

Effets de la baisse de protéine sur la santé intestinale du porcelet : une méta-analyse

Diana LUISE (1), Paolo BOSI (1), Etienne CORRENT (2), Aude SIMONGIOVANNI (2), William LAMBERT (2), Paolo TREVISI (1), Tristan CHALVON DEMERSAY (2)

(1) Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, 40127 Bologna, Italie

(2) Ajinomoto Animal Nutrition Europe, 32, rue Guersant, 75017 Paris, France

chalvon-demersay_tristan@eli.ajinomoto.com

Effets de la baisse de protéine sur la santé intestinale du porcelet : une méta-analyse

La baisse de la teneur en protéines des aliments est une stratégie utilisée pour minimiser le risque de diarrhée du porcelet. Son mode d'action a été décrit dans la littérature mais il n'existe pas, à ce jour, d'étude quantitative sur l'ensemble des données accumulées sur le sujet. Une méta-analyse a donc été réalisée afin d'évaluer les effets de la baisse de protéine sur la santé intestinale des porcelets. Pour cela, une recherche structurée a été réalisée sur PubMed. Celle-ci a permis de trouver un total de 71 références parmi lesquelles 23 articles (publiés avant l'année 2020) ont été sélectionnés. Une recherche manuelle dans la base de données d'Ajinomoto Animal Nutrition Europe a ensuite complété ce travail. Ceci a permis d'obtenir un total de 26 articles. La croissance et les paramètres liés à la santé intestinale (score fécal, morphologie intestinale, marqueurs de l'inflammation, métabolites bactériens, pH intestinal, diversité du microbiote) ont été extraits et exprimés en pourcentage du régime témoin. L'effet de la baisse de protéine a été évalué en utilisant un modèle linéaire général prenant en compte l'effet de l'essai, avec le logiciel Minitab®. L'analyse a révélé que la baisse de protéine dans l'aliment était associée à une diminution du score fécal, du pH, du contenu en ammoniac et en certaines amines biogènes (cadavérine, putrescine) dans l'intestin, de l'expression d'un marqueur de l'inflammation et de la profondeur des cryptes. Le contenu en acides gras à chaînes courtes, la hauteur des villosités et la diversité du microbiote sont restés inchangés. Ce travail a permis de quantifier l'effet de la baisse de protéine sur certains paramètres liés à la santé intestinale et confirme que cette stratégie est associée à une réduction du risque de diarrhées chez le porcelet, phénomène reposant probablement sur une amélioration de l'intégrité intestinale en lien avec une baisse de l'inflammation.

Effects of a low-protein diet on intestinal health of piglets: a meta-analysis

Decreasing protein is a strategy used to minimize diarrhea in piglets. Its mode of action has been described in the literature, but to date, there has been no quantitative study summarizing the data available on the topic. Thus, a meta-analysis was performed to assess effects of a decrease in protein on the intestinal health of piglets. To this end, a structured search was performed on PubMed. A total of 71 articles were found, of which 23 (published before 2020) were selected. This research was supplemented by a manual search based on Ajinomoto Animal Nutrition Europe database to obtain a total of 26 articles. Growth and intestinal health parameters (fecal score, intestinal morphology, markers of inflammation, bacterial metabolites, intestinal pH, microbiota diversity) were extracted and expressed as a percentage of the control diet. The effect of the decrease in protein was assessed using a general linear model that included the effect of the trial, using Minitab® software. The analysis revealed that the decrease in protein was associated with a decrease in fecal score, pH, ammonia and some biogenic amines (cadaverine, putrescine) in the intestinal contents, in the expression of an inflammatory marker and in crypt depth in the intestine. The intestinal content of short-chain fatty acids, villus height and microbiota diversity remained unchanged. This study confirms allowed to quantify the effect of the decrease in protein on parameters related to gut health. It also confirms that this strategy is associated with a decrease in the risk of diarrhea in piglets, probably due to an improvement in intestinal integrity and inflammatory status.

INTRODUCTION

Chez le porcelet, le sevrage est une période particulièrement clé de la vie de l'animal : ces derniers passent d'un aliment liquide faible en protéines à un aliment solide plus concentré, ils sont séparés de leur mère et sont mélangés à des individus provenant d'autres portées. Ces changements génèrent un fort stress qui généralement réduit la prise alimentaire et en retour détériore les fonctions barrière et digestive de l'intestin (Pluske *et al.*, 1997). En effet, il a été rapporté que l'intestin des porcelets au sevrage présente une atrophie villositaire, une hyperplasie des cryptes et un plus petit nombre de cellules calciformes productrices de mucus. L'intégrité intestinale et l'activité des enzymes digestives sont réduites ce qui a pour effet d'augmenter l'infiltration bactérienne et de diminuer l'absorption des nutriments respectivement (Lallès *et al.*, 2004). Un phénomène de dysbiose est aussi observé et se caractérise par une réduction des bactéries bénéfiques aux dépens d'agents pathogènes opportunistes comme *Escherichia coli* (Gresse *et al.*, 2017). Ces évènements sont associés à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif, à l'occurrence de fortes diarrhées et à une croissance réduite.

Dans le contexte européen actuel de réduction de l'utilisation des antibiotiques et de l'oxyde de zinc, la pression sur la santé intestinale grandit et, avec elle, la nécessité de développer des stratégies nutritionnelles permettant de limiter les conséquences des changements survenant au sevrage. La baisse de protéine dans l'aliment est une stratégie utilisée sur le terrain pour limiter les problèmes intestinaux chez le porcelet. Son mode d'action a été décrit dans la littérature mais il n'existe pas, à ce jour, d'étude quantitative sur l'ensemble des données accumulées sur le sujet.

Une méta-analyse a donc été réalisée afin d'évaluer les effets de la baisse de protéine sur la santé intestinale des porcelets.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Recherche de la littérature

Une recherche structurée a été réalisée sur PubMed, principal moteur de recherche de données bibliographiques de l'ensemble des domaines de spécialisation de la biologie et de la médecine, en combinant des mots clés liés au régime [« Low protein diet » OU « Low protein level » OU « Decreased protein level » OU « Reduced protein level »] ET à la santé [« health » OU « Immunity » OU « Gut health » OU « microbiota » OU « diarrhea » OU « microflora »] ET à l'espèce [« pigs » OU « piglets »]. Un total de 48 recherches a été réalisé permettant de trouver 1918 références parmi lesquelles 23 articles ont été retenus. Une recherche manuelle dans la base de données d'Ajinomoto Animal Nutrition Europe a ensuite complété ce travail. Ceci a permis d'obtenir un total de 26 articles rapportant les effets de la baisse de protéine sur au moins un critère de la santé intestinale.

1.2. Extraction des données

La vitesse de croissance ainsi que les critères liés à la santé intestinale (morphologie intestinale, marqueurs de l'inflammation, métabolites bactériens, ammoniacque intestinal, pH intestinal, diversité du microbiote) ont été extraits et exprimés en pourcentage du régime témoin sous la condition que ces critères aient été étudiés dans trois études différentes. Le score fécal a été extrait et homogénéisé en utilisant l'échelle

suivante : 1 = fèces fermes, 2 = fèces molles, 3 = diarrhée légère, et 4 = diarrhée sévère, puis exprimé en pourcentage du régime témoin.

La composition en nutriments des aliments a été recalculée en utilisant les tables INRA-AFZ (Sauvant *et al.*, 2004) à l'aide du logiciel EvaPig®.

1.3. Statistiques

Un modèle linéaire général a été utilisé pour évaluer l'effet de la baisse de protéine sur ces critères. L'effet « essai » a été pris en compte comme facteur fixe. Des corrélations de Pearson ont aussi été calculées pour évaluer l'effet de la baisse de protéine sur d'autres composants de l'aliment. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab®. Le niveau de significativité a été fixé à $P = 0,05$.

2.1. Etudes incluses et caractéristiques

Les 26 articles inclus ont été publiés entre 2007 et 2019 et regroupent un total de 34 essais rapportant les effets de la baisse de protéine sur la santé intestinale du porcelet. L'âge et le poids moyens des porcelets en début d'étude est de $26,8 \pm 0,6$ jours et $10,4 \pm 0,7$ kg, respectivement, et en fin d'étude de $48,5 \pm 1,4$ jours et $15,6 \pm 0,7$ kg, respectivement. Le niveau moyen de protéine brute (N x 6,25) du groupe témoin est de $21,4 \pm 1,5\%$ et celui des régimes faibles en protéines de $16,8 \pm 1,8\%$. La baisse de protéine est corrélée à une augmentation de la concentration en amidon dans l'aliment (Tableau 1). Les lipides et la cellulose brute ne sont pas corrélés à la teneur en protéine brute dans l'aliment (Tableau 1).

Tableau 1 - Tableau de corrélation entre la teneur en protéines brutes (N x 6,25) et la teneur en amidon, lipides et cellulose brute dans l'aliment

	Corrélation de Pearson	
	P-value	Coefficient
Amidon (%)	<0,0001	-0,497
Lipides (%)	0,484	-0,077
Fibres brutes (%)	0,490	0,076

2.2. Effet de la baisse du niveau de protéines sur la performance et les critères de santé intestinale

La vitesse de croissance n'est pas impactée par la baisse du niveau de protéines dans l'aliment en période post-sevrage ($P = 0,698$; Tableau 2). A l'inverse, la baisse du niveau de protéines dans l'aliment est liée à une baisse du score fécal (Tableau 2). Pour chaque point de protéine en moins dans l'aliment, le score fécal baisse de 2,6% ($P < 0,0001$; Tableau 2).

Cette baisse de protéine dans l'aliment induit également une baisse du pH ($P = 0,02$; Tableau 2), de l'ammoniacque ($P < 0,0001$; Tableau 2) et de la putrescine dans les digestas intestinaux ($P < 0,0001$; Tableau 2). Pour chaque point de protéine en moins dans l'aliment, la concentration en ammoniacque dans les digestas intestinaux baisse de 4,8% (Tableau 2). Une tendance pour une baisse de la concentration en cadavérine peut aussi être observée ($P = 0,102$; Tableau 2).

La concentration en acides gras à chaîne courte dans les contenus intestinaux, à l'exception de celle de l'acide acétique, n'est pas impactée par la baisse de protéine (Tableau 2). Il en est de même pour les indices de diversité du microbiote : indice de Shannon et indice de Simpson (Tableau 2).

Un seul paramètre de l'inflammation a été étudié dans au moins trois études ; il s'agit du récepteur membranaire TLR-4 (Toll-like receptor-4). La baisse de protéine est liée à une baisse de l'expression de ce marqueur de l'inflammation. Pour chaque point de protéine en moins dans l'aliment, l'expression de ce marqueur de l'inflammation baisse de près de 11% ($P < 0,0001$; Tableau 2).

Enfin, la baisse de protéine induit baisse de la profondeur des

cryptes dans la muqueuse ($P = 0,014$; Tableau 2) sans affecter la hauteur des villosités dans la muqueuse.

Les effets de la baisse de protéine sur le score fécal, les concentrations en ammoniac et en putrescine dans les digestas intestinaux et l'expression de TLR-4 dans la muqueuse intestinale sont représentés dans les figures 1-A, 1-B, 1-C et 1-D, respectivement.

Tableau 2 - Effet de la baisse de protéine sur la performance et les critères de santé intestinale.

Critère	R ² (%)	P-value ¹		Pourcentage d'évolution de chaque critère par point de baisse de protéine
		Baisse de protéine	Effet « essai »	
Performance et score fécal				
Gain moyen quotidien	46,7	0,698	0,139	1,20
Score fécal	59,8	<0,0001	0,260	-2,56
pH et concentration en métabolites dans les digestas intestinaux				
pH	49,9	0,020	0,107	-0,28
Ammoniac	72,8	<0,0001	0,024	-4,77
Cadavérine	43,3	0,102	0,281	-2,74
Putrescine	45,2	0,027	0,310	-3,22
Spermidine	24,6	0,558	0,558	2,90
Spermine	30,9	0,776	0,393	0,85
Acide acétique	57,3	0,003	0,014	-1,65
Acide propionique	46,4	0,466	0,068	0,66
Acide isobutyrique	33,2	0,957	0,361	0,10
Acide butyrique	51,7	0,212	0,015	-1,39
Acide isovalérique	22,3	0,981	0,765	-0,12
Acide valérique	32,4	0,766	0,191	0,80
Diversité du microbiote dans les digestas intestinaux				
Shannon index	39,4	0,368	0,508	-0,07
Simpson index	44,1	0,651	0,411	-1,14
Morphologie intestinale et marqueur de l'inflammation de la muqueuse				
Profondeur des cryptes	42,3	0,014	0,064	-0,63
Hauteur des villosités	42,1	0,506	0,061	0,17
Expression de TLR-4	84,1	<0,0001	0,106	-10,92

¹Un modèle linéaire général a été utilisé pour évaluer l'effet de la baisse de protéine sur ces critères. L'effet « essai » a été pris en compte comme facteur fixe.

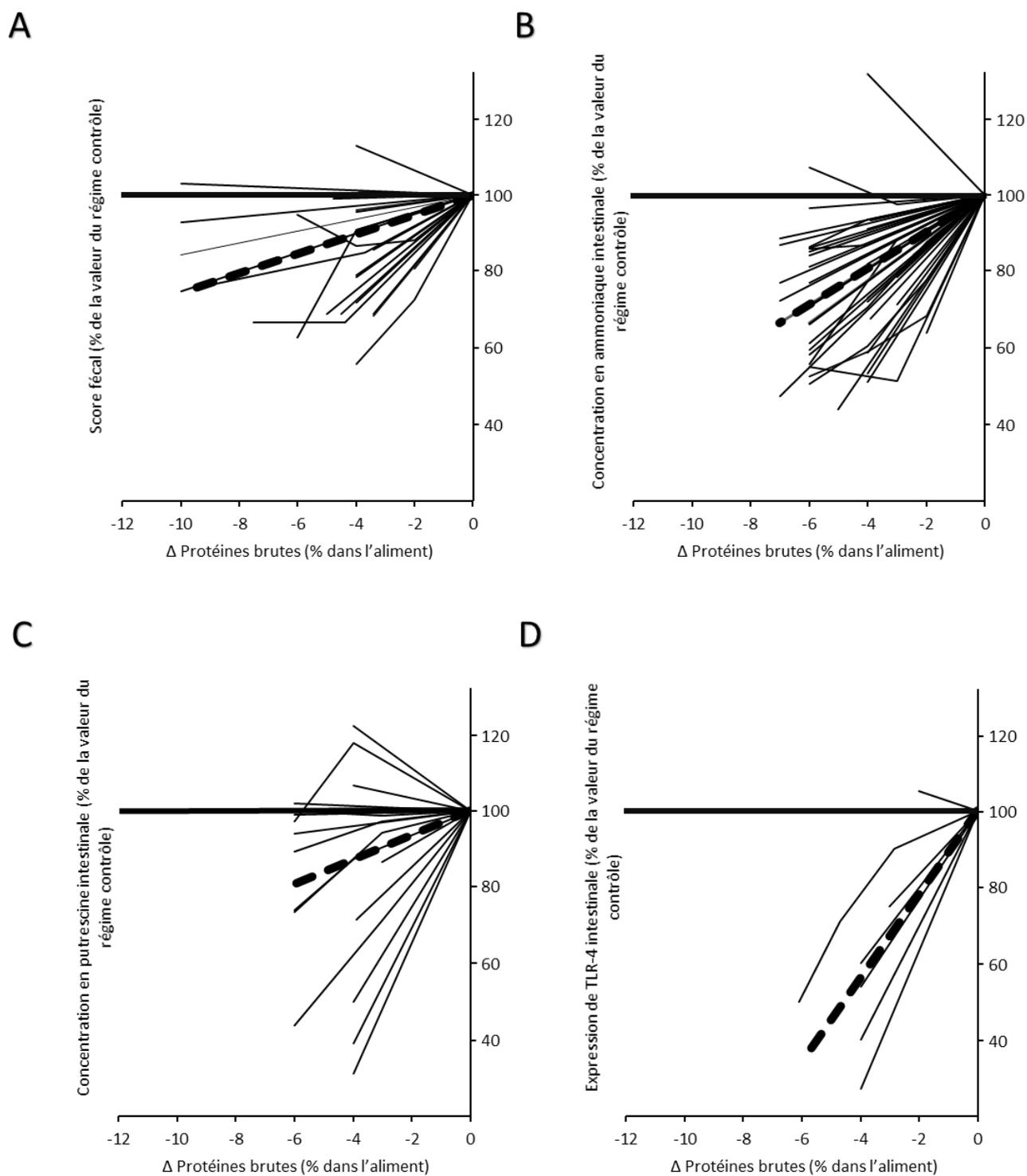


Figure 1 - Effet de la baisse de la teneur en protéines brutes sur le score fécal (A), la concentration en ammoniaque dans les digestats intestinaux (B), la concentration en putrescine dans les digestats intestinaux (C) et l'expression de TLR-4 dans la muqueuse intestinale (D) en pourcentage du régime témoin. Les lignes pleines correspondent aux réponses des essais. La ligne en pointillés représente l'équation du modèle linéaire général.

3. DISCUSSION

Cette méta-analyse est la première revue quantitative faisant la synthèse des études rapportant l'effet de la baisse de protéine sur la santé intestinale du porcelet. Cette revue confirme l'effet positif de la baisse de protéine sur les risques de diarrhée chez le porcelet et permet d'en cerner le mode d'action. Il est intéressant de noter que la baisse de protéine, sans altérer la vitesse de croissance des animaux, minimise certains effets du sevrage comme l'augmentation du statut inflammatoire ainsi que l'hyperplasie des cryptes intestinales (Pié *et al.*, 2004).

Nous avons observé dans ce travail que la baisse de protéine est associée à une diminution de la concentration en ammoniacque dans les digestas intestinaux et de certaines amines biogènes, molécules issues du catabolisme des acides aminés. Ceci peut contribuer à l'amélioration de la santé intestinale. En effet, en cas d'excès, l'ammoniacque et les amines biogènes peuvent altérer la prolifération et le métabolisme des cellules intestinales (Apajalahti et Vienola, 2016). La baisse de protéine peut aussi induire la diminution de la concentration d'autres métabolites potentiellement délétères pour la production d'énergie au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie tels que les phénols, les indoles et le para-crésol. Ces paramètres n'ont pas été intégrés dans la méta-analyse car seules deux études rapportent l'effet du niveau de protéine sur la concentration de ces molécules (Zhang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2019).

La baisse de protéine n'affecte pas la concentration en acides gras à chaîne courte dans les digestas intestinaux à l'exception de l'acide acétique. Cela peut s'expliquer par le fait que, lors de la baisse de protéine, une partie des acides aminés dont certains sont précurseurs d'acides gras à chaîne courte est substituée par de l'amidon dont le catabolisme par les bactéries peut également générer des acides gras à chaîne courte (Oliphant et Allen-Vercoe, 2019). La baisse de l'acide acétique pourrait s'expliquer par la baisse dans l'intestin de l'abondance des bactéries du phylum *bacteroides* en réponse à la baisse de protéine, producteurs importants d'acétate (Miller, 1978). Toutefois, nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse faute de données dans la littérature sur l'impact de la baisse de protéine sur les phylums bactériens.

La baisse de protéine est associée à une baisse du pH intestinal marquant une acidification légère de l'intestin. Cette baisse du pH peut s'expliquer par la substitution des protéines, au fort pouvoir tampon sur le pH, par de l'amidon (Gao *et al.*, 2019). Cette condition environnementale est décrite comme étant défavorable à la prolifération de bactéries opportunistes telles que les entérobactéries et peut donc participer à une meilleure santé intestinale (Gao *et al.*, 2019). En accord avec ce résultat, il a été rapporté dans des études précédentes que la baisse de protéine chez le porcelet était associée à une baisse dans

l'intestin de l'abondance d'*Escherichia coli* appartenant à la famille des entérobactéries (Wellock *et al.*, 2008 ; Wan *et al.*, 2020).

L'ensemble des modifications précédemment décrites pourraient expliquer l'évolution de l'expression des marqueurs de l'inflammation de la muqueuse en réponse à la baisse de protéine et notamment la moindre expression de TLR-4. Ce récepteur membranaire peut se lier aux endotoxines tel que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négative et déclencher une cascade inflammatoire (Molteni *et al.*, 2016). D'autres marqueurs de l'inflammation tel que IFN- γ et IL-6 sont diminués en réponse à la baisse du niveau de protéines (Zhang *et al.*, 2017 ; Wan *et al.*, 2020) mais n'ont pas été intégrés dans la méta-analyse faute de données suffisantes. Ces observations signifieraient que la baisse de protéine est associée à une moindre inflammation ; les acides aminés et l'énergie pourraient alors être utilisés préférentiellement pour la croissance plutôt que pour la fonction immunitaire.

La conséquence de cette moindre inflammation pourrait aussi se manifester par une amélioration de l'intégrité intestinale comme le montre la plus faible profondeur de cryptes dans la muqueuse en réponse à la baisse de protéine. Cet effet est signe d'une moindre prolifération des cellules souches se situant dans cette zone et d'une plus faible apoptose des cellules intestinales. Certaines études ont aussi rapporté que la baisse de protéine dans l'aliment est associée à une augmentation de l'expression ou de l'abondance de certaines jonctions serrées, marqueurs de l'intégrité intestinale (Richter *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2015). Ces données n'ont, toutefois, pas été intégrées dans la méta-analyse car un nombre trop faible d'articles rapportent l'effet de la baisse de protéine sur ces critères.

CONCLUSIONS

Ce travail montre que la baisse de protéine est liée à une diminution de l'accumulation de métabolites délétères et du pH dans l'intestin ce qui pourrait en retour diminuer l'inflammation et améliorer l'intégrité intestinale. L'ensemble de ces modifications contribuent à diminuer le risque de diarrhée chez le porcelet et probablement les conséquences néfastes qui en découlent tel que l'augmentation de la mortalité et la diminution de la performance. Les effets bénéfiques de la baisse de protéine sur le microbiote (l'abondance de bactéries commensales), l'expression des jonctions serrées et l'accumulation de certains autres métabolites (phénols, indoles, para-crésol) restent à explorer lors de futures études. Cette revue confirme que la baisse de protéine est une stratégie particulièrement intéressante pour préserver la santé intestinale des porcelets dans le contexte actuel de réduction de l'utilisation des antibiotiques et de l'oxyde de zinc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Apajalahti J., Vienola K., 2016. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 221, 323-330.
- Gao J., Yin J., Xu K., Li T., Yin Y., 2019. What is the impact of diet on nutritional diarrhea associated with gut microbiota in weaning piglets: A system review. *BioMed Res. Int.*, vol. 2019, 14 pp.
- Gresse R., Chaucheyras-Durand F., Fleury M.A., van de Wiele T., Forano E., Blanquet-Diot S., 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the keys to health. *Trends Microbiol.*, 25, 851-873.
- Lallès J.P., Boudry G., Favier C., Le Floc'h N., Luron I., Montagne L., Oswald I.P., Pié S., Piel C., Sève B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.*, 53, 301-316.
- Miller T.L., 1978. The pathway of formation of acetate and succinate from pyruvate by *Bacteroides succinogenes*. *Arch. Microbiol.*, 117, 145-152.
- Molteni M., Gemma S., Rossetti C., 2016. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators Inflamm.*, Article ID 6978936, 9 pp.

- Oliphant K., Allen-Vercoe E., 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7, 91.
- Pié S., Lallès J.P., Blazy F., Laffitte J., Sève B., Oswald I.P., 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.*, 134, 641-647.
- Pluske J.R., Hampson D.J., Williams I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 51, 215-236.
- Richter J.F., Pieper R., Zakrzewski S.S., Günzel D., Schulzke J.D., Kessel A.G.V., 2014. Diets high in fermentable protein and fiber alter tight junction protein composition with minor effects on barrier function in piglet colon. *Br. J. Nutr.*, 111, 1040-1049.
- Sauvant D., Perez J.M., Tran G., 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage (Porcs, volailles, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons). INRA Editions, 301 pp.
- Wan K., Li Y., Sun W., An R., Tang Z., Wu L., Chen H., Sun Z., 2020. Effects of dietary calcium pyruvate on gastrointestinal tract development, intestinal health and growth performance of newly weaned piglets fed low-protein diets. *J. Appl. Microbiol.*, 128, 355-365.
- Wang H., Shen J., Pi Y., Gao K., Zhu W., 2019. Low-protein diets supplemented with casein hydrolysate favor the microbiota and enhance the mucosal humoral immunity in the colon of pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 10, 79.
- Wellock I.J., Fortomaris P.D., Houdijk J.G.M., Kyriazakis I., 2008. Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: health. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, 2, 834-842.
- Wu Y., Jiang Z., Zheng C., Wang L., Zhu C., Yang X., Wen X., Ma X., 2015. Effects of protein sources and levels in antibiotic-free diets on diarrhea, intestinal morphology, and expression of tight junctions in weaned piglets. *Anim. Nutr.*, 1, 170-176.
- Zhang C., Yu M., Yang Y., Mu C., Su Y., Zhu W., 2017. Differential effect of early antibiotic intervention on bacterial fermentation patterns and mucosal gene expression in the colon of pigs under diets with different protein levels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 2493-2505.