

EFFICACITÉS COMPARÉES DE LA L-MÉTHIONINE, DE LA DL-MÉTHIONINE ET DU SEL DE CALCIUM DE L'ACIDE HYDROXY-MÉTHYLTHIOBUTYRIQUE POUR LE POUSSIN

A. BRETTE et D. PIAT

Service zootechnique de l'A.F.C.

Société de Chimie Organique et Biologique, Commentry (Allier)

SOMMAIRE

Les efficacités de la L-méthionine, de la DL-méthionine et du sel de calcium de l'acide hydroxyméthylthiobutyrique pour la croissance et la consommation d'aliment du poussin ont été étudiées.

On a utilisé pour cela un régime de base semi-purifié, fortement carencé en amino-acides soufrés et bien pourvu en tous les autres amino-acides.

Les trois produits ont été comparés ;

— d'une part, à des doses qui ne couvraient pas les besoins en acides aminés du poussin (0,1 p. 100 de méthionine ou 0,125 p. 100 de M.H.A.) ;

— d'autre part, à des doses excessives (0,4 p. 100 et 0,5 p. 100 de méthionine ou 0,5 p. 100 de M.H.A.),

A chacun des niveaux de supplémentation, la L-méthionine, la DL-méthionine et l'acide hydroxyméthylthiobutyrique se sont montrés équivalents quand ils étaient comparés sur la base équimoléculaire.

Il n'y a pas de règle générale concernant l'utilisation des formes D et L des amino-acides. Certains auteurs, se fondant sur cette particularité, ont pu classer les amino-acides en deux et quelquefois trois groupes, suivant que leur forme D était plus ou moins facilement transformable en forme L. FELL et *al.* (1959), LÉVEILLÉ et *al.* (1960), WACHTER et BERG (1960) et tout dernièrement KAMATH et BERG (1964) ont réalisé des travaux très importants dans ce domaine. Si pour des acides aminés tels que le tryptophane et la thréonine, il apparaît quelques divergences suivant les auteurs, il en est d'autres pour lesquels tous semblent d'accord. Ainsi, la D-lysine ne serait pas transformable comme a pu le vérifier CALET (1960) dans une étude réalisée sur poussins. Inversement, tous ces chercheurs s'accordent pour classer la D-méthionine dans les amino-acides facilement convertibles.

A l'opposé de cette dernière thèse, on trouve un travail de GORDON et SIZER (1955) dont on ne connaît qu'un résumé, et qui met en doute l'équivalence des formes D et L, de la méthionine. Pour ces auteurs, la D-méthionine subit une certaine perte, non évaluée, au cours de la désamination oxydative qui a lieu principalement dans

le rein. Ce processus n'existerait pas pour son hydroxy-analogue (acide hydroxy-méthylthiobutyrique) qui est transaminé sans désamination préalable. Pour ces chercheurs, la D-méthionine est inférieure à la L-méthionine. Ils poursuivent leur raisonnement et concluent que le DL-hydroxy-analogue est équivalent à la L-méthionine, tandis que la DL-méthionine présente une activité inférieure.

D'autres auteurs ont orienté leurs recherches sur l'absorption intestinale. La vitesse de passage de la D-méthionine à travers la paroi intestinale, est légèrement plus faible que celle de la L-méthionine ; cela a été démontré par GIBSON et WISEMAN (1951). Mais celle de l'hydroxy-analogue est encore beaucoup plus lente ; elle serait environ quatre à cinq fois plus faible que celle de la L-méthionine et trois à quatre fois plus faible que celle de la D-méthionine (STOUDT-ÉBERT, 1961).

Il ne faut pas oublier cependant, que dans les régimes naturels et même semi-purifiés, l'essentiel des amino-acides est fourni par des protéines complexes qui doivent subir une hydrolyse enzymatique. Leur vitesse de libération et par suite de passage à travers la paroi intestinale, est probablement plus lente encore que celle de la D-méthionine et a fortiori celle de l'hydroxy-analogue. On peut penser que cette différence de vitesse d'absorption intestinale n'influence pas leur utilisation par l'animal.

Confirmant cette hypothèse, CALET et MELOT-FENDRY (1961) ont montré, dans une étude portant sur la croissance du poussin, que la DL-méthionine et son DL-hydroxy-analogue étaient également bien utilisés. Ils ont vérifié en outre que la D-méthionine, la L-méthionine et la DL-méthionine avaient une activité comparable (CALET et FENDRY 1965).

Leurs travaux devraient mettre un terme à la controverse, d'autant plus qu'ils ont utilisé dans leurs essais la méthode de l'alimentation séparée, qui est beaucoup plus riche d'enseignements que celle du régime mixte.

Certains se sont cependant demandés si leurs conclusions pouvaient être étendues aux cas de régimes mixtes. C'est très probable mais, pour en apporter la preuve, deux séries d'expériences ont été entreprises.

On est parti de l'hypothèse déjà démontrée par CALET, que la DL-méthionine et son hydroxy-analogue étaient équivalents sur la base équimoléculaire. La L-méthionine a été prise comme élément de référence.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Trois cent quatre-vingt-quatre coquelets âgés de 14 jours et choisis dans une population de 900 sujets *Nichols J 6*, sont répartis en 12 lots homogènes ; chaque lot comporte 4 répétitions de 8 animaux chacune. 7 lots sont destinés à l'expérience 1. Les 5 autres lots servent à l'expérience 2. Les animaux sont élevés dans 2 batteries à chauffage électrique (une par expérience). L'eau de boisson et la nourriture sont distribuées à volonté. La température dans les cages est contrôlée par thermostat. La durée de l'éclairage est de 14 heures par jour.

Régime de base

Le régime de base est un aliment semi-purifié (tabl. 1). La source azotée choisie est l'« ADM Assay-Protein Cr » (1). C'est une protéine qui a l'avantage d'être bien équilibrée en tous les amino-acides, sauf en amino-acides soufrés.

TABLEAU I

Composition du régime de base

Protéine de soya purifiée ⁽¹⁾	22
Cérélose	68,3
Huile de maïs	1,6
Cellulose	2
Complément vitaminique	0,5
Complément minéral	5
Amino-acides libres	0,6
Total	100,0

⁽¹⁾ *A. D. M. assay protein C₁* (protéine de soya purifiée) *Archer Daniels Midland Company — Minnesota* (tabl. 2).

TABLEAU 2

Composition de la protéine de soya purifiée
(g d'amino-acides par 16 g. d'azote) ⁽¹⁾

	%
Acide aspartique	11,8
Thréonine	3,75
Sérine	5
Acide glutamique	18,9
Proline	5,2
Glycocolle	4,2
Alanine	4,3
Valine	5,6
Méthionine	1,4
Isoleucine	5,4
Leucine	8,4
Tyrosine	3,9
Phénylalanine	5,5
Lysine	6,3
Histidine	2,5
Arginine	7,3
Ammoniac	1,9
Cystine	1,32
Matières azotées: N × 6,25	83,15

⁽¹⁾ Déterminations effectuées par chromatographie sur colonne par la méthode de MOORE, SPACKMAN et STEIN (1954) et de BELSUNCE et PION (1963).

Le taux d'incorporation choisi, 22 p. 100, apporte 0,5 p. 100 d'acides-amino soufrés totaux dans le régime, ce qui représente un déficit important par rapport aux besoins du poussin en croissance qui sont voisins de 0,8 p. 100.

Pour être sûr que la réponse à l'addition de méthionine ne sera freinée par aucun autre facteur limitant, on a supplémenté le régime de base à l'aide des acides-amino dont le niveau pouvait paraître insuffisant (tabl. 3).

Le régime de base est par ailleurs correctement pourvu en minéraux, oligo-éléments et vitamines (tabl. 4 et 5).

TABLEAU 3

Amino-acides libres ajoutés

	Pour 100 kg de régime (g)
DL-valine	100
DL-thréonine	100
DL-leucine	100
Glycocolle	240
DL-tryptophane	60

TABLEAU 4

Composition du complément vitaminique

	pour 100 kg de régime (g)
Vitamine A.	1 600 000 UI
Vitamine D ₃	200 000 UI
Acétate d' α -tocophérol	10
Vitamine K ₃	1
Thiamine	2
Riboflavine	3
Pyridoxine	3
Pantothénate de calcium	10
Acide nicotinique	29
Acide folique	0,6
Biotine	0,1
Acide para-amino-benzoïque	43
Inositol	50
Vitamine B ₁₂ au 1/10 000	120
Vitamine C	50
Choline à 25 %	100
B.H.T.	14,3
Avoine broyée q.s.p.	500

Expérience n° 1

Les doses ajoutées de méthionine ou d'hydroxy-analogue ont été calculées de telle sorte qu'après supplémentation, la teneur totale en acides-amino soufrés du régime, reste inférieure aux besoins de l'animal.

Les acides-amino étudiés ont été ajoutés aux dépens du cérélose.

TABLEAU 5
Composition du complément minéral

	Pour 100 kg de régime (g)
CO ₃ Ca	1 480
K ₂ HPO ₄	730
NaCl.....	500
Mg SO ₄ , 7H ₂ O.....	500
CaHPO ₄	1 700
SO ₄ Mn, HO ₂	33
Citrate ferrique	33
Alun de K	1
Sélénite de Na	0,055
Bromure de Na	2,4
ZnCl ₂	8
Silicate de Na	5,5
Sulfate de Co, 7HO ₂	0,2
NaMo O ₄	0,9
SO ₄ Cu, 5HO ₂	2
Acide borique.....	0,9
Iodure de K.....	4
Total	5 000

TABLEAU 6
Expérience n° 1
Protocole expérimental

Lots	Régime
A	Régime de base (R. B.)
B	R.B. + 0,1 % L-méthionine
C	R.B. + 0,1 % DL-méthionine
D	R.B. + 0,125 % « M.H.A. »
E	R.B. + 0,2 % L-méthionine
F	R.B. + 0,2 % DL-méthionine
G	R.B. + 0,25 % « M.H.A. »

TABLEAU 7
Expérience n° 2
Protocole expérimental

Lots	Régime
A'	Régime de base (R.B.)
H	R.B. + 0,4 % L-méthionine
I	R.B. + 0,4 % DL-méthionine
J	R.B. + 0,5 % « M.H.A. »
K	R.B. + 0,5 % DL-méthionine

L'acide hydroxyméthylthiobutyrique a été apporté sous forme d'un sel de calcium à 90 p. 100 de pureté : le « M. H. A. »*, qui contient 80 p. 100 d'hydroxy-analogue de la méthionine. Cent vingt-cinq grammes de M. H. A. contiennent donc 100 grammes de DL-hydroxy-analogue de la méthionine.

Expérience n° 2

Les doses de méthionine ou d'hydroxy-analogue ajoutées sont telles que le total des acides soufrés contenus dans l'aliment est supérieur aux besoins de l'animal. Ces quantités sont, par ailleurs, quatre à cinq fois supérieures aux supplémentations pratiques.

RÉSULTATS

On a mesuré dans les deux expériences, le gain de poids et la consommation d'aliment entre 14 et 32 jours.

Les résultats de l'expérience n° 1 sont indiqués dans le tableau 8 ; ceux de l'expérience n° 2, dans le tableau 9.

TABLEAU 8

Expérience n° 1

Croissance et consommation d'aliment

Lots	Régime	Gain de poids (g) du 14 ^e au 32 ^e jour	Consommation d'aliment (g)	Indice de consommation
A	Régime de base (R. B.)	357	857	2,40
B	R. B. + 0,1 % L-méthionine	467	948	2,03
C	R. B. + 0,1 % DL-méthionine	460	925	2,01
D	R. B. + 0,125 % « M. H. A. »	448	923	2,06
E	R. B. + 0,2 % L-méthionine	499	913	1,83
F	R. B. + 0,2 % DL-méthionine	498	916	1,84
G	R. B. + 0,25 % « M. H. A. »	489	910	1,86

TABLEAU 9

Expérience n° 2

Croissance et consommation d'aliment

Lots	Régime	Gain de poids (g) du 14 ^e au 32 ^e jour	Consommation d'aliment (g)	Indice de consommation
A'	Régime de base (R. B.)	373	968	2,33
H	R. B. + 0,4 % L-méthionine	513	918	1,79
I	R. B. + 0,4 % DL-méthionine	514	910	1,77
J	R. B. + 0,5 % « M. H. A. »	517	936	1,81
K	R. B. + 0,5 % DL-méthionine	527	922	1,75

* marque déposée par *Monsanto Chemical Company*

Expérience n° 1

L'analyse de la variance et l'étude des différences entre moyennes des traitements par le test de Duncan, montrent que le régime de base diffère de façon hautement significative des régimes supplémentés.

L'analyse factorielle des résultats des régimes supplémentés montre que :

- Il n'y a pas d'interaction entre les doses et les produits.
- L'effet de la dose double est supérieur à celui de la dose simple ($P < 1$ p. 100).
- Les effets des trois produits ne sont pas significativement différents aux deux niveaux considérés.

Toutes les supplémentations ayant été effectuées dans la zone de réponse de l'animal à l'addition d'amino-acides soufrés, on peut en déduire qu'aux doses étudiées, la L-méthionine, la DL-méthionine et l'hydroxy-analogue sont équivalents sur la base équimoléculaire.

Expérience n° 2

On pouvait se demander si l'addition de fortes doses de DL-méthionine n'aurait pas un effet plus défavorable sur le gain de poids et sur la consommation d'aliment que les mêmes doses de L-méthionine ou d'hydroxy-analogue. On vérifie qu'à la dose de 0,4 p. 100 les résultats sont absolument équivalents.

On constate même qu'une supplémentation en DL-méthionine de 0,5 p. 100 qui, à elle seule, représente déjà plus de la moitié des besoins du poussin en amino-acides soufrés, n'a pas d'effet dépressif.

DISCUSSION

Y avait-il dans les deux essais, assez de radicaux NH_2 libres dans le régime de base, pour que l'hydroxy-analogue puisse être entièrement transformé en méthionine?

L'attention des chercheurs a été attirée sur ce point par les travaux de SULLIVAN et BIRD (1957) mais le régime de base qu'ils ont employé, avait une teneur très faible en protéines brutes : 12 p. 100. En outre, le glyco-colle qui a été ajouté au régime utilisé dans nos essais, pouvait très facilement servir de source de radicaux NH_2 .

Cette étude en régime mixte confirme donc les résultats de CALET et MELOT (1961) établis en alimentation séparée, ainsi que ceux de BRUGGEMANN *et al.* (1962) qui ont travaillé en régime semi-purifié, comme dans les expériences ci-dessus. On peut dire que la DL-méthionine et son hydroxy-analogue sont bien équivalents sur le plan équimoléculaire.

Il y a une contradiction entre cette constatation et les affirmations de GORDON et SIZER (1955) basées sur des études réalisées sur homogénats de rein. L'explication nous semble être la suivante :

La quantité de D-méthionine qui peut être désaminée et oxydée puis transformée en L-méthionine, dépend de la quantité de D-amino-acide-oxydase présente dans l'organe où s'effectue la désamination oxydative.

L'animal peut disposer de suffisamment de D-amino-acide-oxydase pour trans-

former une quantité moyenne de D-méthionine, arrivant par la voie digestive normale, mais pas assez pour convertir une forte dose de D-méthionine ajoutée expérimentalement à des homogénats de rein. C'est pourquoi il serait intéressant de connaître les quantités de D-méthionine que peut transformer un animal, sans qu'il y ait de pertes.

BAURIEDEL (1963) a essayé de répondre à cette question ; il a administré à des poulets, des doses relativement élevées de D-méthionine ou de L-méthionine (0,2 p. 100 du régime).

Il a mesuré la vitesse de croissance des animaux, puis les sujets ont été sacrifiés. L'activité en D-amino-acide-oxydase de leur foie et de leurs reins a été évaluée. Il y avait dans tous les cas suffisamment de D-amino-acide-oxydase pour transformer au moins un taux de D-méthionine égal à 0,2 p. 100 du régime. Cette quantité correspondait à 0,4 p. 100 de DL-méthionine, soit plus de quatre fois les suppléments couramment utilisés.

Plus récemment, MARRETT *et al.* (1964) ont nourri des poussins avec un régime purifié carencé en amino-acides soufrés et contenant soit un mélange de DL-amino-acides, soit des amino-acides sous forme L. Ils ont montré que l'aptitude du poussin à transformer la D-méthionine en L-méthionine dépendait de la teneur du régime en D-amino-acides. Quand dans leurs essais, le régime de base carencé en amino-acides soufrés ne contenait que des amino-acides sous forme L et que l'on ajoutait de la D ou de la L-méthionine, les deux formes étaient également bien utilisées. Précisons que dans ces expériences, les suppléments en méthionine variaient de 0,3 à 0,8 p. 100 du régime ; or, avec 0,8 p. 100 de méthionine les besoins en amino-acides soufrés du poussin sont pratiquement couverts.

Reçu pour publication en septembre 1965

REMERCIEMENTS

La détermination de la composition en amino-acides de la protéine de soya purifiée a été effectuée par R. PION, Laboratoire des Métabolismes, C.N.R.Z. Jouy-en-Josas.

SUMMARY

COMPARATIVE EFFICIENCIES OF D-METHIONINE, DL-METHIONINE AND THE CALCIUM SALT OF HYDROXYMETHYLTHIOBUTYRIC ACID FOR CHICKENS

GORDON and SIZER (1955), have raised doubt as to whether D- and L-methionine are of equal value. According to those authors the transformation of D-methionine to L-methionine would be accompanied by some loss which they did not evaluate. In contrast, the transformation of the hydroxy analogue (MHA) to L-methionine would be complete, so that DL-hydroxymethylthiobutyric acid would be equivalent to L-methionine while DL-methionine would be of less value. BAURIEDEL (1963) showed that the chicken produced enough D-amino acid oxidases to transform without loss amounts of D-methionine equivalent to supplements considerably in excess of the amounts given in practice, and BRUGGEMANN *et al.* (1962) and CALET and MELOT (1961) gave the same value to L-methionine, DL-methionine and hydroxymethylthiobutyric acid.

Trials were done to verify this last hypothesis and to compare the three compounds in a wide

range of supplementation. For the trials a basal semi-purified diet greatly deficient in sulphur amino acids and well supplied with all other amino acids was used.

The three compounds were compared :

— in amounts which did not cover the amino acid requirements of the chicken (0.1 p. 100 methionine or 0.125 p. 100 MHA) ;

— or in excessive amounts (0.4 and 0.5 p. 100 methionine or 0.5 p. 100 MHA).

With each amount of supplement L-methionine, DL-methionine and hydroxymethylthiobutyric acid were shown to be of equal value when compared on an equimolecular basis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAURIEDEL W. R., 1963. The effect of feeding D-methionine on the D-amino-acid oxidase activity of chick tissues. *Poult. Sci.*, **42**, 214-217.
- BELSUNCE C. de, PION R., 1963. Dosage de la cystine dans les aliments. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **3**, 191-199.
- BRUGGEMANN J., DREPPER K., ZUCKER H., 1962. Quantitative Bestimmung der Verwertung von D-L-DL-methionin und Ca-DL-2-hydroxy-4-methylthiobutyrat durch das Hühnerküken. *Naturwissenschaften*, **49**, 334.
- CALET C., 1960. Comparaison de l'efficacité pour la croissance du poussin des formes L et DL de la lysine. *Cahier n° 4, A. E. C.*, 245-254.
- CALET C., MELOT-FENDRY M., 1961. Efficacité comparée pour la croissance du poussin de la méthionine et du sel de calcium de l'acide hydroxyméthylthiobutyrique (M. H. A.). *Ann. Zootech.*, **10**, 205-213.
- CALET C., MELOT-FENDRY M., 1965. Comparaison de l'efficacité des énantiomorphes de la méthionine chez le poussin. *Ann. Zootech.* à compléter
- FELL R. V., WILKINSON W. S., WATTS A. B., 1959. The utilization by the chick of D and L-amino-acids in liquid and dry diets. *Poult. Sci.*, **33**, 1203-1204.
- GIBSON Q. H., WISEMAN G., 1951. Selective absorption of stereo-isomers of amino-acids from loops of the small intestine of the rat. *Biochem. J.*, **48**, 426-429.
- GORDON R. S., SIZER L. W., 1955. The biological equivalence of methionine hydroxy analogue. *Poult. Sci.*, **34**, 1198.
- KAMATH S. H., BERG C. P., 1964. Antagonism of poorly invertible D-amino-acids toward growth promotion by readily invertible D-amino-acids. *J. Nutr.*, **82**, 237-242.
- LÉVEILLÉ G. A., FISHER H., 1960. Amino-acid requirement for maintenance in the adult rooster. III—The requirements for leucine, isoleucine, valine and threonine, with reference also to the utilization of the D-isomers of valine, threonine and isoleucine. *J. Nutr.*, **70**, 135-140.
- MARRETT L., BIRD H. R., SUNDE M. L., 1954. The effects of different isomers of methionine on growth of chicks fed amino-acid diets. *Poult. Sci.*, **43**, 1113-1118.
- MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN W. H., 1958. Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins compounds. *J. Biol. Chem.*, **30**, 1185-1190.
- SULLIVAN T. W., BIRD H. R., 1957. Effect of quantity and source of dietary nitrogen on the utilization of the hydroxy analogues of methionine and glycine by chicks. *J. Nutr.*, **62**, 143-150.
- STOUDT-EBERT P., 1961. *Intestinal absorption of methionine and methionine analogues by the chicken* Thesis Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. pp. 94.
- WACHTER J. P., BERG C. P., 1960. Growth promotion by invertible D-amino-acids in diets containing extraneous (poorly invertible) D-amino-acids. *J. Nutr.*, **70**, 31-35.