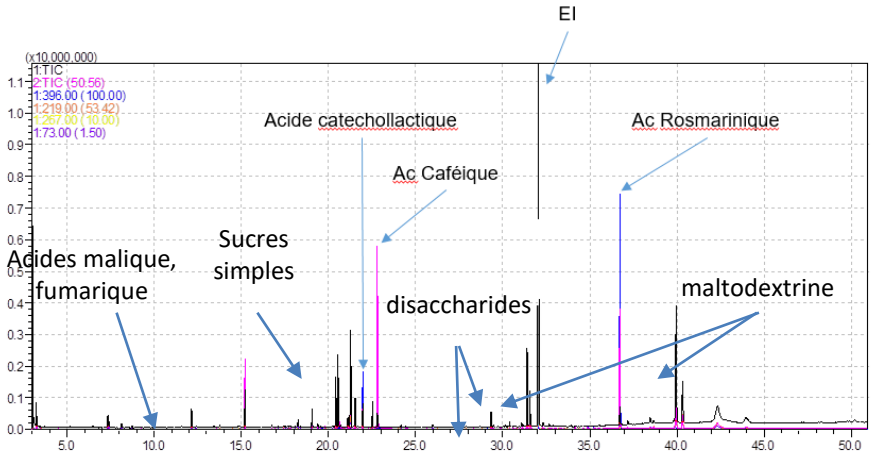
Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

Que sont les 92% restant ?

Que sont les 80% restant ?

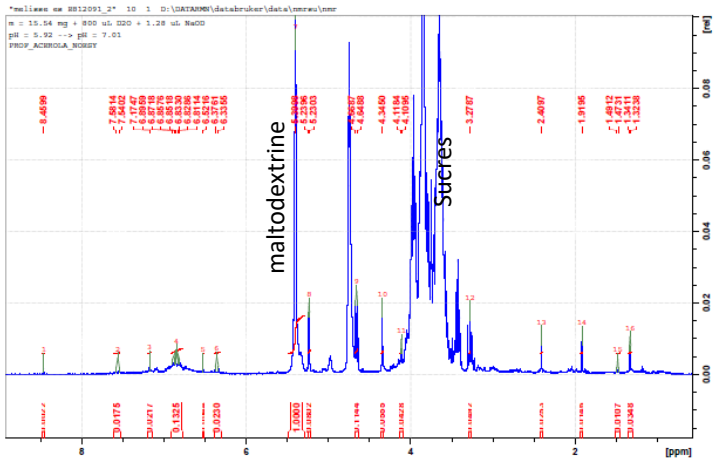
Profils GCMS TMS

Oses 10-15 % + Maltodextrine



Profils RMN H1

Maltodextrine 40-60%



CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

Comment procéder, quelles définitions ?

Normes officielles, méthodes de références,

Méthodes internes, dossiers d'enregistrement

	valeur %	%
eau et composés volatils	6	
Il reste		94
cendres totales (SiO_2)	6	
Il reste		88
polyphénols totaux	8	
Il reste		**80**

valeur %	%	
40-60		maltodextrine
	30	Il reste
10-15		Sucres
	20	Il reste
2-5		Acides organiques
	0-15	**Il reste**

Protéines ?
Sels minéraux (Mg)
Lipides ?

Auxiliaires technologiques

Résultats MEXAVI

Stabilité de l'extrait de mélisse

Extrait de mélisse	T0	T0 + 4 mois	T0 + 9 mois
Arnow %	6,49	6,23	6,41
AR HPLC %	1,44	1,37	1,38

Résultats MEXAVI

❖ **Fabrication farines et granulés :**

incorporation :

PLANTE	INCORPORATION 2018	INCORPORATION 2019	biblio
Ginseng	1,00%	0,05%	1,00%
Echinacée	1,50%	0,50%	0,50%
Mélisse	2,00%	1,00%	1,00%
Astragale	2,00%		
Comm 1	0,01%		
Comm 2	0,01%		

Resultats MEXAVI

❖ **Fabrication farines et granulés :**

incorporation :

PLANTE	INCORPORATION 2018	INCORPORATION 2019	biblio
Ginseng	1,00%	0,05%	1,00%
Echinacée	1,50%	0,50%	0,50%
Mélisse	2,00%	1,00%	1,00%
Astragale	2,00%		
Comm 1	0,01%		
Comm 2	0,01%		

Effet de la température de granulation

PLANTE	granulation 70°C	granulation 85°C
Mélisse	0,01%	0,01%

AUCUN

autres extraits : TENEURS TROP FAIBLES POUR ETRE MESUREES

Résultats MEXAVI

❖ **Fabrication farines et granulés août 2019 (pour essai en élevage):**

incorporation :

échantillon	CT	MS	Acide Rosmarinique %
MELISSE extrait sec	8,21	92,48	1,42
DEMARRAGE C	4,93	89,98	0,01
CROISSANCE C	4,72	90,68	0,01
FINITION C	4,11	90,61	0,00

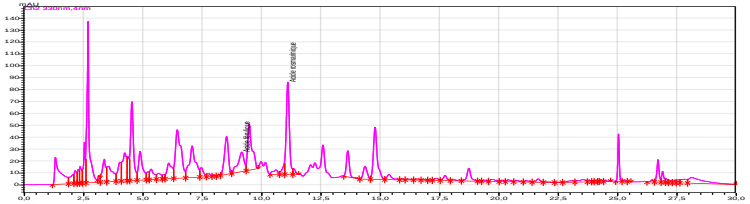
Résultats MEXAVI

❖ **Fabrication farines et granulés août 2020 (essai en élevage):**

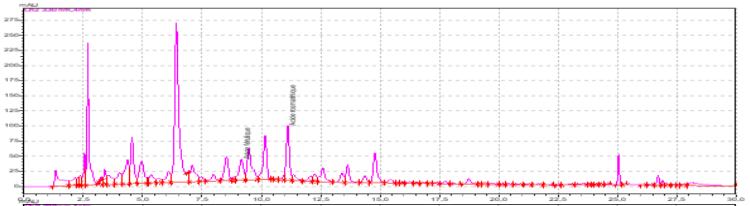
incorporation :

échantillon	CT	MS	Acide Rosmarinique %
MELISSE extrait sec	8,21	92,48	1,42
DEMARRAGE C	4,93	89,98	0,01
CROISSANCE C	4,72	90,68	0,01
FINITION C	4,11	90,61	0,00

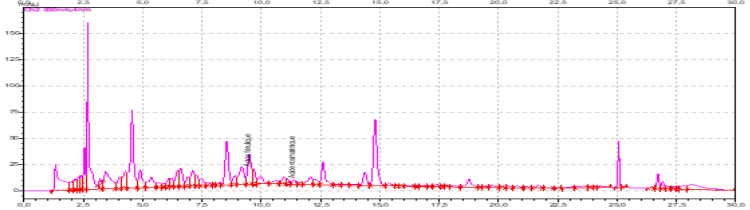
DEMARRAGE



CROISSANCE



FINITION



Matrices différentes

➔ interférences différentes

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ **Comment caractériser un extrait ? :**

Choix des marqueurs :

Caractérisation « totale »

Mise en oeuvre de différentes méthodes
Complémentaires ou se recoupant plus ou moins

Méthodes globales / méthodes spécifiques
Méthodes destructives / non destructives
Méthodes couteuses / peu couteuses

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Validation des méthodes d'analyse :

Pré-requis -> Equipements qualifiés, personnel qualifié, procédure optimisée, échantillons représentatifs des lots, matériaux de référence…

Dr Hanh DUFAT

Produits Naturels, Analyse et Synthèse / CiTCoM – UMR 8038 CNRS/Univ. de Paris
UFR Pharmacie 4, avenue de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06

CARACTERISATION DES EXTRAITS

❖ Validation des méthodes d'analyse :

Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives (selon le guide ANSES)

Étape du processus de validation	Caractéristique		Type de procédure analytique	
			Qualitative	Quantitative
Caractérisation Intra labo	Spécificité		X	X
	Sensibilité		X	(X)
	Fonction d'étalonnage/efficacité (PCR)			X
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse		sans objet	X
	Exactitude (justesse + fidélité)[a]		sans objet	X
	Linéarité		sans objet	X
	Limite de	quantification	sans objet	X
		détection	X	(X)
	Domaine de validité		X	X

(X): caractéristiques recommandées. a : méthodes analytiques quantitatives l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité

Dr Hanh DUFAT

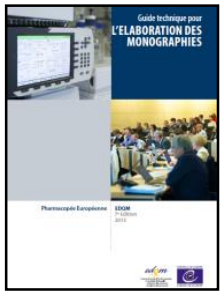
Produits Naturels, Analyse et Synthèse / CiTCoM – UMR 8038 CNRS/Univ. de Paris
UFR Pharmacie 4, avenue de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06

CARACTERISATION DES EXTRAITS

Validation des procédures analytiques des drogues végétales et préparations à base de drogues végétales

Objectifs : estimation des **performances** des procédures analytiques physicochimiques en routine (qualitatives, recherches impuretés, quantitative)

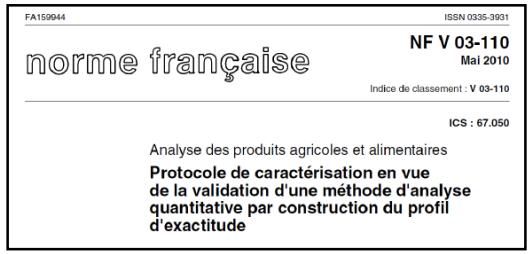
-> Fiabilité des résultats pour la comparaison des lots et le suivi des stabilités



GUIDE TECHNIQUE pour <u>l'élaboration des monographies</u>

7ème éd. - 2015, DEQM - Ch. 3 - Validation analytique

https://www.edqm.eu/sites/default/files/guide_technique_pour_l_elaboration_des_monographies_7eme_edition_2015.pdf


FA159944 ISSN 0335-3931

norme française

NF V 03-110
Mai 2010

Indice de classement : V 03-110

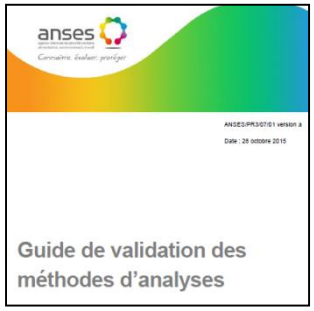
ICS : 67.050

Analyse des produits agricoles et alimentaires

Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude

Compléments alimentaires
Médicaments vétérinaires

https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf



Problématiques liées au développement d'une procédure analytique de dosage de constituants dans les médicaments à base de plante(s)

2012. STP PHARMA PRATIQUES, vol. 22(1), p. 3-15
2012. STP PHARMA PRATIQUES, vol. 22(6), p. 347-362
2013. STP PHARMA PRATIQUES, vol. 23(6), p. 1-12
2015. STP PHARMA PRATIQUES, vol. 25(4), p. 231-270

Bellenot D., et al. ;

Dr Hanh DUFAT

Produits Naturels, Analyse et Synthèse / CiTCoM – UMR 8038 CNRS/Univ. de Paris
UFR Pharmacie 4, avenue de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06

CARACTERISATION DES EXTRAITS

- **Difficultés rencontrées :**

Fortes dilutions dans les aliments.

Beaucoup d'interférents (malto dextrine, cations)

- **Perspectives :**

Améliorer sensibilité et spécificité des méthodes

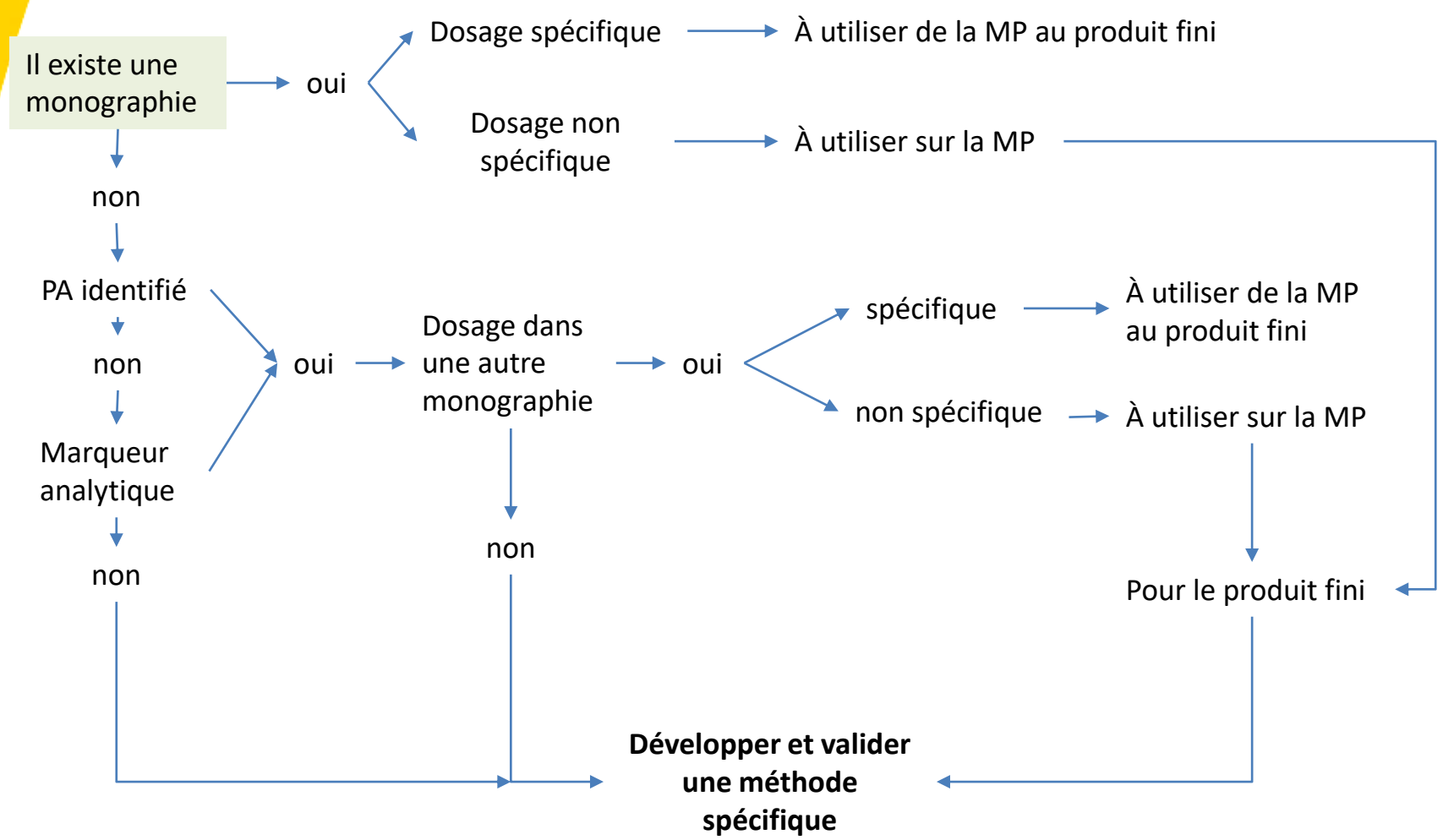
- **Conclusions :**

Quelles cibles choisir ?

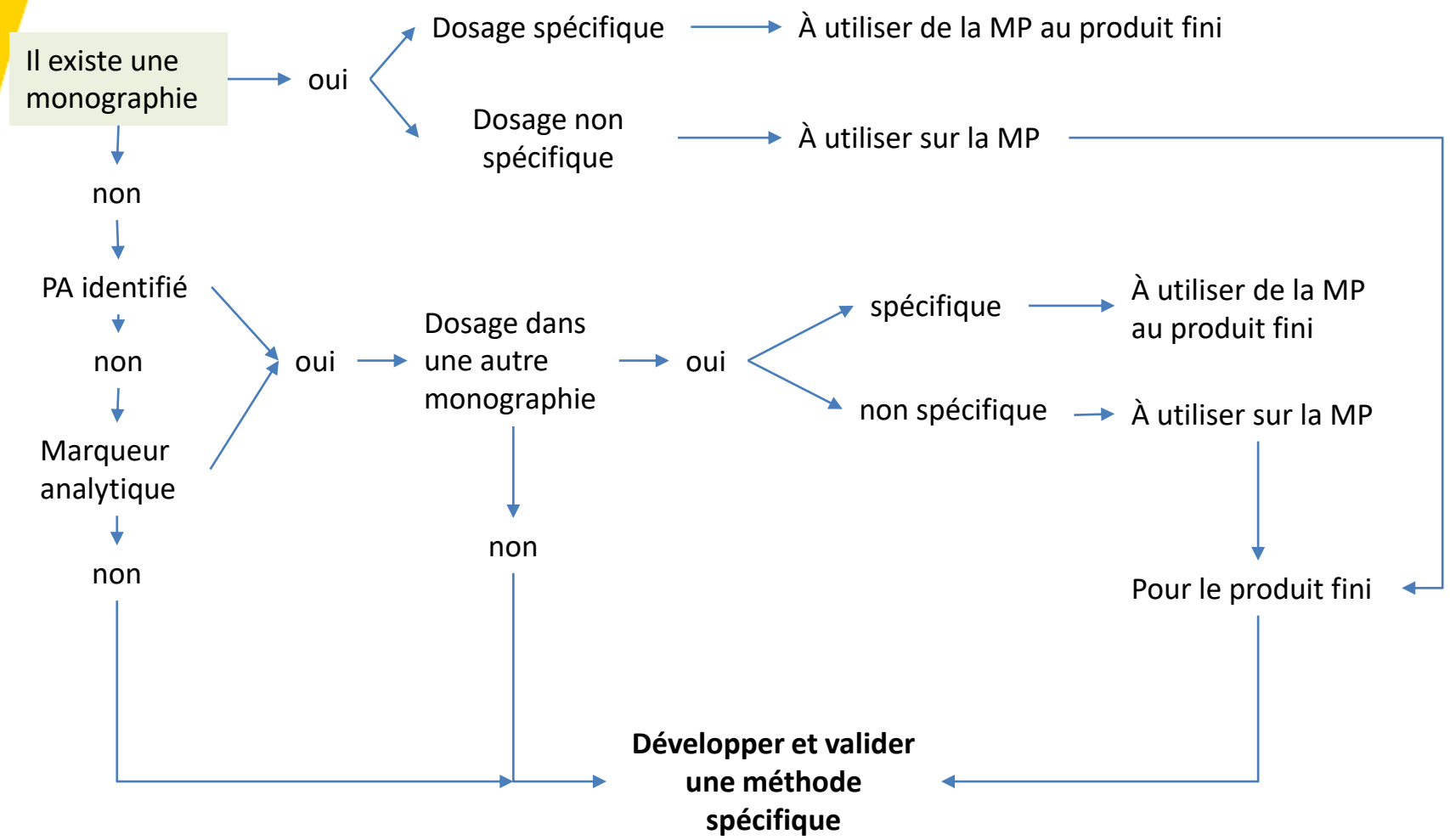
Quelles méthodes utiliser ?

Comment exprimer ses résultats ?

CARACTERISATION DES EXTRAITS



CARACTERISATION DES EXTRAITS



… et caractériser les 90% restants

Caractérisation des extraits



Melissa officinalis L. collection iteipmai

La position réglementaire d'extraits végétaux et de produits à base de plantes en alimentation animale au travers de cas concrets

Pierre CHICOTEAU

CEO NorFeed – Administrateur AFCA-CIAL

AFCA CIAL

Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale

Présentation du guide de bonnes pratiques

Guide de bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et des produits à base de plantes en alimentation animale

- Enjeu : Des produits identifiés comme des solutions aux enjeux actuels, une règlementation complexe pour leur mise sur le marché
- Objectif : Avoir le maximum de produits disponibles sur le marché dans un cadre sécurisé
- Rédaction d'un guide de bonnes pratiques
  - Aider à la classification règlementaire des produits dont le statut est incertain (matière première ou additif)
  - Proposer des recommandations sur les plantes utilisables ou non en alimentation animale
  - Apporter des connaissances techniques sur les produits à base de plantes et leurs procédés d'obtention



Présentation du guide de bonnes pratiques

2 ans
pour rédiger le guide

22 professionnels
(producteurs/fournisseurs et utilisateurs de produits à base de plante)

10 réunions
du groupe de travail
(divisé en sous-groupes)

Huile essentielle d'orange (*Citrus aurantium*)

- Nom commercial :
  - Huile essentielle d'orange (*Citrus aurantium*)
- Statut règlementaire :
  - Figure dans le registre communautaire des additifs (2b)
- Composition
  - Limonène 85,7%
  - Pas de nutriment



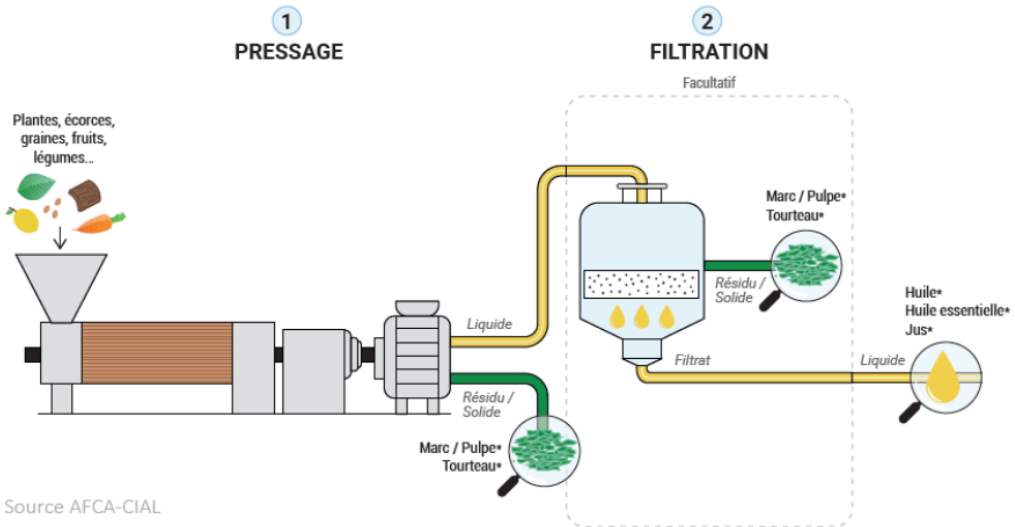
DETERMINACIONES QUIMICA

Alfa Pineno	1.439%
Sabineno	1.450%
Beta- Pineno	0.165%
Mirceno	4.120%
Felandreno	0.161%
Delta-3-Careno	0.682%
Limoneno	85.656%
Beta-Ocimeno	0.103%
Gamma Terpineno	0.097%
Alfa Terpinoleno	0.129%
Linalool	0.660%
Citronellal	0.150%
4- terpineol	0.011%
Alfa terpineol	0.115%
Trans carveol	0.024%
Citronellol	0.013%
Nerol	0.017%
Neral	0.168%
L-Carvone	0.019%
Geranial	0.287%

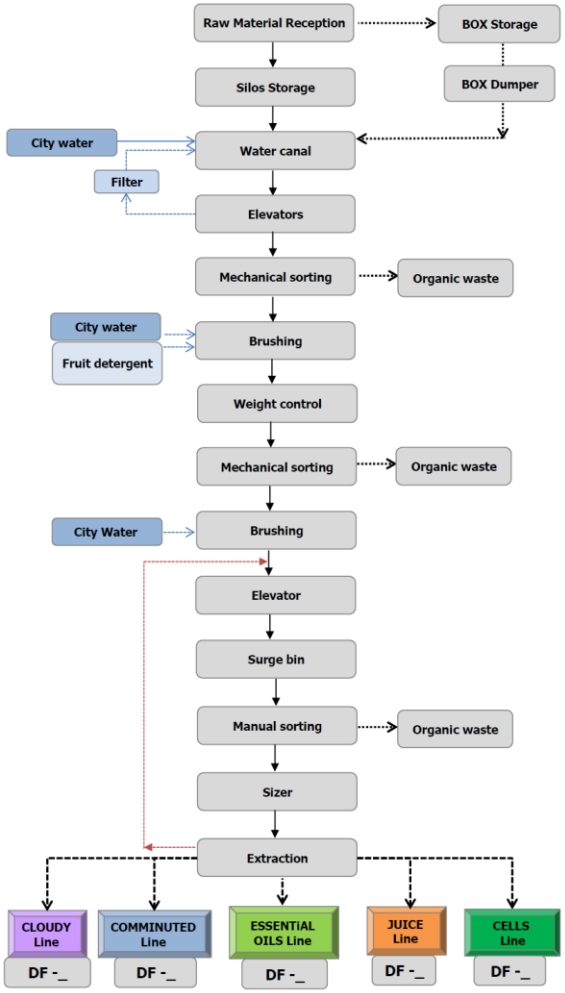
Huile essentielle d'orange (*Citrus aurantium*)

- Procédé :
  - Pressage de l'écorce d'orange
  - Procédé « simple » et purification

- Usage et présentation
  - Conformément au registre communautaire des additifs
  - Substance aromatique



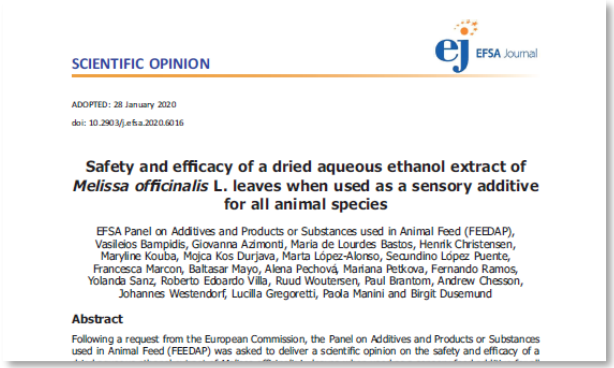
Source AFCA-CIAL



Extrait de *Melissa officinalis*

- Nom commercial :
  - Extrait de *Melissa officinalis*

- Statut règlementaire :
  - Figure dans le registre communautaire des additifs (2b)
  - Dossier d'autorisation – en cours d'évaluation
  - Questions sur la génotoxicité en raison de publications contradictoires ; nouveaux tests réalisés (Ames et Micronucleus négatifs)



SCIENTIFIC OPINION

EFSA Journal

ADOPTED: 28 January 2020

doi: 10.2903/j.efsa.2020.6016

Safety and efficacy of a dried aqueous ethanol extract of *Melissa officinalis* L. leaves when used as a sensory additive for all animal species

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Vasilelos Bampidis, Giovanna Azimonti, Maria de Lourdes Bastos, Henrik Christensen, Maryline Kouba, Mojca Kos Durjava, Marta López-Alonso, Secundino López Puente, Francesca Marcon, Baltasar Mayo, Alena Pechová, Mariana Petkova, Fernando Ramos, Yolanda Sanz, Roberto Edoardo Villa, Ruud Woutersen, Paul Brantom, Andrew Chesson, Johannes Westendorf, Lucilla Gregoretti, Paola Manini and Birgit Dusemund

Abstract

Following a request from the European Commission, the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) was asked to deliver a scientific opinion on the safety and efficacy of a

- Composition
  - Une définition / composition précise
    - Composition à 100% fournie à l'EFSA
    - > 5% d'acide rosmarinique HPLC
    - > 10% dérivés hydroxicinnamiques UV
    - Une origine géographique et une variété définie

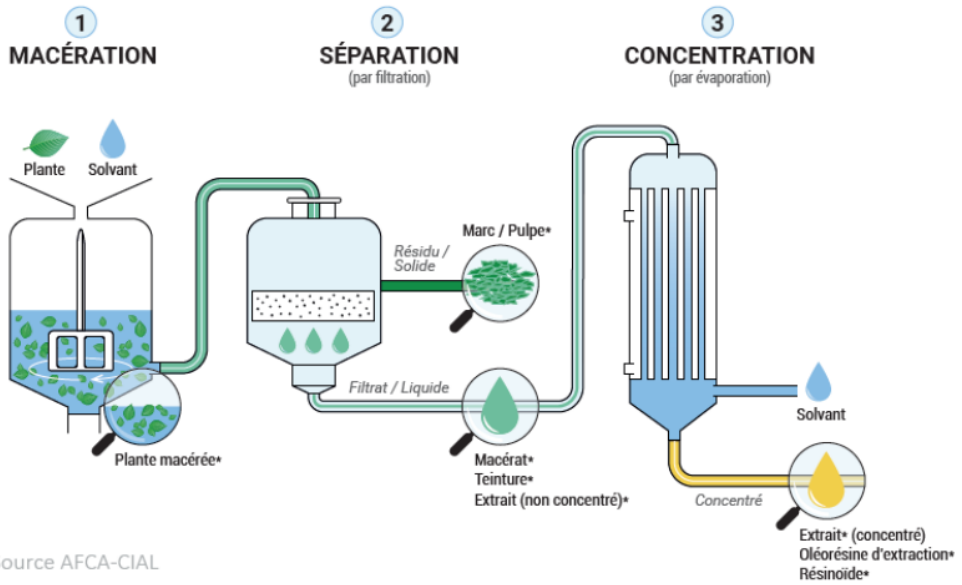


Extrait de *Melissa officinalis*



- Procédé :
  - Concentration
  - Procédé « complexe »

- Usage et présentation
  - Extrait sec hydroalcoolique
  - Conformément au registre communautaire des additifs
  - Substance aromatique



Source AFCA-CIAL

Jus de *Yucca schidigera*

- Nom commercial :
  - Extrait de *Yucca*

YUCCA SCHIDIGERA CONCENTRATE
EXTRACT ORGANIC

- Statut règlementaire :
  - Extrait pas dans le catalogue MP et annexe II dans le registre additifs
  - Jus dans le catalogue MP (7,12,2)

- Composition
  - Nutriments : glucides 46%

SECTION 4

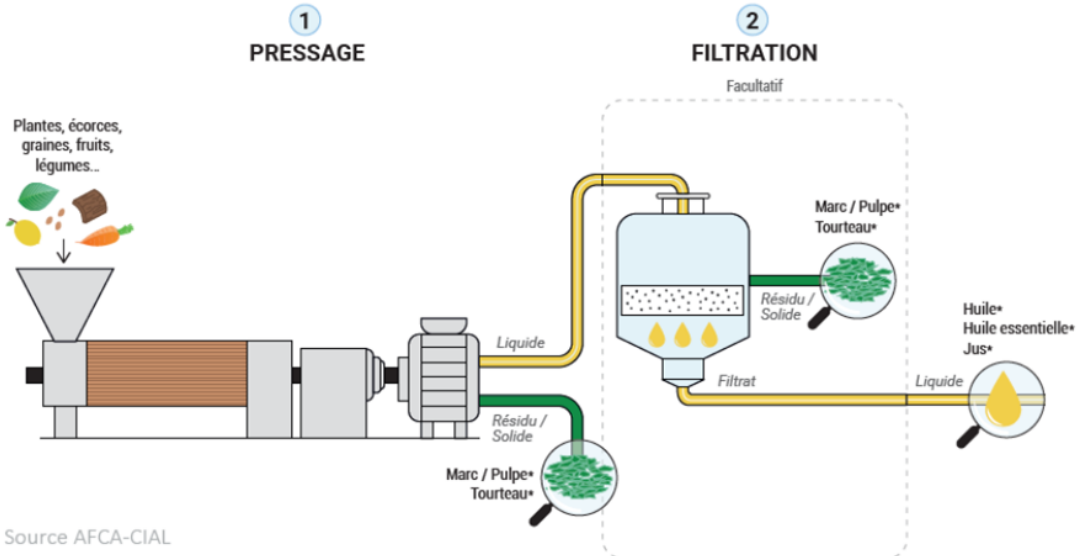
PROXIMATE ANALYSIS

MOISTURE	Max	49.75%
PROTEIN	Min	0.80%
CRUDE FAT	Min	0.60%
CRUDE FIBER	Max	0.30%
ASH	Max	2.50%
CARBOHYDRATE	Min	46.05%

Jus de *Yucca schidigera*

- Procédé :
  - Pressage
  - Procédé « simple »

- Usage et présentation
  - Correspond à l'entrée 7.12.2 catalogue MP
  - = **Jus de *Yucca schidigera***



Poudre de *Trigonella foenum-graecum*

- Nom commercial :
  - Poudre de *Trigonella foenum-graecum*

- Statut règlementaire :
  - Graines de fenugrec, dans le catalogue (3.5.1)

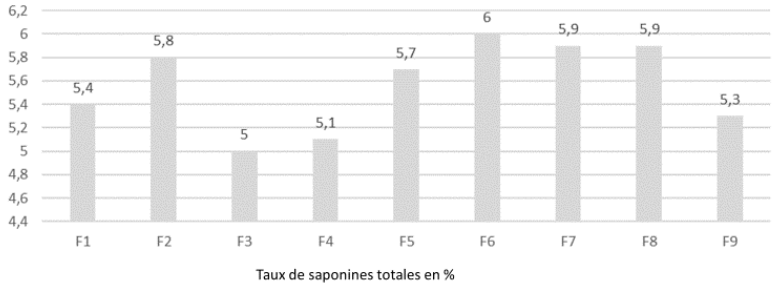
- Composition
  - Nutriments variés, non standardisé

Valeurs nutritionnelles typiques pour 100 g

- Energie (kCal) 323 kCal
- Protéines 23 g
- Lipides 6.41 g
- Glucides 58.35 g
- Fibres 24.6 g
- Eau 8.84 g
- Cendres 3.4 g

→ Taux de saponine variable en fonction de l'origine de la graine

Teneur en saponines

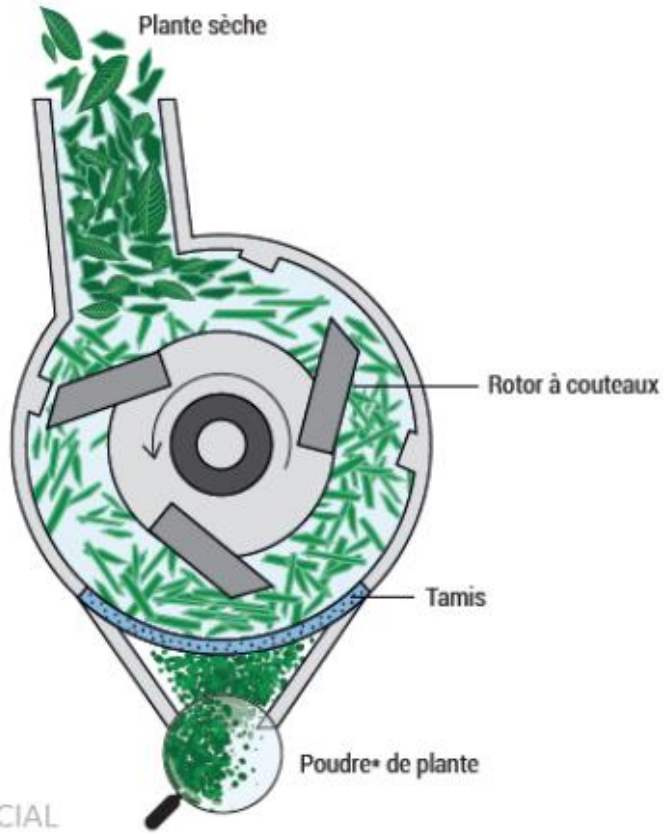


A. Manière *et al.*, Fulda 2020

Poudre de *Trigonella foenum-graecum*

- Procédé :
  - Broyage
  - Procédé « simple »

- Usage et présentation
  - Correspond à l'entrée 3.5.1 = graine de Fenugrec
  - + Procédé n°37 du catalogue MP
  - **= Graine de Fenugrec broyée**



Source AFCA-CIAL

Teinture/oléorésine/huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*)

- Noms commerciaux :
  - Teinture/oléorésine/huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*)
  -
- Statut règlementaire :
  - Dossier d'autorisation – en cours d'évaluation / Demande additifs 2b
- Composition
  - Pas de nutriments
  - Composés aromatiques / concentration variable selon le produit

Table 9: Proximate analysis of ginger tincture (*Zingiber officinale* Roscoe) based on the analysis of five batches (mean and range). The results are expressed as % (w/w)

Constituent	Mean[(a)] % (w/w)	Range % (w/w)
Dry matter	2.34	2.08–2.88
Ash	0.1	< 0.1–0.1
Total sugars	0.5	< 0.5–0.5
Lipids	0.56	0.5–0.7
Protein	0.1	< 0.1–0.1
Fibre	< 0.5	< 0.5
Solvent (ethanol/water, 90/10)	97.66	97.12–97.92

(a): Mean calculated on five batches.

	Teinture	Oléorésine	Huile essentielle
Matière sèche	2,34 %	72,4 %	100 %
Composés aromatiques	0,59 %	26,83 %	84,93 %
Alpha zingibérène	0,145 % (0,057 à 0,213)	5,27 % (2,30 à 7,23)	36,78 % (33,82 à 39,20)

Caractérisation des produits existants sur le terrain

Critères en accord avec le statut de matière première

Critères cumulatifs non exhaustifs

PROCÉDÉS

Procédés simples, inscrits dans le catalogue des matières premières - règlement (UE) 68/2013 modifié (7)

TYPES D'APPORT

- Apports en nutriments variés
- Présence de molécules d'intérêt parmi d'autres (pas d'apport à 100 % d'une malécule unique)
- Si caractérisation, peut se limiter aux constituants analytiques de la règlementation (Règlement (CE) 767/2009 (2)

USAGES ET PRÉSENTATION

- Utilisation de qualificatif de procédé du catalogue des matières premières - règlement (UE) 68/2013 modifié (7)
- Allégation conforme au règlement (CE) 767/2009 (2)

Au cas par cas

Critères en accord avec le statut d'additf

Critères cumulatifs non exhaustifs

PROCÉDÉS

Procédés complexes, inscrits ou non dans le catalogue des matières premières

TYPES D'APPORT

- Apport purifié
- Caractérisation/identification d'une ou plusieurs substances actives
- Standardisation/normalisation (quantification)

USAGES ET PRÉSENTATION

- Doit répondre à une catégorie ou groupe fonctionnel listé dans le règlement (CE) 1831/2003 (1)
- Non utilisable en grande quantité
- Dénominations usuelles « additifs » : huile essentielle, teinture…

Extrait non concentré de *Trigonella foenum-graecum*

- Nom commercial :
  - Extrait non concentré de *Trigonella foenum-graecum* ou macérat ou teinture

- Statut règlementaire :
  - Au cas par cas

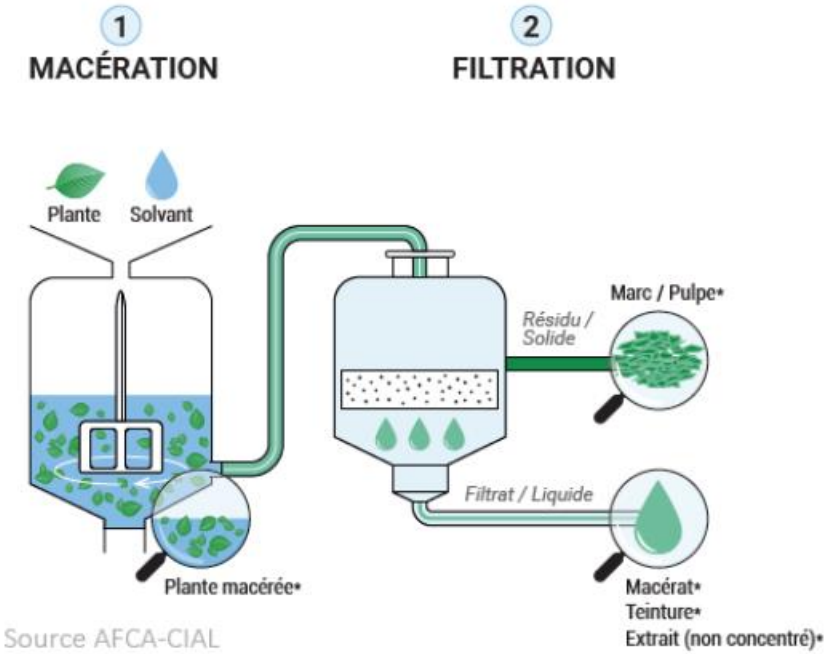
- Composition
  - Nutriments : Glucides, fibres, minéraux, fer, manganèse, potassium, magnésium, phosphore, vitamines, …..



Extrait non concentré de *Trigonella foenum-graecum*

- Procédé :
  - Macération + filtration
  - Pas de concentration
  - Procédé « simple »

- Usage et présentation
  - entrée 13.1.9 = produit de la transformation de plante
  - + Procédé n°42 et 29 du catalogue MP
  - **= macérat de *Trigonella foenum-graecum***
  - **Fenugrec macéré filtré**



Source AFCA-CIAL

Exemple des conditions de production :

- Macération statique de la plante dans une solution hydroalcoolique, 10 jours
- Séparation
- Filtration

Statut de Matière première

Conclusions

- Lien entre produits et procédés :
  1. Des procédés de transformation différents peuvent aboutir à des produits ayant des dénominations techniques identiques.
  2. Un procédé peut donner différentes dénominations (selon l'état de la matière première, la nature des solvants…).

- Plusieurs dénominations pour un même produit

- Utilisation du terme « extrait » : générique désigne des produits + ou – concentrés avec des statuts matière première ou additif

- Certains termes conditionnent qualification du produit par présentation :
  - teintures, huiles essentielles, oléorésine = additifs

Conclusions

- Évaluation suivant les critères (procédés, apports et présentation) se font au cas par cas
- 3 critères pour classer un produit : procédés, apports, présentation (cumulatifs)
- Mais **/!** une dénomination seule peut classer un produit en additif par présentation

MERCI DE VOTRE ATTENTION

AFCA CIAL

Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

Comment identifier les extraits de plantes d'intérêt : présentation de l'outil de sélection Check'Mex et retour d'expérience utilisateur

Angélique TRAVEL

Virginie MICHEL

Contexte

- **Préservation de la santé et du BEA** des animaux dans un contexte de réduction de l'usage des ATB

- Offre d'alternatives en **plein essor**

anses agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail

saisine alternatives aux antibiotiques (2018)

#1 Plantes et Huiles essentielles

1. Recense les substances et préparations commerciales qui revendiquent, d'être une solution pour limiter l'usage des antibiotiques chez les animaux dans différentes filières animales (ttes espèces).

2. Souligne l'hétérogénéité des données disponibles pour en évaluer l'innocuité et l'efficacité

APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE POUR L'ÉVALUATION DES PRODUITS

La démarche

mexavi

Outil d'aide à la sélection des extraits végétaux efficaces pour renforcer les défenses naturelles des volailles (**Préventif**)

A priori





chercheurs et professionnels

Phytochimie



Zootechnie



Analyse qualitative



- ✓ Extraits, pas huiles essentielles,
- ✓ Uniquement dans l'aliment
- ✓ Indicateurs phytochimiques
- ✓ Indicateurs du statut
  - Immunitaire
  - Inflammatoire
  - Antioxydant des volailles

Recensement et évaluation des publications

RECHERCHER

Choisir
- BDD
- Mots clefs *(espèces et effets)*
- Dates de publication
- Types de documents

➔ Filtres suppl. d'exclusion

AFFINER

- Analyse textuelle du corpus BDD

➔ Extraction noms des plantes

- Analyse d'occurrence
- Analyse des connaissances pharmacologiques

COLLECTER RESSOURCES

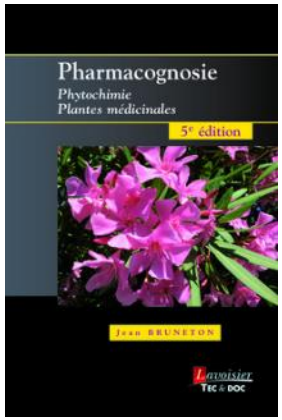
EVALUER

- Niveau de **FIABILITÉ DES ARTICLES**

- Niveau d'**EFFICACITÉ DES EXTRAITS** sur les défenses naturelles

VOSviewer
Visualizing scientific landscapes

***BRUNETON**, ouvrage de synthèse qui fait référence sur l'activité pharmacologique des plantes*



Collecte et évaluation des publications

COLLECTER RESSOURCES

EVALUER

Niveau de **FIABILITÉ DES ARTICLES**

➔ grille d'analyse pour vérifier

1. caractérisation suffisante de l'extrait
2. pertinence design expé et analyse résultats

➔ Scoring /40 pt

Niveau de fiabilité des publications

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extraction

Echinacea was cultivated in Esfahan city (Iran) and the aerial parts of EP were used for this study. These parts were collected during the flowering season and dried under standard conditions (45°C). The dried aerial parts of EP plants were pressed to cobs to provide optimal storage conditions and were added to experimental diets of broilers after carefully grinding them. The ethanolic extract was extracted using a percolation method at room temperature with 70% ethanol. The extract was concentrated under reduced pressure (bath temp. 50°C) and dried in a vacuum desiccator. The residue was dissolved in distilled water and filtered, after which the filtrate was evaporated to dryness (Chattopadhyay, 1999



Dans l'outil :

- Indicateurs simples pour des non spécialistes
- Calcul des scores

Guide pour la description des extraits et réalisation des essais
➔ auteurs/revues

Volet Phytochimie

- 4 critères, 19 indicateurs
- Caractérisation de la plante utilisée, de l'extrait utilisé, du produit testé et de son utilisation

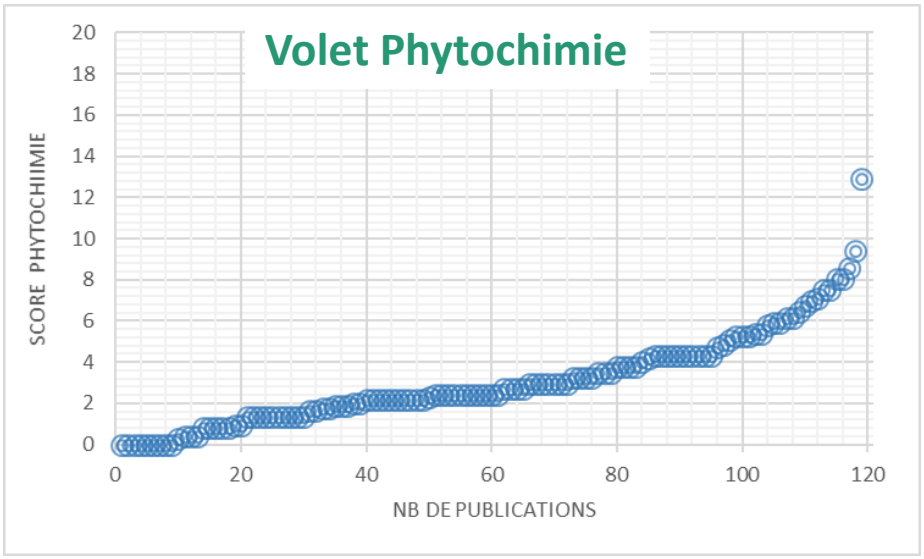
➔ connaitre parfaitement la nature du produit, sa préparation et ses modalités d'usage
CONNAISSANCE / REPRODUCTIBILITE

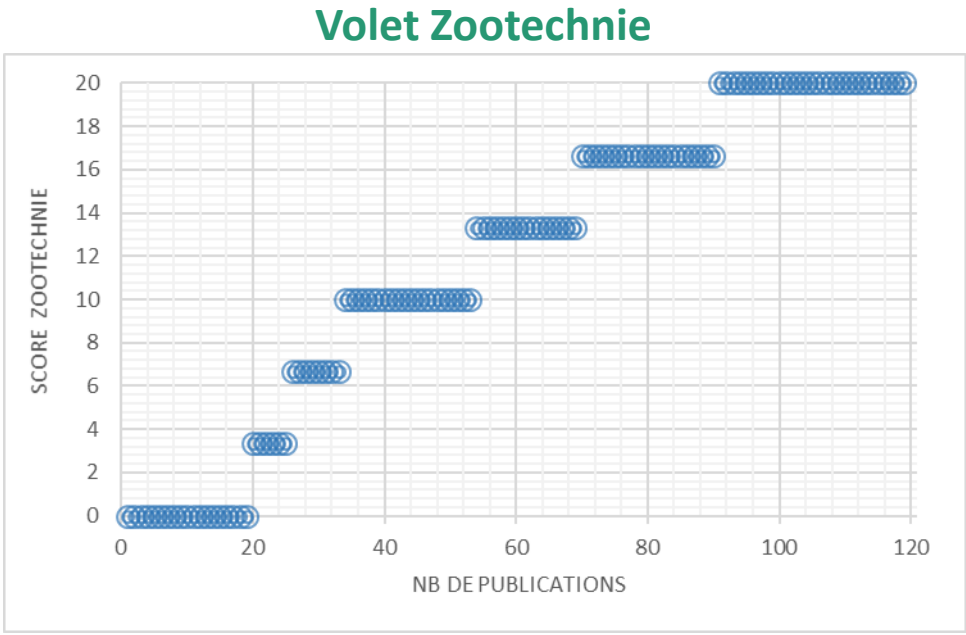
Volet Zootechnie

- 5 critères, 15 indicateurs
- Stimulation des défenses naturelles, les groupes témoin et contrôle, les conditions d'essai, le plan d'expérience, plan d'analyse

➔ Être certain que le design et analyse de données permettent de conclure avec FIABILITE

Niveau de fiabilité des publications





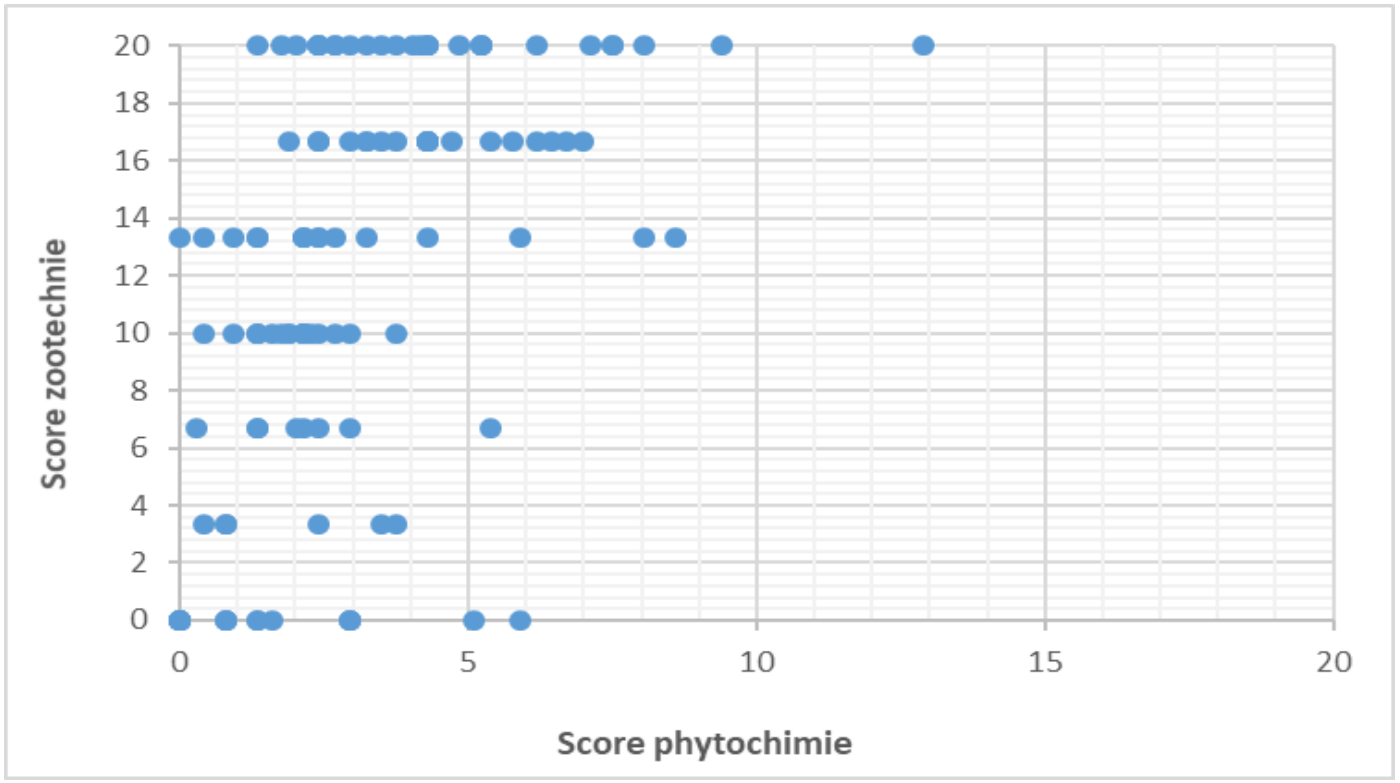
Forte hétérogénéité selon les publications et les volets

Les principaux manques:

** la variété, le traitement, le stade phénotypique, stabilité de l'extrait, quantification incomplète et galénique*

** les effectifs, les statistiques, la randomisation*

Niveau de fiabilité des publications



Pas de corrélation entre les scores zootechnie et phytochimie

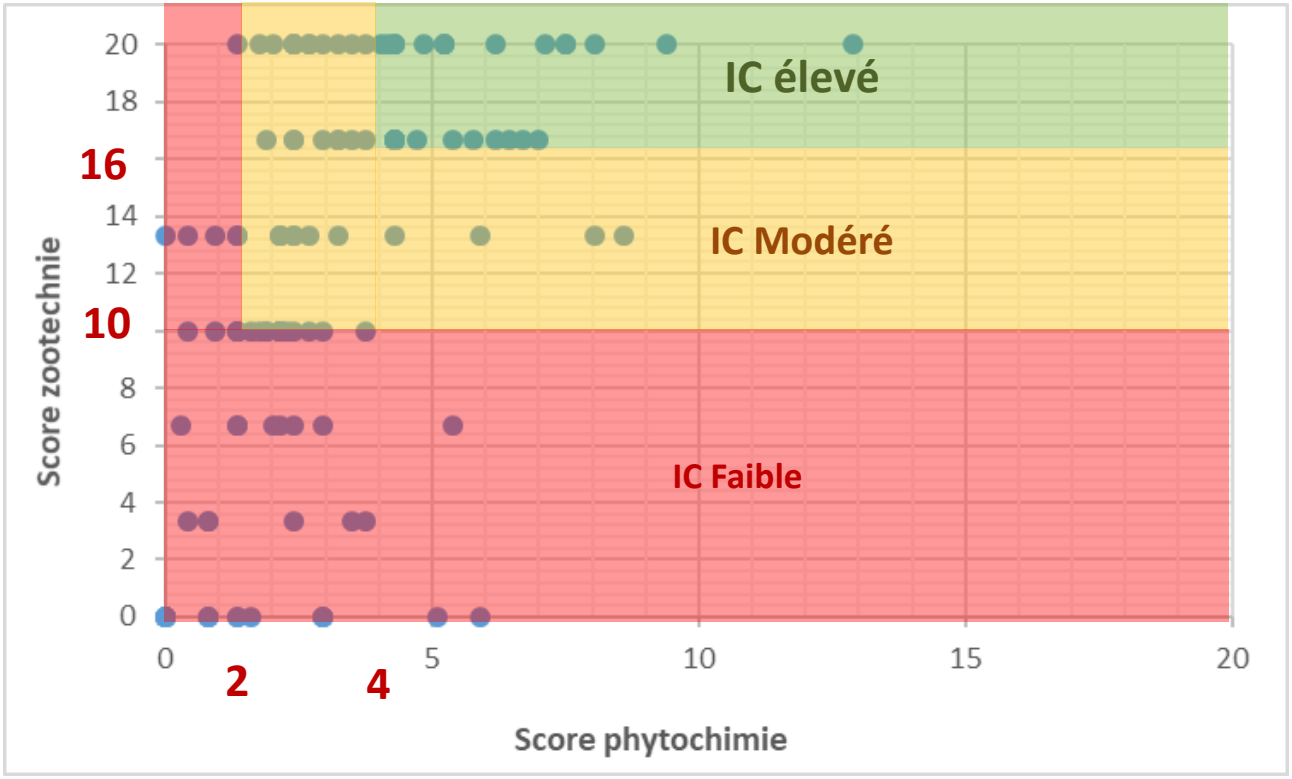
Score zootechnie > Score phytochimie car publication par zootechniciens,

Critères phytochimiques parfois complexes pour des non spécialistes

➔ Intéret d'un guide pour mieux caractériser et évaluer les extraits

Peut expliquer en partie le manque de reproductibilité et les discordances de résultats entre essais

Niveau de fiabilité des publications

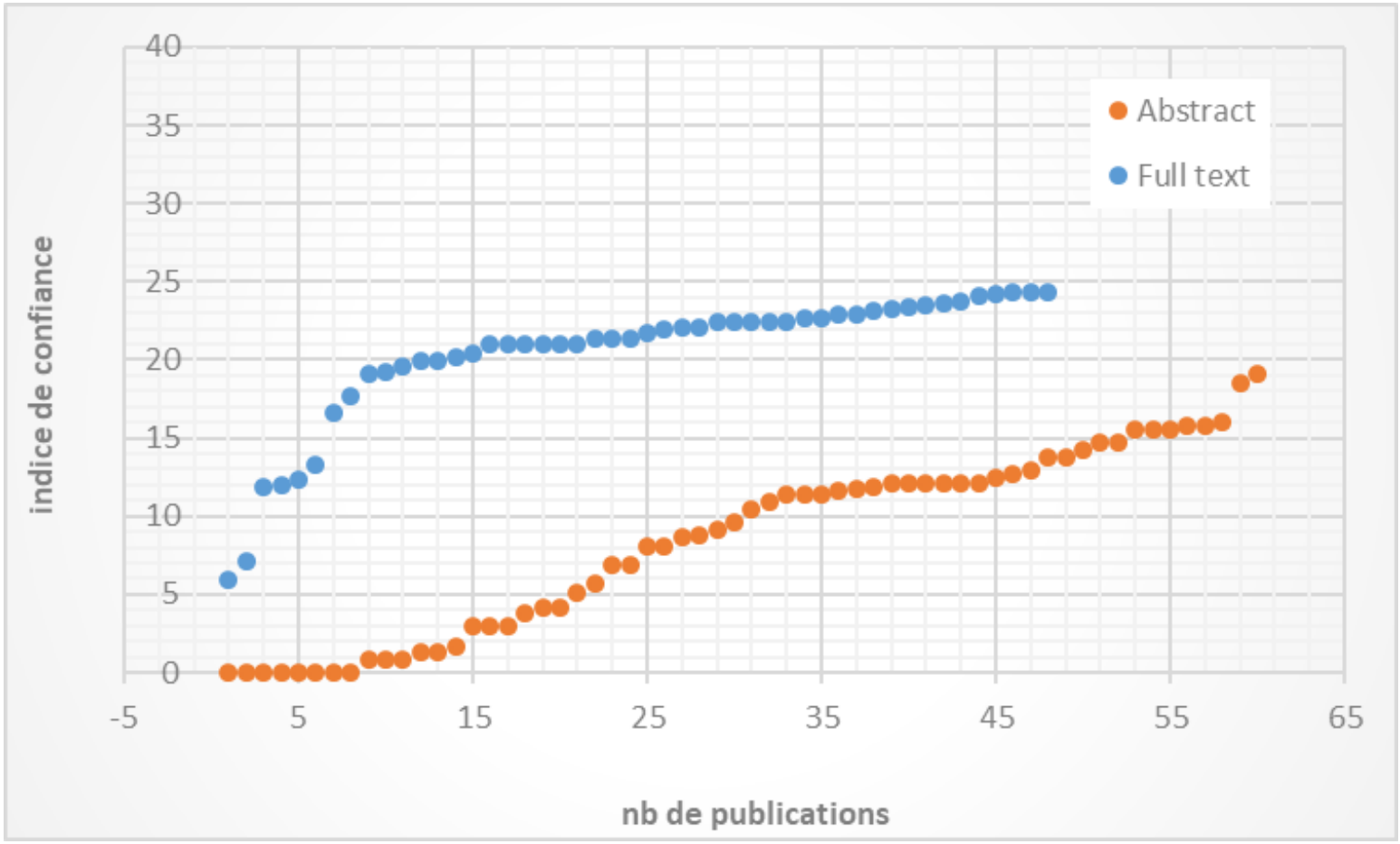


Dans l'outil :

- Calcul des bornes automatiques et
- Possibilité de les fixer manuellement *(selon le domaine)*

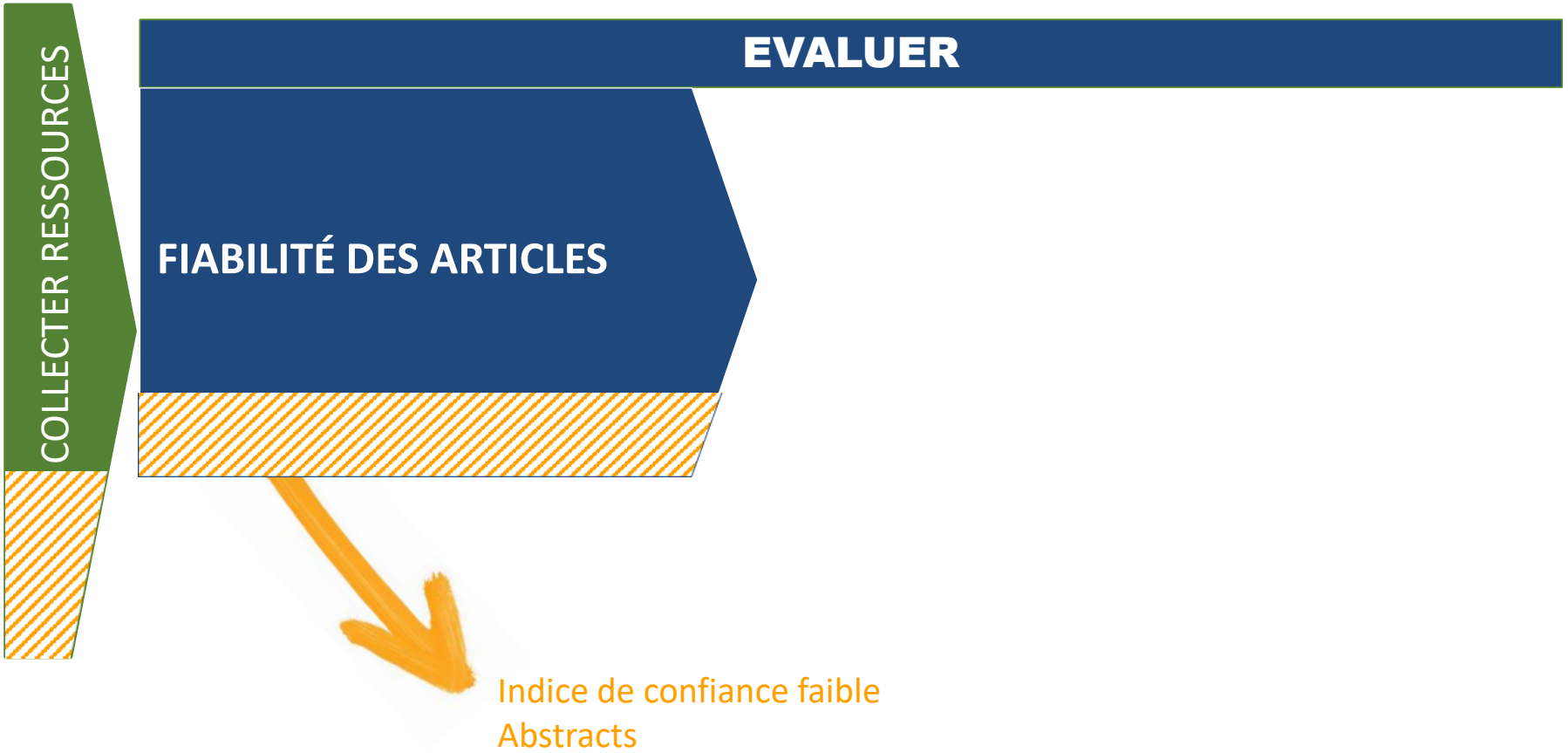
➔ **l'indice de confiance intègre la valeur des 2 notes en tenant compte de leur DISPERSION**

Niveau de fiabilité des publications

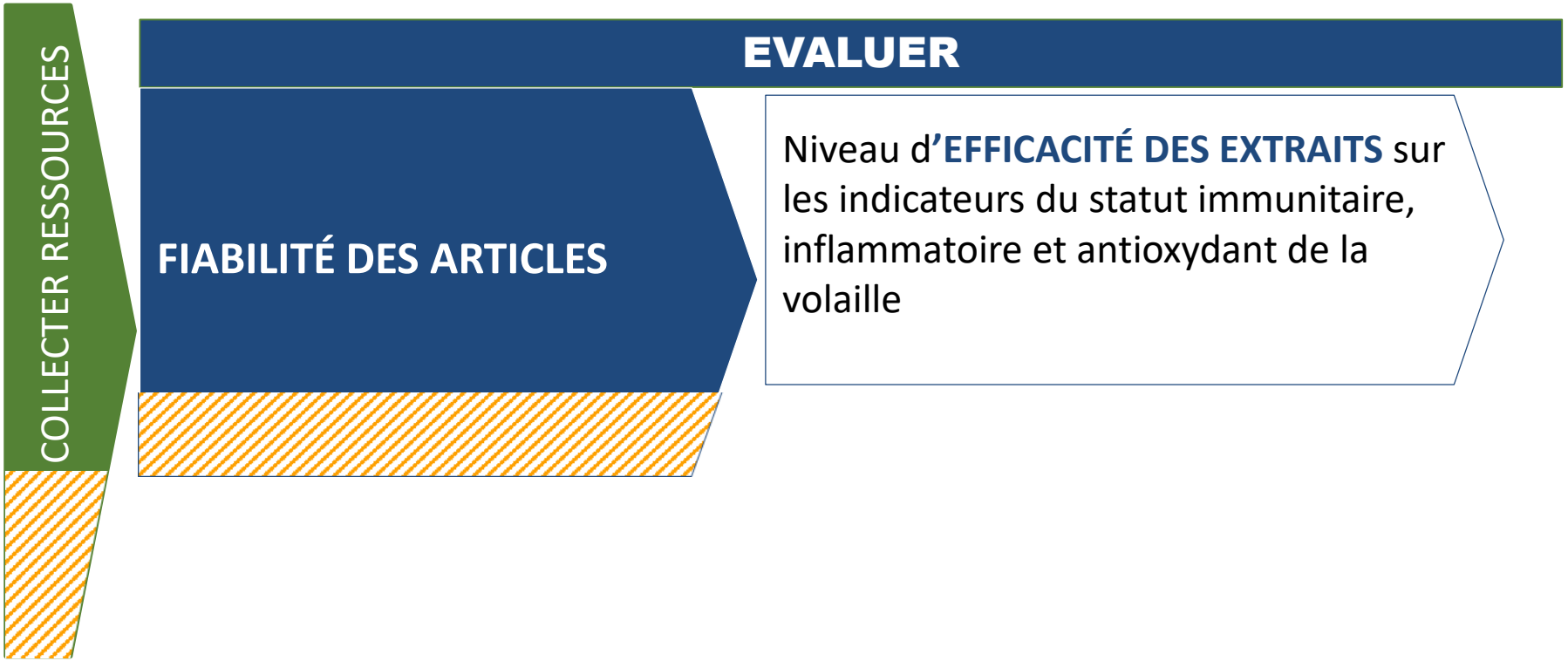


Les abstracts ne sont pas suffisants pour juger de la fiabilité de la méthodologie mise en œuvre ➔ EXCLUSION

Niveau d'efficacité des extraits



Niveau d'efficacité des extraits



Niveau d'efficacité des extraits

Relever le contexte particulier de l'essai

Espèce animale
Souche
Environnement d'essai
Lot soumis à une stimulation des défenses naturelles
Type de stimulation des défenses naturelles
Commentaires sur l'environnement d'essai
Programme alimentaire

Relever les caractéristiques et modalité d'usage

Extrait de plante
Composition de l'extrait de plante
Age de début de distribution en jour
Age de fin de distribution en jour
Durée de la période distribution
Taux d'incorporation de l'extrait de plante

Relever les effets obtenus

Catégorie d'indicateur
Indicateur évalué
Effet statistique
Comparaison contrôle

1 ligne / variable mesurée/ lot => plusieurs lignes/articles

Niveau d'efficacité des extraits

Conversion taux d'incorporation %	Critères	Indicateur mesuré	Effet
0,5	Performances	GMQ 12-21j	amélioration significative
0,5	Marqueur de stress ox	GSH/GSSG ratio	amélioration significative
0,5	Marqueur de santé globale	mortalité 0-35j	pas d'effet
0,5	Performances	IC	amélioration significative
1	Performances	GMQ 12-21j	dégradation significative
1	Marqueur de stress ox	GSH/GSSG ratio	amélioration significative
2	Performances	GMQ 12-21j	dégradation significative
2	Marqueur de stress ox	GSH/GSSG ratio	dégradation significative

- **Objectiver les effets par une analyse qualitative des résultats d'essais**
- **Permet une vision globale par analyse de la récurrence des effets et les conditions dans lesquels ils ont été obtenus**

Cadre et contexte actuel en R&D

Grandes thématiques d'études au sein de la R&D du groupe ADM



- Santé digestive
- Performances zootechniques
- Efficacité alimentaire
- Stimulation et renforcement des défenses naturelles
- Etc…

….Associées à un contexte sociétal de **démédication** et de **réduction de l'usage des antibiotiques** en élevage….

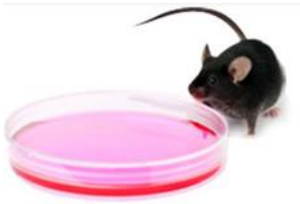
Rechercher des **solutions naturelles**:

Se tourner vers l'usage des plantes et des extraits de plantes.

Intérêt croissant aussi bien en productions animales qu'en santé humaine (aromathérapie, phytothérapie…)

Cadre et contexte actuel en R&D

Contrainte réglementaire dans le domaine de la R&D
→ **Projet de recherche** et autorisation ministérielle



La règle des « 3R » en Expérimentation Animale :
> **Réduire** : ↘ nombre d'animaux mis en expérimentation
> Raffiner : diminuer les contraintes et la douleur
> **Remplacer** : trouver des solutions alternatives aux essais in-vivo

Synthèse bibliographique pour agir sur ces deux R ?

- Recherche biblio en amont de chaque projet R&D : état des lieux des publications existantes, résultats observés etc..
- Permet parfois de justifier la pertinence d'un sujet d'étude, et/ou de répondre entièrement ou en partie à une problématique

Biblio, comment faire la sélection des articles ?

CONSTAT

Enormément de publications sur les extraits végétaux:

- Origines diverses
- Différentes natures ou espèces végétales
- Différents stades physio, chémotypes, différentes parties (aérienne, racinaire), différents process d'extraction, galéniques
- Protocoles d'essais différents, plus ou moins fiables
- Conditions d'élevages des animaux
- Vocabulaires, dénominations non homogènes entre les publications

Panorama de l'existant → Nécessité de faire un tri
Importance d'avoir des références scientifiques fiables !

Grille de Fiabilité

Comment sélectionner les extraits d'intérêt?



OBJECTIF : Comparer sur une même base les publications d'intérêt retenues

Confronter les résultats obtenus dans différentes conditions
Confronter la nature des extraits végétaux

- ✓ Grille d'Evaluation → évaluer l'effet de chacun des EV sur différents indicateurs recherchés (statut immunitaire, inflammatoire et antioxydant)

- ✓ Comparer sur une même base les publications, pour ainsi étudier les effets (ou non) des EV :
  - Pour un même extrait végétal : incorporation, âge des animaux, challenge (vaccins…), conditions d'essai (bio…)
  - Cela permet de comparer plus facilement les extraits entre eux
  - Et pour un même extrait, pouvoir trouver des explications sur son efficacité (ou non)

Comment sélectionner les extraits d'intérêt?



OBJECTIF : Comparer sur une même base les publications d'intérêt retenues

Confronter les résultats obtenus dans différentes conditions
Confronter la nature des extraits végétaux

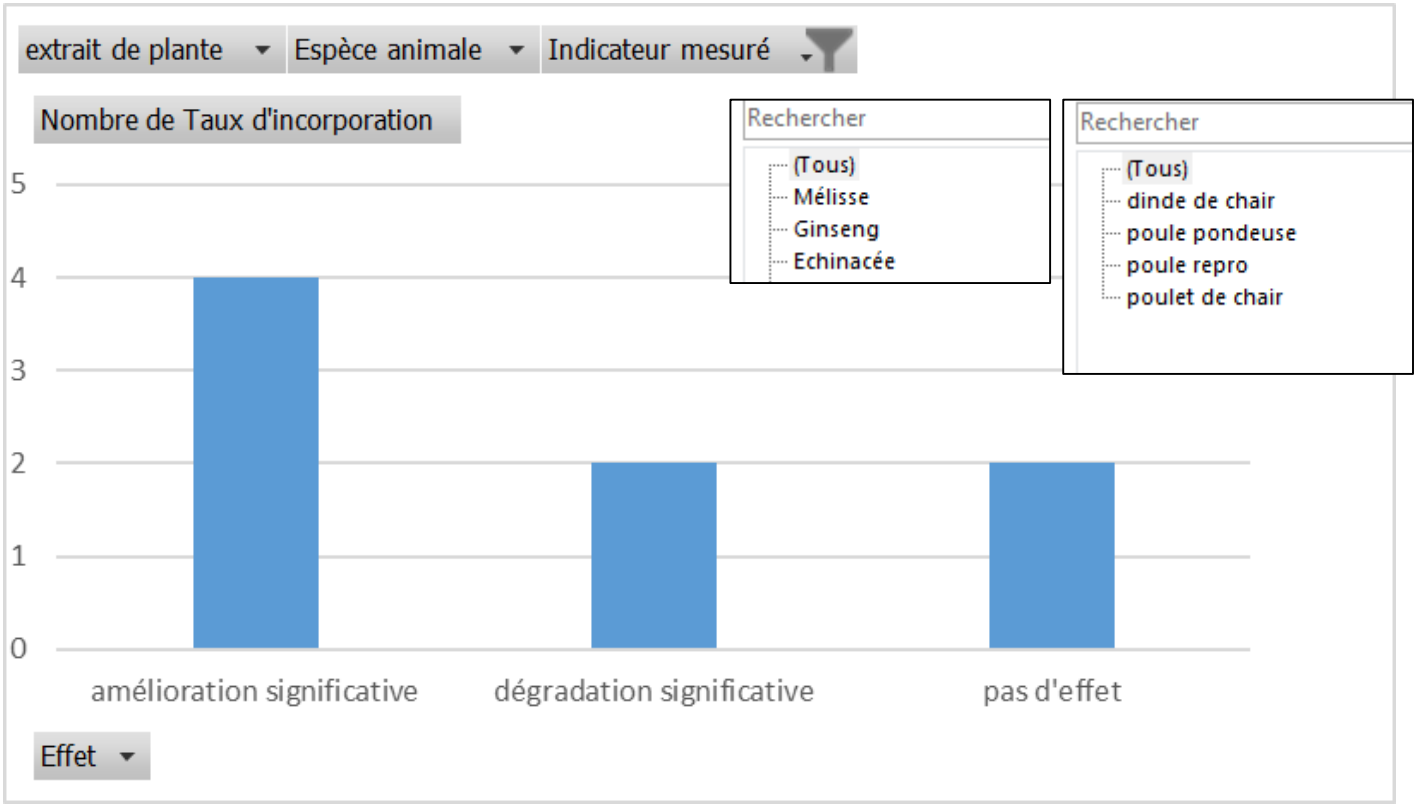
- ✓ Grille d'Evaluation → évaluer l'effet de chacun des EV sur différents indicateurs recherchés (statut immunitaire, inflammatoire et antioxydant)

- ✓ Comparer sur une même base les publications, pour ainsi étudier les effets (ou non) des EV :
  - Pour un même extrait végétal : incorporation, âge des animaux, challenge (vaccins…), conditions d'essai (bio…)
  - Cela permet de comparer plus facilement les extraits entr[illegible]eux
  - Et pour un même extrait, pouvoir trouver q[illegible]on efficacité (ou non)

OBJECTIVER

Niveau d'efficacité des extraits

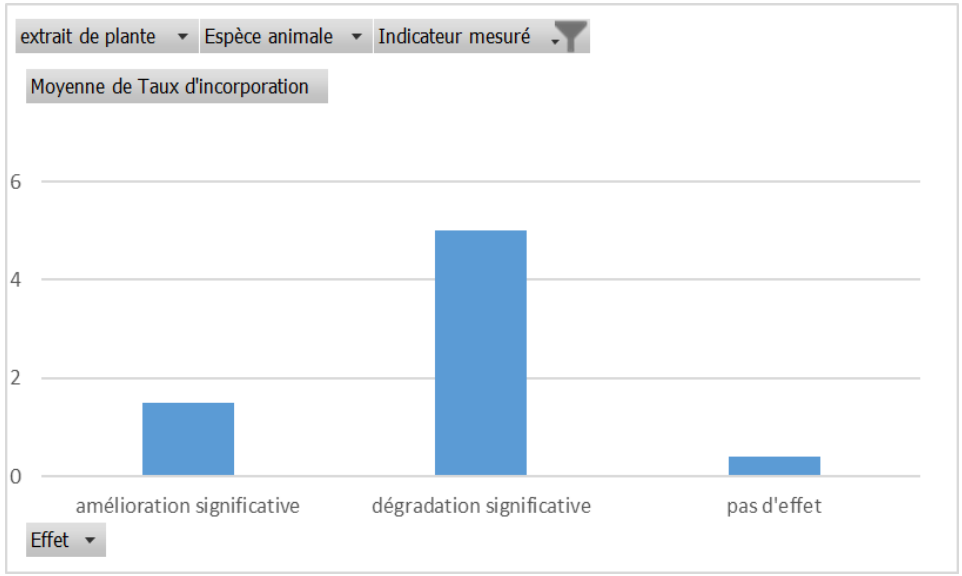
Nombre de publications



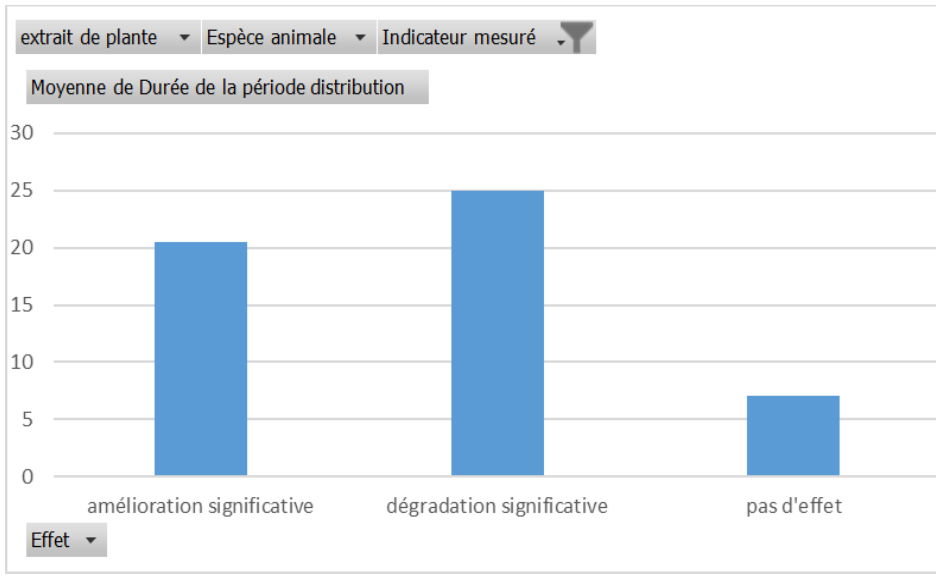
Objectiver les effets par une analyse qualitative des résultats d'essais selon l'extrait, l'espèce et l'indicateur

Niveau d'efficacité des extraits

Moyenne effet dose (%)



Moyenne effet durée (j)



Permet une vision globale par analyse de la récurrence des effets et les conditions dans lesquels ils ont été obtenus *(dose, durée, âge d'administration)*

En termes de PERSPECTIVES ?

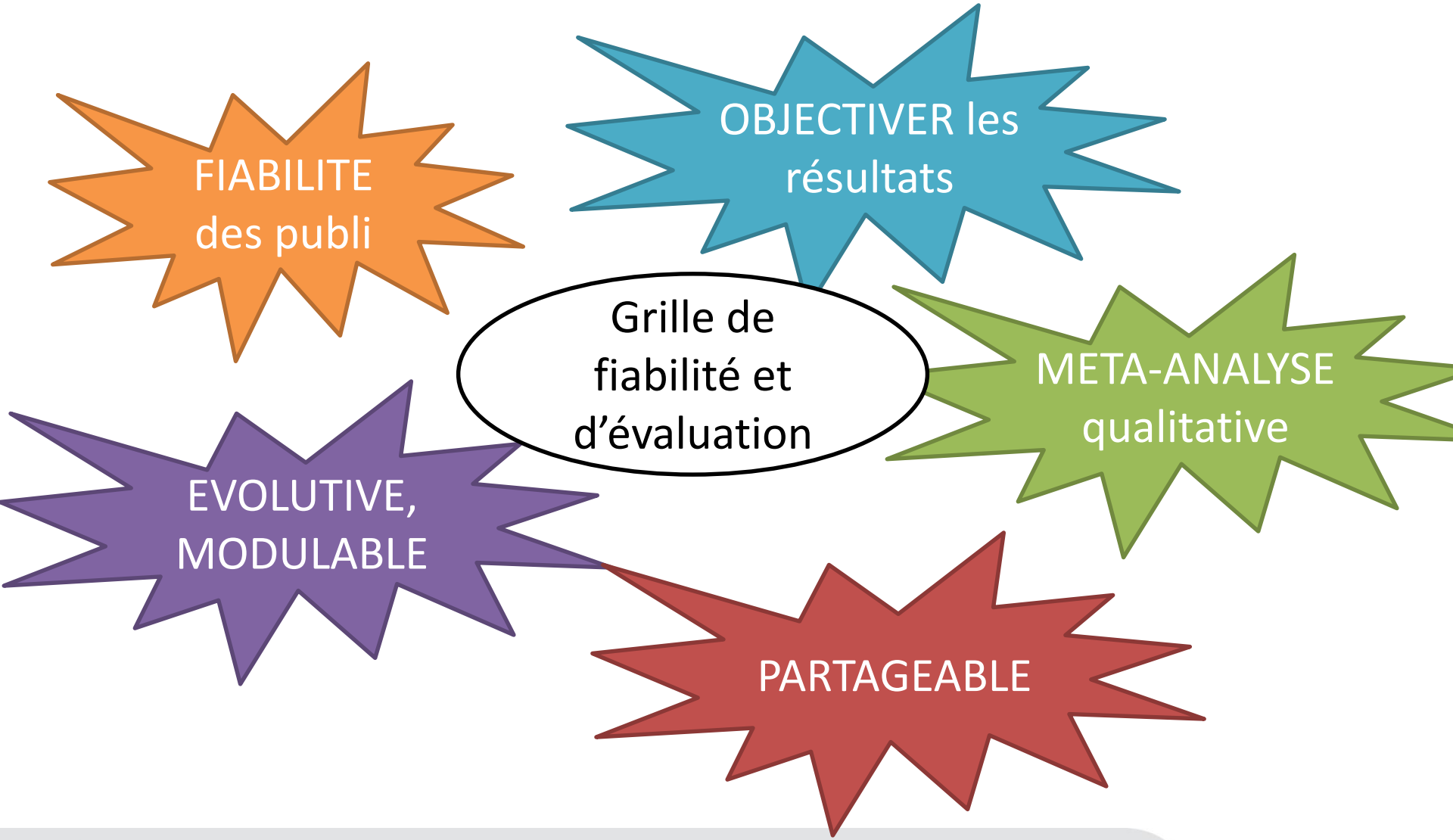


- Utilisée pour les extraits végétaux
- Utilisée pour la volaille
- Temps d'enregistrement long
  (1 ligne = 1 EV, 1 dose, 1 critère de performances)



- Panel d'autres **ADDITIFS** :
  Elargir aux probiotiques, prébiotiques, acidifiants, antioxydants… ou **mélanges**
- Etendre au **MULTI-ESPECE**
- Valoriser du travail déjà réalisé, création d'une base de données **PARTAGEABLE,** et **EVOLUTIVE**
- Plus-value : croisement d'informations
  → **META-ANALYSE QUALITATIVE**
- Grille **EVOLUTIVE, MODULABLE** (ajouter des critères, bornes de confiance…)
  → **L'utilisation reste pilote !**
- Grille simple et transparente, open access, facile à utiliser → **ACCESSIBLE**

Pour résumer…



La mise en application

iteipmai

Pour la recherche

- Mots clefs
- Date > 2005
- Cab / Wos



Pour la pré-sélection

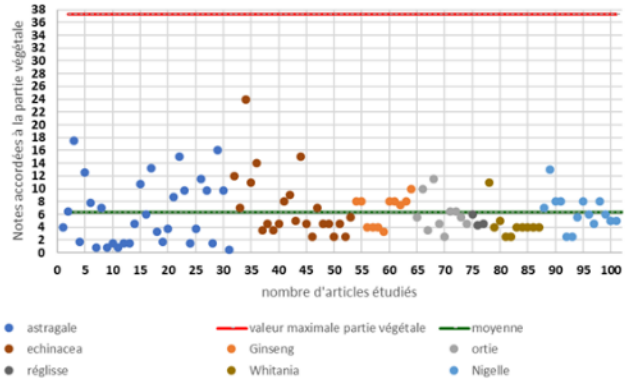
- occurrence de citations
- Effets identifiés par Bruneton



Pour l'évaluation

UniLaSalle Terre & Sciences





Liste de ressources

- 917 articles, comm…
- 48 plantes

Liste des plantes

- 8 plantes intéressantes, cultivables
- 159 publications
  - Ail
  - Astragale
  - Echinacées
  - Ginseng
  - Nigelle
  - Ortie
  - Réglisse
  - Whitania
  - *Mélisse*

40% d'abstracts, mélange

Analyse qualitative
Conditions d'expérimentation
Pertinences des critères
Niveau des effets
Répétition des effets

Astragale
Ginseng
Echinacées
Nigelle (cout, tox)
Mélisse

MERCI DE VOTRE ATTENTION

travel@itavi.asso.fr

virginie.michel@adm.com

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

La mangeoire électronique BIRD-e : un outil pour évaluer l'impact d'un extrait de plante sur le comportement alimentaire

Eva PAMPOUILLE, ITAVI

Evaluation de l'impact d'un extrait de plante

- Sur la santé des animaux
  - Défenses immunitaires
  - Réponse inflammatoire
  - Stress oxydatif

- Sur les performances des animaux
  - Mortalité
  - **Poids vif**
  - **Consommation alimentaire**
  - **Efficacité digestive (IC)**

- Sur le comportement alimentaire des animaux
  - **Rythme alimentaire**

MEXAVI : Suivi zootechnique avec extraits de plantes





- 4 conditions :







- Aliment seul (Standard, S)
- Aliment + Echinacée (E)
- Aliment + Ginseng (G)
- Aliment + Mélisse (M)



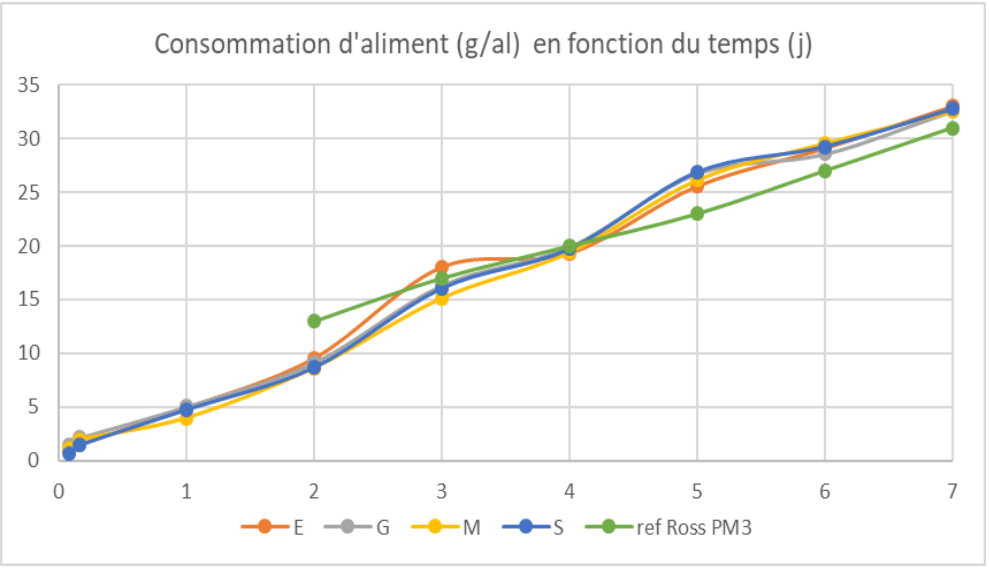
4 poussins /parquet
6 parquets/condition

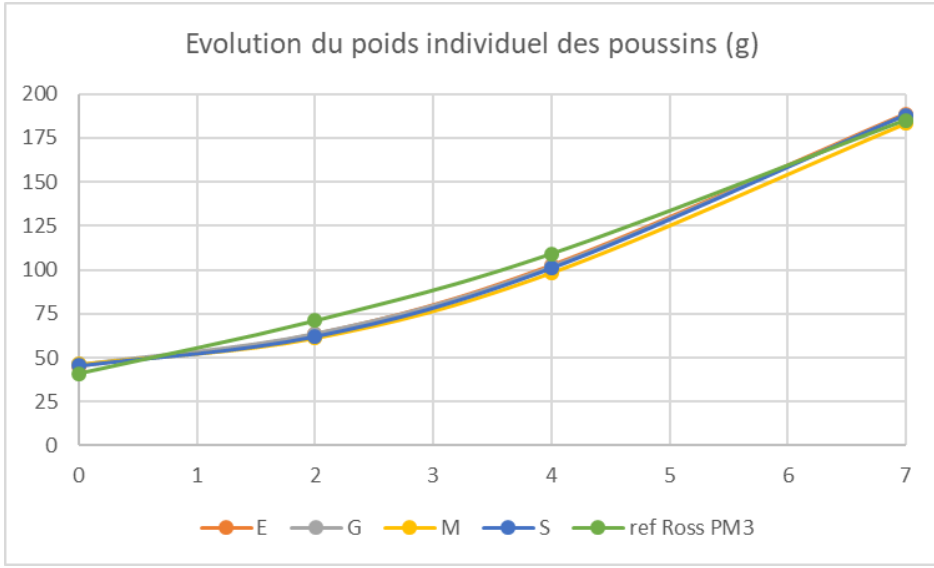
- Pendant une semaine :
  - Suivi consommation aliment (2h, 4h, puis tous les jours jusqu'à J7)
  - Suivi poids des poussins (J0, J2, J4 et J7)

☛ **Choix des aliments + extraits qui sont consommés et qui n'affectent pas les performances (étude limitée)**

MEXAVI : Suivi zootechnique avec extraits de plantes

- Pas de différence significative sur la consommation d'aliment ni sur le poids





- Cohérent avec la référence souche Ross PM3
- Pas d'extrait 'déconseillé' suite à ce test

Les limites du dispositif

- Petit nombre d'animaux
- Consommation à l'échelle du parquet *(4g de précision)*
- Mesures de poids en discontinu *(15g de précision)*
- Pas réellement de mesures de comportements alimentaires

➔ Idéalement, il serait souhaitable d'avoir :

- des données **précises**, **en continu**
- de réelles mesures de **comportements alimentaires**

La mangeoire électronique BIRD-e

UMT BIRD INRAE ITAVI

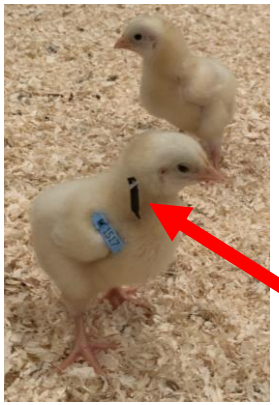


Coffret électrique-électronique climatisé
PC, cartes électroniques, intégrateur de données

Antenne (position réglable en fonction de la taille de l'animal)

Plateau de pesée animal adaptable à la taille de l'animal

Accès aliment (réglable en hauteur, Adaptable à la taille de l'animal)



Puce RFID

La mangeoire électronique BIRD-e



https://www.youtube.com/watch?v=KW4-N857Yxk&feature=emb_logo

Des données individuelles en continu

- Suivi individuel et journalier des performances des animaux :
  - Poids *(précision 2g)*
  - Consommation d'aliment *(précision 0,5g)*
  - Indice de consommation

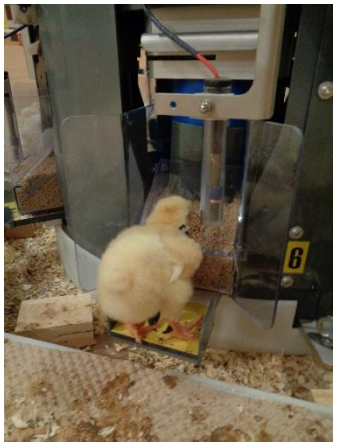
- Interface de données : extraction au format .csv

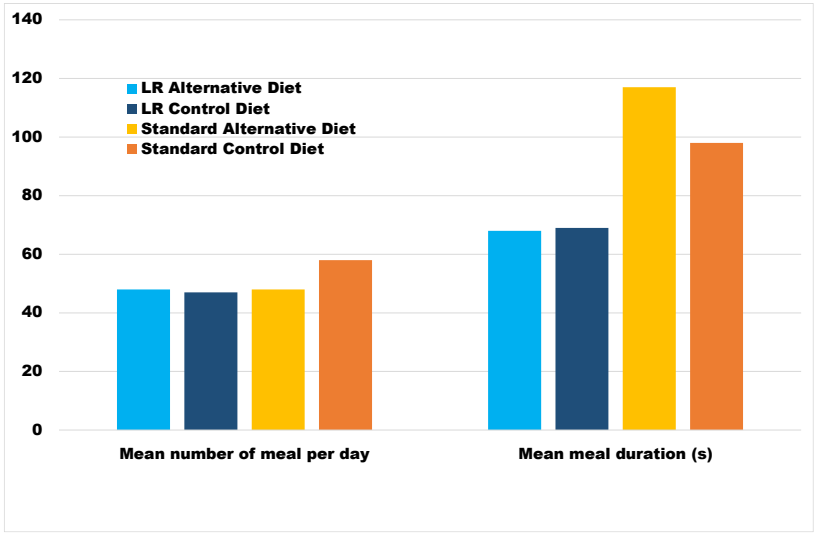


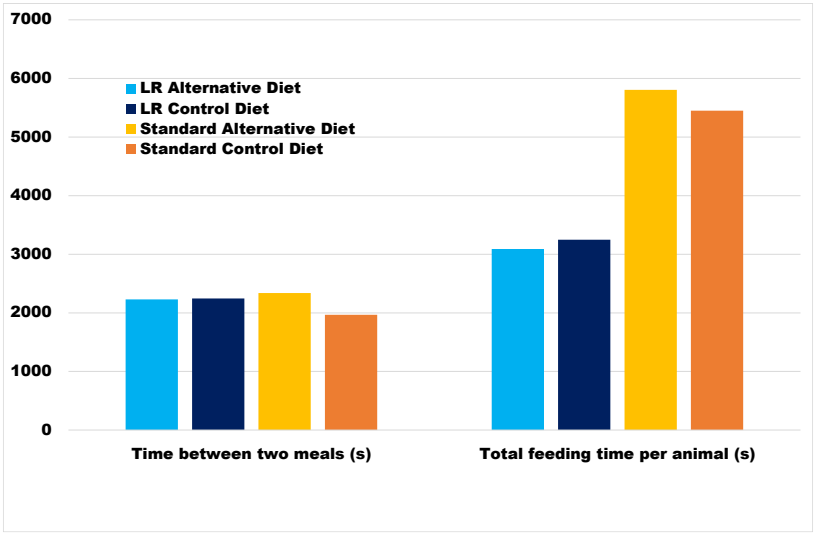
Début	Fin	ID animal	Poids animal	Poids aliment	Mangeoire	Accès
2019-10-02 17:54:07	2019-10-02 17:54:11	0900000000000240	983.0466	2.0	Proto 1	access3
2019-10-02 17:51:28	2019-10-02 17:51:34	0900000000000245	882.99146	5.2	Proto 1	access8
2019-10-02 17:50:56	2019-10-02 17:50:59	0900000000000153	1062.901	5.6	Proto 1	access5

L'accès à de nouvelles données

- Données de comportement alimentaire :
  - Accès privilégié
  - Nombre de repas par jour
  - Temps moyen d'un repas
  - Temps moyen entre deux repas
  - Temps moyen passé à manger / jour
  - Consommation moyenne lors d'un repas







Evaluation de l'intérêt des extraits de plante avec BIRD-e

- Performances individuelles
  - Meilleure précision de l'efficacité alimentaire
  - Dispositif puissant : nombre d'animaux par lot restreint (100 à 120 animaux/mangeoire) – 3R

- Suivi du comportement alimentaire
  - Impact sur la consommation détecté rapidement (effet direct ou indirect)
  - Test d'appétence (fréquence aux différents accès des mangeoires)
  - Possibilité de déterminer un seuil d'alerte (concentration d'un additif) à partir duquel on dégrade les performances

BIRD-e aujourd'hui

- Dispositif R&D
  - 6 mangeoires
  - Mises à contribution pour une recherche partenariale d'ici un an (INRAe & ITAVI) : contrat de recherche ou prestation de service

- Perspectives d'évolution
  - Ajout d'un logiciel de pré-traitement des données brutes : un seul fichier de sortie avec poids, consommation et IC par animal et par jour (en cours)
  - Consommation d'eau ?

MERCI DE VOTRE ATTENTION

pampouille@itavi.asso.fr

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

Comment évaluer sur cellules l'innocuité et les effets immunostimulants des extraits de plantes ?

Rodrigo GUABIRABA

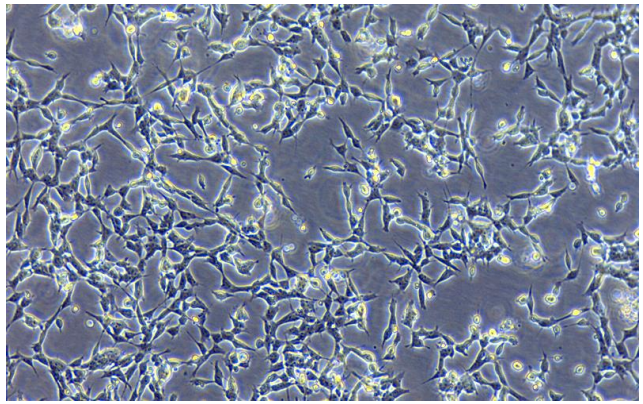
UMR1282 Infectiologie et Santé Publique

Contexte

Culture cellulaire: le maintien en dehors de l'organisme des cellules non organisées en tissu mais capable de se diviser *in vitro* et de maintenir leurs fonctions physiologiques .

Les **méthodes *in vitro* sur cultures cellulaires** sont un bon compromis entre les méthodes biochimiques et les méthodes sur animaux (*in vivo)*: **coût, 3Rs…**



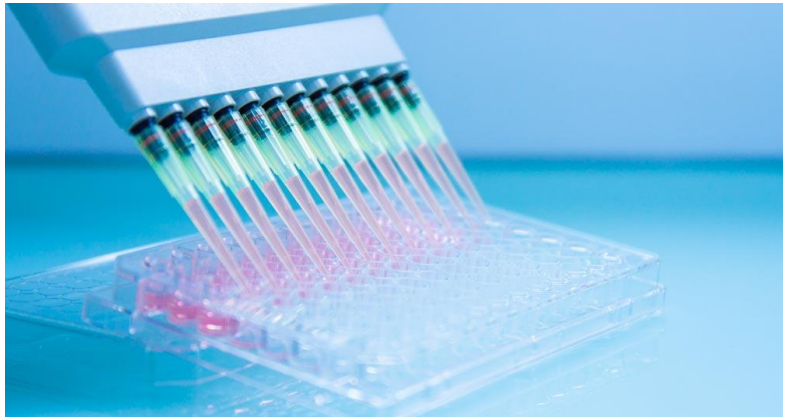


Contexte

Tests sur cellules: permettent de mesurer la **« perturbation physiologique »** engendrée par des substances/produits testées, en fonction des capacités métaboliques des cellules utilisées.

Identification de plusieurs modifications physiologiques: **métabolisme et immunité**

Etapes initiales de la recherche préclinique: Important d'obtenir des résultats précis et fiables à partir des **tests métaboliques et d'immunostimulation** *in vitro.*



Objectifs

Une étude bibliographique a permis d'identifier 4 extraits végétaux d'intérêt: Astragale, Echinacée, Ginseng et Mélisse

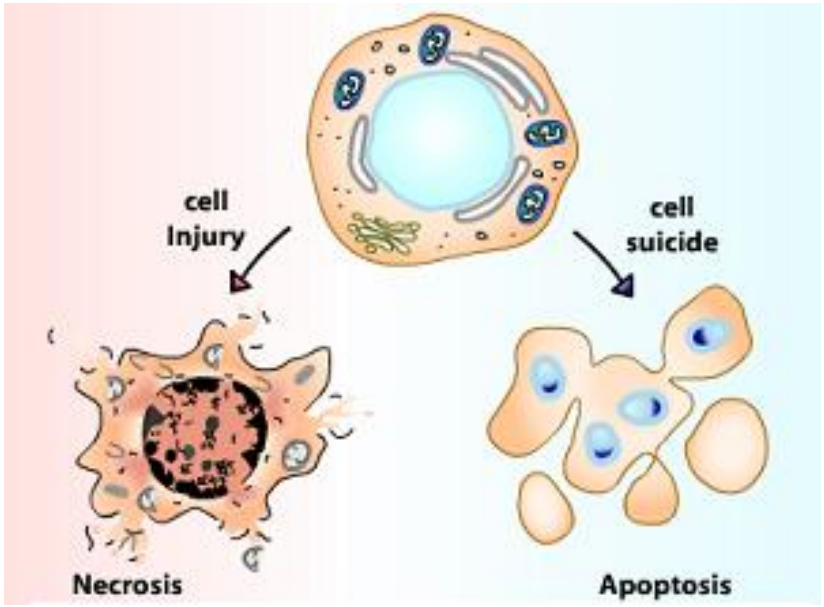
1. Un test **d'activité métabolique (MTT)** a été réalisé sur trois lignées cellulaires de poulets, représentatives des fonctions **respiratoire** (cellules épithéliales pulmonaires CLEC213), **hépatique** (hépatocytes LMH) et de la **réponse immunitaire** (macrophages HD11).

2. L'immunostimulation induite chez les **macrophages** a été étudiée en évaluant la production de **l'oxyde nitrique (NO)**, une molécule pro-oxydante et antimicrobienne, et l'activation de la **voie NFκB**.

Viabilité cellulaire

Les tests de **viabilité cellulaire** sont utilisés pour cribler des composés afin de déterminer si les molécules d'essai ont des **effets cytotoxiques**, qui peuvent conduire à la mort cellulaire.

Un test de viabilité cellulaire est souvent basé sur **l'analyse du métabolisme cellulaire.**



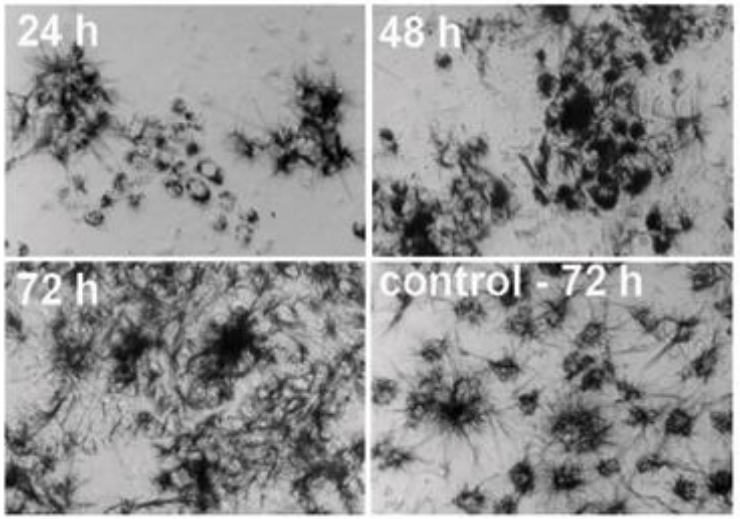
Test MTT

Sel de tétrazolium MTT: métabolisé par les mitochondries

Formation d'un précipité de couleur violette dans les cellules.

La quantité de précipité formée est proportionnelle à l'activité métabolique de chaque cellule.

Dissolution et dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie permet de connaître la quantité relative de cellules actives métaboliquement.



Test MTT

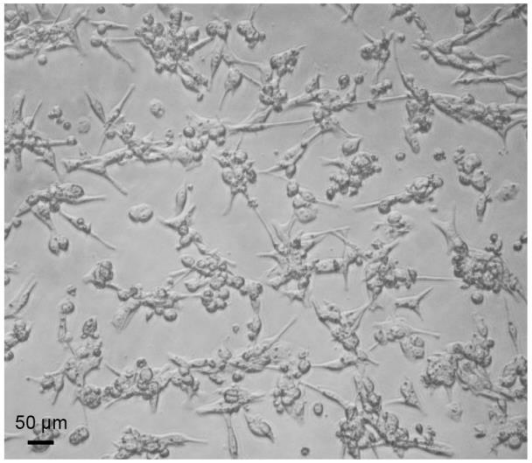
Principaux facteurs pour la reproductibilité et le succès :

1) L'utilisation d'une source de cellules contrôlée et cohérente pour mettre en place des expériences
2) La caractérisation appropriée de la concentration de réactif et du temps d'incubation pour chaque système modèle.

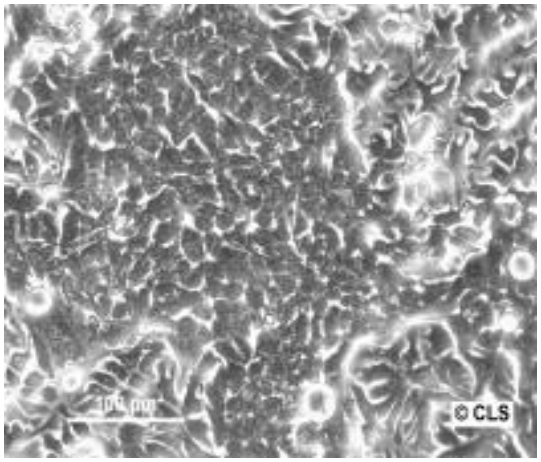
Norme ISO 10993-5: les pourcentages de viabilité cellulaire supérieurs à 80% sont considérés comme non cytotoxiques; entre 80 et 60% faible; entre 60% à 40% modérée et **inférieure à 40% cytotoxique**.

Lignées cellulaires

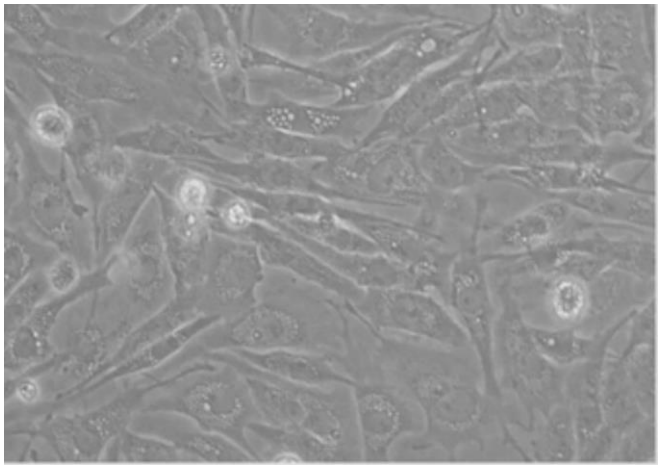
Macrophages HD11 (cellules immunitaires)



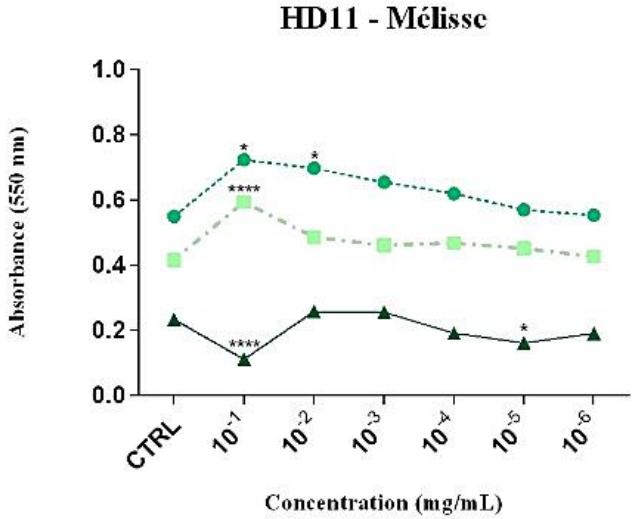
Hépatocytes LMH (cellules hépatiques)

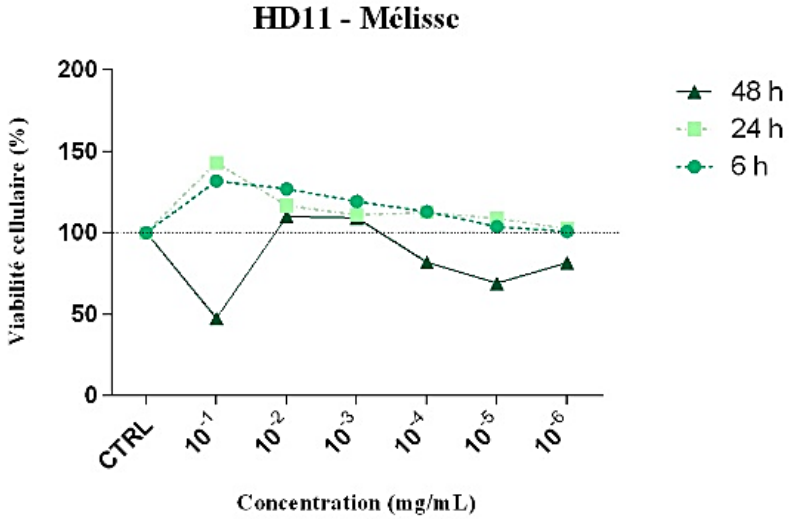


Epithéliales CLEC 213 (cellules pulmonaires)



Résultats MTT



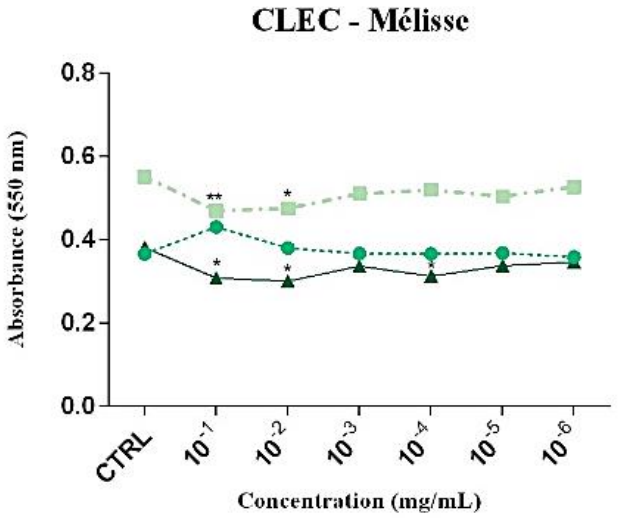


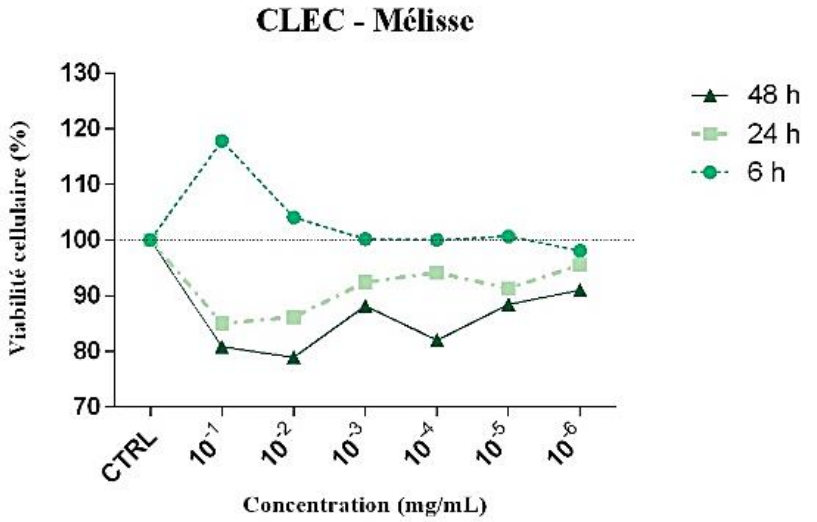
6 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,550	
$10.^{-1}$	0,724 (*)	31,7
$10.^{-2}$	0,698 (*)	26,9
$10.^{-3}$	0,656	19,2
$10.^{-4}$	0,621	12,9
$10.^{-5}$	0,570	3,7
$10.^{-6}$	0,554	0,7

24 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,496	
$10.^{-1}$	0,422	-14,8
$10.^{-2}$	0,506	2,2
$10.^{-3}$	0,446	-10,1
$10.^{-4}$	0,417	-15,9
$10.^{-5}$	0,458	-7,5
$10.^{-6}$	0,46	-7,3

48 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,671	
$10.^{-1}$	0,677	1
$10.^{-2}$	0,631	-5,9
$10.^{-3}$	0,594 (*)	-11,5
$10.^{-4}$	0,595 (*)	-11,3
$10.^{-5}$	0,593 (*)	-11,6
$10.^{-6}$	0,581 (**)	-13,4

Résultats MTT



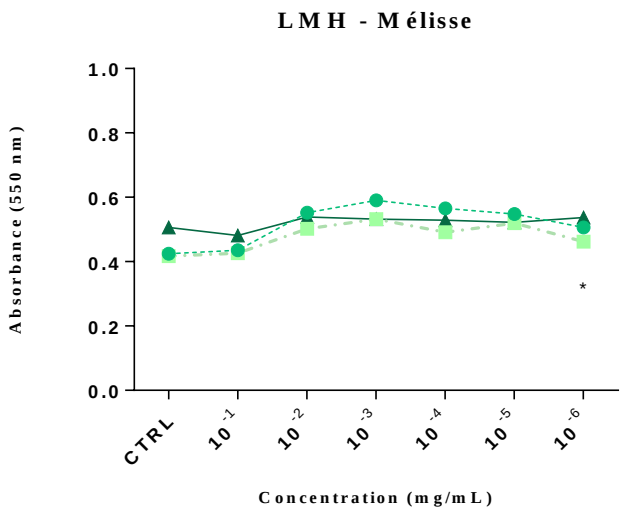


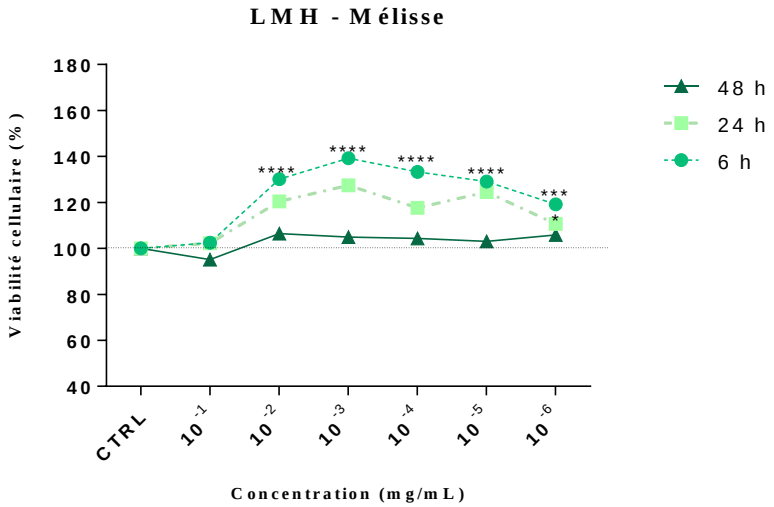
6 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,366	
$10.^{-1}$	0,431	17,8
$10.^{-2}$	0,381	4,1
$10.^{-3}$	0,367	0,2
$10.^{-4}$	0,366	0
$10.^{-5}$	0,369	0,7
$10.^{-6}$	0,359	-1,9

24 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,552	
$10.^{-1}$	0,469 (**)	-15
$10.^{-2}$	0,476 (*)	-13,8
$10.^{-3}$	0,510	-7,6
$10.^{-4}$	0,520	-5,8
$10.^{-5}$	0,504	-8,7
$10.^{-6}$	0,527	-4,5

48 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,382	
$10.^{-1}$	0,309 (*)	-19,2
$10.^{-2}$	0,301 (*)	-21,1
$10.^{-3}$	0,337	-11,8
$10.^{-4}$	0,313 (*)	-18
$10.^{-5}$	0,338	-11,6
$10.^{-6}$	0,347	-9

Résultats MTT





6 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,424	
$10.^{-1}$	0,435	2,5
$10.^{-2}$	0,552	30,1
$10.^{-3}$	0,591	39,2
$10.^{-4}$	0,566	33,3
$10.^{-5}$	0,548	29,1
$10.^{-6}$	0,506	19,2

24 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,417	
$10.^{-1}$	0,426	2,2
$10.^{-2}$	0,502	20,4
$10.^{-3}$	0,531	27,4
$10.^{-4}$	0,491	17,7
$10.^{-5}$	0,519	24,5
$10.^{-6}$	0,461	10,6

48 h		
Dilutions	Moyenne Abs 550 nm	%
CTRL	0,507	
$10.^{-1}$	0,482	-4,9
$10.^{-2}$	0,539	6,4
$10.^{-3}$	0,532	4,9
$10.^{-4}$	0,529	4,3
$10.^{-5}$	0,522	3
$10.^{-6}$	0,537	5,9

Test MTT

Avantages: Méthode supérieure aux méthodes d'exclusion de colorant (e.g. Bleu de Trypan) – Facilité et reproductibilité élevées.

Inconvénients: le formazan est insoluble dans l'eau et forme des cristaux violets. Un solvant organique tel que le diméthyl du sulfoxyde (DMSO) ou de l'isopropanol est nécessaire pour solubiliser les cristaux.

De plus, certains composés chimiques interfèrent avec la réduction du MTT en formazan et ne sont donc pas facilement compatibles avec les dosages MTT.

Immunostimulation

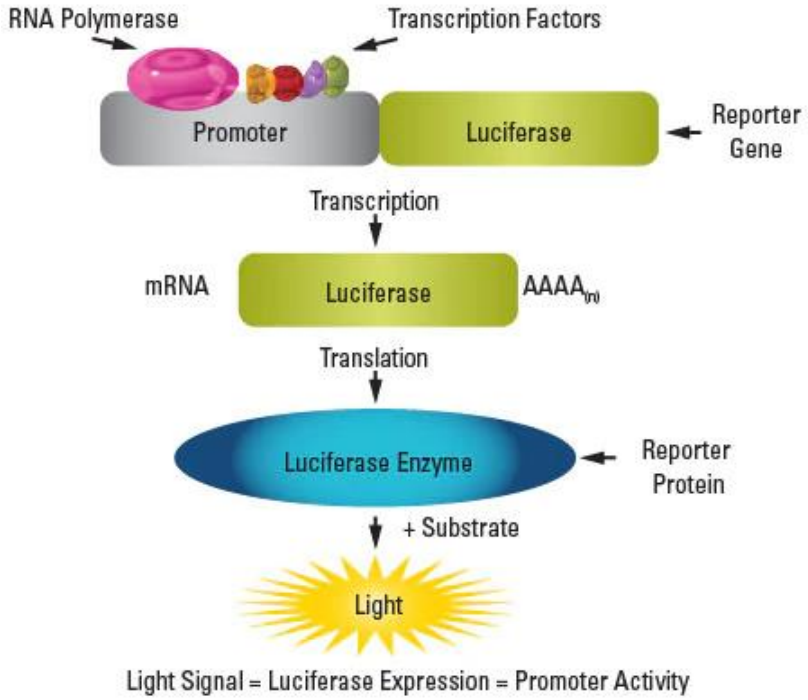
La signalisation NFkB

Mécanisme cellulaire impliquée dans l'inflammation et le cancer.

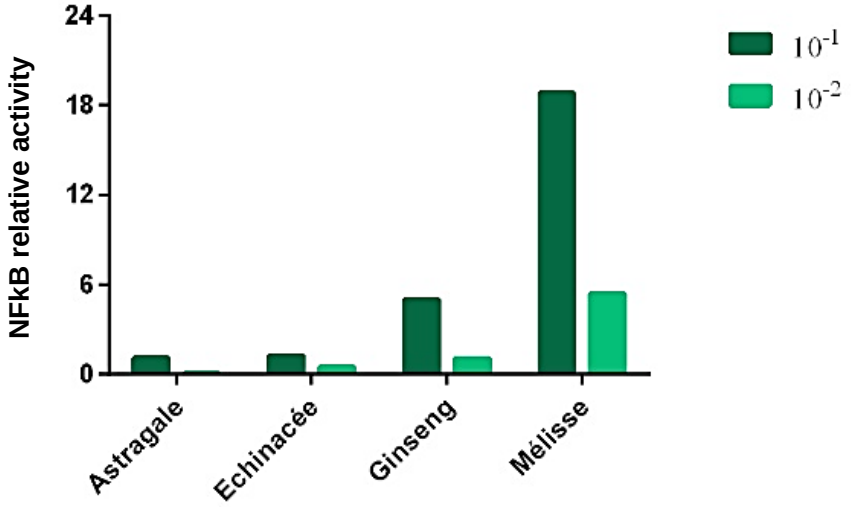
Chez les **cellules immunitaires (e.g. macrophages)** elle est directement lié a ses fonctions inflammatoires et anti-pathogènes.

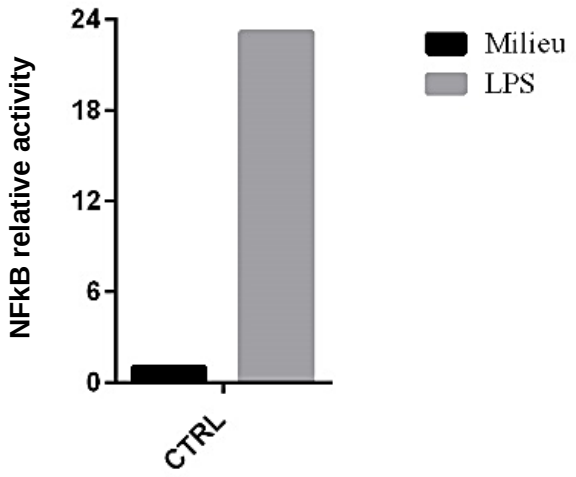
Lignée de macrophages HD11 reportrice luciférase avec élément de réponse NFκB:

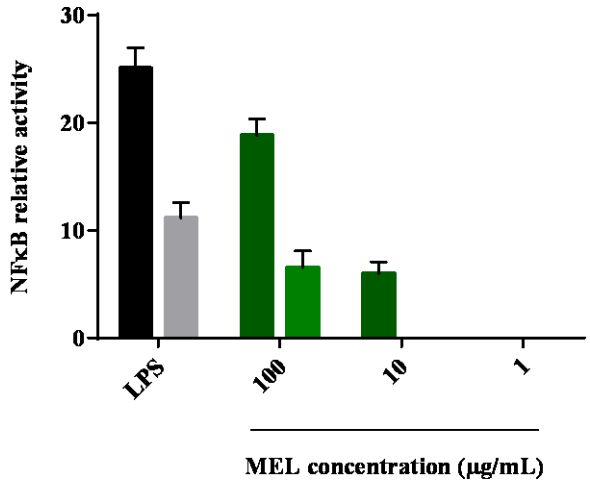
Détection rapide et bioluminescente de toute réponse cellulaire entraînant une modification des activités NF-κB



Résultats NFkB

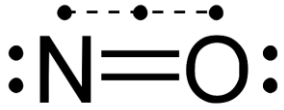






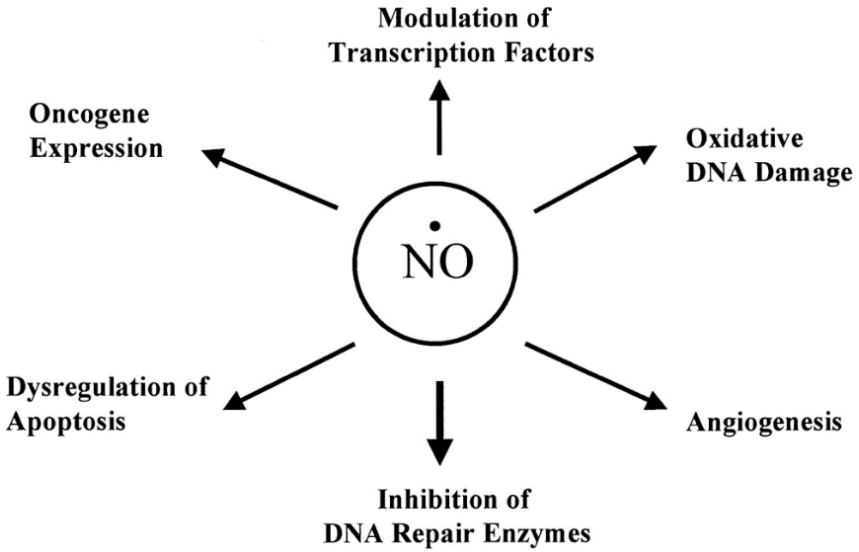
Immunostimulation

L'oxyde nitrique (NO)



L'oxyde nitrique NO est impliqué dans de nombreux processus physiologiques:

Régulation de la pression artérielle et la réponse immunitaire.

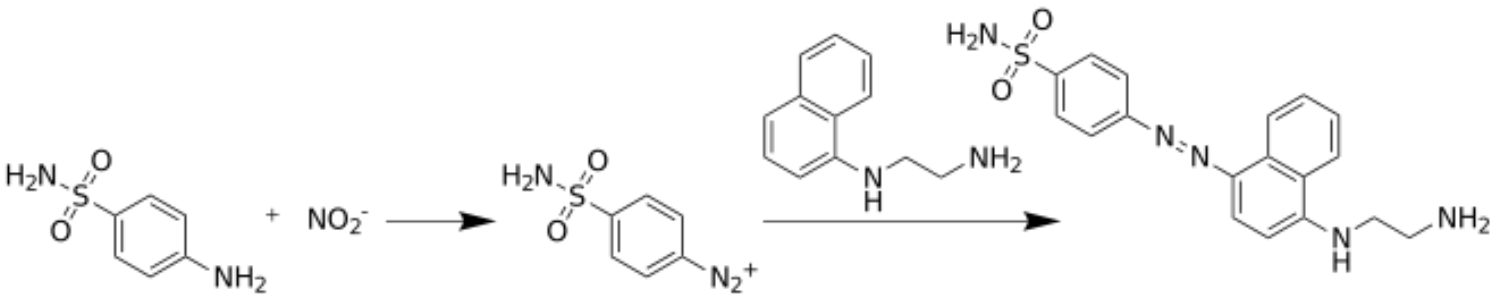


Immunostimulation

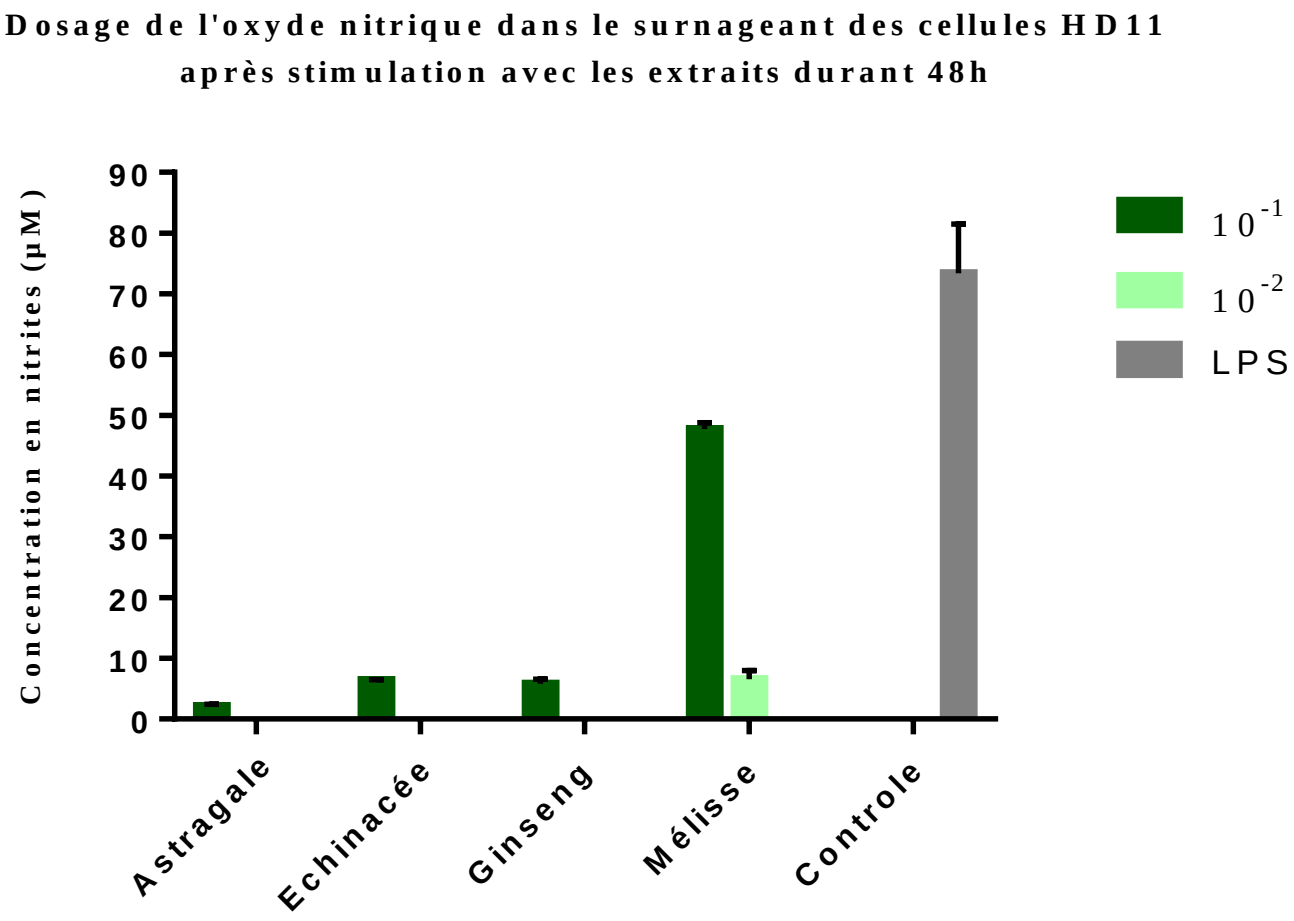
La méthode de Griess

Mesure le **nitrite (NO_2^-)**, l'un des deux principaux produits de dégradation stables et non volatils de l'oxyde nitrique (NO).

Détection du **nitrite (NO_2^-)** dans une variété de matrices liquides biologiques et expérimentales telles que le plasma, le sérum, l'urine et le milieu de culture tissulaire.

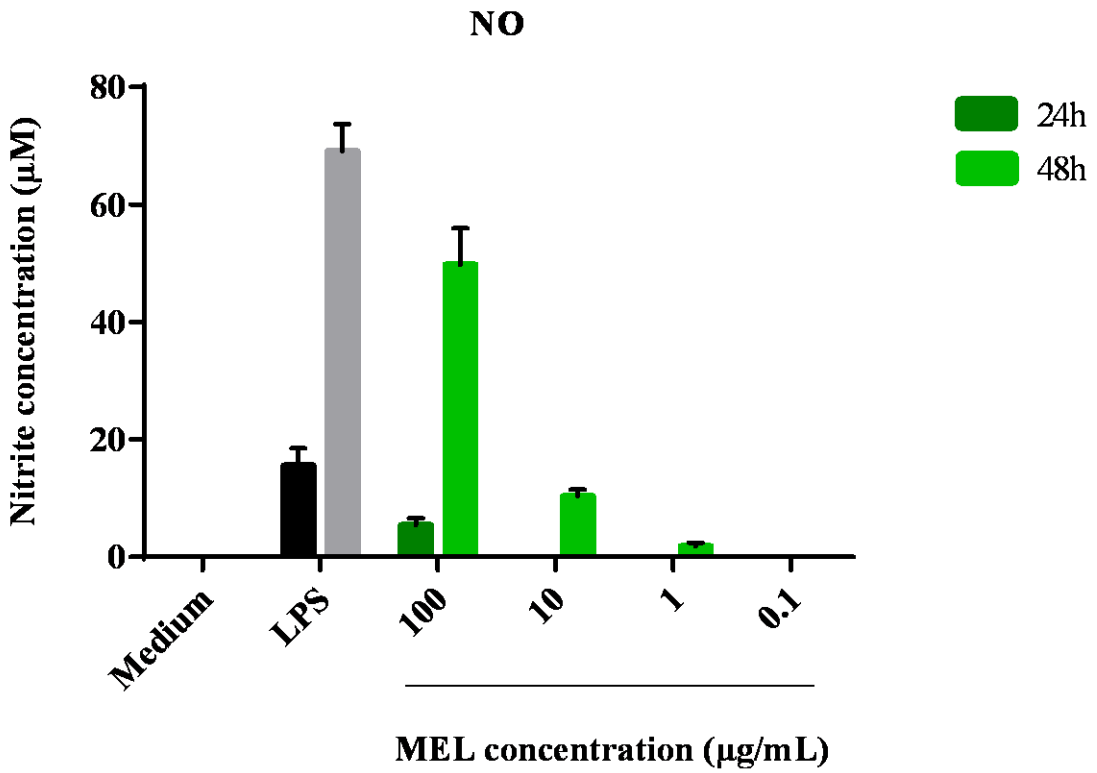


Résultats NO



Résultats NO

Mélisse



Conclusions

Nos extraits présentent peu ou pas d'effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires étudiées.

Les seuils de cytotoxicité vis-à-vis du test MTT sont bien discutés dans la littérature, où un taux d'environ 60% de perte d'activité métabolique peut être réellement lié à un phénomène de cytotoxicité (ISO 10993-5:2009).

L'extrait de Mélisse possède une forte activité immunostimulante à deux concentrations (10^{-1} et 10^{-2} mg/ml) pour la lignée de macrophages aviaire, une activité nettement supérieure à celle observée avec l'extrait de Ginseng

Les différentes étapes de préparation des extraits, de choix des types cellulaires et des conditions de mise en contact avec les extraits ont permis de définir une méthode pertinente pour évaluer l'innocuité et la capacité immunostimulante de nos extraits.

Tous les extraits végétaux testés semblent non cytotoxiques, mais seuls la Mélisse et le Ginseng semblent des candidats capables de stimuler les défenses naturelles des volailles.

MERCI DE VOTRE ATTENTION

rodrigo.guabiraba-brito@inrae.fr

@rodguabiraba

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :

Validation de l'efficacité des extraits de plantes en ferme expérimentale

Camille BOURRIER--CLAIRAT

Les conditions de l'essai

- **Objectif**

  Evaluer l'effet de la mélisse et du ginseng sur les indicateurs de santé, de bien-être et de performances de poulets de chair standard

- **Animaux**

  1080 mâles ROSS PM3



Mélisse



Ginseng

Les conditions de l'essai



Mélisse

- **Objectif**

  Evaluer l'effet de la mélisse et du ginseng sur les indicateurs de santé, de bien-être et de performances de poulets de chair standard



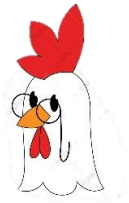
Ginseng

- **Animaux**

  1080 mâles ROSS PM3

- **Conditions peu favorables**

  Vieilles reproductrices



Les conditions de l'essai



Mélisse

- **Objectif**

  Evaluer l'effet de la mélisse et du ginseng sur les indicateurs de santé, de bien-être et de performances de poulets de chair standard

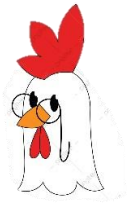


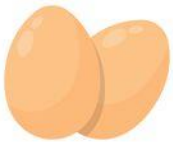
Ginseng

- **Animaux**

  1080 mâles ROSS PM3

- **Conditions peu favorables**

Vieilles reproductrices 

OAC stockés 15 j 

Les conditions de l'essai

- **Objectif**

  Evaluer l'effet de la mélisse et du ginseng sur les indicateurs de santé, de bien-être et de performances de poulets de chair standard



Mélisse

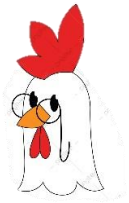


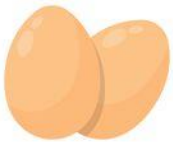
Ginseng

- **Animaux**

  1080 mâles ROSS PM3

- **Conditions peu favorables**

Vieilles reproductrices 

OAC stockés 15 j 

Attente des poussins 24h à 18C° 

Les conditions de l'essai

- **Objectif**

  Evaluer l'effet de la mélisse et du ginseng sur les indicateurs de santé, de bien-être et de performances de poulets de chair standard



Mélisse

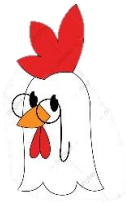


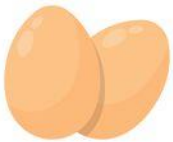
Ginseng

- **Animaux**

  1080 mâles ROSS PM3

- **Conditions peu favorables**

Vieilles reproductrices 

OAC stockés 15 j 



Attente des poussins 24h à 18C°

Conditions d'élevage :

Densité d'élevage 39 kg/m²

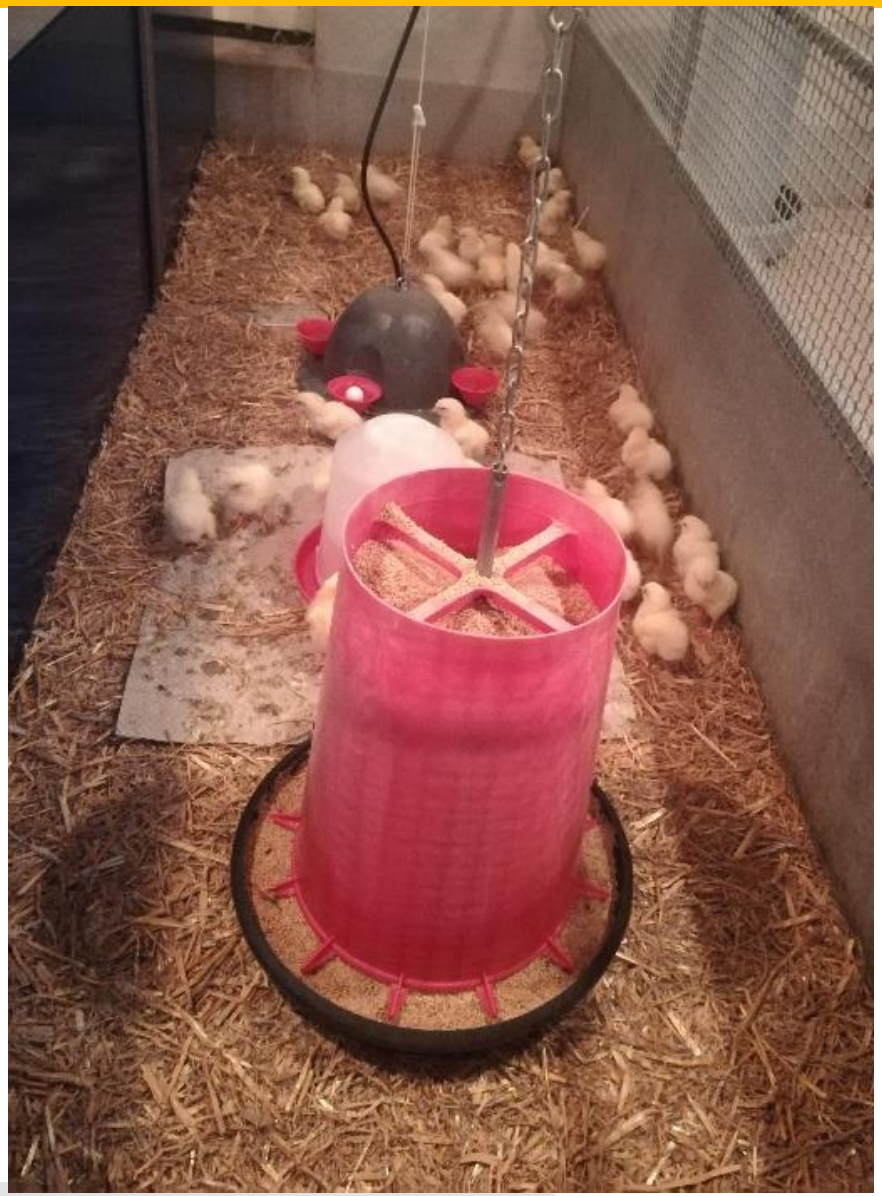


Paille 

Les conditions de l'essai

3 lots X 40 poulets X 9 répétitions

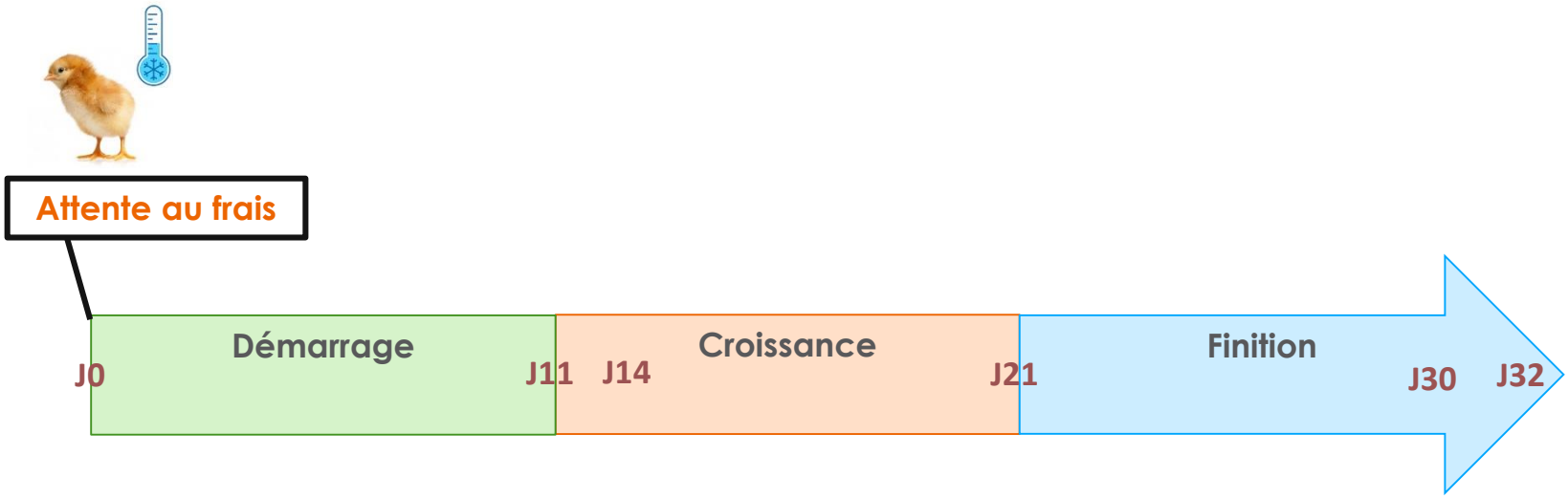
Lot	Extrait de plante	Nb d'animaux
Témoin	Aucun	360
Mélisse	1% de mélisse	360
Ginseng	0,05% de ginseng	360



Déroulement de l'essai



Déroulement de l'essai



Déroulement de l'essai



Attente au frais

J0 — Démarrage — J11 J14 — Croissance — J21 — Finition — J30 J32

MEP en élevage



Déroulement de l'essai



Attente au frais

Démarrage

J0

J11

J14

Croissance

J21

Finition

J30

J32

MEP en élevage



Prise de sang



Prise de sang



Déroulement de l'essai



Attente au frais

J0 — Démarrage — J11 J14 — Croissance — J21 — Finition — J30 J32

MEP en élevage



Prise de sang



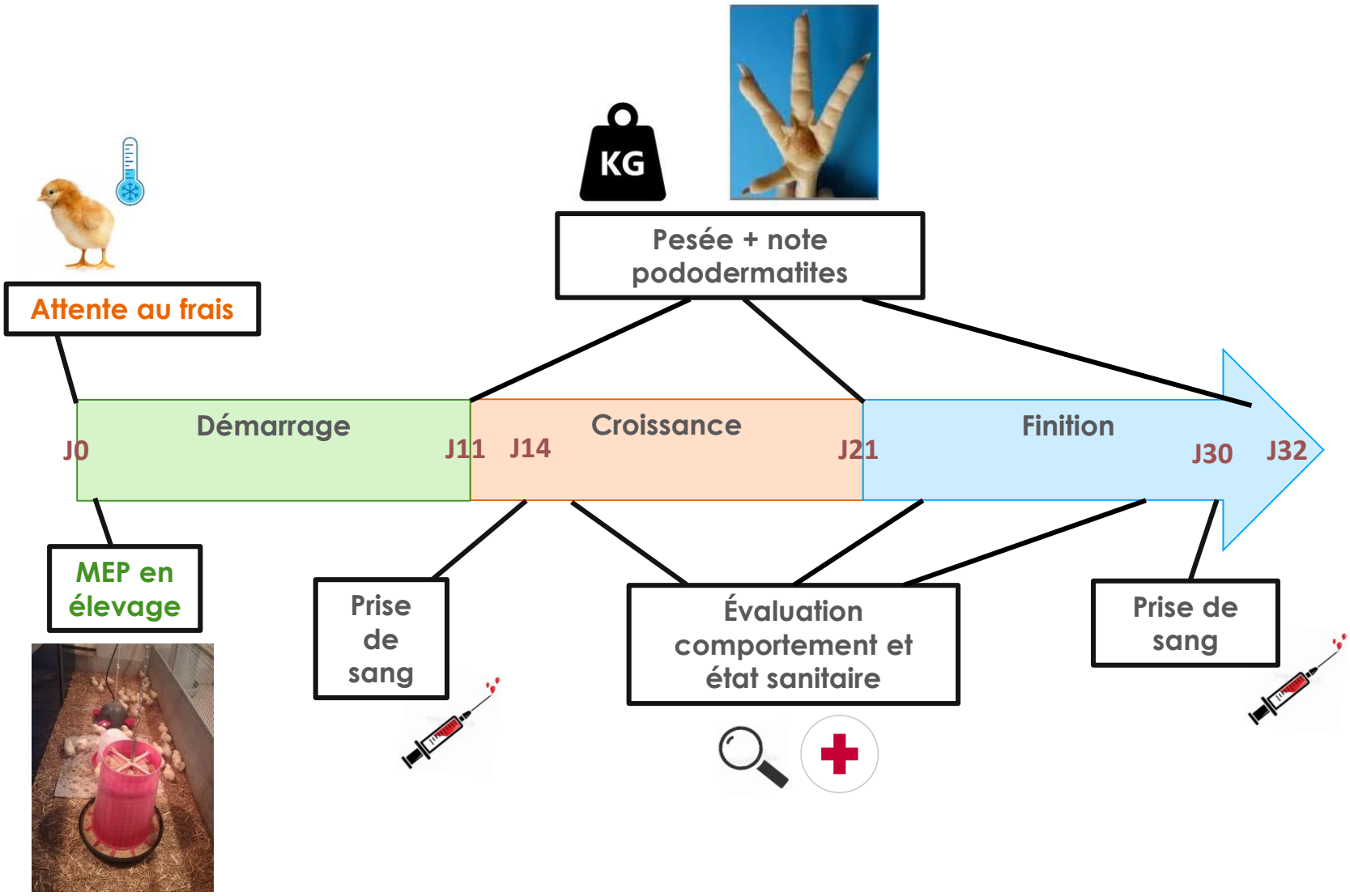
Évaluation comportement et état sanitaire



Prise de sang



Déroulement de l'essai



Déroulement de l'essai



Attente au frais





Pesée + note pododermatites

Mesure des défauts musculaires



Démarrage

Croissance

Finition

J0 J11 J14 J21 J30 J32

MEP en élevage



Prise de sang



Évaluation comportement et état sanitaire



Prise de sang



Paramètres physiologiques



- Formule sanguine

Hétérophiles, lymphocytes, Hétérophiles/lymphocytes, monocytes, éosinophiles

- Métabolisme

Glucose, acide urique, triglycérides

- Marqueur de l'inflammation

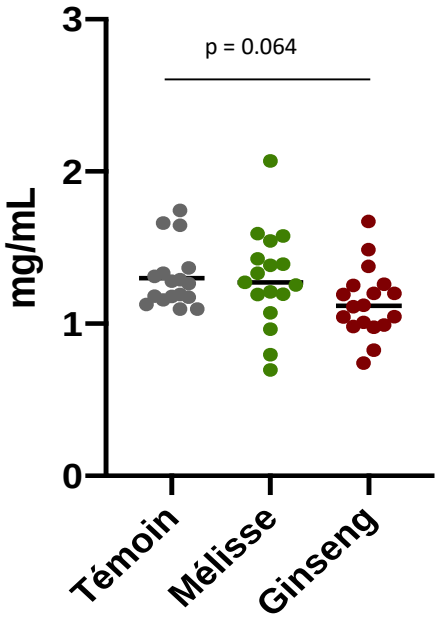
Haptoglobine

- Marqueurs de la balance redox

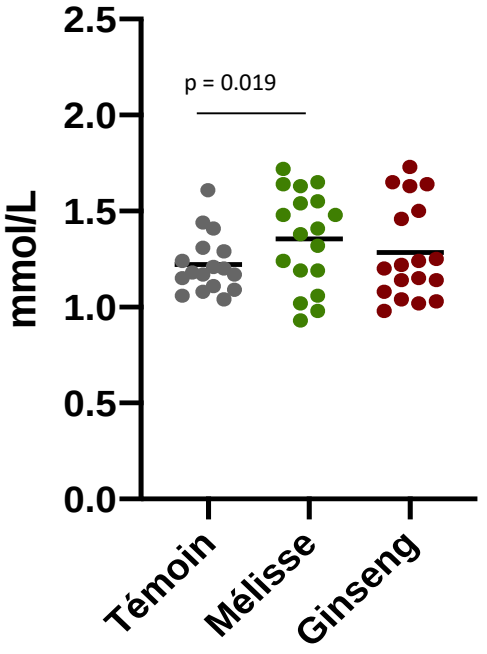
Statut anti-oxydant total (TAS)
TBARS (peroxydation lipides)
Superoxyde dismutase (SOD)

Paramètres physiologiques

J14
Haptoglobine

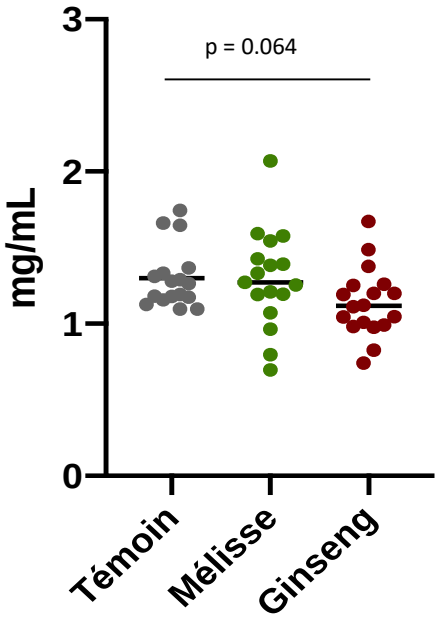


J30
Statut antioxydant
(TAS)

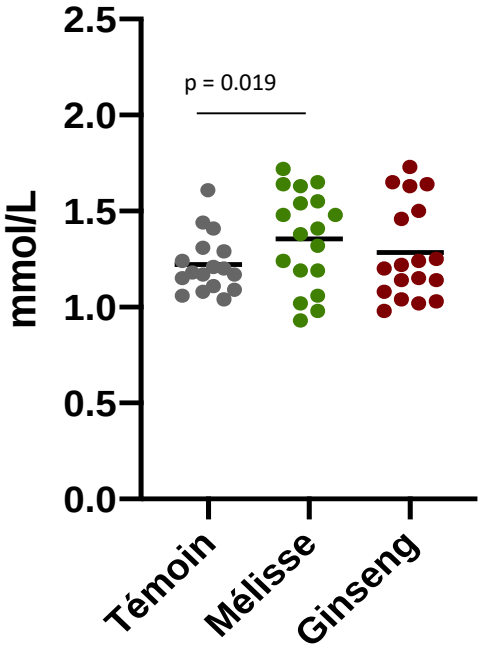


Paramètres physiologiques

J14
Haptoglobine



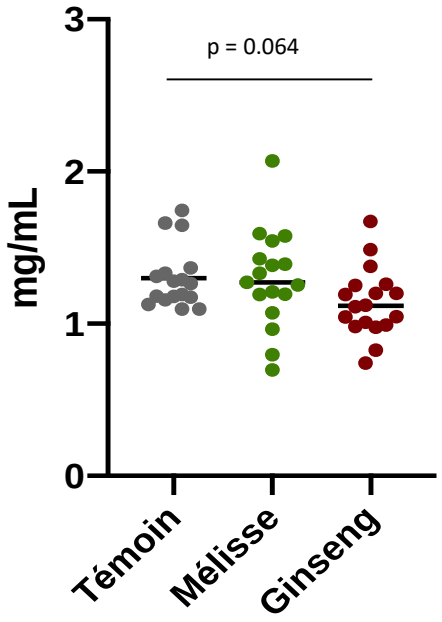
J30
Statut antioxydant
(TAS)



Tendance Ginseng
↓ inflammation

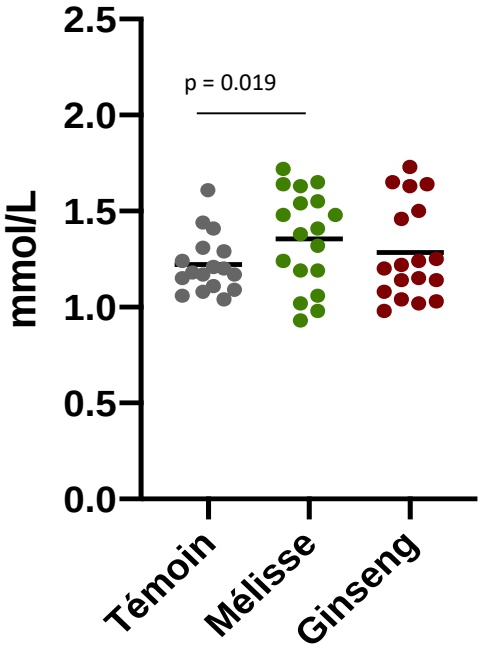
Paramètres physiologiques

J14
Haptoglobine



Tendance Ginseng
↓ inflammation

J30
Statut antioxydant
(TAS)



Effet Mélisse
↑ statut antioxydant (TAS)

Paramètres comportementaux, sanitaires et défauts musculaires



- Comportement

Activité, interaction entre individus, répartition, exploration de l'environnement, expression de comportements



- Sanitaire

Animaux sales, blessés, boiteux ou immobiles, état des pattes, propreté du cloaque, gène respiratoire, mortalité

- Défauts musculaires



Wooden breast, white stripping et muscle spaghetti

Paramètres comportementaux et sanitaires



Pas de différences observées sur les paramètres comportementaux

Paramètres comportementaux et sanitaires



Pas de différences observées sur les paramètres comportementaux

Paramètres sanitaires

Lot	Mortalité	
	MEP – J15	Totale
Témoin	0,83%	2,22%
Mélisse	0,83%	3,06%
Ginseng	0,28%	2,22%

Paramètres comportementaux et sanitaires



Pas de différences observées sur les paramètres comportementaux

Paramètres sanitaires

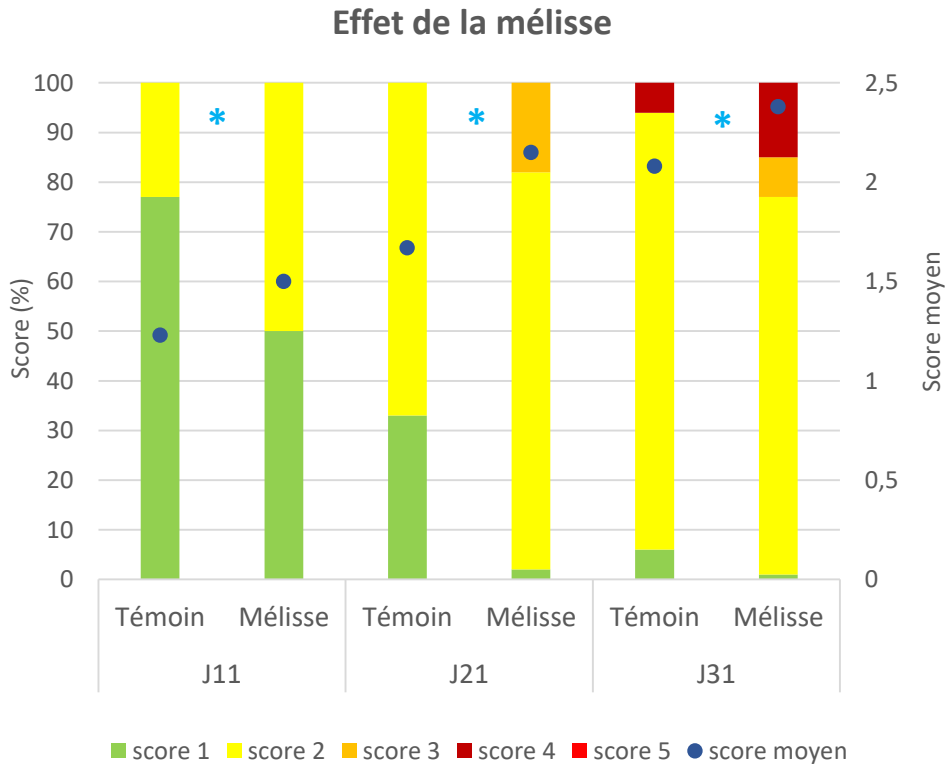
Lot	Mortalité	
	MEP – J15	Totale
Témoin	0,83%	2,22%
Mélisse	0,83%	3,06%
Ginseng	0,28%	2,22%

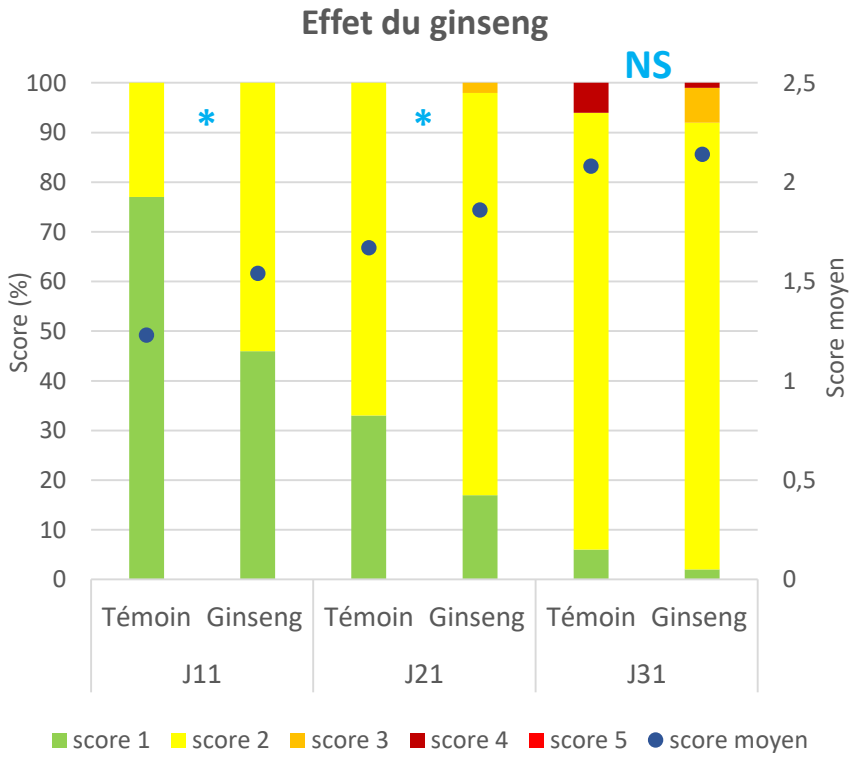
→ Mortalités faibles
Pas de différences

Paramètres sanitaires : pododermatites

Graphiques de répartition des scores de pododermatites

Grille 5 scores ITAVI

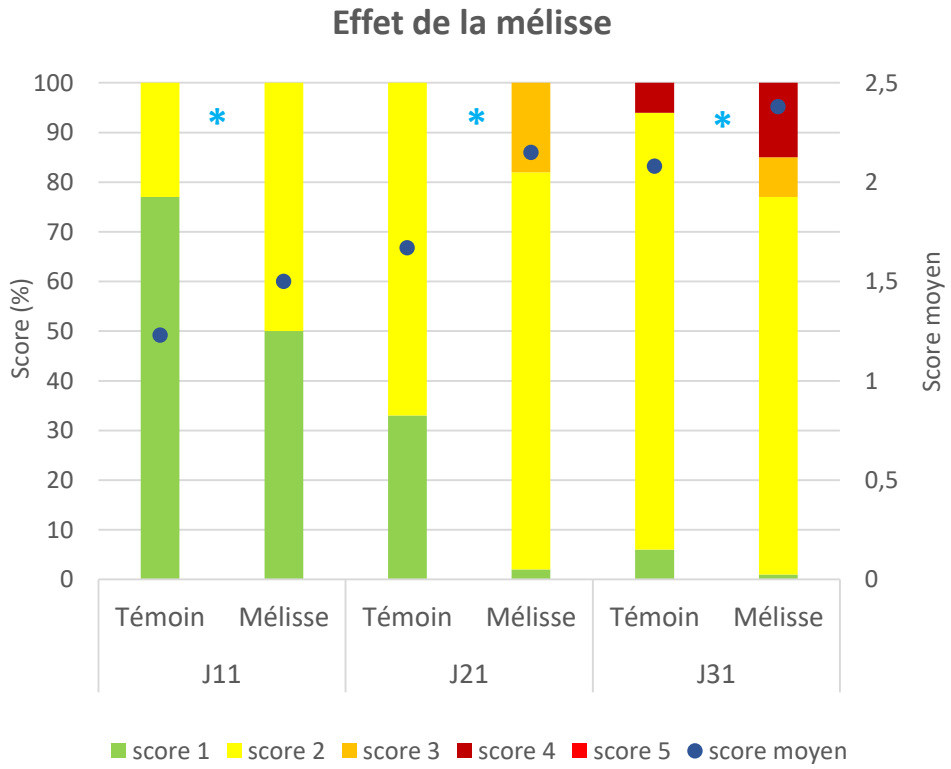


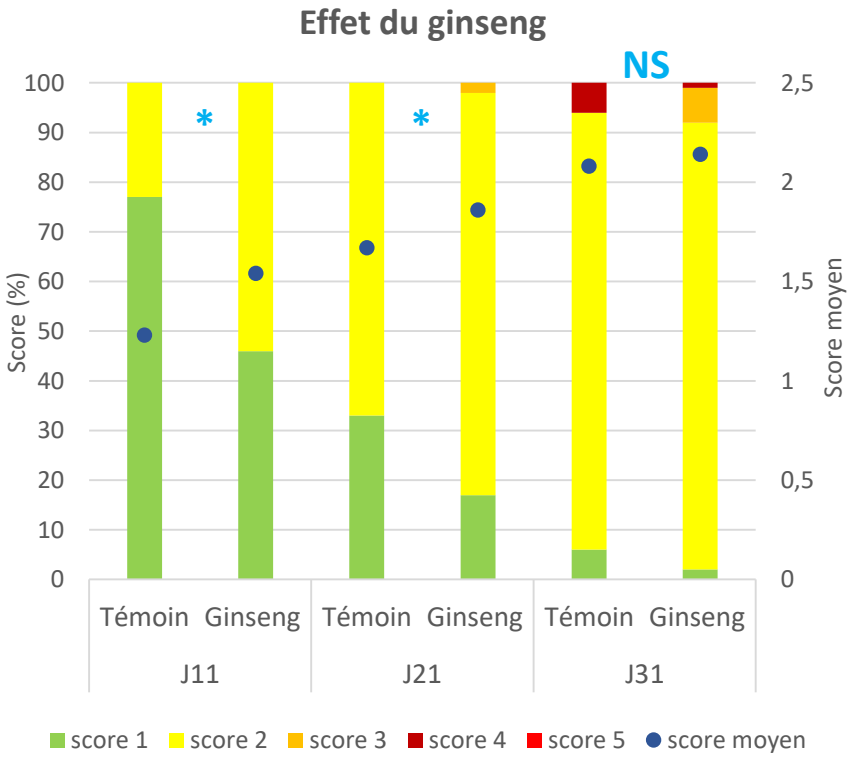


Paramètres sanitaires : pododermatites

Graphiques de répartition des scores de pododermatites

Grille 5 scores ITAVI

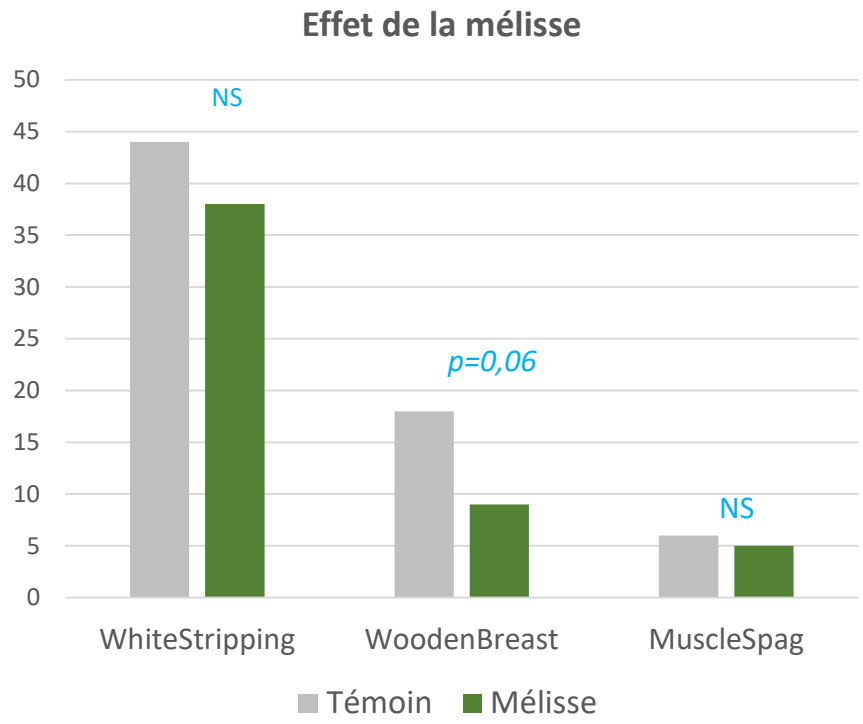


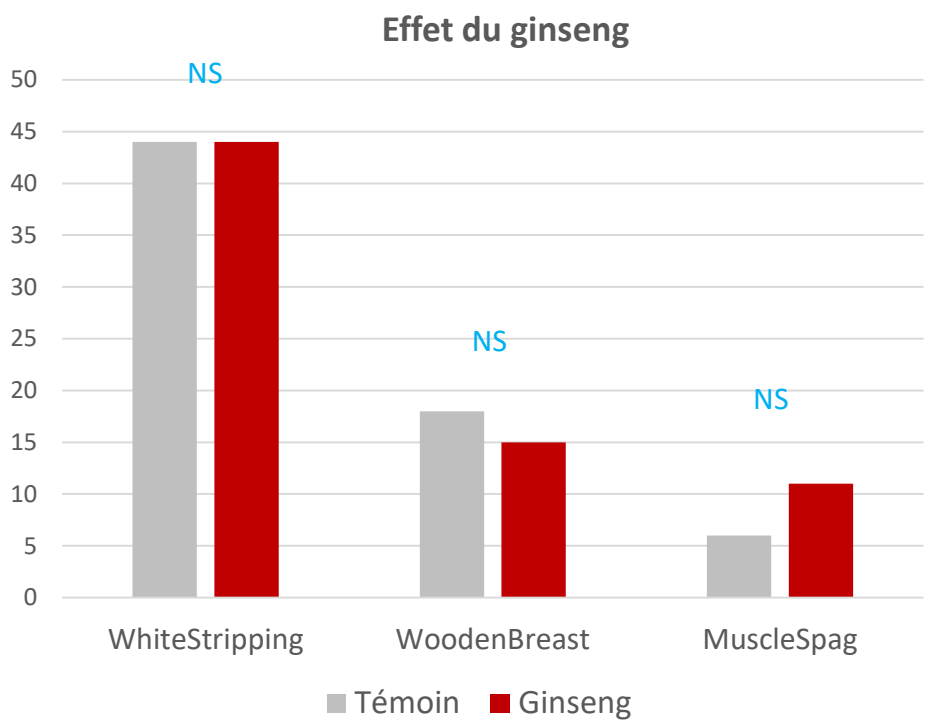


Scores de pododermatites légèrement plus élevés avec les extraits de plantes

Paramètres de défauts musculaires

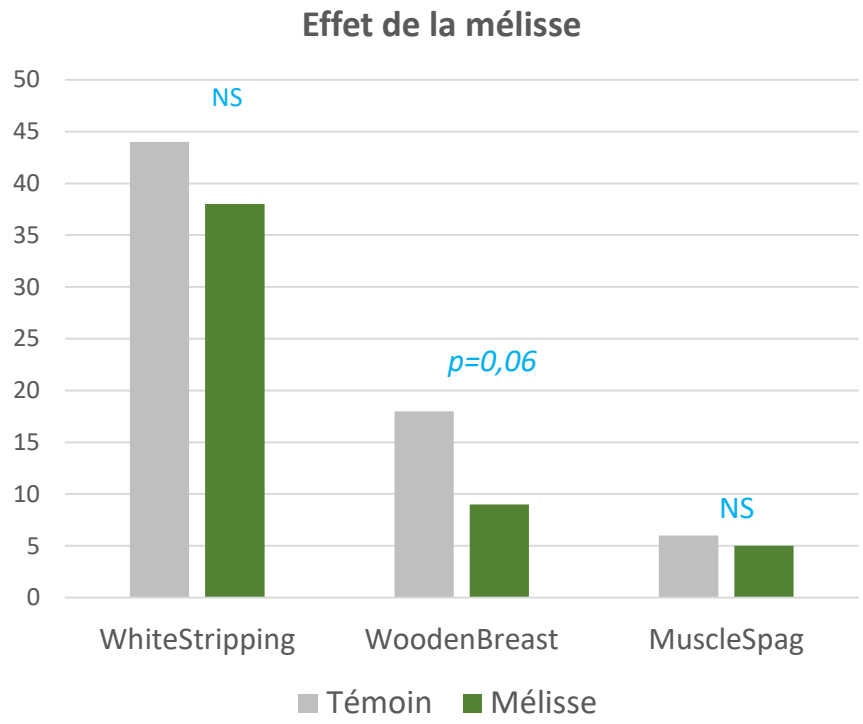
Graphiques des pourcentages de white stripping, wooden breast et muscle spaghetti

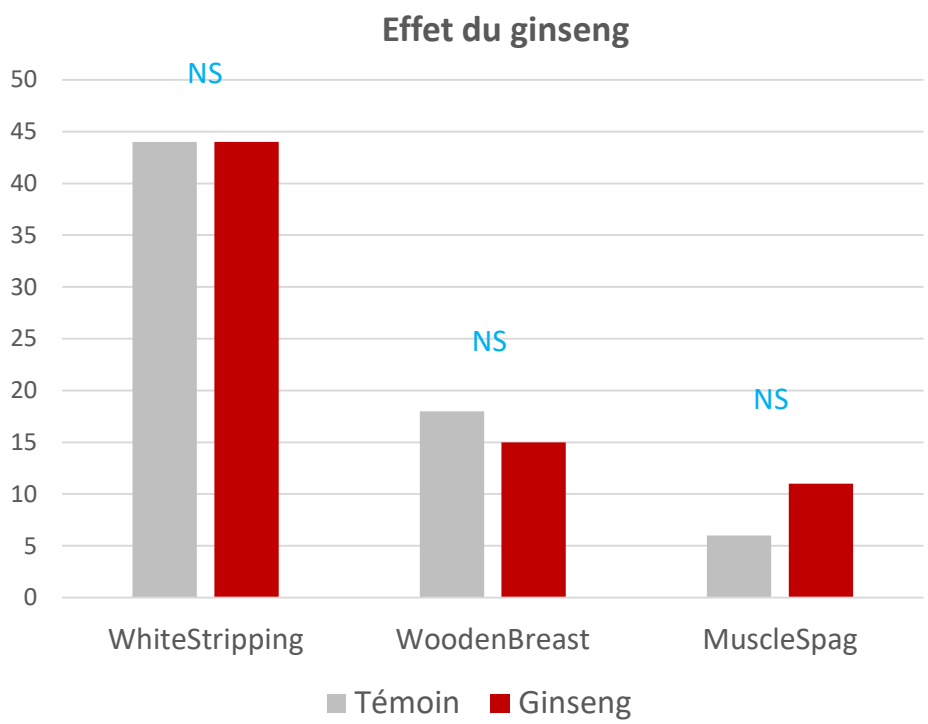




Paramètres de défauts musculaires

Graphiques des pourcentages de white stripping, wooden breast et muscle spaghetti





Tendance diminution du défaut wooden breast avec la mélisse

Paramètres de performance technique



- Élevage

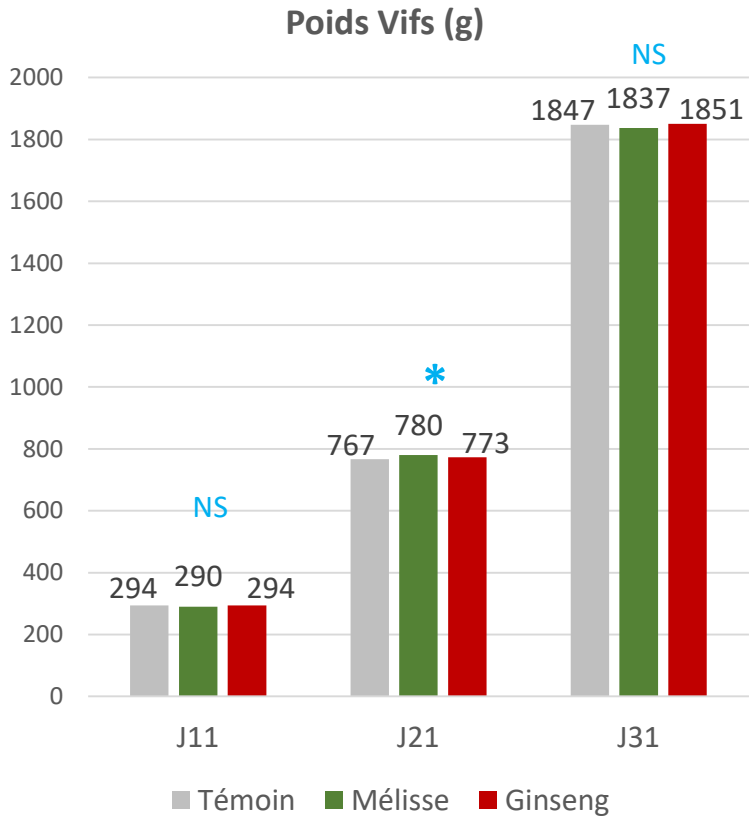
Poids vifs, GMQ, consommation d'aliment, indice de consommation

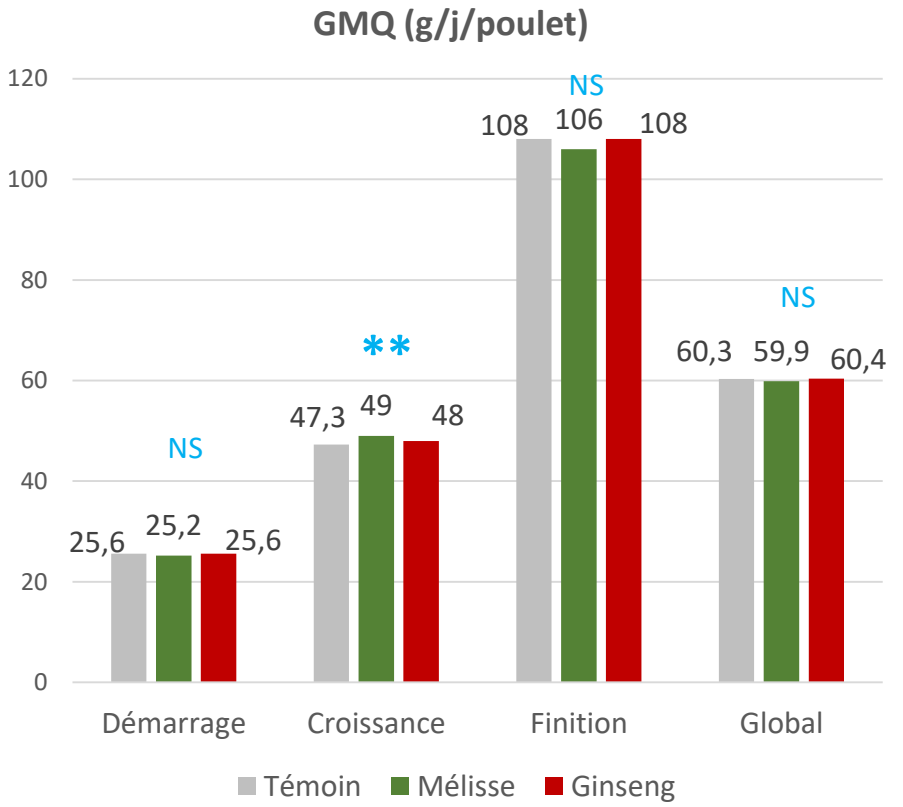
- Abattage



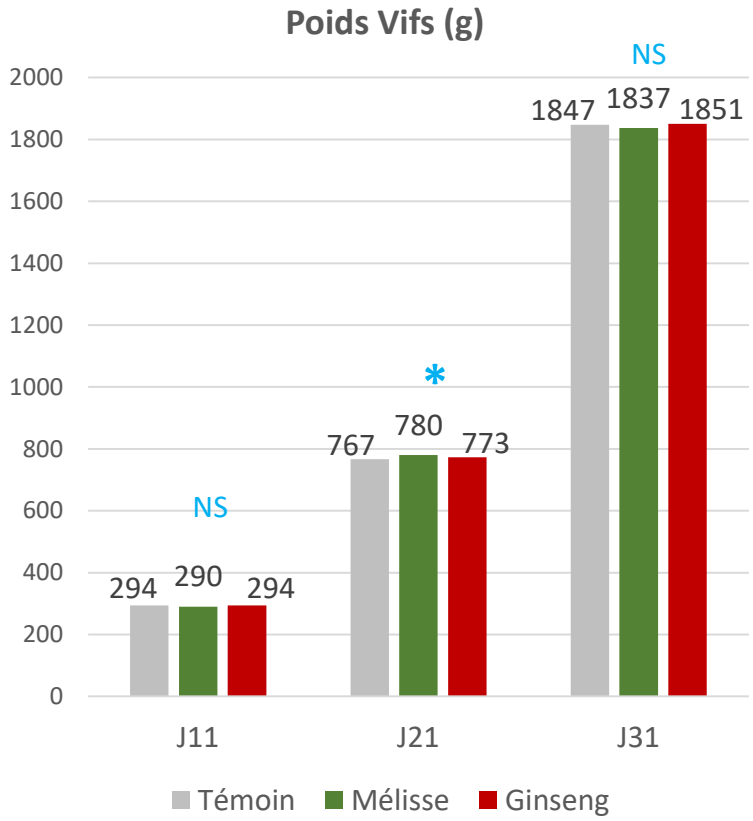
Poids carcasse, rendement carcasse, pourcentage de saisie

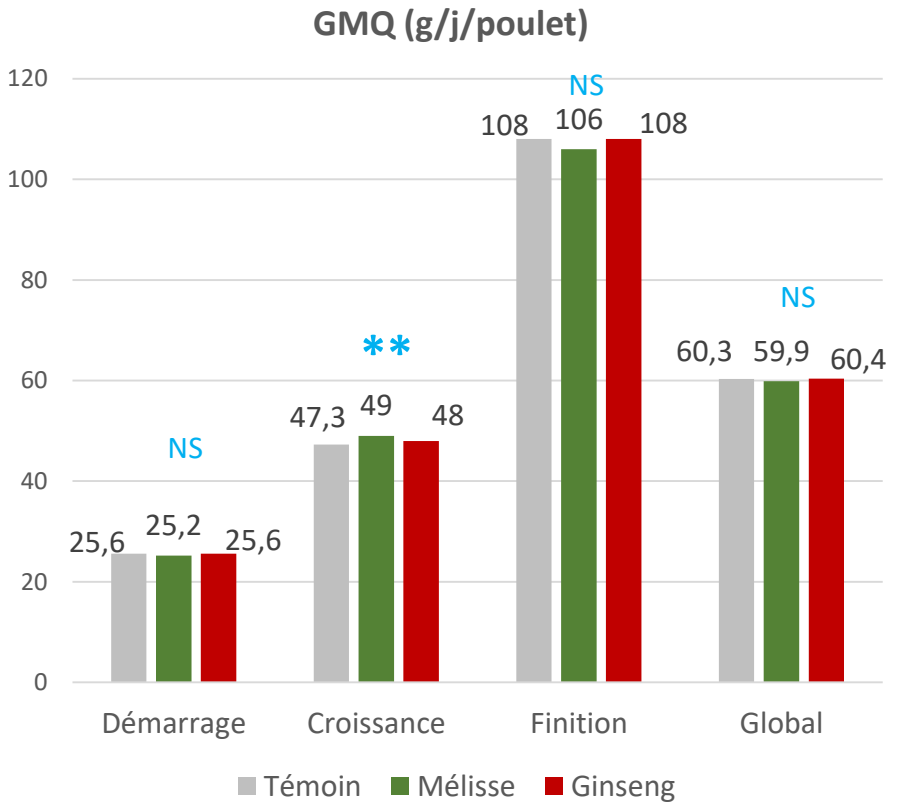
Paramètres de performance technique : élevage





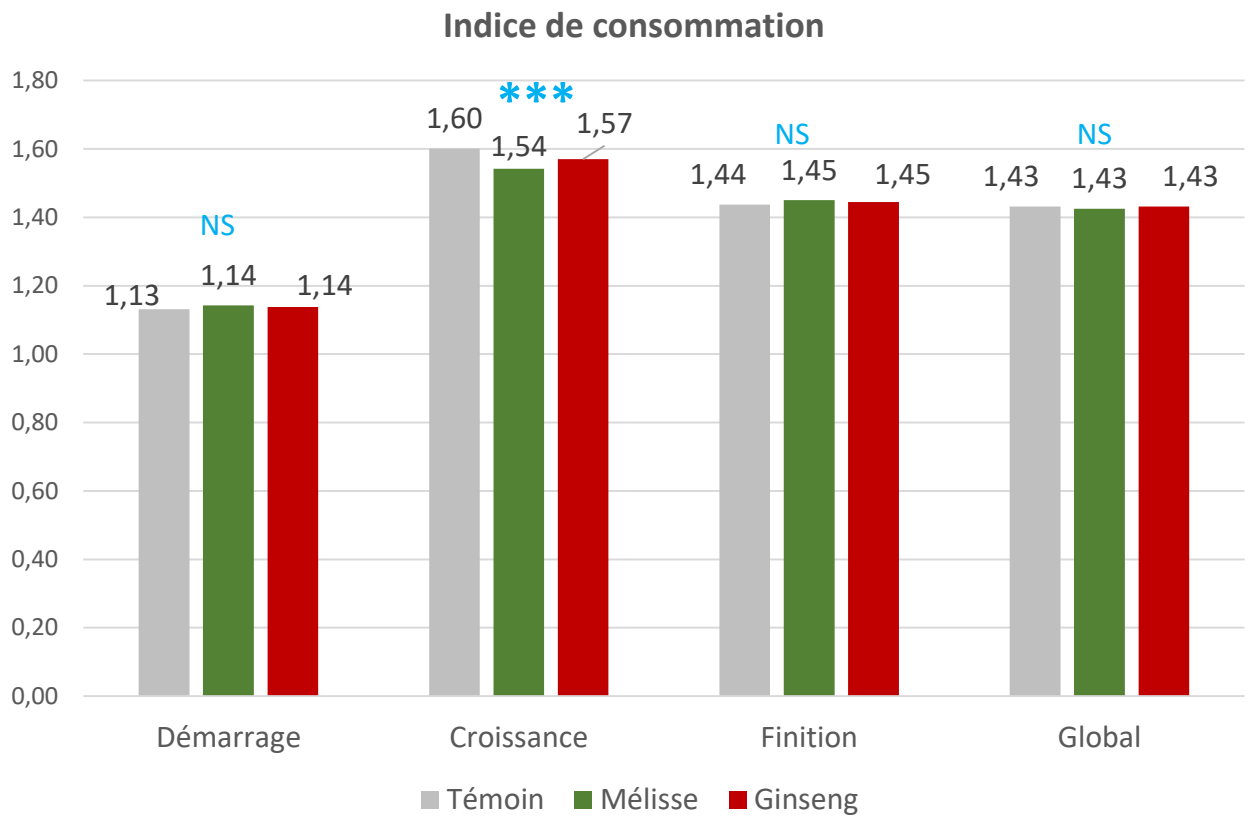
Paramètres de performance technique : élevage



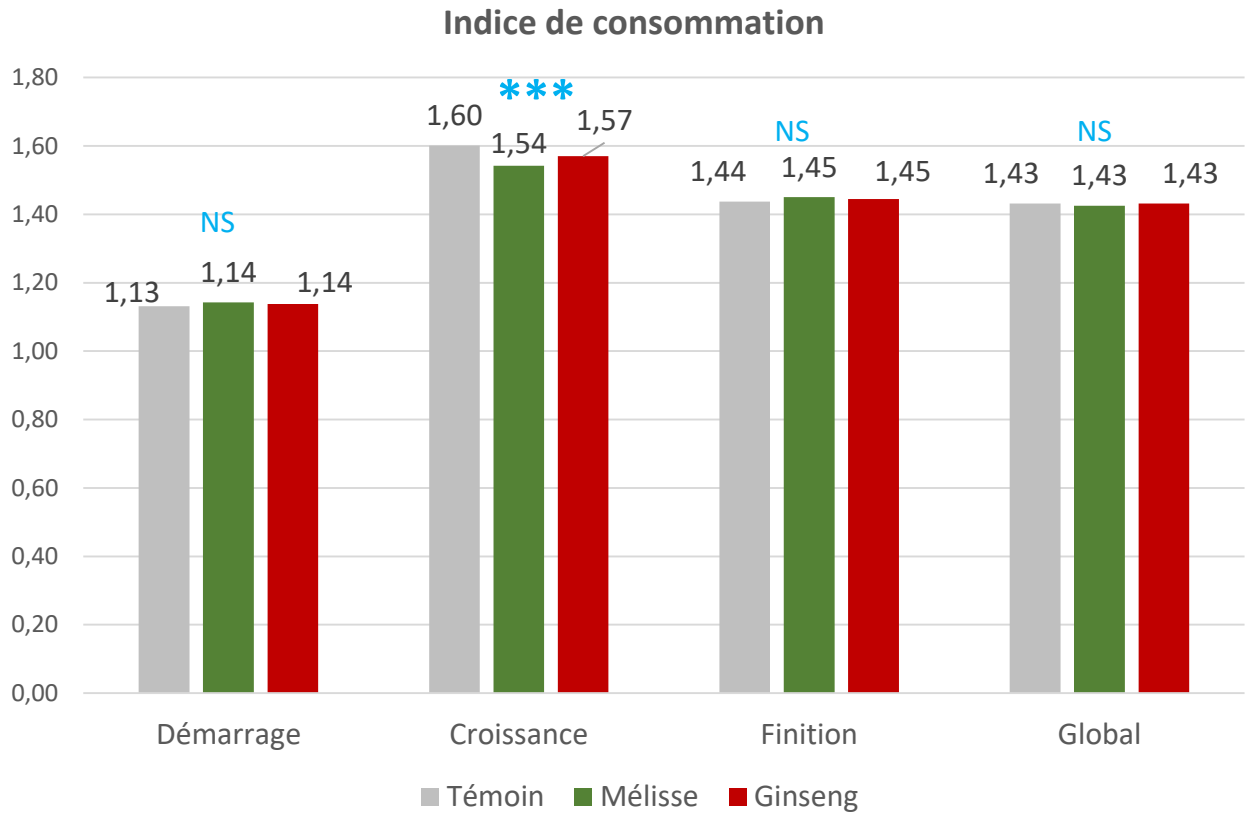


La mélisse améliore poids vif et GMQ en phase croissance

Paramètres de performance technique : élevage



Paramètres de performance technique : élevage



La mélisse améliore la valorisation alimentaire en phase de croissance

Conclusions

Paramètres / Extrait	Physiologiques	Comportement	Sanitaires	Défauts musculaires	Performances techniques
Mélisse	↑ du statut antioxydant	RAS	↑ de la pododermatite	↘ wooden breast	↑ en phase de croissance
Ginseng	↘ de l'inflammation	RAS		RAS	RAS

Conclusions

Paramètres / Extrait	Physiologiques	Comportement	Sanitaires	Défauts musculaires	Performances techniques
Mélisse	↑ du statut antioxydant	RAS	↑ de la pododermatite	↘ wooden breast	↑ en phase de croissance
Ginseng	↘ de l'inflammation	RAS		RAS	RAS

Résultats confortés par la bibliographie

Mélisse :

Activité antioxydante *(Miraj et al., 2017)*

Amélioration des performances en élevage *(Kasapidou et al., 2014 ; Poorghasemi et al., 2017 ; Mohammadi, 2015)*

Ginseng :

Effet anti-inflammatoire *(Lee & Lau, 2011 ; Kim et al, 2017)*

en complément des effets sur l'immunité adaptative *(Abdullahi, et al. 2016 ; Kallon and Abdullahi, 2015 ; Zhai et al., 2011, 2014 ; Li et al., 2012)*

Conclusions et perspectives

Résultats des essais précédents confirmés

Véritable intérêt d'une analyse multi-critères











Conclusions et perspectives

Résultats des essais précédents confirmés

Véritable intérêt d'une analyse multi-critères








Prochaine étape



Obtiendrait-on les mêmes observations en situation réelle d'élevage ?




MERCI DE VOTRE ATTENTION

c.bourrier-clairat@maisadour.com

Colloque mexavi

Organisé avec le soutien financier de :