

**L'HYDROXY-ANALOGUE LIQUIDE DE LA METHIONINE :  
BIEN PLUS QU'UN ACIDE AMINE !**

**Mercier Yves, Geraert Pierre-André**

*ADISSEO France S.A.S., Rue Marcel Lingot, 03600 Commentry*

**RÉSUMÉ**

L'objectif du travail proposé est de comparer les effets antibactériens de l'hydroxy-analogue liquide de la méthionine (HMTBA) par rapport à différents acides organiques couramment utilisés en alimentation animale. L'étude réalisée *in vitro* dans le système APES sur flore iléale de poulet de chairs âgés de 35 jours a permis de mettre en évidence les activités relatives des différents produits testés. Les résultats obtenus montrent des effets antibactériens significatifs de l'HMTBA et des acides Formique, Fumarique et Butyrique sur la flore iléale. Il apparaît également que la substitution de la moitié des différents acides organiques par la même quantité d'HMTBA permet un effet antibactérien équivalent à celui de l'acide seul. La comparaison des différents paramètres d'activité de la flore iléale semble également indiquer des modes de fonctionnement différent et complémentaires entre HMTBA et les acides organiques testés. Ainsi, au vu des différents mécanismes mis en jeu dans l'effet antibactérien des acides organiques il est raisonnable de penser que la multiplication des sources d'acidifiants dans l'aliment constitue une solution à l'élargissement du spectre antibactérien permettant un meilleur contrôle de la flore. Enfin, d'un point de vue pratique cette étude fait ressortir la possibilité de substituer une partie des acides organiques usuels dans les aliments volaille par l'utilisation du HMTBA comme source de méthionine.

**ABSTRACT**

The objective of this work is to compare the antibacterial effect of methionine Hydroxy analogue (HMTBA) and current feed organic acids. The *in vitro* study done with the "APES" apparatus on 35 day old broilers ileal microflora, allows determining the relative activities of the different products tested. The results obtained on the total microflora demonstrate a significant ( $p < 0,05$ ) antibacterial effect of HMTBA, Formic acid, Fumaric acid and Butyric acid on ileal flora compared to control. It also appears possible to replace half of the organic acid by HMTBA while maintaining the antimicrobial potential. Moreover, the results obtained on the observed parameters seem to indicate different and complementary action modes of HMTBA and the tested organic acids. Considering the multiple parameters involved in the antibacterial mechanisms of organic acids, enlarging the sources of acidifiers in poultry diet appears as the best alternative to broaden the antibacterial spectrum activity and thus to allow a better gut microflora control. Finally, this study highlights the practical benefits of using hydroxy-analogue of methionine as the methionine source in feeds to save dietary organic acid supply.

## INTRODUCTION

L'interdiction d'utiliser les antibiotiques comme facteur de croissance (AFC) en alimentation animale en Europe a entraînée l'apparition de nombreuses alternatives nutritionnelles pour tenter de réguler la microflore chez les animaux d'élevage. Parmi les diverses solutions proposées l'utilisation d'acides organiques comme éléments de régulation de la flore endogène des monogastriques apparaît certainement comme la solution la plus répandue. Les mécanismes et sites d'actions des acides organiques en font certainement une des solutions actuelles les plus performantes tant d'un point de vue économique que du point de vue des résultats obtenus.

Par ailleurs, la méthionine qui représente le premier acide aminé limitant chez la volaille est systématiquement ajoutée sous forme synthétique dans les formules pour assurer un apport optimal. L'originalité de cet acide aminé est qu'il est disponible sur le marché sous une forme d'hydroxy-acide : le HMTBA (Acide 2-Hydroxy-4-Methyl-Thio-Butanoïque). Cette molécule qui représente une source de méthionine à part entière, offre également l'avantage sous sa forme native de présenter les caractéristiques chimiques d'un acide organique.

Ainsi, le présent article propose de comparer les effets antibactériens de l'hydroxy-analogue liquide de la méthionine à celui d'acides organiques usuels sur la flore totale du poulet de chair.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Prélèvement des contenus digestifs

50 poulets de chair de lignée Ross PM3 sont élevés sur une période de 0-35 jours sur un régime standard maïs-soja complétement en méthionine avec de la DL-méthionine. A 35 jours les animaux sont euthanasiés par injection intracardiaque de bentobarbital. La partie iléale de l'intestin est prélevée dans les minutes qui suivent la mort de l'animal. Les extrémités de l'iléon sont clampées à deux centimètres sous le diverticule de Meckel et environ 5 centimètres de la jonction iléo-caecale avant d'être coupées. La partie de l'iléon est alors désinfectée rapidement à l'alcool sur la partie externe pour éviter les contaminations par les micro-organismes extérieurs. L'iléon clampé est alors introduit dans une boîte à gants sous flux de CO<sub>2</sub> permettant de maintenir une atmosphère anaérobie. Les contenus iléaux sont collectés et maintenus à 4°C sur lit de glace durant toute la collecte. Les échantillons de contenus digestif sont alors aliquotés puis conservés à -20°C jusqu'à l'essai *in vitro*.

### 1.2. Fermentation *in vitro* avec le système APES

La méthode de fermentation *in vitro* à l'aide du système APES (Automated Pressure Evaluation System) sur contenu intestinal de monogastriques découle de celle décrite par Bauer en 2002. Pour l'essai un inoculum est préparé à partir du contenu iléal dilué au 1/3 grâce à une solution physiologique stérile, préalablement préchauffée à 39°C. La dilution est réalisée en conditions anaérobies. Une fois cette étape réalisée, l'ensemble est filtré sur une toile bultex à 300 µm de diamètre. L'inoculum alors prêt est conservé sous flux de CO<sub>2</sub>. Les items d'essai sont introduits dans les bouteilles APES avant l'apport des différents tampons comme décrit dans le tableau 1. Le pH du milieu réactionnel est maintenu à un pH proche de la neutralité en début d'essai (6,8) pour finir aux alentours de 5,8 après 72 heures. Les quantités des différents items sont apportées directement dans la bouteille APES en considérant un apport équivalent à 3 ou 1,5 kg de produit par tonne d'aliment (Tableau1). Les dilutions effectuées pour chacun des produits apportée prennent en compte la dilution intestinale sur la base d'une consommation Aliment : Eau, de 1 : 2 en masse. Les items d'essai testés dans cette étude sont le HMTBA (Rhodimet™ AT88), l'acide formique (Formi.) ; l'acide Butyrique (Buty.) et Fumarique (Fuma.) (Aldrich). L'inoculum est apporté dans chaque bouteille au moment du lancement du run. L'acquisition des données de fermentation commence au moment de l'introduction de l'inoculum jusqu'à la fin du run 72 heures plus tard. .

### 1.3. Analyse des résultats de fermentation

La production de gaz est suivie en continu durant les 72 heures du run. Les courbes de dégagement gazeux obtenues sont alors modélisées en utilisant le model de Groot (1996) permettant de dégager 2 paramètres de la cinétique de fermentation pour la comparaison statistique des différents traitements.

$$Y=A / (1+(C/t)^B)$$

*Model de Groot*

Les deux paramètres obtenus à partir du modèle sigmoïde sont l'asymptote (A) qui correspond à la quantité finale de gaz produite durant la fermentation en mL et le Trm (Time for maximum rate) qui correspond au temps d'atteinte du maximum de production de gaz. Ce paramètre peut plus simplement être assimilé à une mesure du temps de latence. Ainsi, les effets antibactériens des différents traitements sont comparés sur leur efficacité à diminuer la production globale de gaz (A) et/ou à allonger le temps d'atteinte de la production maximale de gaz (Trm). La

comparaison statistique des courbes est réalisée par une analyse de variance sur ces deux paramètres avec le logiciel Statview (Abacus Concepts, 1996) selon le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  le paramètre du dégagement gazeux (A, Trm)

$\mu$  la moyenne générale

$\alpha_i$  l'effet traitement  $i$  ( $i = 1, \dots, t$ )

$\varepsilon_{ij}$  le résidu ( $j = 1, \dots, n$ )

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 présente les résultats obtenus pour le volume final de dégagement gazeux avec les différents traitements au bout des 72 heures de fermentation. La moyenne de dégagement gazeux obtenue sans traitement (témoin) est d'environ 660 ml. L'application des différents traitements *in vitro* entraîne une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du volume de gaz produit durant la fermentation d'environ 10 %. La diminution de production de gaz obtenue avec l'apport d'HMTBA n'est pas différente de celle obtenue avec les différents acides organiques utilisés à la concentration de 3kg/tonne d'aliment. Par ailleurs, les différentes associations HMTBA + acides organiques présentent des valeurs d'abaissement de la production de gaz non différentes de celles obtenues avec les acides organiques apportés seuls. Bien que les différences ne soient pas significatives, une tendance numérique est observée montrant un effet plus marqué de l'acide fumarique sur l'abaissement de la production totale de gaz. Cette tendance est observée aussi bien avec l'acide seul que lorsqu'il est utilisé en association avec l'HMTBA.

Les résultats obtenus sur la valeur de Trm montrent des résultats sensiblement différents de ceux observés sur le volume de gaz produit. Bien que tous les traitements, HMTBA, acides organiques et mélange HMTBA + Acides organiques entraînent une augmentation significative du Trm par rapport au traitement témoin, il apparaît des différences significatives entre les traitements sur ce paramètre. L'HMTBA entraîne un allongement du Trm significativement supérieure à celui obtenu avec chacun des différents acides organiques. Ces résultats tendent à montrer un effet plus précoce du HMTBA que des autres acides organiques. Il apparaît également une différence significative entre acides organiques sur ce paramètre. L'effet de l'acide formique sur l'allongement du Trm apparaît significativement plus important que celui des acides Fumarique et Butyrique. L'allongement du Trm obtenu avec les différents mélanges HMTBA + acides organiques entraîne une augmentation significative du Trm par rapport à l'effet obtenu avec les acides organiques seuls.

Ces résultats montrent que la présence simultanée des acides organiques et du HMTBA permet d'améliorer significativement l'action court terme des acides organiques (Trm) sans dégrader de manière significative l'action sur l'activité globale.

Les résultats obtenus dans la présente étude *in vitro* sont en accord avec ceux obtenus dans une précédente étude sur la diminution de l'activité de la flore de poulet de 21 jours par un apport de HMTBA alimentaire (Mercier et al., 2005). Par ailleurs, si les essais tant *in vitro* (Strauss et Hayler 2001) que *in vivo* (Partanen, 2001) sur l'effet antibactérien des acides organiques existent, il convient de noter qu'à notre connaissance ce essai est le premier qui compare HMTBA et Acides organiques sur flore totale. De plus, l'effet de l'HMTBA sur bactéries isolées a montré, un effet spécifique du HMTBA sur *Campylobacter jejuni* avec une valeur de concentration minimum bactéricide inférieure à 0,036 % (Geraert et al. 2005). Cet effet bactéricide sur *Campylobacter jejuni* a d'ailleurs été récemment confirmé *in vivo* (résultats en cours de publication).

La pénétration des acides organiques dans les bactéries est sous la dépendance du pH du milieu et du pKa de l'acide organique. En effet lorsque le pH du milieu est inférieur au pKa de l'acide comme c'est le cas au niveau du pro ventricule et du gésier l'équilibre de dissociation de l'acide tend vers la forme associée selon l'équation suivante :



Sous sa forme associée l'acide organique à la possibilité de traverser les membranes bactériennes. Dans notre étude, bien que le pH du milieu de fermentation, maintenu entre 6,8 et 5,8, ne soit pas favorable au déplacement de la réaction vers la forme associée, l'effet antibactérien des acides organiques est observé. Ceci indique que l'activité des acides organiques et du HMTBA peuvent également se prolonger au niveau duodéal et jejunal où le pH varie de 5,7 à 6,5 (Franer, 1942) Par ailleurs, si les bactéries gram négatif sont exclusivement sensibles aux acides dont la chaîne carbonée est inférieure à huit carbones, les bactéries gram positif sont d'autant plus sensibles que la chaîne carbonée de l'acide est longue ceci améliorant sa lipophilie (Cherrington et al., 1991). Avec cinq carbones le HMTBA semble donc apporter un compromis intéressant pour une action mixte. Ainsi, dans notre étude, l'effet significativement plus élevé du HMTBA par rapport aux autres acides organiques sur le paramètre Trm pourrait s'expliquer par une large majorité de bactéries Gram positif présente au niveau intestinal chez le poulet (Lu et al., 2003). Par ailleurs, Le mécanisme d'action des acides

organiques apparaît sensiblement différent selon le type de bactéries considérées : acido-sensibles ou acido-tolérantes (Lück, 1986, Cherrington et al., 1991, Russel, 1992, Russel et al., 1998). Ainsi, dans le cas des bactéries acido-sensibles, les protons sont évacués vers le milieu extérieur par une pompe échangeuse d'ions (H<sup>+</sup>/Anion). On assiste alors à une accumulation d'anions intracellulaires qui perturbent la synthèse protéique et la duplication de l'ADN de la bactérie. Chez les bactéries acido-tolérantes les protons s'accumulent dans le cytoplasme et entraînent une chute de pH qui inhibe la glycolyse et les transports actifs. Ainsi, les différences de mode d'action tout comme les spécificités propres à la fois des bactéries et des acides organiques, incluant le HMTBA, semblent indiquer un potentiel non négligeable sur la complémentarité des sources d'acidifiants pour l'élargissement du spectre bactéricide et ainsi une optimisation du contrôle de la flore.

D'un point de vue plus pratique, il ressort également de cette étude que l'utilisation du HMTBA comme source de méthionine à la place de la DL-méthionine permet de substituer une partie équivalente en point d'acide organique de l'aliment. Les suppléments usuels en méthionine chez le poulet en croissance et finition sont respectivement de l'ordre de 2-2,2 kg/ton et 1,3 à 1,5 kg/tonne d'aliment. Par ailleurs, les niveaux d'apport en acides organiques sont de l'ordre de 3,5 à 4,5 kg /tonne. Ainsi, tout en optimisant l'effet de régulation de la flore, l'utilisation du HMTBA comme source de méthionine dans l'aliment pourrait permettre de diminuer de moitié l'apport en acides organiques dans l'aliment.

## CONCLUSION

La présente étude a permis de démontrer in vitro que le potentiel antibactérien de l'hydroxy-analogue liquide de la méthionine sur la flore globale du poulet de chair est comparable à celui obtenu avec différents acides organiques couramment utilisés en alimentation animale. Il ressort également des différentes études recensées dans la bibliographie que la multiplicité des effets et mécanismes impliqués dans l'effet antibactérien des acides organiques et de l'HMTBA suggère qu'un élargissement du spectre de l'activité antibactérienne peut être obtenu par la diversification des sources acidifiantes. Enfin, d'un point de vue pratique, l'utilisation du HMTBA comme source de méthionine dans l'aliment pourrait permettre une économie d'environ la moitié des acides organiques utilisés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

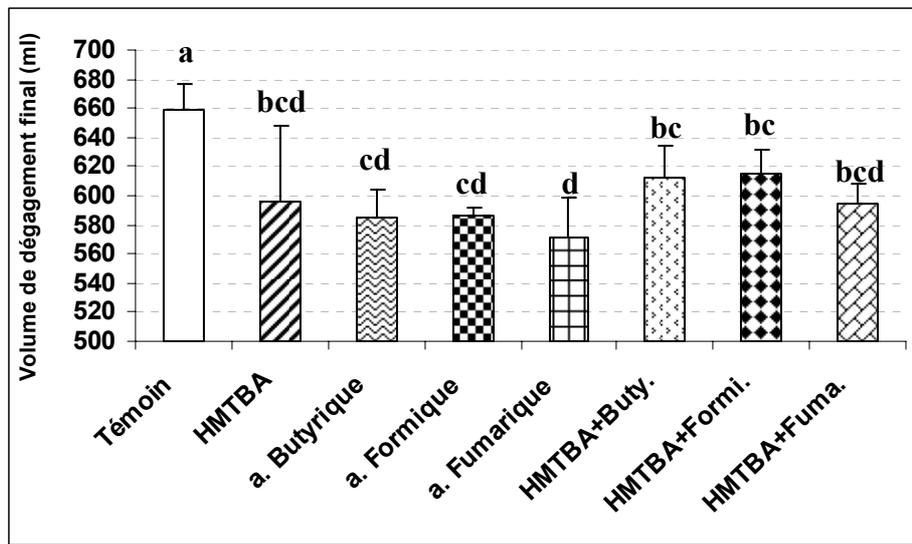
- Cherrington, C.A., Hinton, M., M., Mead, G.C., Chopra, I. (1991) Adv. in Microbial Physiol. 32, 87-108
- Franer, D.S. 1942 poult. Sci. 21 : 445-450
- Geraert, P.A. ; Graulet, B. ; Mercier, Y. ; Becker, P.M. & Van der Kliss, J.D. Worldwide ban on the horizon? 31 jan.- 1 Feb, the Netherlands 93.
- Groot J.C.J., J.W. Cone, B.A. Williams, F.M.A. Debersaques, E.A. Lantinga. 1996. Anim. Feed Sci. & Technol. 64, 77-89.
- Lu, J. ; Idris, U. ; Harmon, B. ; Hofacre, C. ; Maurer, J. ; Lee, M.D. (2003) Appl. & Environ. Microbiol. 69 : 6818-6824.
- Lück, E. (1986): Chemische Lebensmittelkonservierung. Stoffe, Wirkungen, Methoden. Springer-Verlag, Heidelberg
- Mercier, Y. ; Becker, P.M ; Van der Kliss, J.D. ; Geraert, P.A. 15th European Symposium on Poultry Nutrition. Balatonfüred, Hungary, 25-29 september 2005
- Partanen, K. (2001): in Piva, A., Bach-Knudsen, K.E. and Lindberg, J.E. (Ed.) Gut environments of pigs. Nottingham University Press, pp. 201-217
- Russel, J.B. (1992): J. Appl. Bact. 73, 363-370
- Russel, J.B., Diez-Gonzales, F. (1998) Microbial Physiol. 39, 205-234
- Strauss, G., Hayler, R. (2001): Feed magazine 4, 147-152

**Tableau 1.** Schéma expérimental

Traitements	Témoin	HMTBA	Formi	Buty	Fuma	HMTBA + Formi	HMTBA + Buty	HMTBA + Fuma
AT88 (Kg/ton.)	0	3	-	-	-	1,5	1,5	1,5
Formi (Kg/ton.)	0	-	3	-	-	1,5	-	-
Buty (Kg/Ton.)	0	-	-	3	-	-	1,5	-
Fuma (Kg/ton)	0	-	-	-	3	-	-	1,5
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4

Les valeurs d'apport des différents items correspondent à une équivalence exprimée kg par tonnes.

**Figure 1.** Evolution du volume final de production de gaz en fonction des traitements *in vitro*. Moyenne  $\pm$  écart type. Les traitements pour lesquels les lettres en indice sont différentes montrent des effets significativement différents ( $p < 0,05$ ).



**Figure 2.** Evolution du Trm en fonction des traitements *in vitro*. Moyenne  $\pm$  écart type. Les traitements pour lesquels les lettres en indice sont différentes, ont des effets différents au seuil  $p < 0,05$ .

