

ETUDE DE LA BIOEFFICACITE DE L'HYDROXY ANALOGUE LIQUIDE DE LA METHIONINE MHA-FA EN COMPARAISON AVEC LA DL-METHIONINE ET VALIDATION DU MODELE DE TYPE DOSE-REPONSE SIMULTANEE.

Naranjo Victor¹, Lemme Andreas¹, Lepoudere Mathieu²

¹ EVONIK NUTRITION & CARE GmbH, Rodenbacher Chaussee 4, 64357 HANAU

² EVONIK NUTRITION & CARE GmbH, 2 Rue au Duc, 35000 RENNES

mathieu.lepoudere@evonik.com

RÉSUMÉ

Premier acide aminé limitant dans la nutrition des volailles, la méthionine est communément supplémentée sous la forme de DL-méthionine poudre (DLM) ou de MHA-FA, produit analogue liquide. De nombreuses sources scientifiques ont démontré une efficacité biologique relative moyenne, ou bioefficacité, de 65% sur base produit pour le MHA-FA en comparaison avec la DLM (100%). Plus récemment, l'Autorité de Sécurité Alimentaire Européenne (EFSA) a publié un avis scientifique sur le MHA-FA et son sel de calcium, confirmant une bioefficacité d'environ 75% sur base équimolaire, soit 66% sur base produit. L'étude qui suit avait pour objectif de valider les valeurs de bioefficacité ainsi que la pertinence du modèle de type dose-réponse simultanée utilisé pour leur détermination. 1920 poulets mâles Ross 308 ont été répartis en 16 traitements de 6 répétitions chacun. Le lot témoin, traitement 1, a reçu un régime non supplémenté en méthionine et déficient en Met+Cys. Les lots essais ont reçu des doses croissantes de méthionine, de 0.40 à 3g/kg, sous la forme de DLM (traitements 2 à 6), de MHA-FA (traitements 7 à 11) et de DLM diluée à hauteur de 65%, DLM65, (traitements 12 à 16). Au terme de l'essai, les résultats ont montré des efficacités biologiques du MHA-FA et de la DLM65 inférieures à celle de la DLM pure avec des valeurs moyennes respectives de 65 et 61%. Cette étude a permis de confirmer la valeur de bioefficacité moyenne de 65% pour le MHA-FA en comparaison avec la DLM. De plus, le résultat obtenu pour la DLM65 était proche de la valeur attendue et relative à la concentration du produit (61% pour 65%). Ce résultat confirme que le modèle de type dose-réponse simultanée est une approche appropriée pour déterminer les efficacités biologiques des différentes sources de méthionine disponibles sur le marché.

ABSTRACT

Bioavailability study of methionine hydroxy-analogue MHA-FA relative to DL-methionine and validation of the simultaneous dose-response model.

As the first limiting amino acid in broiler nutrition, methionine is usually supplemented whether on a powder form with DL-methionine (DLM) or on a liquid form via the hydroxy-analogue of methionine MHA-FA. Various literature reviews have reported a relative bioefficacy value of about 65% for liquid MHA-FA compared to DLM (100%) on product-to-product basis. More recently, the European Food Safety Authority (EFSA) released a scientific opinion on liquid MHA-FA and its calcium salt, confirming a bioefficacy of 75% on equimolar basis which is equivalent to 66% on a product-to-product basis. The aim of the current study was to provide further evidence of bioefficacy values and to validate the suitability of the simultaneous dose-response model to determine bioefficacy. A total of 1920 broiler male Ross 308 were allocated in 16 treatments of 6 replicates each. Birds from the control treatment were fed with a Met+Cys deficient diet and without any methionine supplementation. Diets used to test the response to the Met sources were supplemented with increasing doses of methionine, from 0.40 to 3g/kg. Sources of methionine were DLM for treatments 2 to 6, MHA-FA for treatments 7 to 11 and diluted DLM with 65% methionine content, DLM65, for treatments 12 to 16. Results showed bioefficacy of MHA-FA and DLM65 lower than pure DLM with mean values of 65 and 61% respectively. This study confirmed a relative bioefficacy mean value of 65% for MHA-FA compared to DLM. Moreover the average bioefficacy of 61% for DLM65 was close to the expected value of 65% and relative to the dilution level. This result confirms that the simultaneous dose-response model is an appropriate approach for determining the biological efficiencies of the different methionine sources available on the market.

INTRODUCTION

La méthionine est un acide- α -aminé soufré essentiel. Premier acide aminé limitant dans la nutrition des volailles, son rôle est primordial dans la synthèse protéique et la croissance musculaire, dans les réactions de méthylation et dans la synthèse de cystéine via la voie métabolique de trans-sulfuration. Différentes sources d'origine synthétique sont disponibles sur le marché, le produit de référence étant la DL-méthionine poudre (DLM), pure à 99% et qui représente environ 2/3 du marché mondial. Le dernier tiers est occupé par l'hydroxy analogue de la méthionine, principalement incorporé sous sa forme liquide, MHA-FA.

S'il est admis que la DLM présente une efficacité nutritionnelle, ou bioefficacité, de 100%, la valeur attribuée au MHA-FA est régulièrement sujette à débat. Une connaissance précise de cette valeur est cependant nécessaire, car elle définit non seulement le taux de supplémentation du produit dans les formules mais également son niveau de prix par rapport aux sources concurrentes. Plusieurs publications ont ainsi démontré une bioefficacité relative moyenne chez le poulet de chair d'environ 65% sur base produit pour le MHA-FA en comparaison avec la DLM (Jansman et al., 2003 ; Sauer et al., 2008). Plus récemment l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, 2018) a publié un avis scientifique sur la bioefficacité du MHA-FA et de son sel de calcium, confirmant une valeur relative moyenne de 75% sur base équimolaire soit 66% sur base produit.

Bien que la valeur de 65% de bioefficacité pour le MHA par rapport à la DLM ait été confirmée dans de nombreux essais (Lemme et al., 2012 ; Sangali et al. 2014), le dispositif expérimental pour sa détermination a fait l'objet de récentes discussions (Vazquez-Anon et al, 2006 ; Agostini et al., 2016).

Afin de fournir des preuves supplémentaires que la méthodologie d'un essai de type dose-réponse simultanée est une approche valide pouvant être considérée comme une méthodologie de référence, une source de méthionine avec une valeur de bioefficacité connue a priori peut être incluse au protocole. Par exemple, une DLM diluée à 65% (65% de DLM et 35% d'amidon) afficherait une bioefficacité proche de 65% en raison de son niveau de dilution. Bien que plusieurs expériences avec cette approche aient déjà été publiées (Lemme et al., 2002 ; Hoehler et al., 2005, Elwert et al., 2008), des données plus récentes et prenant en compte les génétiques modernes sont nécessaires.

L'étude qui suit avait donc pour objectif d'évaluer l'efficacité biologique du MHA-FA en comparaison avec la DLM et de valider dans le même temps la

pertinence du modèle de type dose-réponse simultanée. Cet essai incluait de la DLM diluée à 65% (DLM65) comme standard interne.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et alimentation

L'étude a été réalisée au centre de recherche de Schothorst situé aux Pays-Bas.

1920 poulets mâles Ross 308 d'un poids vif moyen initial de 39g (± 0.23 g) ont été répartis en 16 traitements de 6 répétitions chacun et 20 animaux/répétition. Ces animaux ont reçu un programme alimentaire en 3 phases : démarrage (0-10 jours), croissance (11-28 jours) et finition (29-35 jours). Un aliment témoin pour chaque période, déficient en méthionine+cystine et non supplémenté en méthionine, a été fabriqué pour les 16 traitements (voir Tableau 1).

1.2. Traitements et mesures

Les animaux du traitement 1 ont reçu l'aliment témoin seul. Les aliments des traitements 2 à 6 ont été supplémentés avec 0.04, 0.08, 0.12, 0.21 et 0.30% de DLM (MetAMINO®). Les mêmes niveaux de supplémentation ont été appliqués dans les traitements 7 à 11 et 12 à 16 avec de la méthionine apportée sous la forme MHA-FA, et DLM65, DLM pure diluée à hauteur de 65% avec de l'amidon. La teneur en équivalent méthionine a été recalculée pour chaque traitement (Voir Tableau 2). Les aliments ont été distribués sous la forme miette en démarrage et pellet de 3.0 mm en croissance et finition. Les animaux disposaient d'aliment et d'eau ad libitum.

Les paramètres de croissance, poids vifs (PV), consommations et indices de consommation (IC) ont été calculés pour chaque phase. A 35 jours, 2 animaux par répétition avec un poids vif proche du poids moyen du lot, ont été prélevés et leurs carcasses ont été réfrigérées pendant 4 heures avant découpe. Ces carcasses ont ensuite servi au calcul des rendements de carcasse (RC) exprimés en pourcentage du poids vif et aux rendements de filet, exprimés en pourcentage du poids vif à 35 jours (RF-PV) et en pourcentage du rendement de carcasse (RF-RC). Les indices de performances (EPEF) ont également été calculés à 35 jours pour les trois traitements.

L'ensemble de ces paramètres ont été traités par ANOVA avec un seuil de signification de 0,05. Ces données ont ensuite fait l'objet d'un traitement statistique par régression multi-exponentielle selon la procédure de régression non-linéaire décrite par Littell et al. (1997).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le Tableau 2, indiquent que les animaux ont répondu de manière significative au premier niveau de supplémentation en méthionine par rapport au régime témoin, indépendamment de la source choisie. De plus, les résultats montrent une amélioration des performances de croissance et des rendements de carcasse avec l'augmentation des doses de méthionine. En comparaison avec le régime témoin, la supplémentation en méthionine à la dose maximale de 3g/kg a permis d'améliorer les PV de 70, 67 et 70%, et de réduire les IC de 22, 22 et 23% pour les traitements avec DLM, MHA-FA et DLM65. Les rendements de carcasse et de filet, RC, RF-PV et RF-RC, ont quant à eux augmenté de 13, 11 et 13%, de 62, 60 et 63% et de 43, 43 et 45% par rapport au témoin.

Pour l'ensemble de ces paramètres, les différences observées n'étaient pas significatives entre les traitements. En d'autres termes, toute dose additionnelle de méthionine, quelle que soit son origine, n'avait plus qu'un effet marginal sur la croissance des animaux. Les résultats obtenus lors de cette première approche nous amèneraient donc à conclure que les trois sources de méthionine testées avaient des bioefficacités identiques. L'efficacité biologique de la DLM65 serait ainsi équivalente à celle de sa forme pure (DLM). Pour surmonter cette équivoque et déterminer les bioefficacités respectives de la DLM, du MHA-FA et de la DLM65, nous avons décidé d'utiliser le modèle de type dose-réponse simultanée avec une analyse des données par régression multi-exponentielle. Les courbes de dose-réponse sont

présentées Figure 1. Les résultats indiquent une efficacité biologique du MHA-FA de 58, 66, 62, 63, 73 et 65% en comparaison avec la DLM sur les paramètres PV, IC, EPEF, RC, RF-RC et RF-PV. Toutes les valeurs étaient significativement inférieures à 88% ($P < 0,05$) et donc inférieures à la teneur en substance active du MHA-FA. De plus, les bioefficacités globales moyennes pour le MHA-FA et la DLM65 étaient respectivement de 65 et 61%. Ces résultats sont en cohérence avec les valeurs attendues. La valeur de 61% pour la DLM65 est en effet proche du niveau de dilution du produit (65%). Il en est de même avec la valeur de 65% pour le MHA-FA qui vient confirmer les résultats déjà obtenus dans les études de Lemme et al. (2002), Hoehler et al. (2005) et Elwert et al. (2008).

CONCLUSION

Cette étude a permis de valider la valeur de bioefficacité moyenne de 65% sur base produit pour le MHA-FA, valeur significativement inférieure à la concentration en substance active du produit. Cette valeur est de plus cohérente avec l'avis scientifique de l'EFSA de 2018 qui spécifie une bioefficacité de 75% sur base équimolaire, soit 66 % sur base produit, pour le MHA-FA et son sel de calcium. L'utilisation d'une méthionine poudre diluée DLM65 a permis quant à elle de confirmer l'intérêt et la pertinence du modèle de type dose-réponse simultanée pour déterminer les efficacités biologiques des différentes sources de méthionine proposées sur le marché.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agostini, P. S., P. Dalibard, Y. Mercier, P. Van der Aar, and J. D. Van der Klis, 2016: Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers, *Poultry Science* 95:560-569.
- Elwert, C., Fernandes, E. A. and Lemme, A. 2008. Biological effectiveness of methionine hydroxy-analogue calcium salt in relation to DL-methionine in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21:1506-1515.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2018: Safety and efficacy of hydroxy analogue of methionine and its calcium salt (ADRY+®) for all animal species, *EFSA Journal* 16(3): 5198.
- Hoehler, D., A. Lemme, S.K. Jensen, and S.L. Vieira, 2005b: Relative effectiveness of methionine sources in diets for broiler chickens, *Journal of Applied Poultry Research* 14: 679-693.
- Jansman, A.J.M., C.A. Kan, and J. Wiegenga, 2003: Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and poultry, CVB documentation report nr. 29.
- Lemme, A., D. Hoehler, J.J. Brennan, and P.F. Mannion, 2002: Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens, *Poultry Science* 81: 838-845.
- Littell, R.C., P.R. Henry, A.J. Lewis and C.B. Ammermann, 1997: Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures, *Journal of Animal Science* 75: 2672-2683.
- Sangali, C.P., Giusti Bruno L.D., Vianna Nunes, R., Oliveira Neto, A.R., Pozza, P.C., Oliveira, T.M., Frank, R. and Schone, R.A., 2014. Bioavailability of different methionine sources for growing broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43: 140-145.
- Sauer, N., K. Emrich, H.-P. Piepho, A. Lemme, M.S. Redshaw, and R. Mosenthin, 2008: Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid compared with DL-methionine in broilers using nonlinear mixed models, *Poultry Science* 87: 2023-2031.
- Vazquez-Anon, M., D. Kratzer, R. Gonzalez-Esquerro, I.G. Yi, and C.D. Knight, 2006: A multiple regression model approach to contrast the performance of 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid and DL-methionine supplementation tested in broiler experiments and reported in the literature, *Poultry Science* 85: 693-705.

Tableau 1. Compositions et profils nutritionnels des aliments témoins : Démarrage, Croissance et Finition

Composition	Démarrage (0-10)	Croissance (11-28)	Finition (29-35)
Blé, %	28.61	36.46	36.60
Maïs, %	25.00	20.88	20.00
Tourteaux de soja, %	32.37	25.58	21.86
Pois, %	5.00	10.00	13.94
Gluten de maïs, %	18.20	--	--
Huile de soja, %	1.44	1.13	1.73
Graisse de porc, %	1.94	2.86	3.41
Carbonate de calcium, %	1.45	1.16	0.90
Phosphate monocalcique, %	0.76	0.43	0.13
Sel, %	0.33	0.25	0.26
Bicarbonate de sodium, %	--	0.10	0.10
L-Lysine HCl (78%), %	0.27	0.18	0.14
L-Thréonine (98.5%), %	0.11	0.09	0.07
L-Valine (96.5%), %	0.07	0.05	0.03
Phytase, %	0.33	0.33	0.33
Premix ¹ , %	0.50	0.50	0.50
Profil nutritionnel²			
EMAn, kcal/kg	2900	2975	3075
Protéine brute, %	23.35 (23.73) ³	20.52 (21.07)	19.42 (19.87)
Lys Totale	1.41 (1.46)	1.20 (1.24)	1.12 (1.19)
Lys DIS ⁴ , %	1.27	1.09	1.00
Lysine dig ⁵ , %	1.26	1.07	0.99
Méthionine dig, %	0.30	0.26	0.24
Méthionine+Cystine Totale, %	0.71 (0.72)	0.62 (0.62)	0.58 (0.63)
Méthionine+Cystine dig, %	0.62	0.54	0.51
Thréonine dig, %	0.82	0.70	0.64
Valine dig, %	1.00	0.86	0.79

¹ : vitamines, minéraux, enzyme NSP et coccidiostatique (Salinomycine), ² : valeurs calculées sur la base des recommandations AMINOChick[®] d'Evonik de 2012, ³ : valeurs analysées, ⁴ : digestibilité iléale standardisée, ⁵ : formulation en digestibilité fécale apparente selon le centre de recherche de Schothorst

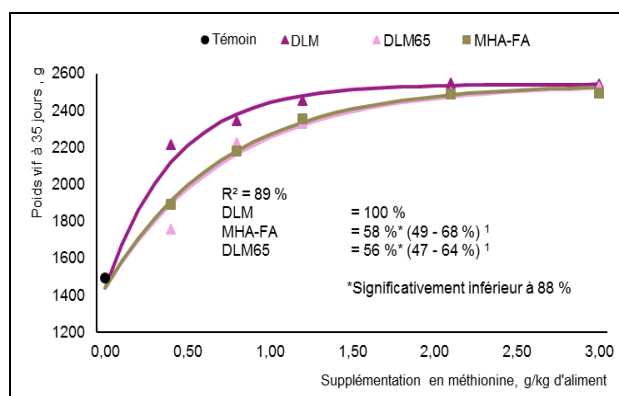
Tableau 2. Paramètres zootechniques à 35 jours d'âge pour les différents traitements – ANOVA (p< 0.05)

Traitements		Méthionine Supplémentée (g/kg)	Equivalent méthionine (g/kg)	PV (g)	IC (g/g)	RC (% PV)	RF-PV (%)	RF-RC (%)
1	Témoin	0	0	1492 ^a	1.885 ^h	58.1 ^a	12.3 ^a	21.2 ^a
2	DLM	0.40	0.40	2212 ^d	1.605 ^e	62.1 ^c	15.4 ^{cd}	24.9 ^{cd}
3	DLM	0.80	0.80	2347 ^e	1.555 ^{cd}	63.8 ^{def}	17.4 ^{efg}	27.1 ^{ef}
4	DLM	1.20	1.20	2455 ^f	1.528 ^{bc}	66.1 ⁱ	18.5 ^{hi}	27.9 ^{fg}
5	DLM	2.10	2.10	2551 ^f	1.457 ^a	65.4 ^{ghi}	20.4 ^k	30.5 ⁱ
6	DLM	3.00	3.00	2542 ^f	1.467 ^a	65.8 ^{hi}	20.0 ^k	30.4 ⁱ
7	MHA-FA	0.40	0.35 [*]	1896 ^c	1.750 ^f	61.6 ^c	14.7 ^{bc}	23.8 ^{bc}
8	MHA-FA	0.80	0.70 [*]	2179 ^d	1.578 ^{de}	62.9 ^{cde}	16.4 ^{de}	26.0 ^{de}
9	MHA-FA	1.20	1.06 [*]	2354 ^c	1.554 ^{cd}	64.2 ^{efgh}	17.3 ^{ef}	26.9 ^{ef}
10	MHA-FA	2.10	1.85 [*]	2489 ^f	1.490 ^{ab}	64.1 ^{efg}	18.4 ^{ghi}	28.7 ^g
11	MHA-FA	3.00	2.64 [*]	2496 ^f	1.472 ^a	65.0 ^{fghi}	19.7 ^{jk}	30.2 ^{hi}
12	DLM65	0.40	0.26	1756 ^b	1.813 ^g	60.0 ^b	14.0 ^b	23.4 ^b
13	DLM65	0.80	0.52	2226 ^d	1.614 ^e	62.4 ^{cd}	15.7 ^{cd}	24.9 ^{cd}
14	DLM65	1.20	0.78	2328 ^e	1.593 ^{de}	64.7 ^{fghi}	17.6 ^{fgh}	27.1 ^{ef}
15	DLM65	2.10	1.37	2501 ^f	1.491 ^{ab}	65.4 ^{fghi}	18.9 ^{ij}	28.9 ^{gh}
16	DLM65	3.00	1.95	2529 ^f	1.459 ^a	65.5 ^{fghi}	20.0 ^k	30.6 ⁱ
LSD				100.4	0.042	1.65	1.04	1.39
P-value				<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

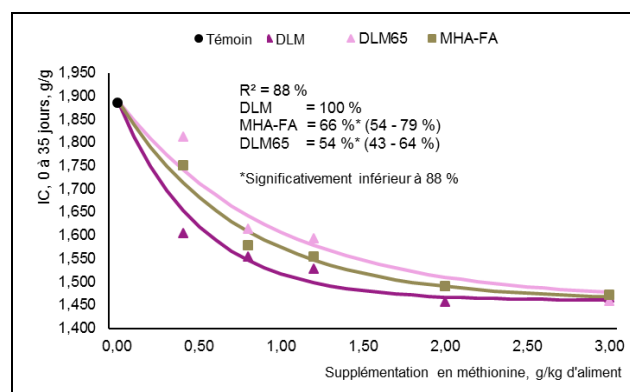
^{*} : valeur calculée sur la base de la composition du produit MHA-FA, soit 88% de substance active et 12% d'eau.

Figure 1. Valeurs nutritionnelles relatives moyennes, ou bioefficacités, calculées à 35 jours d'âge

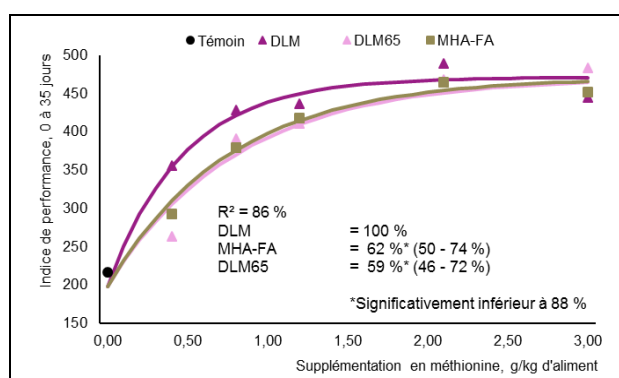
- a) Régression exponentielle pour le poids vif - PV :
 $y = 1440 + 1103 * (1 - e^{-(2.41*DLM + 1.40*MHA-FA + 1.34*DLM65)})$



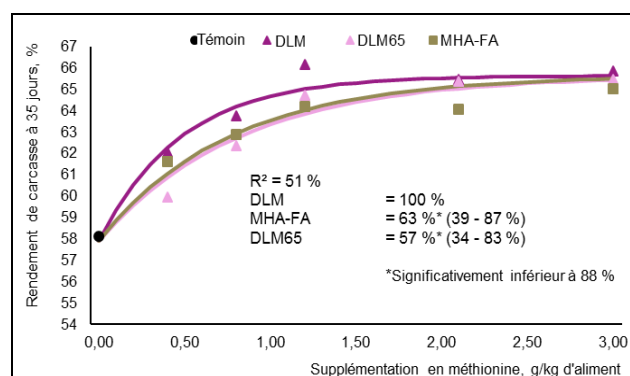
- b) Régression exponentielle pour l'indice de consommation - IC :
 $y = 1.892 - 0.432 * (1 - e^{-(2.00*DLM + 1.33*MHA-FA + 1.07*DLM65)})$



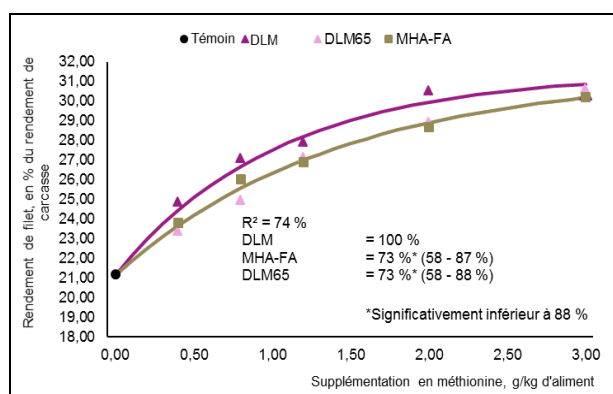
- c) Régression exponentielle pour l'indice de performance - EPEF² :
 $y = 198 + 273 * (1 - e^{-(2.12*DLM + 1.32*MHA-FA + 1.25*DLM65)})$



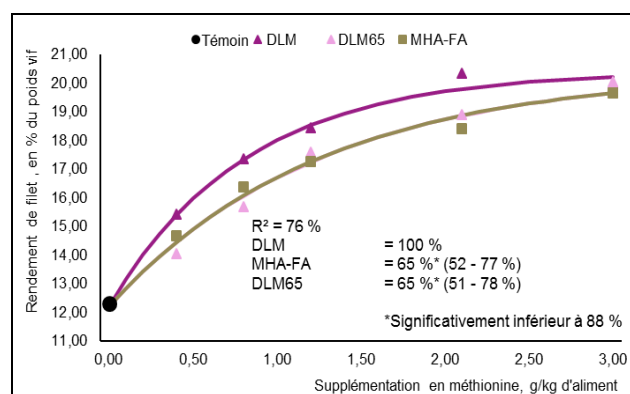
- d) Régression exponentielle pour le rendement de carcasse - RC :
 $y = 57.9 + 7.7 * (1 - e^{-(2.09*DLM + 1.31*MHA-FA + 1.22*DLM65)})$



- e) Régression exponentielle pour le rendement de filet en pourcentage du rendement de carcasse - RF-RC :
 $y = 21.2 + 10.3 * (1 - e^{-(0.96*DLM + 0.70*MHA-FA + 0.70*DLM65)})$



- f) Régression exponentielle pour le rendement de filet en pourcentage du poids vif - RF-PV :
 $y = 12.23 + 8.2 * (1 - e^{-(1.22*DLM + 0.79*MHA-FA + 0.79*DLM65)})$



* : significativement différent de 88% à P<0.05

¹ : 95% d'intervalle de confiance

² : Indice Européen de Performances ou EPEF « European Production Efficiency Factor »

= (Gain de poids moyen (g/j) x Nombre d'animaux vivants (%)) / Indice de consommation (g/g) x 10