

# Modèle mécaniste de l'utilisation métabolique du phosphore et du calcium alimentaires et de la dynamique de dépôt des cendres corporelles : version 2.0

Marion LAUTROU (1,2,3), Candido POMAR (2), Jean-Yves DOURMAD (4),  
Marie-Pierre LÉTOURNEAU-MONTMINY (1)

(1) Département des sciences animales, Université Laval, Québec, QC, J1V 0A6 Canada

(2) Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, QC, J1M 1Z3 Canada

(3) UMR MOSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 75005 Paris, France

(4) INRA-Agrocampus Ouest, UMR PEGASE, 16 Le Clos, 35590 Saint-Gilles, France

Marie-Pierre.Letourneau@fsaa.ulaval.ca

## Modèle mécaniste de l'utilisation métabolique du phosphore et du calcium alimentaires et de la dynamique de dépôt des cendres corporelles : version 2.0.

L'alimentation de précision permet de diminuer les impacts environnementaux des systèmes d'alimentation actuels, mais nécessite l'estimation précise des besoins de phosphore (P) et de calcium (Ca). L'objectif est d'adapter un modèle mécaniste récemment développé portant sur l'utilisation du P et du Ca alimentaires, à l'alimentation de précision. Une première étape a consisté à modifier le potentiel de dépôt de P et Ca dans l'os pour le rendre indépendant du dépôt protéique. Ceci a été réalisé à partir de résultats récents obtenus sur des porcs nourris avec des excès de P et Ca. Ensuite, des données de composition corporelle de porcs recevant des apports de Ca et P contrastés (rations couvrant ou non les besoins et dont l'apport de Ca et de P est déséquilibré ou non) ont été utilisées pour estimer la capacité de prédiction du modèle par l'erreur quadratique moyenne de prédiction (EMP) et sa décomposition en erreur de tendance centrale (ETC), de régression (ER) et de bruit (EB). Les résultats montrent une prédiction globale qui est très bonne avec des EMP de moins de 9% provenant à plus de 70% d'EB, donc non liées aux paramètres du modèle. Lorsque la qualité de prédiction est étudiée par groupes d'apport (témoins, carencés, stratégies de déplétion-réplétions), les témoins présentent une ETC plus élevée (P : ETC = 30%, ER = 0%, EB = 70% ; Ca : ETC = 22%, ER = 2%, EB = 76%) montrant que le modèle sous-estime le Ca et P corporels (pente = 0,99 et 0,98 respectivement). Pour les porcs carencés, l'ER est plus élevée (P : ETC = 6%, ER = 11%, EB = 83% ; Ca : ETC = 51%, ER = 23%, EB = 26%) mettant en évidence que le modèle surestime la teneur corporelle en P et Ca des porcs en phase de finition. Des pistes d'amélioration ont été proposées pour améliorer sa prédiction sur ses points faibles avant de passer à l'étape de l'inversion pour prédire les besoins de porcs en groupe puis ceux d'animaux alimentés individuellement de façon journalière.

## Mechanistic model of metabolic use of dietary phosphorus and calcium and dynamics of body ash deposition: version 2.0.

Precision feeding reduces environmental impacts of current phase-feeding systems but requires an accurate estimate of phosphorus (P) and calcium (Ca) requirements. The aim is to adjust to precision feeding a mechanistic model recently developed to predict the fate of dietary P and Ca. The first step was to modify the model's potential Ca and P deposition into bone to make it independent of protein deposition. This was done by using recent results for pigs fed excess P and Ca. Then, body composition data from pigs receiving contrasting Ca and P supplies were used to evaluate the predictive ability of the model. Mean squared prediction error (MSPE) and its decomposition into central tendency error (ECT), regression (ER) and disturbance (ED) were calculated. The results show good prediction overall, with MSPE less than 9% from more than 70% of ED not related to model parameters. For predictive ability by contribution group, control pigs have higher ECT (P: ECT = 30%, ER = 0%, ED = 70%; Ca: ECT = 22%, ER = 2%, ED = 76%), showing that the model underestimates requirements (slope = 0.99). For pigs fed deficient dietary Ca and P diets, higher ER was observed (P: ECT = 6%, ER = 11%, ED = 83%; Ca: ECT = 51%, ER = 23%, ED = 26%), showing that the model overestimates requirements in the finishing phase. Areas for improvement have been identified, and in the next steps the model will be modified to improve its prediction of its weak points before moving to the inversion stage to predict requirements of pigs fed on group basis and then on an individually basis.

## INTRODUCTION

L'alimentation de précision est proposée pour diminuer les impacts environnementaux des systèmes d'alimentation par phase et par groupe actuellement utilisés. En effet, elle permet des réductions de la consommation et de l'excrétion d'azote de, respectivement, 25 et 40 % une fois les besoins individuels connus (Pomar *et al.*, 2015). L'estimation des besoins de phosphore (P) et calcium (Ca) dans un contexte d'alimentation minérale de précision pourrait permettre des réductions de consommation et de rejets de P, similaires à celles observées pour l'azote. Un modèle mécaniste a été développé (Létourneau-Montminy *et al.*, 2015) pour simuler la rétention du calcium et du phosphore dans différents compartiments anatomiques du porc en réponse au potentiel de croissance de l'animal ainsi qu'aux quantités de Ca et P ingérées. L'originalité de ce modèle par rapport aux modèles disponibles (ex. : InraPorc et NRC) réside dans le fait que le dépôt de Ca et de P dans l'os sont prédits indépendamment de la protéine corporelle. Cependant, faute de données, la prédiction du potentiel de dépôt osseux demeure liée à celui de la protéine. Afin de répondre à cette problématique, divers essais visant tant à maximiser qu'à diminuer les réserves minérales corporelles ont été réalisés. Ces derniers ont été utilisés pour faire la démonstration que le dépôt des minéraux dans l'os et le dépôt de protéines ne sont pas liés (Couture *et al.*, 2018). L'objectif du présent travail était donc de simuler le potentiel de dépôt de Ca et P dans l'os indépendamment du dépôt protéique et d'évaluer la capacité du modèle à prédire la rétention corporelle de Ca et P chez des porcs recevant des apports contrastés (élevés, faibles, déséquilibrés) de ces deux minéraux.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Description de la base de données

Les données de porcs recevant tant des apports faibles de Ca ou de P, des apports déséquilibrés en Ca et P, que des stratégies de déplétion et réplétion sans phytase ajoutée ont été combinés dans une base de données (Pomar *et al.*, 2006 ; Langlois *et al.*, 2016 ; Gonzalo *et al.*, 2018).

Dans l'essai de Pomar *et al.* (2006), les porcs ont reçu des apports très élevés (VH), élevés (H), moyens (M), bas (L) ou très bas (VL) de Ca et de P (Tableau 1). Les six rations de Langlois *et al.* (2016) étaient déséquilibrées en P et Ca, c'est-à-dire que le ratio Ca:Pdig allait de 1,75 à 4,63 en fonction du traitement. Dans les six traitements le P variait de 60 à 140 % du besoin en même temps que le Ca variait de 130 à 70 % du besoin (ex : trt 140-70 apporte 140 % du besoin en P et 70 % du besoin en Ca). Enfin, les porcs étudiés dans Gonzalo *et al.* (2018) recevaient une stratégie de déplétion-réplétion : soit les porcs recevaient durant certaines phases un aliment apportant du P et du Ca en quantité suffisante (C), soit l'aliment n'apportait que 60 % du besoin (L, phase de déplétion).

Dans les essais de Langlois *et al.* (2016) et Gonzalo *et al.* (2018), les porcs étaient radiographiés par absorption bi-photonique à rayons X (DXA ; Prodigy, GE Healthcare, Madison, WI) tous les 28 jours soit quatre à cinq fois durant la phase de croissance pour mesurer le contenu minéral osseux (CMO), la masse corporelle maigre et grasse. Les teneurs en maigre et gras étaient converties en protéines et lipides selon la méthode proposée par Pomar et Rivest (1996) et celles en CMO en P et

Ca corporels selon Nielsen (1973). Dans l'essai de Pomar *et al.* (2006), les porcs ont été abattus, saignés, les viscères ont été vidés et le corps entier incluant le sang et les viscères a été broyé pour quantifier la teneur en protéines, lipides, P et Ca corporels.

La base de données répertoriait les données d'entrée nécessaires à la simulation des essais dans le modèle soit les apports de P sous forme phytique, non-phytique végétal et non-phytique minéral et l'apport de Ca, les performances de croissance et les sorties du modèle soient les teneurs en protéines, lipides, Ca et P corporels (Tableau 1).

### 1.2. Description de la démarche d'analyse

#### 1.2.1. Estimation du potentiel de dépôt de Ca et P dans les cendres corporelles

Dans un premier temps, les données ont été comparées graphiquement afin de sélectionner le ou les traitements permettant d'atteindre le maximum de minéralisation. Les données de CMO de ces traitements ont alors été utilisées pour créer une équation de potentiel de dépôt de Ca et P dans les cendres osseuses. Autrement dit, cette nouvelle équation sera considérée comme l'estimation du dépôt maximal de Ca envisageable dans les os et est rarement atteinte sur le terrain.

À titre de rappel, dans le modèle, le P et le Ca fixés dans les tissus mous protéiques et lipidiques ont priorité sur le tissu osseux. Ils sont déposés de façon fixe par unité de protéines et de lipides et ont été déterminés à partir de données de composition chimique de dissection de porcs entiers (Nielsen, 1973).

#### 1.2.2. Évaluation de la qualité de prédiction du modèle en termes de P et Ca corporels

Pour cette étape, chaque traitement de la base de données a été simulé avec le modèle. Les apports en nutriments autres que Ca et P (ex. : énergie, acides aminés) sont considérés non limitants pour le dépôt de protéines et de lipides. De plus, afin que le modèle représente précisément la croissance corporelle non minérale des porcs étudiés, des équations polynomiales ont été déterminées pour chacun des essais pour simuler le dépôt de protéines et de lipides, ainsi que l'ingestion journalière. Ces équations dépendent du poids de l'animal :

$$\text{Dépôt de protéines, kg/j} = a + b \times \text{poids vif} + c \times \text{poids vif}^2$$

$$\text{Dépôt de lipides, kg/j} = a + b \times \text{poids vif}$$

$$\text{Consommation, kg/j} = a + b \times \text{poids vif} + c \times \text{poids vif}^2$$

La consommation journalière et les dépôts de protéines et de lipides étaient des valeurs d'entrées correspondant aux valeurs observées au même titre que les teneurs alimentaires en P et Ca. Les résultats de Ca et P corporels de début et de fin de phase ont été comptabilisés dans la base de données à titre de données, permettant une comparaison avec les résultats des simulations.

### 1.3. Analyses statistiques

La qualité de prédiction a été évaluée en comparant les valeurs simulées avec les résultats rapportés dans les essais comme il suit :

$$\begin{aligned} \text{Teneur corporelle observée}_{ij} \\ = \alpha + \alpha_i + B \times \text{Teneur corporelle simulée}_{ij} + \varepsilon_{ij}, \end{aligned}$$

où la Teneur corporelle observée<sub>ij</sub> correspond à la teneur corporelle en P ou Ca rapportée dans les essais, Teneur corporelle simulée<sub>ij</sub> correspond à celle prédite par le modèle,

tous deux pour l'expérience  $i$  et le traitement  $j$ ,  $\alpha$  est l'ordonnée à l'origine,  $\alpha_i$  est l'effet fixe de l'expérience sur  $\alpha$ ,  $B$  est la pente de la régression et  $\varepsilon_{ij}$  l'erreur résiduelle. La capacité du modèle à prédire des données expérimentales a été évaluée selon l'ordonnée à l'origine, la pente, l'écart-type et le coefficient de détermination obtenus par régression. De plus, l'erreur quadratique moyenne de prédiction (EMP) a été évaluée par la racine carrée de l'erreur relative de prédiction exprimée en pourcentage de la moyenne observée. L'EMP a été divisée en trois composantes : l'erreur de tendance centrale (ETC) qui indique comment la moyenne prédite dévie de celle mesurée,

celle due à la régression (ER) qui mesure la déviation du coefficient de régression par rapport à 1 et celle due au bruit (EB) qui est la variance non-expliquée, soit la portion de l'erreur de prédiction qui ne peut être expliquée par la régression (Theil, 1966). Une prédiction adéquate se caractérise par une EB la plus élevée possible par rapport à ETC et ER.

Trois sous-groupes ont été créés pour évaluer la qualité des prédictions dans différents contextes, i) les porcs recevant les traitements témoins non-carencés, ii) ceux recevant des traitements ne satisfaisant pas les besoins de Ca et P iii) ceux ayant suivi des stratégies de déplétion et réplétion.

**Tableau 1** – Description de la base de données

Traitements <sup>3</sup>	Publication <sup>1</sup>	Performances globales <sup>2</sup>										
		Caractéristiques de l'aliment					Caractéristiques finales de l'animal					
		PP g/kg	PNPv g/kg	PNPmin g/kg	Pdig g/kg	Ca g/kg	CMJ kg/j	PV final Kg	Protéines kg	Lipides kg	Ca g	P g
<b>Témoins</b>												
CCCC	1	2,14	1,02	2,12	2,61	7,00	3,20	133	20	36	985	675
H	2	2,30	1,13	1,67	2,10	7,13	2,60	106	16	22	763	510
VH	2	2,30	1,13	2,27	2,40	10,17	2,50	105	15	27	806	537
Trt 120-85	3	2,18	1,02	2,12	3,04	6,30	3,00	119	19	27	754	545
Trt 140-70	3	2,18	1,02	2,56	3,55	6,33	2,90	123	19	30	743	547
Trt 135-135	3	2,18	1,02	2,14	3,10	8,13	2,80	123	19	27	911	659
<b>Carencés</b>												
LLLL	1	2,14	1,02	1,22	6,96	5,33	3,02	131	20	33	728	552
M	2	2,30	1,13	1,50	1,80	6,93	2,54	102	15	22	686	464
L	2	2,30	1,13	1,14	1,60	5,90	2,49	103	16	22	592	420
VL	2	2,30	1,13	0,64	1,20	4,23	2,36	98	16	15	488	361
Trt 60-130	3	2,18	1,02	0,82	1,51	6,20	2,60	108	17	22	466	412
Trt 80-115	3	2,18	1,02	1,25	2,02	6,23	2,80	117	18	27	691	539
Trt 100-100	3	2,18	1,02	1,69	2,53	6,27	3,00	121	19	27	780	592
<b>Déplétion-Réplétion</b>												
CLCC	1	2,14	1,02	1,77	2,40	6,58	2,98	129	19	33	910	629
CCLC	1	2,14	1,02	1,94	2,70	6,80	3,04	134	21	32	945	657
LCLC	1	2,14	1,02	1,72	2,30	5,90	2,94	127	20	31	853	603
CCCL	1	2,14	1,02	1,97	2,50	6,85	3,08	132	20	35	910	634

<sup>1</sup>Publication : 1, Gonzalo et al. (2018) ; 2, Pomar et al. (2006) ; 3, Langlois et al. (2016).

<sup>2</sup>Abréviations : PP, P phytique ; PNPv, P non-phytique végétal ; PNPmin, P non-phytique minéral ; Pdig, P digestible ; CMJ, consommation moyenne journalière.

<sup>3</sup>Voir 1.1. Description de la base de données.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Estimation du potentiel de dépôt de Ca dans les cendres corporelles

Le traitement qui apportait le plus de Ca total et de P digestible, et donc susceptible de permettre aux porcs d'atteindre leur potentiel de minéralisation osseuse, était le traitement Trt 135-135 de l'étude de Langlois *et al.* (2016) qui fournissait 135% des besoins de Ca et P digestible en moyenne sur toute la croissance. Celui-ci correspondait à l'alimentation de truies de renouvellement au Québec. Une équation décrivant le mieux ces données, c'est-à-dire le dépôt de Ca en g/j a été générée (Tableau 2).

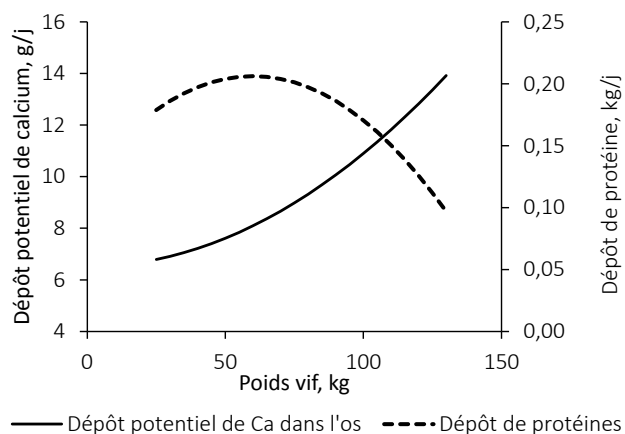
**Tableau 2** – Équation de dépôt potentiel de calcium<sup>1</sup>

Paramètres	Coefficient	Ecart-type	P-value
Ordonnée à l'origine	6,51	0,386	< 0,001
Effet quadratique	4,38 10 <sup>-4</sup>	5,392 10 <sup>-5</sup>	< 0,001
R <sup>2</sup>	0,76		

<sup>1</sup>Langlois et al. (2016).

L'équation montre un dépôt qui augmente progressivement avec le poids de l'animal et tout au long de sa croissance (Figure 1).

La dynamique des dépôts de Ca et de protéines observée dans cet exemple, ainsi que dans les autres traitements étudiés, met en évidence l'absence de relation entre la croissance minérale du tissu osseux et des tissus mous des porcs en croissance. En fait, pendant que la croissance musculaire semble atteindre son maximum aux alentours de 50 kg de poids vif, la croissance minérale osseuse semble stable au début de la période de croissance alors qu'elle augmente par la suite sans que nous ayons observé ni atténuation ni plateau au poids d'abattage.



**Figure 1** – Dépôt potentiel de calcium (Axe Y principal) et de protéine (axe Y secondaire) en fonction du poids vif du porc (d'après trt 135-135, Langlois *et al.* (2016))

## 2.2. Évaluation de la qualité de prédiction en termes de P et Ca corporels

Lorsque toutes les données du tableau 1 sont simulées, le modèle semble bien réagir avec des erreurs quadratiques moyennes de prédiction de 5,5 et 8,4%, respectivement pour P et Ca, avec des erreurs de bruit qui sont à plus de 85% (Tableau 3, Figure 2ab). Par contre lorsque l'analyse est effectuée seulement dans le cas des traitements témoins des essais, l'erreur de tendance centrale s'élève à 30% pour le P et 22% pour le Ca, montrant que le modèle sous-estime alors les teneurs corporelles (Figure 2cd). Ceci pourrait provenir du fait que le traitement 135-135 de Langlois *et al.* (2016), supposé permettre d'approcher le potentiel maximal, n'était pas celui qui maximisait le dépôt de Ca. L'équation de potentiel devra peut-être d'être révisée, bien que les niveaux d'apport en P digestible et Ca du traitement 135-135 de Langlois *et al.* (2016) étaient largement au-dessus du besoin et des apports réalisés dans la pratique. Le même type d'erreur est observé dans les traitements où des stratégies de déplétion et réplétion étaient pratiquées (Figure 2ef), mais il s'agit ici d'une surestimation de la part du modèle. Lorsque les traitements dits carencés (apports plus faibles que les besoins) sont isolés, une erreur de tendance centrale est toujours présente pour le Ca (51%), mais également une erreur de régression (23%). Cette dernière montre que le modèle surestime la rétention de Ca surtout chez les porcs plus lourds (Figure 2gh). Il est donc possible que l'absorption de Ca soit surestimée dans le modèle. Cette équation provient d'une méta-analyse réalisée avec les données disponibles qui n'étaient pas nombreuses et sera certainement à revoir avec de nouvelles données (ex. : Gonzalez-Vega, 2016).

**Tableau 2** – Résultats de l'évaluation du modèle<sup>1,2</sup>

Minéral Sous-groupes	n	Équation			Décomposition de l'erreur		
		Ordonnée à l'origine	Pente	EMPr	Erreur de tendance centrale	Erreur de régression	Erreur de bruit
<b>P corporel, g</b>							
Toutes les données	63	3,4	0,99	5,5	0,57	0,13	99,3
Témoin <sup>3</sup>	23	17,8	0,99	5,7	29,60	0,17	70,3
Carencés <sup>4</sup>	28	8,8	0,96	4,5	6,40	10,90	82,6
Déplétion-Réplétion <sup>5</sup>	12	-10,8	1,00	4,9	12,30	1,04	86,7
<b>Ca corporel, g</b>							
Toutes les données	63	-2,8	0,98	8,4	11,20	1,46	87,3
Témoin	23	28,0	0,98	5,8	22,30	2,24	75,5
Carencés	28	18,1	0,89	11,3	50,80	23,40	25,8
Déplétion-Réplétion	12	-28,3	1,01	8,3	24,90	0,54	74,6

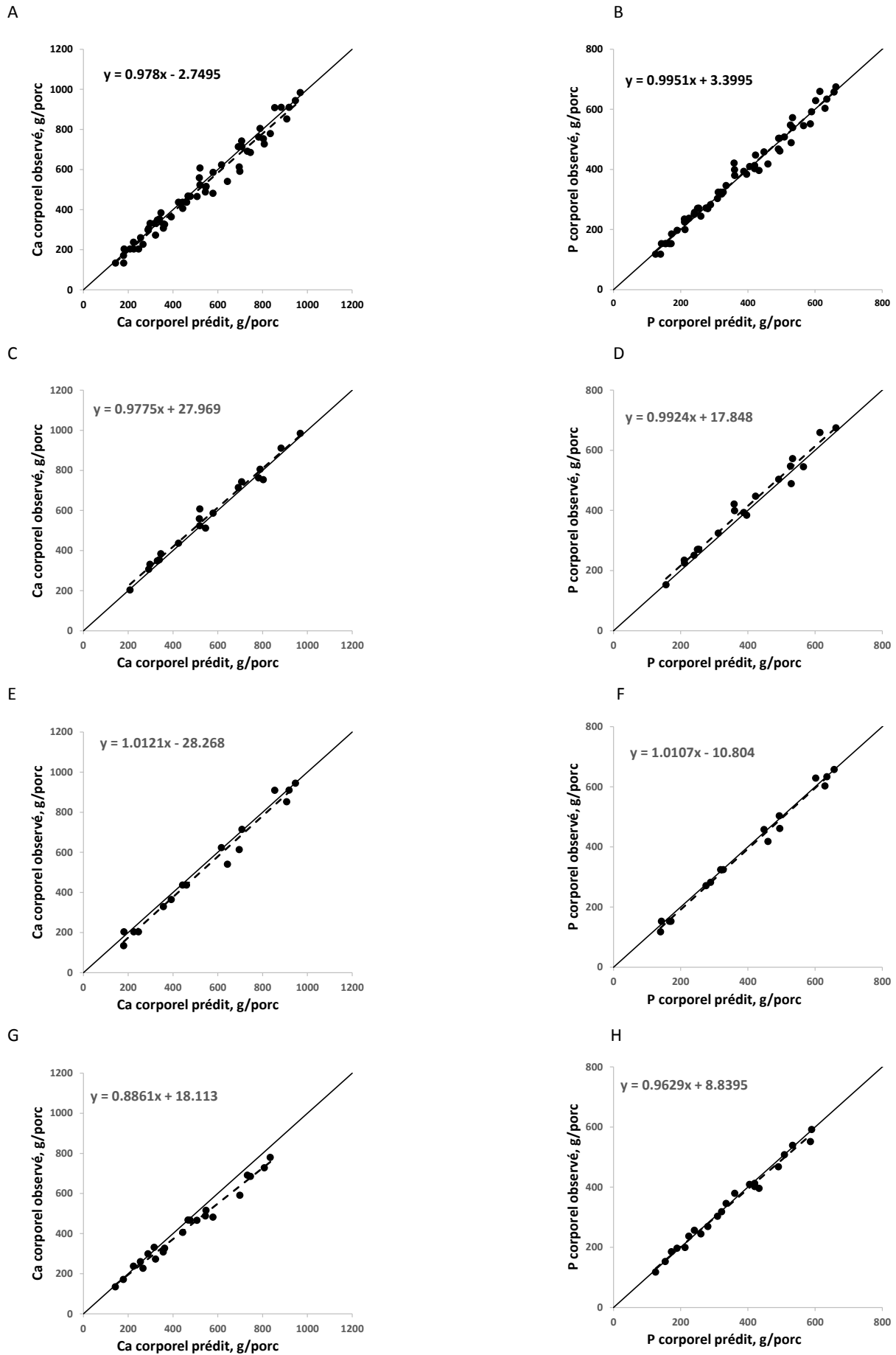
<sup>1</sup>EMPr: erreur moyenne de prédiction relative.

<sup>2</sup>Y, Ca et P corporels observés, g/porc ; X, Ca et P corporels prédits par le modèle, g/porc.

<sup>3</sup>CCCC, H, VH, 120-85, 140-70, 135-135, voir Tableau 1.

<sup>4</sup>LLLL, M, L, VL, 100-100, 80-115, 60-30, voir Tableau 1.

<sup>5</sup>CLCC, CCLC, LCLC, CCCL voir Tableau 1.



**Figure 2** – Masses de Ca et P corporels observées en fonction de celles simulées par le modèle selon la stratégie des apports :  
 A, B : toutes les données ; C,D : témoins ; E, F : déplétion-réplétion ; G, H : carencés ; voir Tableau 1

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une approche de modélisation mécaniste a été choisie pour représenter la complexité du métabolisme phosphocalcique en prenant en compte simultanément tous les mécanismes impliqués. Cette approche permettra de rendre compte de différents objectifs de production donc de donner des recommandations tant pour maximiser la minéralisation osseuse chez les truies de remplacement que de l'optimiser chez le porc en croissance.

Le présent travail montre que le modèle offre une bonne prédiction, mais a mis en évidence certaines faiblesses qui seront corrigées en prenant en compte certains phénomènes que nous savons manquants. C'est le cas notamment de la prédiction de l'absorption de Ca. La prochaine étape consistera à prédire les besoins en P et Ca alimentaires (actuelles entrées du modèle) par les dépôts de P et Ca dans les os et les tissus mous (actuelles sorties du modèle). Ce qui permettra de donner des recommandations d'apports selon divers objectifs notamment lorsque les animaux seront nourris avec des techniques d'alimentation de précision.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Couture C., Chiasson R., Pomar C., Létourneau-Montminy M.P., 2018. Evolution de la teneur en protéine corporelle et du contenu minéral osseux des porcs charcutiers nourris avec différents niveaux de phosphore et calcium alimentaires. *Journées Rech. Porcine*, 50, 167-168.
- Gonzalez-Vega C. 2016. Digestibility of calcium and digestible calcium requirements in pigs. PhD Thesis, University Illinois, 209 p.
- Gonzalo E., Létourneau-Montminy M.P., Narcy A., Bernier J.F., Pomar C., 2018. Consequences of dietary calcium and phosphorus depletion and repletion feeding sequences on growth performance and body composition of growing pigs. *Animal*, 12, 1751-1173.
- Langlois J., Pomar C., Létourneau-Montminy M.P., 2016. Estimation des besoins de phosphore et calcium chez le porc en début de croissance. *Journées Rech. Porcine*, 48, 163-164.
- Langlois J., Pomar C., Létourneau-Montminy M.P., 2016. Impact d'un déséquilibre phosphocalcique sur les performances zootechniques et la minéralisation osseuse chez le porc en finition. *Journées Rech. Porcine*, 48, 109-114.
- Létourneau-Montminy M.P., Narcy A., Dourmad J.Y., Crenshaw T.D., Pomar C., 2015. Modeling the metabolic fate of dietary phosphorus and calcium and the dynamics of body ash content in growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 93, 1200-1217.
- Nielsen A., 1973. Anatomical and chemical composition of Danish Landrace pigs slaughtered at 90 kilograms live weight in relation to litter, sex and feed composition. *J. Anim. Sci.* 36, 476-482.
- Pomar C., Rivest J., 1996. The effect of body position and data analysis on the estimation of body composition of pigs by dual energy x-ray absorptiometry (DEXA). In: *Proceedings of the 46th Annual conference of the Canadian Society of Animal Science*, Lethbridge, Alberta, July 7-11, page 26 (Abstr).
- Pomar C., Jondreville C., Dourmad, J.Y., Bernier J.F., 2006. Influence du niveau de phosphore des aliments sur les performances zootechniques et la rétention corporelle de calcium, phosphore, potassium, sodium, magnésium, fer et zinc chez le porc de 20 à 100 kg de poids vif. *Journées Rech. Porcine*, 38, 209-216.
- Pomar, C., Pomar J., Rivest J., Cloutier L., Létourneau-Montminy M.P., Andretta I., Hauschild L., 2015. Estimating real-time individual amino acid requirements in growing-finishing pigs: towards a new definition of nutrient requirements? In: *Nutritional modelling for pigs and poultry*, Eds N.K. Sakomura, R. Gous, I. Kyriazakis and L. Hauschild, CAB International, Wallingford, UK, 157-174.
- Theil H., 1966. *Applied economic forecasting. Studies in mathematical and managerial economics*. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, 503 p.