



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Infectiologie, Physio-pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. FLORIAN TOUITOU

le jeudi 6 avril 2023

Titre :

Comprendre le lien entre l'activité des micro-organismes présents dans le rumen, le métabolisme de l'hôte et l'efficacité alimentaire des agneaux.

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GENPHYSE)

Directeur de Thèse :

MME ANNABELLE MEYNADIER

Rapporteurs :

MME FLORENCE GONDRET, Centre régional de l'INRA Rennes

M. PHILIPPE SCHMIDELY, AGROPARISTECH

Membres du jury :

M. GILLES FOUCRAS, ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE, Président

M. GONZALO CANTALAPIEDRA-HIJAR, INRA SAINT GENES CHAMPANELLE, Membre

MME VALÉRIE BERTHELOT, AGROPARISTECH, Membre

This work received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Grant Agreement No. 772787 (SMARTER).

This work received funding from the 2018 Joint Call of the Cofund ERA-Nets FACCE ERA-GAS (Grant N° 696356), ICT-AGRI 2 (Grant N° 618123) and SusAn (Grant N° 696231), for the GrassToGas project.

This work received funding from the INRAE metaprogramme MEM (Milage project) and from the Animal Genetics division of INRAE (Phenefficace project).

Remerciements

Un travail de thèse, aussi personnel soit-il, n'est jamais l'œuvre d'une seule personne mais résulte plutôt des efforts combinés d'une ou plusieurs équipes dont le travail joint est synthétisé par le doctorant.

Pour cette raison, je tiens à remercier chaleureusement mes deux directrices de thèse, Mme Annabelle MEYNADIER et Mme Flavie TORTEREAU pour leur soutien et le temps et l'aide qu'elles m'ont accordés au cours de ces un peu plus de trois années. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions et me mettre face à mes contradictions.

Merci également aux financeurs qui ont rendu ce projet possible, notamment le programme européen *Horizon 2020* qui a financé une partie du projet SMARTER et le méta-programme INRAE MEM.

De même, je souhaite exprimer toute ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : Mme Florence GONDRET, M. Philippe SCHMIDELY en leur qualité de rapporteurs, qui ont méticuleusement lu mon manuscrit et y ont apporté leurs commentaires et leurs précisions ainsi que Mme Valérie BERTHELOT, M. Gonzalo CANTALAPIEDRA-HIJAR et M. Gilles FOUCRAS en leur qualité d'examineurs.

Merci également aux membres du comité de suivi de cette thèse pour leurs précieux conseils au cours de nos deux points d'étape : Mme Laurence LIAUBET, Mme Cécile MARTIN, Mme Nathalie VIALANEIX et M. Martin BEAUMONT.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué à ce projet de l'élevage des animaux à l'Unité Expérimentale P3R, notamment M. Didier MARCON, aux prélèvements, en particulier Mme Christel MARIE-ETANCELIN et M. Jean-Louis WEISBECKER, et à l'analyse des échantillons : Mme Marie-Luce CHEMIT, M. Yves FARIZON, Mme Nathalie MARTY-GASSET. Je tiens également à remercier Mme Susana ALVES et M. Rui BESSA pour leur accueil très chaleureux à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Lisbonne et leurs précieux conseils. Merci à M. Francis ENJALBERT pour nos discussions toujours enrichissantes et vos recommandations avisées. Merci à Mmes Nathalie PRIYMENKO, Djamila LEKHAL et Louna ROSELL ainsi qu'à mes parents pour leur relecture que ce soit du fond ou de la forme de ce manuscrit.

Merci à ma famille. Promis, bientôt, j'arrête d'être étudiant.

Merci enfin à tous les copains, qu'ils soient de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse ou de l'INRAE pour leur soutien inconditionnel.

Table des Matières

Remerciements	IV
Liste des abréviations	IX
Liste des Figures et Tableaux	XIII
Introduction Générale.....	1
Partie I. Etude Bibliographique	4
Chapitre 1. L'efficience alimentaire.....	4
1. Définir l'efficience alimentaire.	4
a) Définition des objectifs et produits attendus	4
b) Détermination de l'ingestion	5
c) Les différents indices d'efficience alimentaire	8
2. Facteurs de variation de l'efficience alimentaire	12
a) Facteurs extrinsèques et efficience alimentaire.....	12
b) Facteurs liés à l'animal et efficience alimentaire	14
3. Principaux éléments expliquant la variabilité interindividuelle d'efficience alimentaire.....	18
Chapitre 2. : Efficacité digestive, implication de la communauté microbienne et de son activité dans l'efficience alimentaire	21
1. Part de l'efficacité digestive dans l'efficience alimentaire	21
2. Modifications du tube digestif et efficience alimentaire	23
a) Volume du tube digestif et efficience alimentaire	24
b) Histologie	25
3. Modifications de la communauté microbienne ruminale et efficience alimentaire .	26
a) Le microbiote ruminal	26
b) Méthodes d'étude du microbiote ruminal	28
c) Effets de la diversité microbienne sur l'efficience alimentaire chez les ruminants.	

d)	Micro-organismes identifiés comme ayant un lien avec l'efficacité alimentaire.	
		33
4.	Activités microbiennes et leur potentiel impact sur l'efficacité alimentaire.....	42
a)	Catabolisme des glucides au sein du rumen et synthèse préférentielle d'AGV.	42
b)	Méthanogénèse et efficacité alimentaire	46
c)	Acides gras longs, efficacité alimentaire et lien avec le métabolisme de l'hôte	48
Chapitre 3. Mécanismes métaboliques de l'hôte associés avec l'efficacité alimentaire ..		53
1.	Production de chaleur et efficacité alimentaire	53
2.	Activité des animaux et efficacité alimentaire	54
a)	Activité.....	54
b)	Comportement alimentaire	55
c)	Extra-chaleur et ingestion.....	56
3.	Processus systémiques.....	57
a)	Battements cardiaques.....	57
b)	Hormones	57
c)	Composition corporelle	60
4.	Processus cellulaires.....	61
a)	Turnover protéique	61
b)	Cycle de l'urée	63
c)	La chaîne de phosphorylation oxydative.....	64
Conclusion et objectifs de la thèse		69
Partie II. : Etude expérimentale		71
Chapitre 1. Construction du dispositif expérimental.....		72
1.	Initiation des lignées.....	72
2.	Mise en place du dispositif expérimental.....	73
3.	Régimes	75
4.	Matériel et Méthodes.....	75

a)	Prélèvements	75
b)	Analyse de la communauté microbienne ruminale par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ou l'ARNr 18S.....	77
c)	Analyse des AGV par CPG	82
d)	Analyse des acides gras longs par chromatographie en phase gazeuse	82
e)	Traitement des données compositionnelles issues de l'analyse des AGV et des AG longs et des séquençages microbiens.	83
f)	Analyse en spectrométrie RMN des métabolomes ruminal et plasmatique.....	86
g)	Statistiques	91
Chapitre 2.	Existe-t-il des liens directs entre la communauté microbienne des agneaux et leur efficacité alimentaire ?	95
1.	Associations entre les procaryotes du rumen et leur activité et l'efficacité alimentaire	96
2.	Association entre les eucaryotes du rumen et l'efficacité alimentaire	140
a)	Introduction	140
b)	Matériel et méthodes spécifiques	140
c)	Résultats	141
d)	Discussion	152
e)	Conclusion.....	154
Chapitre 3.	Le profil en Acides Gras Longs du rumen est-il lié aux phénotypes d'ingestion, de croissance et d'efficacité alimentaire chez les ovins Romane mâles ?.....	155
1.	Associations entre les profils des acides gras longs ruminiaux et l'efficacité alimentaire.....	156
2.	Corrélations entre les phénotypes impliqués dans le calcul de la consommation résiduelle et les profils d'acides gras ruminiaux.	185
a)	Introduction.....	185
b)	Matériel et méthodes spécifiques.....	185
c)	Résultats	186

d) Discussion	186
Chapitre 4. Liens entre l'efficacité alimentaire et le métabolome des ovins : étude par résonance magnétique des métabolites ruminiaux et plasmatiques.....	188
Discussion Générale :.....	220
Bibliographie Générale :	231
Liste des publications et communications :.....	276
Annexes :.....	279
Résumé :.....	288
Abstract	290

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

ACTH : Adrénocorticotrophine

ADF : Acid Detergent Fiber

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AGV : Acides Gras Volatils

AG : Acides gras (longs)

ALR : Additive Log-Ratio

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

AUROC : Aire sous la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic)

BHB : Bêta-hydroxybutyrate

BHT : Butylated hydroxytoluen

CH₄ : Méthane

CLA : Acide Linoléique Conjugués

CLR : Centered Log-Ratio

CO₂ : Dioxyde de Carbone

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

$\delta^{15}\text{N}$: Abondance relative de l'isotope ¹⁵N

DES : Diéthylstilbestrol

EM : Énergie Métabolisable

EMAG : Esters Méthyliques d'Acides Gras

FAO : Food and Agriculture Organization

FCE : Feed Conversion Efficiency (1/FCR)

FCR : Feed Conversion Ratio

GBM : Geometric Bayesian-Multiplicative replacement

GH : hormone de croissance, somatotrophine

GMQ : Gain Moyen Quotidien

GSPHx : Glutathion Peroxydase

GWAS : Genome-Wide Association Study

H₂ : Dihydrogène

IGF-1 : Insulin-like growth factor 1

ILR : Isometric Log-Ratio

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INRAE : Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

3MH : 3-méthylhistidine

MB : Matière brute

MSI : Matière Sèche Ingérée

mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères

NDF : Neutral Detergent Fiber

NPY : Neuropeptide Y

NRC : National Research Council

OTU : Operational Taxonomy Unit

PCoA: Analyse en coordonnées principales

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLS-DA : Partial Least-Squares Discriminant Analysis

RFI : Residual Feed Intake (consommation résiduelle)

RG : Residual Gain

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROC : Receiver Operating Characteristic

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SNP : Polymorphisme mononucléotidique

SOD : Superoxyde Dismutase

TSP : Trimethylsilylpropanoic acid

UCP : Uncoupling Protein (protéine découplante)

VIP : Variable Importance in Projection

Liste des Figures et Tableaux

Figure Introduction.1 : Triangle de la performance, d'après Gibert (1980).	2
Figure I.1.1 : Partitionnement de l'énergie brute ingérée chez les ruminants, d'après McDonald (2011).	5
Figure I.1.2 : Cinq processus majeurs en lien avec l'efficacité alimentaire chez l'animal en croissance développés par Herd et al. (2004).	18
Figure I.2.1 : Dissimilarités entre les communautés microbiennes identifiées dans divers segments digestifs chez des ovins adultes à partir d'une analyse canonique des composantes principales (d'après Douglas et al. 2016).	27
Figure I.2.2 : Illustration de l'importance de la taille d'échantillon sur la distance de Bray-Curtis entre différents échantillons (A à D), au-dessus de la diagonale les distances pour des échantillons de tailles similaires, en-dessous de la diagonale les distances entre ces mêmes communautés lorsque les échantillons A et C ont des profondeurs de séquençage 5 fois plus élevées.	32
Figure I.2.3 : Synthèses d'AGV au sein du rumen et bilans (Sauvant et al. 2011, Baldwin et al. 2017).	43
Figure I.2.4: Résumé des principaux facteurs qui pourraient expliquer l'efficacité alimentaire en lien avec l'efficacité digestive. Les flèches vertes et rouges témoignent d'une association positive ou négative entre déterminants. Ainsi, l'augmentation de la digestibilité apparente de la ration et la diminution des rejets gazeux sont tous deux des déterminants de l'efficacité alimentaire mais il existe un antagonisme entre eux. Les points d'interrogation représentent un manque de données dans la littérature.	52
Figure I.3.1 : Schéma simplifié des processus mitochondriaux aboutissant à la production d'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative.	65
Figure I.3.2 : Schéma récapitulatif des principales explications avancées dans la littérature pour expliquer la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire que ce soit au niveau digestif ou au niveau métabolique avec les potentielles interactions entre ces deux phénomènes. Les flèches vertes et rouges représentent des relations positives ou négatives entre les déterminants de l'efficacité alimentaire présentés. Les étoiles violettes représentent l'efficacité mitochondriale qui peut être évaluée dans de multiples tissus. Les points d'interrogation représentent un manque de données dans la littérature.	68
Figure II.0.1 : Résumé des analyses réalisées dans cette partie expérimentale.	71

Figure II.1.1 : Schéma du dispositif expérimental. Les phases notées «Prépa »sont les phases d'habituations au nouvel aliment. Les astérisques représentent les absences de mise à jeun des animaux et la boîte rouge un épisode d'acidose ayant occasionné un report du chantier de prélèvements.....	73
Figure II 1.2 : Représentation schématique des processus d'amplification en pont et de séquençage des clusters sur une cellule de flux.	78
Figure II.1.3: Illustration de l'incohérence des corrélations lors de la manipulation de données compositionnelles. Le chercheur A et le chercheur B ont les mêmes échantillons et réalisent une analyse des corrélations entre la partie animale (en rouge) et la partie végétale (en vert) soit en déshydratant (chercheur B), soit en ne déshydratant pas (chercheur A) les échantillons. ..	84
Figure II.1.4 : Représentation schématique d'une partie du spectre de l'acide isovalérique. ...	88
Figure II.1.5 : Alignement progressif du spectre d'un métabolite M appartenant au spectre complexe d'un échantillon au spectre de référence du métabolite M, d'après Lefort et al. (2021).	90
Figure II.1.6: Analyse en composante principale des genres microbiens obtenues par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S à partir des prélèvements sur les animaux recevant le régime CONC avant (A) et après (B) transformation CLR mettant en évidence un effet fort de l'année de prélèvement.....	91
Figure II.1.7 : Illustration de l'approche PLS-DA et de la détermination du meilleur modèle par AUROC.....	93
Figure II.2.1 : Sample processing from collection to creation of genus abundance tables. Samples from 2018 and 2019 were analyzed in the same sequencing run but extraction was performed in four plates and samples from 2020 were analyzed in a second run and separated in two plates. In the 2019 CONC phase and during the fall period of the 2018 MIX phase feeders were not stopped prior to sampling (indicated in red).	102
Figure II.2.2: Percentages and numbers of animals from each line (rfi- and rfi+ in gold and blue respectively) belonging to each phenotypic group pRFI+ and pRFI- or to the intermediate group in each of the phases: A. CONC phase, B. MIX phase.....	106
Figure II.2.3: Phenotypic RFI in phases CONC/MIX of animals belonging to each of the four efficiency groups. Group A= Inefficient/Inefficient, Group B= Inefficient/Efficient, Group C= Efficient/Efficient and Group D=Efficient/Inefficient.	106

Figure II.2.4 : Main phyla identified in CONC samples (A) and MIX samples (B) after filtering. On the left, the two main phyla Bacteroidetes and Firmicutes and, on the right, the proportions of the other phyla. 108

Figure II.2.5 : Description of the global balances of rumen microbial genera for genetic lines (A) and phenotypic groups of efficiency (B). Efficient animals (line rfi- and pRFI-c group) and inefficient animals (rfi+ and pRFI+c) are represented in gold and blue respectively. Genera that are common to both discrimination of efficiency lines and phenotypic groups are highlighted in gold and blue for efficient and inefficient groups respectively..... 109

Figure II.2.6 : Rumen microbial genera associated with the same group either genetic or phenotypic in several years according to selbal analyses within years. 110

Figure II.2.7 : Description of the global balances of rumen microbial genera for genetic lines (A) and phenotypic groups of efficiency (B). Line rfi+ and pRFI+m group are represented in blue while line rfi- and pRFI-m group are represented in gold. Genera that are common to both discrimination of efficiency lines and phenotypic groups are highlighted in gold and blue for efficient and inefficient groups respectively..... 112

Figure II.2.8 : Graphical output of the two first components of the Multilevel PLS-DA of rumen microbial compositions discriminating the four groups of phenotypic efficiency: A=pRFI+c/pRFI+m ; B=pRFI+c/pRFI-m ; C=pRFI-c/pRFI-m ; D=pRFI-c/pRFI+m. Each of the 163 animals was sequenced twice which was considered as repeated measures in the multilevel design 114

Figure II.2.9 : Average ratio of Aitchison distances between the microbial composition of a sample in phase CONC and that of the sample from the same animal in phase MIX and the average distance of the sample in phase CONC with all samples in phase MIX in the four groups of phenotypic efficiency: A=pRFI+c/pRFI+m ; B=pRFI+c/pRFI-m ; C=pRFI-c/pRFI-m ; D=pRFI-c/pRFI+m. 115

Figure II.2.10 : Volatile Fatty Acid profiles in ruminal fluid samples during phase CONC and MIX expressed as percentages of the total VFA concentration. 116

Figure II.2 S1: Graphical output of the two first components of the PCA in both phase CONC (on the left) and phase MIX (on the right) to identify the main experimental factors responsible for a large part of the variance in either the CONC or the MIX microbiota datasets.	132
Figure II.2.S2: Correlations between microbial genera and volatile fatty acids in phase CONC (A) and phase MIX (B) with a minimum threshold set to 0.3.....	137
Figure II.2.S3: Main correlations between genera and VFA in CONC phase. Genera that have been identified as associated with efficient animals or inefficient animals in their respective years are represented in gold and blue respectively. Genera were kept if they were significantly correlated with at least one VFA with an absolute correlation higher than 0.4.	138
Figure II.2.S4 : Main correlations between genera and VFA in MIX phase. Genera were kept if they were significantly correlated with at least one VFA with an absolute correlation higher than 0.4. No genus previously identified as associated with phenotypically efficient or inefficient animals was correlated with VFA.	139
Figure II.2.11 : Profondeur de séquençage obtenue après amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 18S (en noir) ou pour l'ARNr 16S (en blanc) des échantillons de fluide ruminal prélevés en phase CONC en 2018, 2019 et 2020. Le séquençage des échantillons de 2018 et 2019 a été réalisé simultanément tandis que les échantillons de 2020 ont été traités séparément.	142
Figure II.2.12:Prévalences et abondances relatives des différents genres appartenant au règne des Chromoalveolata et identifiés par séquençage d'échantillons de fluide ruminal prélevés en 2018, 2019 et 2020 lors de la phase CONC. Le séquençage des échantillons de 2018 et 2019 a été réalisé simultanément tandis que le séquençage des échantillons de 2020 a été réalisé séparément.....	143
Figure II.2.13: Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des lignées génétiques en phase CONC estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).	144
Figure II.2.14 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des groupes phénotypiques en phase CONC estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).	146

Figure II.2.15 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des lignées génétiques en phase MIX estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (Selbal) (à droite).....	148
Figure II.2.16 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des groupes phénotypiques en phase MIX estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).	150
Figure II.3.1 : T-Stochastic Neighbor Embedding illustrating diet and year effects on fatty acid profiles.....	164
Figure II.3.2 : Fatty acid (FA) profile in phase CONC : A. Proportions of the main saturated FA ; B. Other FA identified by gas chromatography grouped by categories: OBCFA = Odd and Branched-Chain Fatty Acids, Even SFA = Even Saturated Fatty Acids other than C16:0 and C18:0, LA = Linoleic Acid, CLA = Conjugated Linoleic Acids, ALA = Alpha Linolenic Acid, DMA = Dimethylacetals issued from methylation of aldehydes, Others = Phytanoic acid, C20:1, C24:1, oxo-C18:0, cyclo-C17:0.	165
Figure II.3.3 : Best FA to discriminate lines using either selbal (A) or Variable Importance in Projection (VIP) of the best PLS-DA (B) and best FA to discriminate phenotypic efficiency groups using either selbal (C) or VIP (D) in phase CONC.....	166
Figure II.3.4 : Main relationships between rumen microbial genera and rumen fatty acids in phase CONC evidenced by a sparse PLS approach.	169
Figure II.3.5 : Summary of the main correlations between rumen prokaryotic genera and rumen C16 and C18 biohydrogenation intermediates.	171
Figure II.3.6 : Summary of the main correlations between rumen prokaryotic genera and microbial lipids (DMA and OBCFA) during the CONC phase.	172
Figure II.3.7 : Fatty acid (FA) profile in phase MIX : A. Proportions of the main saturated FA ; B. Other FA identified by gas chromatography grouped by categories: OBCFA = Odd and Branched-Chain Fatty Acids, Even SFA = Even Saturated Fatty Acids other than C16:0 and C18:0, LA = Linoleic Acid, CLA = Conjugated Linoleic Acids, ALA = Alpha Linolenic Acid, DMA = Dimethylacetals issued from methylation of aldehydes, DMA C26:0 and 28:0 deriving from Dactylis aldehydes, Others = Phytanoic acid, C20:1, C24:1, oxo-C18:0, cyclo-C17:0.	173
Figure II.3.8 : Best FA to discriminate lines using either selbal (A) or Variable Importance in Projection (VIP) of the best PLS-DA (B) and best FA to discriminate phenotypic efficiency groups using either selbal (C) or VIP (D) in phase MIX.	174

Figure II.3.9 : PLS loadings and network evaluating the structure of associations between phenotypes and fatty acids variables. The cutoff threshold was set to 0.25 to extract relevant associations.....	175
Figure II 3.S1 : Principal component analysis of fatty acid profiles in phase CONC (orange) and MIX (green) and main fatty acids involved in the separation of phases evidence by the correlation circle plot on the first component (cutoff = 0.85).....	183
Figure II.3.S1 : Correlations between rumen prokaryotic genera and rumen fatty acids during the CONC phase in 2018 (A), 2019 (B) and 2020 (C). Only correlations with absolute values higher than 0.65 are shown.....	184
Figure II.3.10 : Poster présenté à l’EAAP 2022.....	187
Figure II.4.1 : Results from the PLS-DA of the plasma metabolites measured during the CONC phase according to the rfi divergent genetic line of lambs (n = 133 rfi- and n = 142 rfi+). (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; red line marks the maximum AUROC value obtained with 8 components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values of each metabolite on the first component of the PLS-DA model; in gold and blue, metabolites associated with line rfi- and line rfi+, respectively.	195
Figure II.4.2 : Correlation matrix of metabolites measured during the CONC phase in plasma (above the diagonal) and rumen (below the diagonal). Correlations of a metabolite between the two biological fluids are given on the diagonal. Gray squares correspond to non-existing correlations. White squares are non-significant correlations after Benjamini–Hochberg adjustment of p-values.....	196
Figure II.4.3 : Results of the PLS-DA of the plasma metabolites measured during the MIX phase according to the rfi divergent genetic line of lambs (n = 133 rfi- and n = 142 rfi+). (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; the red line marks the maximum AUROC value obtained with nine components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values assigned to each metabolite on the first component of the PLS-DA model; in gold and blue, metabolites associated with line rfi- and line rfi+, respectively.	197

Figure II.4.4 : Correlation matrix of metabolites measured during the MIX phase in plasma (above the diagonal) and rumen (below the diagonal). Correlations of a metabolite between the two biological fluids are given on the diagonal. Gray squares correspond to non-existing correlations. White squares are non-significant correlations after Benjamini–Hochberg adjustment of p-values..... 198

Figure II.4.5 : Summary of plasma metabolite correlations. Significant correlations higher than 0.5 in absolute values specifically in the CONC phase, the MIX phase, or under both diets are represented in orange, green, and purple, respectively. Negative correlations are marked by dashed lines and positive correlations are marked by solid lines..... 199

Figure II.4.6 : Summary of metabolites found to be associated with genetic lines or phenotypic RFI groups. Gold circles and blue circles indicate that metabolites were associated with line rfi- and line rfi+, respectively. Gray circles indicate that the metabolites were not identified in our study. Green circles indicate that the metabolites were identified but not significantly associated with either of the lines. Gold and blue backgrounds represent the association between a metabolite and rfi- or rfi+ phenotypic groups, respectively. Dashed lines represent several reactions in a pathway. Dotted lines represent potentially reversible reactions..... 204

Figure II.4.7 : Experimental design. Periods marked in red indicate that the feeders were not stopped prior to sampling. * Concentrate and forage distributed as a TMR through forage feeders only..... 208

Figure II.4.S1 : Discriminant analysis of the plasma metabolites measured during the CONC phase according to phenotypic RFI groups. Efficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between -328 and -75 g/day and inefficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between 75 and 546 g/day. (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; red line marks the maximum AUROC value obtained with 11 components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values assigned to each

metabolite on the first component of the PLS-DA model; gold and blue represent metabolites associated with efficient and inefficient animals, respectively.	219
Figure Discussion 1 : Lien entre la concentration en AGV totaux et le temps écoulé entre le dernier repas de plus de 200g et le prélèvement lors de la phase CONC.	221
Figure Discussion 2 : Analyse en composantes principales des OTUs obtenues par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S en phase CONC en 2018 (rouge), 2019 (bleu) et 2020 (vert).	225

Tableau I.1.1 : Variabilité de l'ingestion chez les ovins nourris avec des régimes riches en concentrés.....	8
Tableau I.2.1 : Associations rapportées dans la littérature entre l'efficacité alimentaire et les bactéries du phylum Firmicutes, p=Phylum, c=classe, o=ordre, f=famille, g=genre, s=espèce ; CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés.X-/X+ : X études ayant rapporté le taxon relativement plus abondant chez les efficaces (-) ou inefficaces (+) respectivement. Lorsque le taxon a été rapporté relativement plus abondant uniquement chez les animaux efficaces ou inefficaces il apparaît en jaune ou en bleu, respectivement. Lorsqu'au sein d'un même type de ration des associations contraires ont été rapportées il apparaît en vert.	37
Tableau I.2.2 : Associations rapportées dans la littérature entre l'efficacité alimentaire et les bactéries des phyla Fibrobacter, Bacteroidetes, Proteobacteria et Spirochaetes, p=Phylum, c=classe, o=ordre, f=famille, g=genre, s=espèce ; CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés.X-/X+ : X études ayant rapporté le taxon relativement plus abondant chez les efficaces (-) ou inefficaces (+) respectivement. Lorsque le taxon a été rapporté relativement plus abondant uniquement chez les animaux efficaces ou inefficaces il apparaît en jaune ou en bleu, respectivement. Lorsqu'au sein d'un même type de ration des associations contraires ont été rapportées il apparaît en vert.	38
Tableau II.1.1 : Composition des aliments distribués au cours des deux phases. C1= concentré de la phase CONC, C2= concentré de la phase MIX, F=fourrage de la phase MIX.	75
Tableau II.2.1 : Number of genera that were kept in the groups of taxa that formed the global balance between lines (rfi- and rfi+) or phenotypic groups (pRFI-c and pRFI+c) within each year and common genera for efficient (-) and inefficient (+) lambs.	110
Tableau II.2.2 : Relative abundances of rumen microbial genera (with prevalence >70%) differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in phase CONC. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR. Mean relative abundances (SD) are indicated instead of CLR-transformed abundances for a matter of clarity.....	111
Tableau II.2.3 : Relative abundances of rumen microbial genera (with prevalence >70%) differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in phase MIX. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data	

corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR. Mean relative abundances (SD) are indicated instead of CLR-transformed abundances for a matter of clarity.....	113
Tableau II.2.S1: Chemical composition of feed ingredients in the different diets/ C1 = fiber-rich concentrate distributed in phase CONC, C2 = concentrate distributed in phase MIX, F=dactylis hay distributed in phase MIX.	132
Tableau II.2.S2 : Relative abundances of all genera that were or tended to be differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in the CONC phase. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR.....	133
Tableau II.2.S3 : Relative abundances of all genera that were or tended to be differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in the MIX phase. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR.....	134
Tableau II.2.4 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les lignées génétiques d'efficience alimentaire en phase CONC. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans la lignée rfi- ou dans la lignée rfi+, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.....	145
Tableau II.2.5 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les groupes phénotypiques d'efficience alimentaire. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans le groupe pRFI _{-C} ou dans le groupe pRFI _{+C} , ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.....	147
Tableau II.2.6 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les lignées génétiques d'efficience alimentaire lors de la phase MIX. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans la lignée rfi- ou dans la lignée rfi+, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.....	149
Tableau II.2.7 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les groupes phénotypiques d'efficience alimentaire lors de la phase MIX. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans le groupe pRFI _{-M} ou dans le groupe pRFI _{+M} , ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.	151

Tableau II.3.1 : Chemical composition of orchard hay used in the different periods of the MIX phase.	159
Tableau II.3.2 : Fatty acid composition of concentrates and forages from CONC and MIX phases obtained through gas chromatography analysis.	163
Tableau II.3.3 : Summary of multivariate analyses discriminating genetic lines (L) or phenotypic efficiency groups (P) in both CONC and MIX phase. When associated with either line rfi- or pRFI- groups by selbal the fatty acid is highlighted in gold; when associated with either line rfi+ or pRFI+ group by selbal the fatty acid is highlighted in blue	167
Tableau II.3.4 : Main correlations between microbial genera and fatty acids in every sampling period of phase MIX (absolute value > 0,65, p<0,05 after FDR-adjustment).	176
Tableau II.4.1 : Descriptive statistics of phenotypes during CONC (A) and MIX (B) phases, and estimation of the divergent line effect.	191
Tableau II.4.2 : Number of lambs in each phenotypic class in the CONC phase according to their genetic line.	193
Tableau II.4.3 : Number of lambs in each phenotypic class in phase MIX according to their genetic line.	194
Tableau II.4.S1 : Metabolites identified and quantified in the four biological fluid × diet combinations. For each metabolite, the number of samples in which it has been identified is expressed followed by the prevalence percentage between parentheses.	217

Annexe 1 : Récapitulatif des études menées liant l'efficacité alimentaire et les bactéries ruminales utilisées pour le Tableau I.2.1. et le Tableau I.2.2. Les régimes ont été classés en trois catégories selon la proportion de fourrages et de concentrés : CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés. ANCOM = Analysis of Compositions of Microbiomes, ANOVA = Analysis of Variance, FDR= False Discovery Rate, GLM = Generalized Linear Model, LDA = Linear Discriminant Analysis, PERMANOVA = Permutational Analysis of Variance..... 277

Annexe 2 : Protocole d'extraction et d'amplification de l'ADN. 278

Annexe 3 : Analyse chromatographique des acides gras volatils issus de prélèvements de contenu liquide ruminal..... 280

Annexe 4 : Analyse chromatographique des esters méthyliques d'acides gras issus de la méthylation des acides gras du contenu liquide ruminal..... 282

Annexe 5 : Préparation des échantillons de plasma et de contenu ruminal pour analyse par spectrométrie RMN et paramètres d'acquisition des spectres. 285

Introduction Générale

L'efficacité alimentaire s'est imposée dans les 50 dernières années comme un des axes majeurs de réduction des coûts d'élevage par optimisation de la production. Cette optimisation a aussi un intérêt sur le plan environnemental que ce soit en limitant l'éruclation de méthane et de dioxyde de carbone chez les ruminants ou l'excrétion fécale ou urinaire d'éléments potentiellement polluants par les animaux de rente. Ces enjeux économiques et écologiques sont renforcés par l'augmentation des besoins en denrées d'origine animale liée à la croissance démographique mondiale importante, à peine contrebalancée par la réduction de la consommation de produits animaux dans les sociétés occidentales. En effet, à l'horizon 2050, la population mondiale devrait atteindre les 9,7 milliards d'individus d'après l'United States Census Bureau et l'émergence de la classe moyenne dans les pays en développement, notamment la Chine, résulte en un besoin grandissant de viande et de produits laitiers (Alexandratos, 2012; Bruinsma, 2009; United States Census Bureau, 2020).

Au sens strict, l'efficacité alimentaire est liée à la capacité à atteindre des objectifs sans considération des moyens mis en place tandis que l'efficience alimentaire, terme assez peu usité en français bien qu'étant la traduction littérale de la « feed efficiency » très utilisée dans les pays anglophones, consiste à mettre en relation les résultats et les ressources utilisées. À un niveau de performance identique, l'animal le plus efficace est celui qui utilise le moins de ressources.

Ces éléments d'objectifs, de résultats et de ressources sont les trois sommets du « triangle de la performance » développé par Gibert en 1980 (Figure Introduction 1) souvent utilisé en gestion d'entreprise pour assurer la rentabilité d'un système (Gibert, 1980). La rentabilité d'un système dépend à la fois des intrants et des produits. Ces trois sommets sont reliés par des axes caractérisant respectivement l'efficacité d'un système, c'est-à-dire sa capacité à répondre aux objectifs prédéfinis, son efficience, c'est-à-dire sa capacité à produire des résultats en regard des ressources consommées, et sa pertinence, c'est-à-dire sa capacité à utiliser les bonnes ressources pour atteindre un objectif.

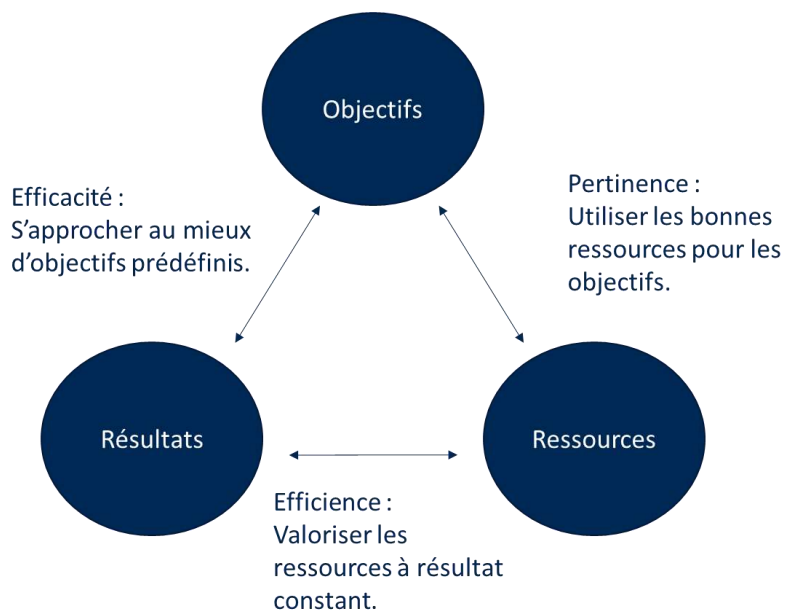


Figure Introduction.1 : Triangle de la performance, d'après Gibert (1980).

Si l'on transpose ces éléments à la production animale, l'efficacité se caractérise par la mesure de phénotypes d'intérêt en regard des objectifs de production, l'efficience par la comparaison entre les phénotypes et la consommation et la pertinence par l'adéquation entre l'alimentation (et les conditions environnementales) et les objectifs attendus.

Au cours du dernier siècle, les animaux ont été sélectionnés pour des critères de production laitière ou de croissance, donc sur des critères d'efficacité. Chez les ruminants, cette sélection a conduit en parallèle à une augmentation de la capacité d'ingestion dépendante du potentiel de production de l'animal mais s'est assez peu concentrée sur les coûts générés par cette augmentation de consommation ou par son impact environnemental (INRA, 2018). De plus, bien que les ruminants soient capables de valoriser des sources alimentaires non valorisables par l'homme, il subsiste une compétition entre les élevages bovins et ovins intensifs et l'alimentation humaine pour les céréales et dans une moindre mesure pour certaines graines oléagineuses (soja, colza, lin) ou protéagineuses (pois, féverole, lupins). Une sélection sur les performances peut être responsable d'une augmentation des coûts car l'augmentation des ressources consommées par un animal n'est pas proportionnelle à l'augmentation de ses performances. En effet, l'animal est un système thermodynamique complexe et les relations entre la production et les pertes ne sont pas nécessairement linéaires. On distingue classiquement le besoin d'un animal en deux sous-parties que sont son besoin d'entretien et son

besoin de production et on considère efficient un animal qui à ressources égales alloue une part plus importante de ses apports à la production ou qui à production égale a des besoins d'entretien réduits. L'efficacité alimentaire, bien qu'étudiée depuis près de 50 ans, est encore assez incomprise.

Dans ce travail de thèse, il s'agira dans une première partie de retracer l'évolution des concepts associés à l'efficacité alimentaire ainsi que les différentes pistes envisagées ou développées par nos prédécesseurs pour la définir et en comprendre les variabilités interindividuelles en nous concentrant plus particulièrement sur les ruminants. En effet, ces derniers partagent des caractéristiques digestives et métaboliques qui les différencient des autres espèces de rente ayant fait l'objet d'études concernant l'efficacité alimentaire. Nous nous placerons ensuite à l'interface animal-aliment dans l'objectif d'appréhender ce qui, dans l'efficacité digestive, explique les variations d'efficacité alimentaire avant d'aborder les phénomènes métaboliques intrinsèques de l'animal pouvant le rendre plus ou moins efficient.

Dans une deuxième partie, les potentiels déterminants biologiques de l'efficacité alimentaire seront explorés sur des ovins mâles de race Romane appartenant à des lignées sélectionnées de façon divergente pour l'efficacité alimentaire. Nous analyserons l'efficacité phénotypique de ces animaux au regard de leur appartenance à l'une ou l'autre des lignées sous deux régimes différents, représentatifs de rations distribuées à des ovins en croissance. Par l'étude de la communauté microbienne ruminale et des produits issus de son activité, nous nous concentrerons sur la valence digestive associée à l'efficacité alimentaire et par analyse du métabolome plasmatique nous nous intéresserons à la part de l'efficacité alimentaire liée au métabolisme de l'hôte et à l'interaction hôte-microbiote.

Enfin, nous conclurons sur les apports de l'étude du microbiote ruminal et des métabolites ruminants et plasmatiques à la compréhension des phénomènes biologiques sous-jacents à l'efficacité alimentaire. Une meilleure compréhension des mécanismes complexes à l'origine de la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire permettrait de mieux relier la génétique des animaux à leur phénotype et d'ainsi améliorer la sélection sur ce caractère en ovins allaitants.

Partie I. Etude Bibliographique

Chapitre 1. L'efficacité alimentaire

1. Définir l'efficacité alimentaire.

a) Définition des objectifs et produits attendus

Efficacité et efficacité alimentaire ont en commun qu'elles nécessitent une mesure objective des performances de l'animal, dans un cas pour les mettre en regard de l'objectif poursuivi, dans l'autre pour les relativiser par rapport aux ressources consommées pour les obtenir. De moins en moins d'animaux sont utilisés pour leur production de travail ou de laine et, dans la plupart des cas, la performance recherchée est liée à la production de denrées alimentaires (Matika et al., 2013).

On considèrera différemment un animal destiné à la production laitière et un animal destiné à la production bouchère. Dans le premier cas, on cherchera à avoir un animal qui valorise aisément son alimentation et la mobilisation de ses réserves pendant la lactation et capable de reconstituer rentablement ses réserves sur la fin de lactation et pendant le tarissement. Dans le second, on cherchera à avoir la meilleure production de viande pour un minimum d'ingéré. Pour considérer l'efficacité globale du système allaitant, il faudrait néanmoins prendre en compte l'efficacité des femelles allaitantes qui constituent une des dépenses majeures du troupeau puisque restant plus longtemps dans l'élevage et dont les performances sont liées non seulement à leur production bouchère mais également à leur intervalle entre mises bas successives, leur prolificité et à la survie de leur progéniture.

Il conviendra donc de définir les objectifs de production attendus convenablement pour discuter de l'efficacité des animaux. Pour ce qui est de l'efficacité, il s'agira de mettre en regard les résultats zootechniques avec la ressource consommée, la plupart du temps mesurée en quantité de matière sèche ingérée (MSI) et parfois représentée par une quantité d'énergie ingérée.

b) Détermination de l'ingestion

i. Définition de l'ingéré

La mesure d'ingestion la plus communément admise est la quantité de MSI. Pour les comparaisons entre études, il est nécessaire d'exprimer l'ingestion en ces termes ou de renseigner la matière sèche de l'aliment utilisé puisque la quantité de matière brute (MB) ingérée, seule, est assez peu informative. En effet, entre un concentré ou un foin dont la matière sèche (MS) avoisine les 85-90% et un ensilage ou de l'herbe, dont la MS varie entre 12 et 40% (selon la nature du fourrage, les modalités de récolte et de conservation), l'écart est assez important. Lorsque c'est la quantité d'énergie qui est utilisée comme mesure de l'ingestion il s'agit, dans la plupart des cas chez les monogastriques, d'énergie métabolisable c'est-à-dire de la part de l'énergie contenue dans l'aliment et absorbée après digestion à laquelle sont soustraites les pertes fécales représentant l'énergie non digestible et les pertes urinaires et par éructation représentant l'énergie non métabolisable (Figure I.1.1). Chez les ruminants, il s'agit généralement de l'énergie nette, c'est-à-dire l'énergie métabolisable non dissipée par extra-chaueur. Cette énergie nette sera orientée soit vers l'entretien, incluant les renouvellements tissulaires et la thermorégulation par exemple, soit vers la production, qu'elle soit laitière ou de tissus musculaires et adipeux (McDonald et al., 2011).

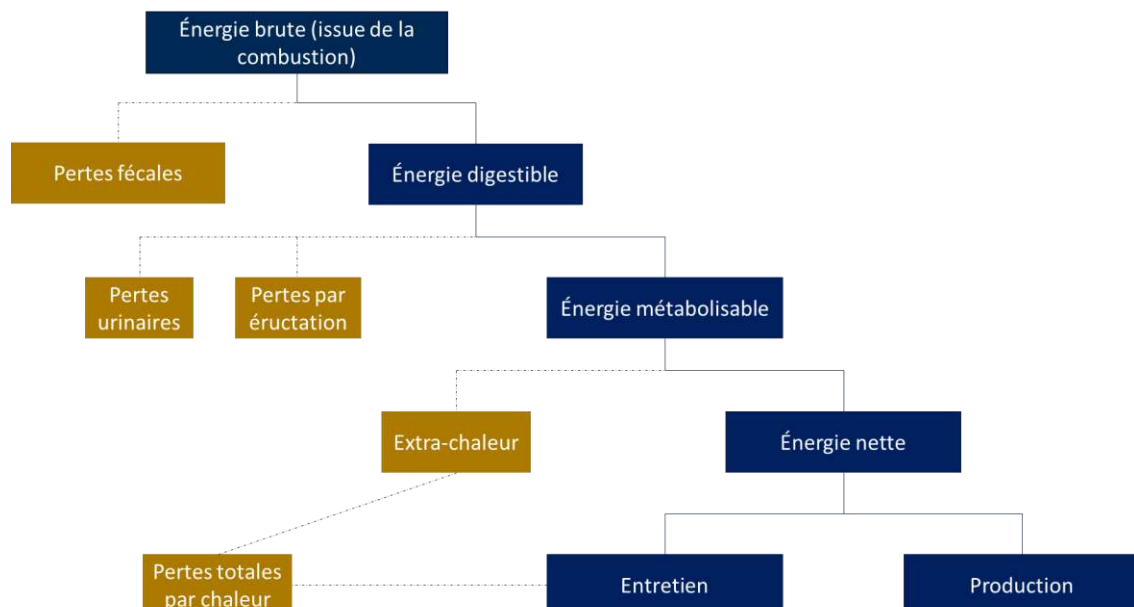


Figure I.1.1 : Partitionnement de l'énergie brute ingérée chez les ruminants, d'après McDonald (2011).

ii. La mesure de l'ingéré

La mesure de l'efficacité alimentaire dépend, tout d'abord, d'une mesure adéquate des quantités d'aliments ingérées, qu'il s'agisse de fourrages ou de concentrés. La mesure de l'ingéré peut se faire par différence entre les apports et les refus mais il est difficile, par cette approche, d'obtenir des valeurs individuelles d'ingestion. En effet, les animaux d'élevage sont, pour la plupart, des animaux sociaux, conduits en lots, et mangeant, pour certains, tout au long de la journée ce qui rend difficile l'établissement de repas individuels.

Dans de nombreux élevages de ruminants, en particulier de bovins, des dispositifs individuels et automatiques de distribution de concentrés sont mis en place. Ces dispositifs permettent une pesée dynamique. Chaque animal entrant dans le distributeur est identifié à l'aide d'une boucle ou d'un collier émetteurs et la quantité de concentrés consommée par l'animal au cours du repas est déduite de la pesée en entrée et de la pesée en sortie. L'estimation de la consommation de fourrages par des dispositifs similaires, utilisée dans l'expérimentation développée en Partie II, est plus complexe et peu utilisable en élevage commercial.

Quel que soit le dispositif de pesée, la quantité ingérée pâtera d'une incertitude liée au « gâchis » d'aliment, c'est-à-dire à la part d'aliment prélevée par l'animal mais non ingérée.

Des méthodes d'évaluation indirecte de la consommation de fourrage ont été proposées notamment pour l'estimation de la quantité d'herbe ingérée en pâture, difficilement mesurable directement. Une technique classique consiste à estimer la masse d'herbe ingérée par le différentiel de hauteur de la pâture à l'entrée et à la sortie du lot d'animaux. Cette méthode, comme la pesée d'herbe fauchée, ne permettent pas une estimation individuelle de l'ingéré.

Enfin il est possible d'approcher la quantité de MSI à partir de la concentration fécale d'un élément inerte administré qui permet de connaître l'excrétion fécale quotidienne et à partir de la digestibilité de l'aliment, qui doit être connue, de calculer l'ingestion (Bell et al., 1988).

À la fin des années 1980, Mayes et collaborateurs ont proposé la méthode des n-alcanes qui consiste à estimer la consommation de fourrage dans une ration mixte soit à partir d'un alcane supposé indigestible, soit à partir des concentrations d'une paire d'alcanes, l'un présent naturellement dans le fourrage (souvent un alcane à chaîne impaire) et l'autre synthétisé (à chaîne paire), de longueur similaire, présent en très faible quantité dans le fourrage et inclus en quantité connue dans la ration (Malossini et al., 1990; Mayes et al., 1986). Dans le premier cas, il s'agit de quantifier exactement la concentration de cet alcane dans les fèces et l'excrétion

fécale journalière afin d'obtenir la quantité d'alcane consommée et donc la quantité de fourrage consommée. Dans le second cas, il n'est pas nécessaire de connaître l'excrétion fécale mais seulement la concentration des deux alcanes. Une méta-analyse menée sur bovins et ovins a mis en évidence une corrélation forte (supérieure à 0,94) entre l'ingestion mesurée et l'ingestion prédite par la méthode des n-alcanes mais le fait que ces alcanes ne soient pas totalement récupérés dans les fèces dans l'intervalle de temps considéré et la lourdeur de la procédure rendent ces méthodes peu applicables en pratique (Andriarimalala et al., 2020).

En conclusion, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'ingestion des animaux. La méthode la plus directe et précise, sous réserve que les animaux ne parviennent pas à prélever l'aliment sans le consommer, est la pesée de concentrés et de fourrage, idéalement distribués séparément de manière à ce que l'ingestion massique soit un bon reflet de l'énergie et des nutriments ingérés. Cette méthode suppose que les animaux n'aient pas accès à de l'aliment en dehors des dispositifs de contrôle de l'ingestion.

iii. Facteurs de variation de l'ingestion volontaire

Le contrôle de l'ingestion alimentaire chez les ruminants est complexe, il intègre des processus de stimulation liés au statut énergétique de l'animal ainsi qu'à des variables sensorielles ou sociales et des processus inhibiteurs principalement liés à la distension du rumen (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2021).

La quantité d'aliment ingérée quotidiennement est essentiellement déterminée par le poids métabolique des animaux, c'est-à-dire leur poids élevé à la puissance 0,75 (Kleiber, 1961), et, lorsque les animaux sont en croissance, par leur gain moyen quotidien ainsi que par des facteurs alimentaires tels que la richesse en fibres de l'aliment, la nature et la digestibilité des fibres (Blaxter et al., 1961; Lewis & Emmans, 2010), la concentration en protéines, en matières grasses (Alba et al., 2021), la teneur en sucres ainsi que la qualité de conservation de l'aliment (Pulina et al., 2013). Pour un animal et un aliment donnés, les principaux autres facteurs de variation de l'ingestion volontaire sont environnementaux. Parmi ces facteurs on compte, en particulier, la température externe qui, au-delà de la zone de confort de l'animal, peut avoir un effet dépresseur de l'appétit.

Dans le cadre d'expérimentations encadrées et en intérieur, les facteurs propres à la nature des aliments et les facteurs environnementaux tels que la température sont communs à tous les

animaux. La variabilité génétique des animaux et les éventuelles interactions génétique/environnement, c'est-à-dire la façon qu'ont les animaux de supporter ou subir les contraintes environnementales, sont alors les principales sources de variation de l'ingestion volontaire (Marie-Etancelin et al., 2019).

Selon les études, la variation d'ingestion peut être exprimée en écart-type (SD), en erreur type de la moyenne (Standard Error of the Mean : SEM) ou en erreur standard de la différence des moyennes (Standard Error of the Difference between the means) quand plusieurs groupes sont comparés. Dans le tableau ci-dessous, les différents indicateurs de variation d'ingestion ont été convertis en SD pour que les études soient comparables (Tableau I.1.1).

Le coefficient de variation de l'ingestion volontaire des ovins pour des régimes riches en concentrés est similaire à celui obtenu chez des bovins : 14,5% dans la méta-analyse réalisée par Berry et Crowley sur les données d'ingestion de 2605 taureaux de différentes races ou 11,5% pour les 789 taurillons charolais de l'étude menée par Taussat et al. (Berry & Crowley, 2012; Taussat et al., 2020).

Tableau I.1.1 : Variabilité de l'ingestion chez les ovins nourris avec des régimes riches en concentrés.

Etude	Nombre d'animaux	SD (kg MS)	Moyenne (kg MS)	CV (%)
Giráldez et al 2021.	20 agneaux mâles Asaf (70j)	0,13	1,25	10,5
Ellison et al. 2019 *	32 agneaux femelles Targhee (âge non renseigné)	0,62	3,46	17,9
Marie-Etancelin et al. 2019 *	951 agneaux mâles Romane (100j)	0,25	1,96	12,6
Zhou et al. 2017	137 agneaux mâles Hu (115j)	0,18	1,22	14,8
Zhang et al. 2021	653 agneaux mâles Hu (180j)	0,21	1,51	13,9
Liang 2017	20 agneaux mâles Hu (âge non renseigné)	0,18	1,61	11,1

*Quantités en kg MB.

c) Les différents indices d'efficience alimentaire

Les indices d'efficience alimentaire visent à mettre en relation l'ingestion des animaux avec leurs performances (Yeaman et al., 2013). Dans le cas des animaux allaitants en croissance, deux catégories sont principalement utilisées : l'une basée sur les ratios entre l'ingéré et la production avec en particulier l'indice de conversion, l'autre basée sur des régressions linéaires de l'ingestion ou du croît.

i. Indice de conversion

L'indice de conversion, autrement appelé FCR pour Feed Conversion Ratio, est le quotient obtenu par la division de la quantité d'aliments ingérée quotidiennement par le GMQ. Cet indice (ou son inverse, parfois noté FCE pour Feed Conversion Efficiency) a très longtemps été considéré comme le critère de référence de l'efficacité alimentaire, en particulier pour les animaux en croissance pour lesquels le GMQ, en tant qu'indicateur de la quantité de tissus déposés, est fortement corrélé avec l'ingestion. Il demeure l'indice le plus utilisé dans les filières d'élevage car il est assez simple à comprendre et à calculer. Cependant, en recherche, de nombreuses remises en question ont émergé dès 1930.

En 1965, Sutherland a rapporté que dans la plupart des études qui utilisaient le FCR comme indicateur de l'efficacité alimentaire on observait une forte corrélation entre le GMQ et cet indice (Sutherland, 1965). Par ailleurs, calculer le FCR revient à calculer la pente k de l'équation : $MSI = k \times GMQ$ mais c'est potentiellement étendre la linéarité de la relation entre ces deux variables au-delà du raisonnable (Tanner, 1949). En effet, un GMQ nul ne correspond pas à une ingestion nulle puisque les besoins d'entretien doivent toujours être couverts et à GMQ faible le FCR tend très vite vers l'infini. Cela découle de l'absence de partitionnement entre les différents besoins dont les principaux sont le besoin d'entretien et le besoin de croissance pour les animaux jeunes.

Un moyen de partitionner les besoins d'entretien et de croissance est de soustraire à l'ingestion un ingestion théorique liée aux besoins d'entretien, obtenue à partir de tables calculées sur un grand nombre d'animaux ou par mesure en chambre calorimétrique avant de faire le ratio GMQ/consommation liée à la croissance. Cette méthode, appelée Partial Efficiency of Growth, présente quelques défauts. D'une part, elle ne prend pas en compte la variabilité interindividuelle potentielle des besoins d'entretien puisqu'on enlève une constante à l'ingestion de tous les individus, d'autre part, si elle peut être individualisée par l'utilisation de cages à métabolisme, ces dispositifs sont coûteux et difficilement utilisables pour des gros animaux. *In fine*, cette méthode présente l'intérêt d'être moins fortement corrélée au GMQ que le FCR mais, puisqu'il s'agit toujours d'un ratio, on n'a pas d'indépendance vraie entre l'indicateur d'efficacité et les paramètres utilisés pour son calcul contrairement à d'autres indices basés sur des modèles de régression de l'ingestion.

ii. Consommation alimentaire résiduelle

Le concept de consommation résiduelle d'aliment ou Residual Feed Intake (RFI) a été introduit par Koch et al. comme la différence entre la consommation réelle d'aliment et la consommation d'aliment estimée à partir du poids métabolique de l'animal et de son gain moyen quotidien représentant respectivement les besoins d'entretien et de croissance (Koch et al., 1963).

Par ailleurs, la RFI est assez flexible et permet l'incorporation d'autres puits énergétiques selon la production d'intérêt ce que ne permettent pas les indices de type ratio. Ainsi, en élevage laitier la RFI est souvent calculée à partir d'un modèle qui, en plus de l'entretien et de la croissance, considère la production laitière et la composition du lait (Fischer, 2017). En élevage allaitant, il est possible d'intégrer dans les calculs de RFI des données de composition corporelle afin de s'affranchir des corrélations qui existeraient entre ces caractères et l'efficacité alimentaire (Basarab et al., 2003; Schenkel et al., 2004). L'ajout d'éléments en lien avec la production de l'animal dans le modèle linéaire permet de se rapprocher des déterminants biologiques de l'efficacité alimentaire indépendants de la production. Ce modèle peut être d'autant plus précis que les déterminants liés à la production sont bien caractérisés.

La principale limite de la RFI réside dans la possible accumulation des erreurs de mesure ou des limites de précision de la mesure des prédicteurs (Berry & Crowley, 2013). Par ailleurs, une valeur de RFI ne peut pas être considérée comme une mesure absolue de l'efficacité alimentaire. En effet, puisqu'elle dépend des paramètres inclus dans le modèle, de la qualité de l'aliment ainsi que de l'ingestion moyenne des animaux, elle peut uniquement servir à comparer des animaux inclus dans la même régression linéaire. Un animal présentant une RFI négative dans un troupeau inefficace pourra être moins efficace qu'un animal présentant une RFI positive dans un troupeau efficace. Enfin, le calcul de la RFI ne peut pas être réalisé sur un faible nombre d'animaux, d'autant moins si les paramètres intégrés au modèle sont nombreux.

D'autres indices basés sur des régressions linéaires ont été développés comme le gain résiduel (ou residual gain, RG) qui est la régression du GMQ par l'énergie ingérée (ou la MSI) et le poids métabolique et qui va avoir tendance à séparer les individus à forte croissance et les individus à faible croissance (Crowley et al., 2010). Le Residual Intake and Body Weight Gain est, quant à lui, basé sur une combinaison linéaire de la RFI et du RG et a été créé pour tenter de concilier la tendance à la sélection de petits animaux économes de la RFI et la tendance à la sélection d'animaux à croissance rapide mais peu économes du RG (Berry & Crowley, 2012).

Dans la plupart des cas, on observe une convergence entre les différents indices puisque la plupart d'entre eux évaluent la quantité de MSI en fonction de caractéristiques physiologiques (Brown, 2005; Carstens & Tedeschi, 2006; Kelly et al., 2010a; Zhang et al., 2021a). La corrélation entre FCR et RFI est d'autant meilleure que l'intervalle de temps considéré pour leur détermination est grand (Zhang et al., 2021a).

Parmi les outils disponibles pour améliorer l'efficacité alimentaire, le premier consiste à individualiser la gestion des animaux, en particulier par l'intermédiaire de l'alimentation de précision qui permet de gérer au mieux les apports alimentaires pour maximiser la production tout en minimisant les rejets. Une autre solution passe par la sélection des animaux les plus efficaces à condition que ce caractère se révèle suffisamment variable et héritable. Cette sélection a été réalisée dans diverses espèces de rentes que ce soient les poulets (Jørgensen et al., 1990), les porcs (Cai et al., 2008; Gilbert et al., 2007) ou les bovins (Davis, 1987; Herd et al., 2004).

2. Facteurs de variation de l'efficacité alimentaire

L'efficacité alimentaire, qu'elle soit évaluée par FCR ou par RFI, est un phénotype dont la variation est la résultante d'effets environnementaux, d'effets génétiques et d'interactions entre l'environnement et la génétique des animaux.

a) Facteurs extrinsèques et efficacité alimentaire

i. *Température et photopériode*

Comme développé précédemment, l'efficacité alimentaire dépend assez fortement de la variabilité des besoins d'entretien des animaux. Or, ces besoins sont liés aux conditions environnementales. En effet, pour maintenir le corps à sa température basale, en dehors de la température de confort de l'animal, des moyens de régulation sont mis en place au niveau métabolique (découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative pour produire de la chaleur par exemple) ou physiologique (accélération du rythme cardiaque et vasodilatation périphérique pour évacuer l'excédent de chaleur par exemple). L'augmentation de la dépense énergétique pour la thermorégulation se fait au détriment de la croissance (Kennedy et al., 1976). Une augmentation de la température peut également être responsable d'une diminution de l'ingestion mais semble avoir un effet plus modéré sur l'efficacité alimentaire (Hill & Wall, 2017). Par ailleurs il peut exister une composante d'interaction génétique \times environnement dans la façon dont certains animaux réagissent aux variations de température (Jiao et al., 2021; McManus et al., 2020).

La photopériode ne semble pas avoir une influence majeure même si un allongement artificiel de la durée du jour tend à améliorer l'efficacité alimentaire (mesurée par FCR) essentiellement par augmentation de la vitesse de croissance (Schanbacher et al., 1982).

ii. *Ration*

L'efficacité alimentaire, au sens de la valorisation par l'animal des constituants alimentaires ingérés, est fortement dépendante de la ration. En effet, à énergie brute ingérée similaire les quantités d'énergie digestible et d'énergie métabolisable apportées à l'animal peuvent varier. Entre autres, la proportion et la nature des fourrages influent sur la digestibilité de la ration et donc sur l'énergie digestible fournie, ce qui peut impacter l'efficacité alimentaire (Alqaisi et al., 2021; Williams et al., 2019). Par ailleurs, l'excès de protéines dégradables ou de protéines

totales ou un mauvais équilibre énergie/protéines dans une ration peuvent être à l'origine d'une augmentation des pertes azotées urinaires et d'une diminution de l'énergie métabolisable apportée par cette ration (Batista et al., 2017; Cole & Todd, 2008).

L'interaction entre l'animal et la ration en lien avec l'efficacité alimentaire est assez bien renseignée dans la littérature et converge vers une reproductibilité assez faible des indices d'efficacité alimentaire suite à un changement de ration (Cassady et al., 2016; Fischer et al., 2022; Freetly et al., 2020b; Russell et al., 2016). Ce manque de reproductibilité est d'autant plus marqué que les rations sont différentes en composition (Hernandez-Sanabria et al., 2012; Lahart et al., 2020). Le principal inconvénient des études comparant les reclassements entre animaux efficaces et inefficaces sous différentes rations est la confusion entre le changement d'aliments et l'âge des animaux. L'étude de Asher et al. a permis de contourner en partie ce problème en identifiant un reclassement plus faible entre les catégories d'efficacité alimentaire des animaux lorsqu'ils étaient nourris avec le même régime riche en énergie à 7 mois et à 15 mois, que lorsqu'ils étaient nourris avec un régime plus pauvre à 11 mois (Asher et al., 2018).

iii. *Pression infectieuse et parasitaire*

L'infestation parasitaire peut être considérée comme un effet environnemental ayant un effet sur l'efficacité alimentaire. En effet, une partie des ressources va être détournée, soit directement par le parasite dans le cas de parasites se nourrissant du contenu digestif ou des sécrétions ou dévoyant la fermentation microbienne (Fox et al., 2018) soit indirectement par spoliation sanguine ou par mobilisation des défenses immunitaires, par exemple (Barling et al., 2001; Blackburn et al., 1991).

Les mécanismes exacts par lesquels le parasitisme influe sur l'efficacité alimentaire sont mal connus. Plusieurs études récentes suggèrent que l'infestation par *Teladorsagia circumcincta* puisse être responsable d'une production plus importante de méthane par kilogramme de MSI en lien avec une diminution de l'efficacité alimentaire (Fox et al., 2018; Houdijk et al., 2017). D'autres travaux, montrent que l'infestation a un effet assez faible sur l'efficacité alimentaire (Bergstrom et al., 1975; Douhard et al., 2022). Enfin, des études menées sur des bovins ou des ovins parasités ont conclu à une diminution de l'ingestion accompagnée d'une diminution de GMQ mais sans effet sur l'efficacité (Bell et al., 1988; Sykes & Coop, 1977).

b) Facteurs liés à l'animal et efficacité alimentaire

i. *Statut physiologique et efficacité alimentaire*

Chez les mammifères, globalement, les mâles ont un GMQ plus important dans les premiers mois de vie et ont un poids final plus élevé que les femelles. Cette vitesse de croissance plus élevée s'explique souvent par une ingestion plus importante (Elzo et al., 2009). La comparaison d'agneaux mâles et femelles de 270 jours suivis pendant 84 jours a montré que les mâles consommaient en moyenne 740 g d'aliment de plus que les femelles quotidiennement et avaient un FCR inférieur de 0,81 kg/kgPV (Frederiksen et al., 1967). Sur la base du même critère, les ovins mâles étaient plus efficaces du sevrage à l'abattage (autour de 32 kg de poids vif) que les femelles, quelle que soit leur race (de Vargas Junior et al., 2014; Karimi et al., 2022).

Cependant, l'inclusion du facteur sexe dans les études utilisant la RFI comme indicateur d'efficacité alimentaire n'améliore pas nécessairement les modèles. Ainsi, dans l'étude de Freitas et al., l'introduction simultanée du sexe et du groupe génétique (race et statut pur-sang ou croisé) au modèle de RFI proposé par Koch et al. a permis d'améliorer le coefficient de détermination de l'ingestion marginalement mais au prix d'un Critère d'Information de Bayes (BIC) plus élevé amenant finalement au rejet du modèle plus complet (Freitas et al., 2020).

Une explication possible de l'effet sexe sur le GMQ et le FCR réside dans la variation interindividuelle de composition corporelle. En effet, l'étude de Almeida et al. menée sur des caprins en croissance a montré que le besoin d'entretien à poids égal (dans la gamme de poids de l'expérience) ne différait pas entre mâles entiers, mâles castrés et femelles mais que le besoin de croissance différait, étant plus élevé chez les femelles, puis chez les mâles castrés que chez les mâles entiers en lien avec une composition corporelle plus grasse chez les femelles que chez les mâles (Almeida et al., 2015). Le National Research Council et l'INRAE estiment que les besoins énergétiques et protéiques de petits ruminants mâles entiers sont 10 à 15% supérieurs à ceux des mâles castrés (INRA, 2018; National Research Council, 2007).

Par ailleurs, il semble que l'efficacité alimentaire décroisse avec l'âge chez les ruminants et que l'efficacité prépubertaire soit supérieure à l'efficacité post-pubertaire (Alqaisi et al., 2021; Bach & Ahedo, 2008). Ainsi, il est possible que la puberté ait un impact sur l'efficacité alimentaire mais les liens entre ces deux paramètres ne sont pas tout à fait établis en particulier en raison du lien fort entre le poids et l'expression de la puberté chez les ruminants (Basarab et al., 2003; Dýrmundsson, 1981; Rosales Nieto et al., 2014).

Certaines études mettent en avant une puberté plus précoce chez les animaux efficients (Canal et al., 2020) probablement du fait d'une croissance accélérée à moindre coût alimentaire, tandis que d'autres présentent un retard à la puberté chez les animaux efficients (Shaffer et al., 2011) lorsque l'ingestion et la croissance sont toutes deux diminuées.

L'effet de l'âge sur l'efficacité alimentaire est particulièrement vérifié chez les animaux en croissance en lien avec l'importance du GMQ dans l'estimation de l'efficacité et, en conséquence, il est surtout retrouvé lorsque l'efficacité alimentaire est estimée par FCR (Alqaisi et al., 2021; Durunna et al., 2011). En effet, sur des animaux plus âgés, le GMQ est plus faible en proportion du poids vif et l'efficacité alimentaire, mesurée par RFI, est alors relativement répétable au cours du temps à condition que le régime et les variables environnementales soient réellement constants (Asher et al., 2018; Hafla et al., 2013; Kelly et al., 2010b; Macdonald et al., 2014; Moore et al., 2009).

ii. *Part génétique de l'efficacité alimentaire*

L'impact de la race sur l'efficacité alimentaire a été mesuré en élevant concomitamment des animaux de races différentes dans les mêmes conditions environnementales. Globalement, que ce soit pour les bovins ou les ovins allaitants, les animaux avec la croissance la plus rapide sont les plus efficients (de Vargas Junior et al., 2014; Elzo et al., 2009). Ainsi, des différences d'efficacité alimentaire entre races bovines ont été mises en évidence : la race Charolaise étant plus efficace que les races Luing, Angus et Simmental mais moins que les races Limousine, Blonde d'Aquitaine et Hereford, qui sont des races plus précoces (Duthie et al., 2017; Schenkel et al., 2004). Cependant, dans l'étude menée par Freitas et al. sur des agneaux Santa Ines de race pure ou croisés Dorper, la prise en compte du statut racial de l'animal dans le modèle de RFI n'améliorait pas la prédiction de la consommation par rapport à un modèle n'incluant que le poids métabolique et le GMQ (Freitas et al., 2020). Ces observations laissent supposer un effet race modéré (Freitas et al., 2020; Notter et al., 1984) voire absent (Karimi et al., 2022) chez les ovins.

En dehors de la variabilité inter-raciale, les variations d'efficacité alimentaire intra-race et non attribuables à des effets environnementaux laissent supposer un possible déterminisme génétique de l'efficacité alimentaire.

La méta-analyse menée par Berry et Crowley sur 39 études investiguant l'héritabilité de l'efficacité alimentaire chez des bovins en croissance conduit à une héritabilité de la RFI de 0,33 (SE = 0,01) avec des valeurs extrêmes à 0,07 et 0,62 (Berry & Crowley, 2013) et une corrélation génétique comme phénotypique proche de 0 avec le GMQ et le poids vif des animaux. Chez les ovins, les données sont moins abondantes et ont été réunies dans la méta-analyse de Mucha et al. qui conclue à une héritabilité de la RFI de 0,32 (SE = 0,15) sur la base de 5 études ce qui justifie que l'erreur standard soit plus importante que chez les bovins (Mucha et al., 2022).

D'assez nombreuses études ont tenté d'identifier des régions génomiques liées à des caractères d'efficacité alimentaire (QTL) chez les bovins que ce soit par des études d'association pangénomiques (GWAS) ou par l'étude ciblée de gènes codant pour des protéines dont la fonction biologique pourrait être liée à l'efficacité sans mettre en évidence de gène majeur affectant l'efficacité alimentaire (Barendse et al., 2007; Moore et al., 2009; Santana et al., 2014; Sherman et al., 2008a; Taussat et al., 2020). Les polymorphismes nucléotidiques (SNP) identifiés comme associés à l'efficacité alimentaire sont souvent dans des régions ne contenant aucun gène identifié ou dans des gènes dont la fonction était encore inconnue (Barendse et al., 2007; Martin et al., 2019; Sherman et al., 2008b). Par ailleurs, les régions identifiées se révèlent parfois propres aux populations ou aux races considérées sans généralisation possible (Saatchi et al., 2014; Serão et al., 2013).

Une étude d'association récente a identifié un rôle potentiel de BRAT1 (dont l'inactivation était responsable d'une augmentation du stress oxydatif et d'une diminution de la production d'ATP dans la mitochondrie) avec la RFI chez des zébus en croissance (Buss et al., 2022). D'autres mécanismes mis en évidence dans plusieurs études s'ajoutent au métabolisme énergétique, en particulier la régulation de la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase II, le transport cellulaire par l'intermédiaire des dynéines ou la synthèse de lipides (de Oliveira et al., 2014; Lam et al., 2021; Moore et al., 2009; Saatchi et al., 2014; Serão et al., 2013; Zhang et al., 2017). Par ailleurs, chez des bovins allaitants, Taussat et al. ont mis en évidence que les variants les plus associés à la RFI étaient dans des gènes impliqués dans la protéolyse, le turnover protéique, le métabolisme énergétique, la digestion, les fonctions cardiovasculaires et la synthèse de certaines hormones : autant de pistes potentielles d'explication de la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire. (Taussat et al., 2020). Ces résultats sont cohérents avec une méta-analyse de GWAS ayant identifié un lien entre la RFI et le catabolisme des acides aminés

branchés (valine, leucine et isoleucine) impliqués dans la régulation de la synthèse protéique (Duarte et al., 2019).

Chez les ovins, les études sont plus rares et assez peu concluantes. Des mutations ponctuelles, peu fréquentes dans la population, situées dans les gènes codant pour l'enzyme malique (ME1), impliquée dans le métabolisme du pyruvate, et pour l'adénylate cyclase 8, impliquée dans la signalisation intracellulaire, ont été associées à l'efficacité alimentaire (Yang et al., 2022b; Zhang et al., 2021a). De la même manière, des analyses par GWAS ont permis d'identifier des régions présentant des différences entre animaux différant par leur RFI, notamment dans les gènes SOX5 et SOX6 impliqués dans la transcription du gène déterminant la différenciation en mâle (SRY), ou dans le gène codant pour la Latrophilin 3, un récepteur couplé aux protéines G impliqué dans les liaisons cellulaires et la cascade de signalisation intracellulaire (Cockrum et al., 2012; Ladeira et al., 2022). Dans la plupart des cas, ces associations ne sont pas retrouvées dans plusieurs études et l'expression des gènes potentiels n'est pas mesurée. Dans l'étude de Higgins et al. cependant, le SNP le plus fortement associé avec la RFI, situé à proximité du gène codant pour GFRA2 était aussi associé avec une plus forte expression de ce gène dans le foie (Higgins et al., 2018). L'inactivation génique de GFRA2 a été associée à une diminution des capacités de digestion et à une augmentation du métabolisme basal chez des souris ce qui pourrait être une piste tant digestive que métabolique (Rossi et al., 2003).

L'efficacité alimentaire est un caractère complexe qui dépend très probablement de nombreux paramètres comportementaux, digestifs (dont microbiens) et métaboliques. Ainsi, il est probable que la part génétique de l'efficacité alimentaire ne soit pas attribuable à des effets monogéniques ou oligogéniques mais repose plutôt sur de très nombreux gènes impliqués chacun dans les différentes fonctions biologiques sous-jacentes à l'efficacité alimentaire.

3. Principaux éléments expliquant la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire

Historiquement, les gains d'efficacité ont majoritairement émergé de la dilution des coûts d'entretien en regard de la production. Cependant, tous les animaux ne partitionnent pas l'énergie et les nutriments de la même manière et des différences interindividuelles existent.

Dès 2004, Herd et Richardson ont essayé de catégoriser les différentes sources potentielles de variabilité interindividuelle pouvant justifier des différences d'efficacité alimentaire (Herd et al., 2004; Richardson & Herd, 2004). Cinq processus ont été mis en avant chez l'animal en croissance : la quantité d'ingéré, l'efficacité digestive, l'efficacité métabolique (caractérisée par les capacités anaboliques et cataboliques associées aux variations de composition corporelle et de masse), l'activité et la thermogénèse (Figure I.1.2).

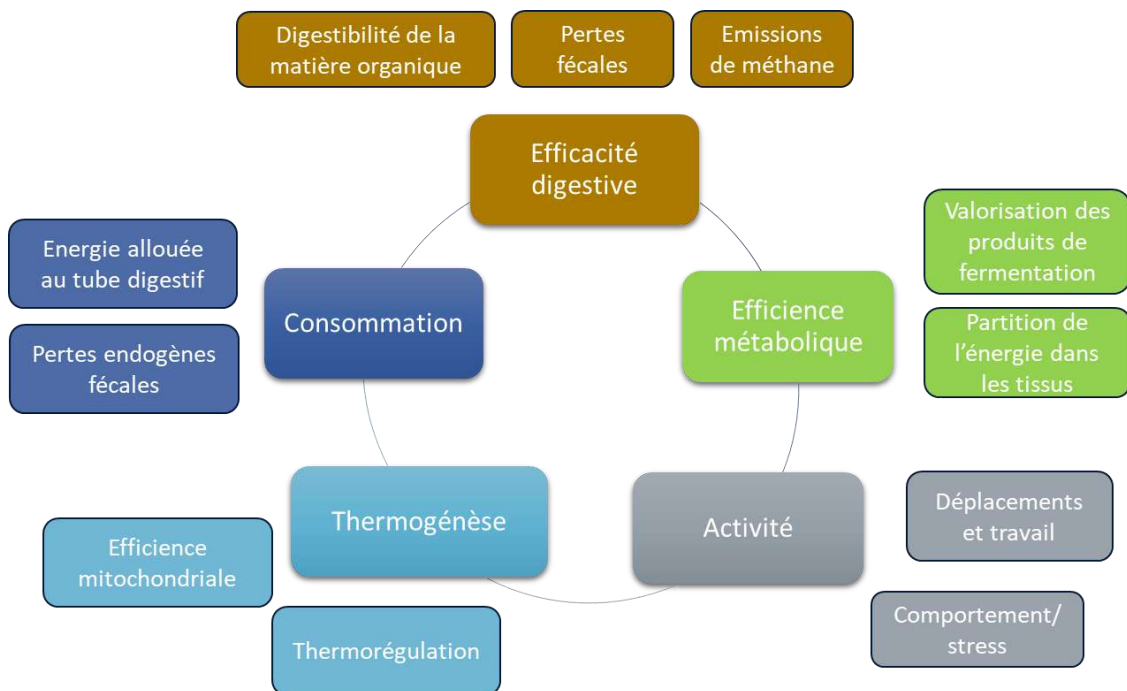


Figure I.1.2 : Cinq processus majeurs en lien avec l'efficacité alimentaire chez l'animal en croissance développés par Herd et al. (2004).

La consommation intervient à différents niveaux. Une augmentation de la MSI, à densités énergétique et protéique constantes, nécessite un effort de digestion plus important, augmentant les besoins d'entretien d'un animal. Cette augmentation des besoins d'entretien peut, cependant, s'avérer négligeable au regard de l'augmentation de production permise par un apport plus important d'aliments au tube digestif. Ces considérations ne sont valables que si

l'augmentation d'ingestion est le seul paramètre à varier ce qui n'est jamais réellement le cas. À titre d'exemple, une augmentation de la MSI résulte souvent en une diminution de sa digestibilité du fait d'un taux de passage des particules plus important (Albornoz et al., 2013; Colucci et al., 1982; INRA, 2018; Moallem, 2016). Ainsi, les différents éléments expliquant la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire ne sont pas indépendants puisque le niveau d'ingestion détermine en partie l'efficacité digestive.

Celle-ci dépend également de la capacité des microorganismes ruminants à dégrader les substrats alimentaires, qui détermine les pertes fécales potentielles, ainsi que des interactions synergiques ou antagonistes entre les microorganismes. Par ailleurs, l'orientation majoritaire de la digestion des glucides chez les ruminants aboutit à la formation de différents produits de fermentation ainsi qu'à une production plus ou moins importante de méthane. Les microorganismes ruminants sont également responsables de la production de protéines microbiennes dont l'équilibre en acides aminés limite la dépendance des ruminants à l'équilibre des protéines alimentaires.

De fait, l'efficacité métabolique peut également dépendre, en partie, du microbiote. En effet, certains métabolites produits au niveau du rumen et absorbés par l'hôte peuvent orienter certaines voies métaboliques et favoriser ou défavoriser des processus plus ou moins économes en énergie. Cette efficacité métabolique dépend de la capacité de l'animal à déposer certains tissus en particulier ou à les mobiliser. Dans ce cas, on pourra distinguer dépôt et mobilisation des réserves qui ne font pas intervenir les mêmes processus métaboliques (Fischer et al., 2018)

Enfin l'activité et la thermorégulation sont des sources de dépenses énergétiques associées au comportement individuel d'une part et au système hypothalamo-hypophysaire d'autre part. La variabilité interindividuelle assez forte de ces deux phénomènes peut être une source d'explication des différences d'efficacité alimentaire (Martin et al., 2021).

Il est probable que ces différentes sources de variation interindividuelle n'aient pas la même importance en fonction des conditions de vie. Dans un environnement très contrôlé, avec un accès à un aliment facilement digestible, les variations d'efficacité digestive auront un rôle minime dans les variations d'efficacité alimentaire globale. De même, dans un système d'entrave, l'activité physique ne sera pas un déterminant majeur des différences d'efficacité.

Ces différents éléments seront développés au cours des chapitres 2 et 3.

L'efficacité alimentaire a été estimée de différentes manières au cours des 50 dernières années. En production d'animaux allaitants l'ingestion alimentaire résiduelle s'est imposée comme l'outil de mesure de l'efficacité.

Cette ingestion alimentaire résiduelle est héritable et variable entre individus ce qui signifie que la génétique de l'animal explique en partie son efficacité alimentaire. La RFI semble assez répétable entre différentes périodes de la vie et moins entre différents régimes chez les bovins mais peu de données existent chez les ovins allaitants.

De nombreux paramètres environnementaux, physiologiques ou pathologiques peuvent entraîner des variations d'efficacité alimentaire. Pour limiter ces facteurs de variations, nous nous concentrerons dans le travail de thèse qui fera l'objet de la deuxième partie de ce manuscrit sur des agneaux mâles de lignées sélectionnées de façon divergente pour l'efficacité alimentaire établies dans la race Romane. Ces agneaux efficaces et inefficaces seront comparés, autant que possible, au même âge et dans les mêmes conditions expérimentales, en bergerie, et ce, pour deux régimes différents

Dans ce contexte, nous supposons que les déterminants majeurs de l'efficacité alimentaire peuvent être différents selon le régime alimentaire, et associés avec l'efficacité digestive des animaux ou avec leur efficacité métabolique, le premier point étant, entre autres, dépendant de la composition microbienne du tube digestif et le second découlant des divers processus métaboliques de l'hôte à différentes échelles.

Chapitre 2. : Efficacité digestive, implication de la communauté microbienne et de son activité dans l'efficience alimentaire

1. Part de l'efficacité digestive dans l'efficience alimentaire

Dans la mesure où l'efficience alimentaire met en parallèle une quantité d'aliment ingérée et des performances il paraît raisonnable de considérer que l'interface digestive puisse être responsable d'une part de l'efficience alimentaire. En effet, c'est par la digestion des différents éléments d'une ration que les nutriments peuvent être libérés, absorbés et en conséquence utilisés par l'organisme pour le maintien des fonctions vitales ou pour la production.

Chez les monogastriques de rente, premiers sujets d'étude pour l'efficience alimentaire, les différences d'efficacité digestive représentent une part assez importante de l'efficience alimentaire, avec notamment des coefficients de digestibilité présentant de fortes corrélations négatives avec la RFI ($r = -0,66$ et $r = -0,54$ pour la digestibilité de l'énergie et de l'azote respectivement) (Déru et al., 2021).

Les études mettant en parallèle efficience alimentaire et efficacité digestive sont plus rares chez les ruminants. L'étude référence, majoritairement citée par les articles traitant d'efficience alimentaire chez les bovins est celle de Herd et al., qui ont estimé la part de l'efficacité digestive à 14% de la variation globale d'efficience alimentaire lorsque les animaux étaient nourris avec une ration contenant 85% de concentrés (Herd et al., 2004). Cette part modérée peut s'expliquer par une variabilité interindividuelle d'efficacité digestive assez faible, en particulier lorsque l'aliment est aisément digestible (De La Torre et al., 2019).

Chez des génisses non sevrées, nourries avec du lait, un aliment de démarrage et du foin, les animaux efficaces en termes de RFI ont une consommation d'aliment solide inférieure et une digestibilité apparente fécale des protéines brutes et des matières grasses plus élevées que les inefficients (de Assis Lage et al., 2019). Ils tendent également à avoir une digestibilité apparente fécale de la MS et de la matière organique accrues.

Chez les bovins en croissance, Johnson et al. ont montré que les animaux efficaces avaient une meilleure digestibilité apparente de la MS (76,3% contre 70,7%) (Johnson et al., 2019). En particulier, la digestibilité des NDF (Neutral Detergent Fiber) était, dans l'absolu, plus

importante de 4% chez les bouvillons et génisses efficaces. La digestibilité de l'azote était également plus importante chez les animaux efficaces bien que cela ne soit statistiquement significatif que chez les génisses (72,7% contre 67,6%). Ces résultats ont également été obtenus chez des vaches laitières adultes en lactation (Rius et al., 2012). Les vaches inefficaces tendaient également à avoir une plus faible digestibilité apparente de la MS et de la matière organique et les efficaces une meilleure digestibilité apparente de l'azote se caractérisant principalement par une diminution de son excrétion fécale.

Ces différences de digestibilité entre animaux efficaces et inefficaces résultent en une quantité d'énergie digestible effectivement utilisable pour les animaux plus importante chez les animaux efficaces pouvant en partie justifier leur efficacité (Brown, 2005; Nkrumah et al., 2006). Cependant, la part de l'efficacité alimentaire expliquée par l'efficacité digestive varie selon les études et, dans certains cas, il ne semble pas y avoir de différence de digestibilité entre animaux divergents pour l'efficacité alimentaire (Lines et al. 2014).

Les principales hypothèses associées à des modifications d'efficacité digestive sont liées à la physiologie de la digestion (temps de transit, nombre de contractions, temps de séjour des aliments dans tel ou tel compartiment digestif permettant un contact accru entre les enzymes microbiennes et les substrats), à des différences de capacités enzymatiques, à des variations de communauté microbienne (particulièrement pour les herbivores stricts dont les ruminants pour lesquels l'activité fermentaire des microorganismes se situe principalement en amont de l'intestin et représente le principal pilier de la digestion), et enfin à une capacité d'absorption variant entre les animaux efficaces ou inefficaces. Notre travail concernant les ovins, nous développerons les éléments digestifs en relation avec les pré-estomacs en raison de leur rôle central dans la nutrition des ruminants.

2. Modifications du tube digestif et efficacité alimentaire

En plus de leur estomac glandulaire, commun à la plupart des espèces animales et en particulier à tous les mammifères, les ruminants possèdent trois pré-estomacs issus de modifications anatomiques de l'œsophage. Ces pré-estomacs sont le rumen où aboutit l'œsophage, le réseau, qui communique proximale avec le rumen et distale avec le feuillet, dernier des pré-estomacs, par l'orifice réticulo-omasal. Le plus volumineux des pré-estomacs est le rumen, qui peut atteindre 6 à 8 L de volume chez les ovins selon l'âge et l'alimentation (Goopy et al., 2014; Hecker et al., 1964; Purser & Moir, 1966). Il abrite un microbiote diversifié et abondant indispensable à la digestion des constituants végétaux de l'alimentation des ruminants.

Dans le rumen, trois phases peuvent être mises en évidence : une phase liquide ventrale, essentiellement constituée d'eau et de particules fines en suspension, une phase solide, parfois appelée le matelas ruminal ou la langue de fourrage, constituée des fourrages encore grossiers compactés et une phase gazeuse dorsale composée en majorité de dioxyde de carbone (CO₂), de dihydrogène (H₂) et de méthane (CH₄) (Bishop-Hurley et al., 2016). Dans la phase liquide, on retrouve les acides gras volatils (AGV) qui représentent le principal substrat énergétique issu de la digestion de la matière organique chez les ruminants (van Houtert, 1993).

Après ingestion, la ration des ruminants séjourne dans le rumen pendant plusieurs heures à jours selon sa fibrosité et sa proportion de concentrés (Dufrenoy et al., 2019). La mise en contact entre les composants de la ration et les enzymes des microorganismes du rumen est favorisée par le processus de rumination qui associe des contractions ruminales permettant un brassage de la langue de fourrage et un antipéristaltisme œsophagien qui permet la remontée du bol mérycique dans la bouche de l'animal (Peralta et al., 1985). Ce processus permet une ré-imbibition salivaire de l'aliment et une trituration mécanique qui, elle-aussi, favorise le broyage des aliments et donc le contact avec les enzymes. La salive des ruminants, basique (pH=8,5) et possédant un fort pouvoir tampon, joue un rôle dans la régulation du pH ruminal (Reid & Huffman, 1949). Lors du processus de rumination une partie des gaz produits par la digestion est éructée, occasionnant une diminution de la pression intra-ruminale mais également une perte de carbone sous forme oxydée (CO₂) ou sous forme réduite (CH₄) ce qui représente une perte de potentiel réducteur et d'énergie pour l'animal.

a) Volume du tube digestif et efficacité alimentaire

Faverdin et al. ont montré qu'à ingestion identique les vaches les plus efficaces avaient un volume abdominal (utilisé comme approximation du volume digestif) plus important que les inefficaces (-21,8 L de volume abdominal pour un kg/j de RFI) (Faverdin et al., 2021). D'autres études, comparant la proportion du rumen vide dans le poids carcasse et l'efficacité chez des ovins et chez des bovins allaitants ou laitiers suggèrent que les animaux efficaces ont un rumen plus lourd que leurs homologues inefficaces (Beecher et al., 2014; Rompala et al., 1991; Taussat et al., 2019).

Cependant, d'autres études menées chez des ruminants (ovins, bovins et zébus) en croissance ne mettent en évidence aucun lien entre la masse du tube digestif ou de ses organes et l'efficacité alimentaire mesurée par RFI (Fidelis et al., 2017; Lam et al., 2018; Mader et al., 2009; Montelli et al., 2021). Les travaux de Zhang et al. ont montré que les agneaux efficaces avaient une masse de réticulo-rumen plus faible que les agneaux inefficaces mais cette différence n'était pas significative quand les masses étaient exprimées en proportion de la masse digestive. De même, la masse digestive était plus importante chez les animaux inefficaces mais pas au regard du poids vif (Zhang et al., 2017).

Enfin, chez des bovins Charolais, les corrélations génétiques tendaient à montrer qu'un système digestif plus lourd en proportion du poids vif au détriment de la composante musculaire de la carcasse était associé à l'inefficacité (Martin et al., 2019).

Le rumen est un organe très demandeur en énergie et il peut représenter jusqu'à 20% des besoins en énergie métabolisable de l'organisme. Ceci s'explique notamment par la consommation d'ATP par les pompes Na/K ATP-ase et par le renouvellement des protéines du tube digestif représentant un quart de la synthèse protéique de l'organisme (Baldwin & Connor, 2017; McBride & Kelly, 1990; Ortigues, 1991). De fait une diminution de la taille relative du tube digestif pourrait être responsable d'une amélioration de l'efficacité alimentaire par diminution des pertes métaboliques au niveau digestif (Basarab et al., 2003; Elolimy et al., 2018; Meale et al., 2017).

Le volume du tube digestif peut avoir un impact sur l'efficacité alimentaire en influençant la digestion auquel cas un volume plus important peut être bénéfique mais également par son importance dans les dépenses énergétiques de l'hôte, auquel cas un volume plus important peut être défavorable.

b) Histologie

L'épithélium ruminal, en tant que surface d'absorption majoritaire des AGV, principaux produits des fermentations ruminales et source d'énergie majoritaire chez le ruminant, semble un candidat potentiel pour expliquer les différences interindividuelles d'efficacité alimentaire. Une absorption plus efficace des AGV au niveau des papilles ruminales par l'intermédiaire de transporteurs permet de limiter les variations de pH intra-ruminal qui peuvent déstabiliser la communauté microbienne et occasionner une diminution de l'efficacité digestive (Ahmad et al., 2020). La capacité d'absorption de l'épithélium ruminal dépend de la surface d'absorption notamment déterminée par la longueur et l'épaisseur des papilles ruminales ainsi que par leur densité. Cependant, la plupart des études menées chez les ruminants n'ont pas mis en évidence de lien direct entre l'organisation morphologique du rumen et l'efficacité alimentaire (Kern et al., 2016; Pereira et al., 2016).

Plusieurs études menées sur des zébus nourris avec des régimes riches en concentrés ont montré un amincissement de l'épithélium kératinisé de 6 à 16% chez les animaux efficaces en parallèle d'une tendance à la diminution de l'aire de la surface d'absorption (Pereira et al., 2016; Silvestre et al., 2022). Au contraire, chez des taurillons et bouvillons nourris avec une ration mixte composée de grains de maïs humides et d'herbe enrubannée, l'épaisseur de l'épithélium ruminal était 8% plus élevée chez les animaux efficaces en lien avec un pH ruminal plus acide sans que le reste des caractéristiques histologiques du rumen soit affecté (Lam et al., 2018). Ces résultats, en apparence contradictoire, peuvent être liés à une meilleure adaptation des animaux efficaces au régime qui leur est distribué (Melo et al., 2013).

La seule étude ayant lié la morphologie des segments distaux au rumen et l'efficacité alimentaire chez les ruminants a montré que les taurillons efficaces tendaient à avoir une profondeur des cryptes intestinales plus importante en lien avec un plus grand nombre de cellules composant les cryptes, en particulier au niveau du duodénum (Montanholi et al., 2013).

Si le tube digestif a son importance dans l'efficacité digestive, chez les ruminants il héberge également les microorganismes responsables de la dégradation des constituants alimentaires. Ainsi, le lien entre le rumen et l'efficacité alimentaire pourrait majoritairement résulter de différences de compositions microbiennes entre animaux efficaces et inefficaces.

3. Modifications de la communauté microbienne ruminale et efficacité alimentaire

a) Le microbiote ruminal

Le microbiote ruminal est l'ensemble des microorganismes présents dans le rumen, parmi lesquels des procaryotes tels que les bactéries (10^8 à 10^{11} /mL) ou les archées (10^6 à 10^7 /mL) et des eucaryotes tels que les ciliés (10^4 à 10^6 /mL) ou les champignons (≈ 1000 /mL) (Castillo-Lopez & Dominguez, 2019; Morvan et al., 1996). Ces microorganismes jouent différents rôles dans la digestion des glucides cytoplasmiques ou pariétaux et permettent aux ruminants de valoriser les fibres de leur alimentation. La synthèse microbienne d'acides aminés à partir de la dégradation des protéines alimentaires ou la valorisation par les microorganismes de l'azote non protéique dans le rumen permettent aux ruminants d'être relativement peu sujets aux carences en acides aminés spécifiques comme cela peut être le cas pour la majorité des mammifères (INRA, 2018).

Les microorganismes du rumen utilisent des substrats alimentaires plus ou moins spécifiques, en particulier concernant les glucides. Ainsi, le principal facteur de variation des communautés microbiennes du rumen est l'alimentation (Global Rumen Census Collaborators et al., 2015). Par exemple, pour les bactéries, on qualifie de fibrolytiques celles qui sont capables de dégrader la cellulose, les héli-celluloses et les pectines, par exemple *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* ou *Ruminococcus albus*, tandis qu'on nomme amylolytiques les bactéries qui dégradent majoritairement les glucides cytoplasmiques tels que l'amidon. Dans cette seconde catégorie, on peut citer par exemple *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* ou *Streptococcus bovis*. Les premières ont tendance à croître à pH supérieur ou égal à 6,5 tandis que les secondes prolifèrent à des pH inférieurs à 6 (Cotta, 1988). L'alimentation a donc aussi un impact indirect sur les populations microbiennes au travers des variations de pH induites par les fermentations plus ou moins rapides des composants alimentaires en AGV.

Le microbiote ruminal, par son abondance et son importance dans la digestion des aliments chez les ruminants est davantage étudié que les microbiotes des segments plus distaux du tube digestif bien que certaines études, privilégiant le caractère non invasif du prélèvement, s'intéressent au microbiote fécal (Brooke et al., 2019; Welch et al., 2021a). À partir de prélèvements étagés tout au long du tube digestif Douglas et al. ont mis en évidence une évolution progressive de la composition microbienne du microbiote chez des ovins de races

Beulah et Suffolk (Douglas et al., 2016). Ainsi, les prélèvements issus du rumen, du réseau ou du feuillet, les trois pré-estomacs, avaient approximativement la même composition tandis qu'ils différaient des échantillons de caillette, de duodénum de jéjunum ou d'iléon, confondus en Analyse canonique des composantes Principales (CAP) ou encore des échantillons de caecum, de colon ou de rectum eux-aussi peu dissociés (Figure I.2.1).

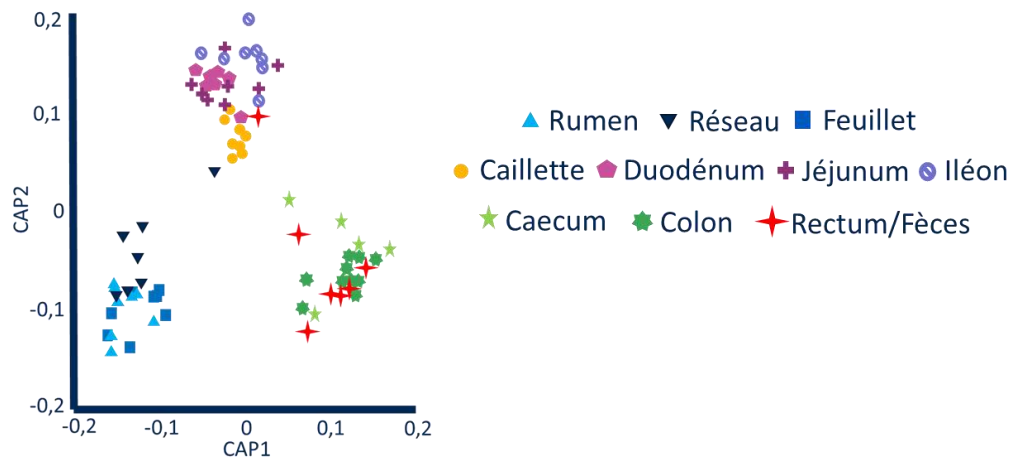


Figure I.2.1 : Dissimilarités entre les communautés microbiennes identifiées dans divers segments digestifs chez des ovins adultes à partir d'une analyse canonique des composantes principales (d'après Douglas et al. 2016).

D'autres études ayant réalisé des prélèvements étagés le long du tractus digestif de ruminants ont mis en évidence une dissimilarité plus forte entre segments digestifs qu'au sein d'un segment, d'autant plus que les segments digestifs sont éloignés l'un de l'autre rendant l'extrapolation entre microbiote fécal et microbiote ruminal assez peu raisonnable (Freetly et al., 2020a; Perea et al., 2017).

Par ailleurs, des différences entre les communautés microbiennes épithéliales, attachées aux particules alimentaires (phase solide) et baignant dans le fluide ruminal (phase liquide) ont été rapportées, ces différences étant renforcées par la proportion de fourrages dans la ration (Fouts et al., 2012; Jewell et al., 2015; McLoughlin et al., 2020; Sadet, 2007). Globalement, la communauté microbienne du fluide ruminal est plus diverse que la communauté associée aux particules (Jewell et al., 2015). Les bactéries attachées à la muqueuse ruminale, moins abondantes, sont différentes des précédentes et semblent davantage liées à l'hôte qu'au régime (Sadet, 2007).

Du fait de ces différences, le mode de prélèvement (sonde oesophagienne, fistule, contenu ruminal après abattage) aura un effet sur la répartition des microorganismes récupérés, la sonde oesophagienne favorisant la récupération de phase liquide et de particules de petit volume mais ne permettant pas d'évaluer la composition microbienne de la phase solide ou de l'épithélium.

b) Méthodes d'étude du microbiote ruminal

Au sein de la population microbienne ruminale, les plus gros microorganismes sont, sans conteste, les ciliés. Certains d'entre eux, comme *Polyplastron multivesiculatum* peuvent dépasser 200 micromètres de long et une centaine de micromètres de large, même si la plupart des ciliés font plutôt une cinquantaine de micromètres de diamètre (Gürelli, 2017). Cette particularité, associée à leurs morphologies suffisamment diverses pour qu'une observation microscopique permette leur caractérisation sommaire, justifie que de nombreuses études ont étudié les protozoaires ruminants par l'intermédiaire d'observations en microscopie confocale ou électronique à transmission (Coleman, 1980; Duarte et al., 2018; Huws et al., 2009). Cependant, tirer des conclusions statistiquement recevables sur un faible nombre d'observations est complexe et l'identification des protozoaires par microscopie est chronophage. Des méthodes métataxonomiques se sont progressivement développées pour analyser la structure de la communauté de protozoaires (Kittelmann et al., 2015) même si l'obstacle majeur du nombre de copies du gène codant pour l'ARN ribosomal 18S subsiste (Medinger et al., 2010; Newbold et al., 2015).

En parallèle de l'observation assez détaillée des ciliés du rumen, les premières études qui se sont intéressées au microbiote ruminal ont décrit les aspects morphologiques des colonies bactériennes, que ce soit la forme des bactéries observées par microscopie ou leur agencement aboutissant aux premières descriptions de la « flore normale du rumen » à une époque où l'ADN n'avait pas encore été découvert (Baker, 1942).

Par la suite, la culture bactérienne s'est imposée comme la méthode de référence pour l'étude des bactéries ruminales notamment avec le développement de milieux strictement anaérobies et adaptés à la croissance de microorganismes anaérobies stricts et dégradant les parois cellulaires (Hungate, 1947). L'identification des espèces bactériennes reposait alors sur des caractéristiques morphologiques, de pigmentation, de coloration (coloration de Gram en particulier) ou de capacité à produire certaines réactions biochimiques (Hamlin & Hungate, 1956; Ransom-Jones et al., 2012). Cependant, la plupart des microorganismes ruminants ne sont

pas cultivables (Koike et al., 2010; Tajima et al., 1999). Les espèces bactériennes et archéales cultivées au regard des espèces identifiées par les méthodes métataxonomiques ont été estimées à 6,5% et 1,7%, respectivement par Kim et al. tandis qu'une autre étude estime le pourcentage du microbiote ruminal effectivement cultivable à 23% avec un fort biais de représentativité (Kim et al., 2011; Zehavi et al., 2018). En outre, la culture bactérienne ne permet pas d'identifier avec précision les espèces bactériennes ou archéales identifiées. C'est pourquoi, même si les méthodes de culture permettent d'isoler des microorganismes, elles ne sont pas capables de rendre compte de l'importante diversité de ceux-ci et ont progressivement été remplacées ou complétées par des méthodes moins sélectives (Chaucheyras-Durand & Ossa, 2014).

Le séquençage à haut-débit a révolutionné les études concernant le microbiote en permettant la quantification relative d'espèces microbiennes présentes dans de nombreux échantillons. La métagénomique consiste en l'étude du contenu génétique d'environnements complexes soit par séquençage global, assez coûteux mais permettant d'avoir un aperçu du potentiel fonctionnel des microorganismes séquencés, soit par séquençage d'un gène particulier partagé par tous les microorganismes à identifier. Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) 16S pour les bactéries et les archées et 18S pour les protozoaires et les champignons anaérobies du rumen se sont imposés comme les gènes de référence du fait de leur caractère ubiquitaire et de la présence au sein de leurs séquences de régions très conservées (pour lesquelles des amorces peuvent être créées) et hyper-variables d'une espèce à l'autre (permettant une classification efficace des microorganismes) (Chakravorty et al., 2007; Pace et al., 1986). Récemment, des séquençages conjoints de multiples échantillons se sont développés, reposant sur deux PCR préalables : la première pour amplifier l'ADN échantillon par échantillon et la deuxième incorporant pour chaque échantillon des amorces marquées par une séquence « étiquette ». Cette étiquette permet après séquençage de démultiplexer les séquences obtenues pour les attribuer à chaque échantillon (Lange et al., 2014). Par cette approche, un certain nombre de séquences sont obtenues par échantillon ce qui permet d'estimer les abondances relatives des microorganismes considérés dans ceux-ci et potentiellement d'expliquer des différences d'efficacité digestive par une abondance relative plus importante de microorganismes capables de dégrader un substrat donné, par exemple (Li et al., 2017; Yang et al., 2022a).

- c) Effets de la diversité microbienne sur l'efficacité alimentaire chez les ruminants.

Deux hypothèses coexistent quant aux liens potentiels entre diversité des microorganismes dans le rumen et efficacité alimentaire. La première suggère qu'au regard de la complexité des aliments, avoir une diversité importante de microorganismes pour pouvoir les digérer soit nécessaire (Krause et al., 2013). Cette première hypothèse n'est pas incompatible avec la seconde qui postule qu'une efficacité alimentaire optimale correspond à une diversité faible puisque chaque réaction sera prise en charge le plus efficacement possible par un ou plusieurs microorganismes complémentaires tandis qu'une abondance de voies métaboliques aboutirait à des voies moins efficaces et à une augmentation des pertes. Les déterminants de l'efficacité alimentaire dépendant aussi des aliments ingérés il est possible que l'une et l'autre des théories soient vraies dans deux contextes alimentaires différents.

i. Définitions

De nombreux indices adaptés des études de biodiversité à des échelles plus importantes ont été appliqués à l'étude du microbiote. La diversité d'un écosystème ruminal augmente avec le nombre d'espèces observées. Cette diversité est estimable à différentes échelles : à l'échelle d'un échantillon, considéré comme homogène (diversité α), entre différents échantillons provenant de localisations différentes ou d'individus différents (diversité β) ou encore dans l'ensemble des échantillons (diversité γ) (Lande, 1996).

Les indices de diversité α se répartissent en deux catégories qui recouvrent deux notions complémentaires : la richesse et l'équitabilité (Marcon, 2015; McIntosh, 1967).

La fonction la plus simple pour exprimer la richesse est le nombre brut d'espèces observées mais cela implique qu'on soit en mesure de définir l'espèce ce qui n'est pas toujours simple. Par ailleurs, le nombre d'espèces observées est une fonction croissante du nombre de microorganismes prélevés. Pour compenser cela, on pourra tenter de normaliser le nombre d'observations par échantillon par « raréfaction », une méthode qui tente de conserver les abondances relatives des microorganismes dans les échantillons en ramenant le nombre d'observations à celui du plus petit d'entre eux pour les rendre comparables en termes de diversité (Sanders, 1968). Cette méthode a été remise en question car, d'une part, elle conduit à rejeter des séquences valides réduisant ainsi, parfois drastiquement, la puissance des tests visant à comparer des abondances relatives entre les différents échantillons (McMurdie & Holmes, 2014) et d'autre part, la raréfaction introduit de l'incertitude par le biais du ré-

échantillonnage aléatoire qu'elle implique (Willis, 2019). Il est également possible de corriger la richesse observée à l'aide d'estimateurs qui s'appuient sur les espèces rarement observées pour estimer la quantité d'espèces qui ne le sont pas. Les estimateurs les plus utilisés sont l'estimateur de Good, aussi appelé « Good's coverage » et le Chao1 (Chiu et al., 2014; Good, 1953; Mao & Colwell, 2005). Ces estimateurs se rapprochent de la richesse à mesure que l'effort d'échantillonnage augmente mais sont sensibles au filtrage.

L'introduction de l'équitabilité permet de quantifier la contribution d'une catégorie à la communauté en fonction du nombre d'individus qui lui appartiennent. Une communauté très largement dominée par une espèce sera moins équitable qu'une communauté diverse de microorganismes présents dans des proportions similaires. Plusieurs indices ont été développés pour prendre en compte l'équitabilité comme l'indice de Shannon, qui accorde une importance assez forte aux espèces minoritaires du fait de l'utilisation d'une fonction logarithmique dans sa détermination, ou l'indice de Gini-Simpson, qui varie plus fortement en lien avec les espèces majoritaires. Ces deux indices sont les plus utilisés dans l'étude de la diversité α des communautés microbiennes (Shannon, 1948; Simpson, 1949).

Une autre caractéristique qui peut être prise en compte dans les calculs de diversité est la disparité, c'est-à-dire la divergence moyenne entre deux espèces qui, en pratique, se caractérise par une proximité phylogénétique : l'appartenance à un même taxon de rang plus ou moins élevé ou un pourcentage d'homologie de séquence. L'introduction de la disparité donne aux indices de diversité un aspect plus concret. Une disparité importante entre deux microorganismes pourra impliquer des conditions de croissance et des substrats ou réactions différentes et donc potentiellement une plus grande adaptabilité du microbiote ruminal. Cette disparité est, en particulier, importante à considérer lors de la comparaison de communautés microbiennes entre individus (diversité β). Ainsi, les indices les plus simples de diversité β sont les indices de Jaccard et de Bray-Curtis qui prennent en compte la présence ou l'absence des espèces dans les échantillons pour le premier et leur abondance relative en sus pour le second tandis que les indices UniFrac, pondéré ou non, sont les pendants des deux premiers qui incluent la disparité (Marcon, 2015).

La diversité β est également sensible aux variations du nombre de séquences observées par échantillon, c'est-à-dire de leur profondeur de séquençage. Ainsi, sur la Figure I.2.2, en conservant les proportions des espèces observées dans les communautés A et C et en mimant un échantillon cinq fois plus grand on augmente de 59% la dissimilarité entre les communautés A et B et de 452% la dissimilarité entre les communautés A et D ce qui aboutit à une

réorganisation des distances. Ce rapport de cinq entre les profondeurs de séquençage est communément retrouvé dans la littérature (Bowen et al., 2020; Liu et al., 2022), en revanche la simplicité de l'exemple accentue les variations qui sont moins flagrantes dans les études comparant les profondeurs de séquençage (Oono, 2017; Santiago-Rodriguez et al., 2020).

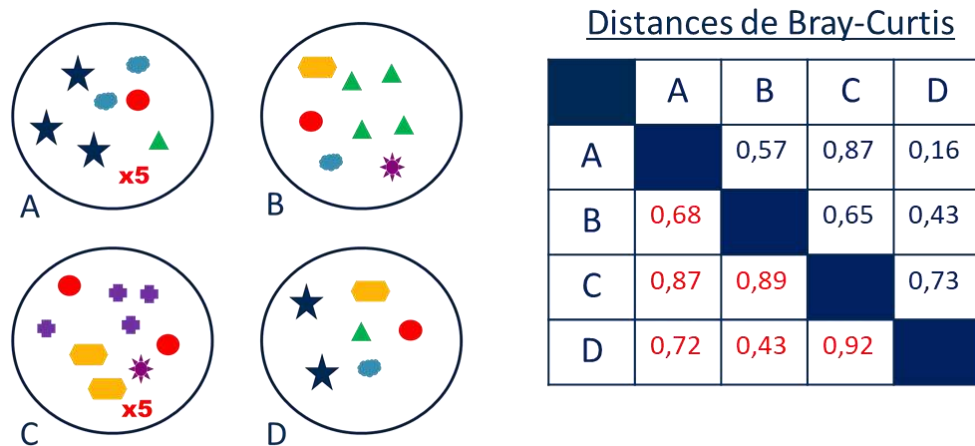


Figure 1.2.2 : Illustration de l'importance de la taille d'échantillon sur la distance de Bray-Curtis entre différents échantillons (A à D), au-dessus de la diagonale les distances pour des échantillons de tailles similaires, en-dessous de la diagonale les distances entre ces mêmes communautés lorsque les échantillons A et C ont des profondeurs de séquençage 5 fois plus élevées.

ii. Diversité α et efficacité alimentaire

De nombreuses études convergent pour établir l'absence de lien entre diversité microbienne et efficacité dans différentes espèces avec différents régimes (Lopes et al., 2021; Marie-Etancelin et al., 2021; McGovern et al., 2018, 2020; Myer et al., 2015a; Perea et al., 2017).

Cependant, certains auteurs appuient l'hypothèse d'une alpha-diversité plus faible chez les animaux efficaces que chez les inefficients témoignant d'un microbiote plus spécialisé. Cela a été montré chez des vaches Holstein avec des animaux efficaces présentant une alpha-diversité bactérienne et archéale plus faible (indice de Shannon) et une dominance plus importante des espèces majoritaires (indice de Gini-Simpson) (Shabat et al., 2016). D'autres études ont mis en évidence une diversité archéale (McLoughlin et al., 2020; Zhou et al., 2010) ou bactérienne (Li et al., 2022; Xie et al., 2022) plus faible chez les ruminants efficaces.

Enfin, une dernière catégorie d'études montre, au contraire, une augmentation de la diversité microbienne dans le rumen chez les animaux efficaces que ce soit la diversité de protozoaires

(Clemmons et al., 2021; Zhang et al., 2020a), d'archées (Auffret et al., 2018; Xie et al., 2022) ou de bactéries (Welch et al., 2021a; Zhang et al., 2021b).

Dans l'ensemble, il semble que la littérature tende à réfuter un quelconque lien entre alpha-diversité microbienne et efficacité alimentaire. Les profondeurs de séquençage moyennes (initiales quand une raréfaction a été appliquée) des groupes comparés sont, par ailleurs, rarement mentionnées ce qui rend l'interprétation difficile (McLoughlin et al., 2020; Perea et al., 2017).

iii. Diversité β et efficacité alimentaire

La bêta-diversité est souvent évaluée entre populations microbiennes disjointes, avec d'une part la bêta-diversité des eucaryotes du rumen et d'autre part celle des procaryotes. Ces éléments complètent généralement une analyse univariée pour déterminer quels microorganismes influent sur l'efficacité alimentaire. Les éléments en lien avec la répartition des espèces microbiennes entre animaux efficaces et inefficaces seront abordés dans les paragraphes suivants. Globalement, les différences de bêta-diversité entre animaux d'efficacité alimentaire différente sont minimales comparativement aux différences préalablement observées entre segments digestifs (Freetly et al., 2020b; Perea et al., 2017).

d) Microorganismes identifiés comme ayant un lien avec l'efficacité alimentaire.

i. Les protozoaires ciliés

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet de la défaunation, c'est-à-dire de l'exclusion des protozoaires ciliés du microbiote ruminal, ou à la comparaison entre le microbiote d'animaux jeunes non colonisés par des ciliés avec leurs homologues présentant des ciliés dans leur microbiote. Ces études, synthétisées dans la méta-analyse de Newbold et al., ont mis en avant un rôle négatif des protozoaires sur la synthèse microbienne de protéines avec une quantité d'azote ammoniacal dans le rumen plus importante et un flux d'acides aminés microbiens arrivant à l'intestin moins important en présence de protozoaires ce qui pourrait avoir un impact sur l'absorption d'acides aminés par l'hôte (Newbold et al., 2015). En revanche, elles ont aussi mis en évidence un rôle positif des protozoaires dans la dégradation de la cellulose et des autres fibres pariétales (Ushida et al., 1990). Cependant, ces effets sont très

fortement liés au régime distribué ainsi qu'à l'espèce de ruminants considérée (Kittelmann & Janssen, 2011).

La plupart des études semblent mettre en avant une augmentation de l'efficacité chez les animaux défaunés au moins pendant les premiers temps de la défaunation ce qui laisse supposer un remodelage de la communauté microbienne au cours du temps (Bird & Leng, 1978; van Nevel et al., 1985). L'effet positif de la défaunation sur l'efficacité alimentaire pourrait reposer sur la diminution des émissions de méthane en l'absence de protozoaires (Guyader et al., 2014; Morgavi et al., 2012). La défaunation pourrait réduire de 11% les émissions de méthane (Newbold et al., 2015). Cette diminution peut être liée à l'augmentation des fermentations aboutissant à la synthèse de butyrate en présence de protozoaires et au lien entre méthanogénèse et butyrate (Newbold et al., 2015; Ushida et al., 1990). Cependant, il existe des études présentant une corrélation négative entre la quantité de protozoaires et l'éruclation de méthane (Carberry et al., 2012) ou la proportion de butyrate au sein des AGV (Bird & Leng, 1978). Il faut tout de même conserver à l'esprit que les différentes méthodes utilisées pour la défaunation peuvent avoir des effets étrangers à la simple absence de protozoaires (Guyader et al., 2014).

En utilisant les mesures de bêta-diversité UniFrac non pondérée et UniFrac pondérée, Zhang et al. ne sont pas parvenus à identifier de différence de bêta-diversité dans les populations d'eucaryotes ruminants entre les taurillons efficaces et inefficaces par Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) (Zhang et al., 2020a). En revanche, ils ont mis en évidence une augmentation significative de la proportion de protozoaires appartenant au genre *Entodinium*, le plus représenté dans le rumen, chez les bovins les plus efficaces après séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 18S en accord avec les données de comptage de l'étude de Silvestre et al. (Silvestre et al., 2022). Cependant, une étude ciblant spécifiquement le genre *Entodinium* par PCR quantitative n'est pas parvenue à mettre en évidence une différence entre animaux efficaces et inefficaces (Carberry et al., 2012).

ii. Bactéries

Les bactéries étant les microorganismes les plus abondants et les plus actifs au sein du rumen, il semble raisonnable de penser que des différences dans cette communauté puissent être un des piliers biologiques de l'efficacité alimentaire. Dans la plupart des cas, les méthodes employées ne permettent pas de quantifier de façon absolue les bactéries mais s'intéressent davantage aux abondances relatives. Plusieurs approches ont été utilisées, parfois concomitamment, dans les études. D'une part, une approche multivariée cherchant à séparer les individus efficaces et inefficaces sur la base de l'intégralité de leurs communautés bactériennes, d'autre part une approche univariée comparant les abondances ou abondances relatives de chaque bactérie entre groupes d'efficacité alimentaire.

Les approches multivariées se soldent fréquemment par une incapacité à discriminer les animaux efficaces et inefficaces (Auffret et al., 2020; Carberry et al., 2012; Myer et al., 2015b, 2015c; Paz et al., 2018; Perea et al., 2017; Silvestre et al., 2022; Xie et al., 2022; Zhang et al., 2021b; Zhou et al., 2021). Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à cette absence de discrimination : soit les différences entre animaux sont liées à quelques bactéries particulièrement actives dont la variation d'abondance pèse trop peu dans une analyse multivariée pour réellement influencer sur la structure de la communauté microbienne regroupant des milliers d'espèces; soit le nombre d'animaux dont le contenu ruminal a été séquencé est trop petit ; soit la communauté microbienne n'explique pas l'efficacité alimentaire auquel cas les différences parfois mises en évidence par approche univariée sont des artefacts liés aux comparaisons multiples réalisées à grande échelle dans le cas où on observe un ou plusieurs milliers d'espèces ou d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) par échantillon. En effet, quand les analyses comparent individuellement les OTUs, les résultats ne sont pas toujours ajustés pour tenir compte des comparaisons multiples (Auffret et al., 2020; Elolimy et al., 2018)

En mettant les études menant des analyses univariées sur les abondances relatives en regard les unes des autres, il est difficile d'identifier une bactérie, un genre ou une famille bactérienne, qui soit unanimement associée avec l'efficacité ou l'inefficacité alimentaire. De nombreux taxons ne sont mis en évidence que par une seule étude et d'autres, bien que souvent retrouvés, font l'objet de résultats contradictoires (par exemple les genres *Prevotella* et *Succinivibrio* et les familles Ruminococcaceae et Lachnospiraceae, Tableau I.2.1). Cela découle, premièrement, du fait que les études utilisent des animaux d'espèces différentes (vaches, zébus, moutons, chèvres...), de races différentes et nourris avec des régimes différents ; deuxièmement, du fait que certaines divergences de communautés bactériennes peuvent être simplement liées au

hasard quand le nombre d'animaux utilisé dans l'étude est faible ; troisièmement des différentes définitions de l'efficacité alimentaire évoquées précédemment et finalement du fait que les associations entre microorganismes et efficacité alimentaire puissent se faire à l'échelle des espèces bactériennes voire des souches ainsi que suggéré par les études qui associent des séquences appartenant au même genre voire à la même espèce à des groupes d'efficacité alimentaire différents (Jewell et al., 2015; Zhou et al., 2021). La localisation et la nature du prélèvement peuvent aussi avoir une influence. Ainsi, dans des prélèvements de jus de rumen de vaches laitières subséquentement séparés en phases solide et liquide, des OTUs appartenant aux Lachnospiraceae tendaient à être associées avec les animaux efficaces dans le liquide ruminal tandis que, dans la phase solide, plusieurs OTUs de cette famille étaient associées avec les animaux efficaces pour certaines et avec les animaux inefficaces pour d'autres (Jewell et al., 2015).

Nous avons tenté de faire une synthèse de la littérature à partir d'études menées chez des ruminants (ovins, bovins et zébus) et listées en Annexe 1. Cette synthèse est présentée dans le Tableau I.2.1 pour les Firmicutes et dans le Tableau I.2.2 pour les autres phyla.

Parmi les rares taxons qui semblent être associés avec un groupe d'efficacité de manière assez constante, le genre *Eubacterium*, appartenant à la famille des Eubacteriaceae et au phylum Firmicutes a été associé aux animaux inefficaces dans plusieurs études menées chez des bovins laitiers (Hernandez-Sanabria et al., 2012; Xie et al., 2022) ou allaitants (Auffret et al., 2020) (Tableau I.2.1) . Cependant, l'espèce *Eubacterium ruminantium* a été rapportée comme 2,2 fois plus abondante (par PCR quantitative) chez des taurillons efficaces (n=6) que chez les inefficaces (n=6) (Elolimy et al., 2018). Le genre *RF39* appartenant à la famille des Enterococcaceae a été associé aux animaux inefficaces dans deux études menées sur des vaches Holstein en lactation (Jami et al., 2014; Jewell et al., 2015) mais a été corrélé négativement à la RFI chez des taurillons (McGovern et al., 2018). La famille des Ruminococcaceae a été tantôt associée aux efficaces dans des régimes avec une forte proportion de fourrages (Liu et al., 2022) et tantôt aux inefficaces dans des régimes plus riches en concentrés (Brooke et al., 2019; Li et al., 2022). Le genre *Butyrivibrio* a été régulièrement associé avec les animaux inefficaces que ce soit chez la vache laitière (Jewell et al., 2015; Shabat et al., 2016; Xie et al., 2022) ou l'ovin allaitant (Liang et al., 2017).

Tableau I.2.1 : Associations rapportées dans la littérature entre l'efficacité alimentaire et les bactéries du phylum Firmicutes, p=Phylum, c=classe, o=ordre, f=famille, g=genre, s=espèce ; CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés. X-/X+ : X études ayant rapporté le taxon relativement plus abondant chez les efficaces (-) ou inefficaces (+) respectivement. Lorsque le taxon a été rapporté relativement plus abondant uniquement chez les animaux efficaces ou inefficaces il apparaît en jaune ou en bleu, respectivement. Lorsqu'au sein d'un même type de ration des associations contraires ont été rapportées il apparaît en vert.

Taxon	Ration CON	Ration MIX	Ration FOR
p/Firmicutes			
c/Bacilli, f/Lactobacillaceae	2+		
g/Sharpea	2+	1+	
g/Lactobacillus	1+		
o/Enterococcaceae, g/RF39	1-/1+		1+
o/Paenibacillaceae, g/Paenibacillus	1+	1+	
c/Negativicutes	1+		
o/Selenomonadales	1+		
g/Selenomonas		1-	
f/ Acidaminococcaceae		1+	
g/Acidaminococcus	2-		
f/Veillonellaceae	1+	1-	
g/Succiniclaticum	2-/1+		
g/Megasphaera	1-		
o/Clostridiales		1+	
g/Clostridium	1+	1+	
g/Sarcina	1-		
g/Eubacterium	2+	1+	
s/Eubacterium ruminantium	1-		
f/Family XIII			1-
o/Eubacteriales			
f/ Lachnospiraceae	1+	3-/1+	1-
g/Blautia		1+	
g/Butyrivibrio	2+	3+	
g/Coprococcus	1+	2-	
g/Pseudobutyrvibrio		1+	2-
g/ND3007		1-	
g/NK3A20		1-	
g/Shuttleworthia	1+	1-	
f/Ruminococcaceae	2+	1-/1+	1-
f/Christensenellaceae		2+	

Le phylum Fibrobacteres, composé d'un unique genre : *Fibrobacter*, a été identifié comme plus abondant chez les individus efficients sous différents régimes (Auffret et al., 2020; Li et al., 2022) (McGovern et al., 2018) (Tableau I.2.2). Mais, cette fois aussi, une étude contradictoire existe, associant *Fibrobacter* aux animaux inefficients (McLoughlin et al., 2020).

Le phylum Proteobacteria, ainsi que des taxons de niveau inférieur : Famille/Sphingomonadaceae, Genre/*Kaitobacter*, ont été associés aux animaux efficients dans le jéjunum de bœufs en croissance tandis qu'au niveau caecal les animaux inefficients abritaient une abondance relative plus importante de Bacteroidales (Myer et al., 2015b, 2016).

Les familles des Rikenellaceae, Campylobacteraceae et Neisseriaceae ont été associées aux animaux efficients dans plusieurs études (Andrade et al., 2022; Li et al., 2022; Liu et al., 2022) (Tan et al., 2021) (Tableau I.2.2). Ces deux dernières ont été identifiées comme ayant une plus forte activité au niveau de l'épithélium ruminal des animaux efficients, elles jouent peut-être un rôle par leur potentiel de capture de l'oxygène assurant au rumen son anaérobiose (Tan et al., 2021).

Tableau I.2.2 : Associations rapportées dans la littérature entre l'efficacité alimentaire et les bactéries des phyla Fibrobacter, Bacteroidetes, Proteobacteria et Spirochaetes, p=Phylum, c=classe, o=ordre, f=famille, g=genre, s=espèce ; CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés. X-/X+ : X études ayant rapporté le taxon relativement plus abondant chez les efficients (-) ou inefficients (+) respectivement. Lorsque le taxon a été rapporté relativement plus abondant uniquement chez les animaux efficients ou inefficients il apparaît en jaune ou en bleu, respectivement. Lorsqu'au sein d'un même type de ration des associations contraires ont été rapportées il apparaît en vert.

Taxon	Ration CON	Ration MIX	Ration FOR
p/Fibrobacteres	1-		
g/ <i>Fibrobacter</i>	2-/ 1+	1-	1-
p/Bacteroidetes f/Prevotellaceae	1+	2+	1-/2+
g/Prevotella	4-/4+	1-/2+	3-/2+
g/Paraprevotella	2-		
g/YRC22			1+
f/Rikenellaceae, g/Rikenellaceae RC9		3-	2-
p/Proteobacteria		2-	1+
g/Bifidobacterium	1+	1+	
f/Succinivibrionaceae, g/Succinivibrio	1-	1-/2+	1+
f/ Neisseriaceae	1-		
f/ Campylobacteraceae	2-		
p/Spirochaetes, g/Treponema	1-		1-

Pour conclure, il est rare que des variations réellement appréciables soient observées entre les communautés bactériennes des animaux efficaces et des animaux inefficaces. La diversité bactérienne ne semble pas un bon indicateur de l'efficacité et si des relations peuvent être établies entre l'efficacité et certains taxons, aucun consensus ne se dégage de la littérature existante à ce jour. Cela peut être dû aux fortes différences de régime entre les différentes études mais également au caractère dynamique de la population bactérienne du rumen ou des autres segments digestifs (Jewell et al., 2015).

Quand un taxon ressort associé à l'efficacité ou à l'inefficacité les auteurs tentent de l'expliquer par le métabolisme particulier de la bactérie en question, par son caractère plus amylolytique ou fibrolytique (McGovern et al., 2018), par sa capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène (Tan et al., 2021) ou par l'orientation particulière de son métabolisme (Auffret et al., 2018; Xue et al., 2022). Pour cette raison, de plus en plus d'études s'orientent vers la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique qui permettent d'observer les phénomènes physiologiques qui se déroulent au sein des compartiments digestifs plutôt que la communauté bactérienne dont on sait qu'elle connaît de nombreuses redondances fonctionnelles rendant peu probable l'identification d'une bactérie particulièrement associée à l'efficacité de la digestion d'une ration.

iii. *Archées*

Dans la mesure où les archées dites méthanogènes sont responsables de l'éruclation de carbone réduit, il a été supposé que des modifications de la communauté archéale puissent être, en partie, responsables de variations d'efficacité alimentaire (Martin et al., 2010).

La grande majorité des archées du rumen appartiennent au phylum Euryarcheota qui contient très majoritairement des archées méthanogènes (Reeve et al., 1997; Tan et al., 2021; Xie et al., 2022). En particulier, la plupart des archées ruminales appartiennent aux genres *Methanobrevibacter* et *Methanosphaera* (Carberry et al., 2014; Fouts et al., 2012; Kittelmann et al., 2013; Kumar et al., 2015; Li et al., 2020; Wright et al., 2004) et globalement la diversité archéale est assez faible pour les niveaux taxonomiques supérieurs à l'espèce que ce soit chez les bovins ou les ovins (Carberry et al., 2014; McLoughlin et al., 2020).

Plusieurs études ont mesuré l'abondance totale de méthanogènes par PCR quantitative sans parvenir à la corréler avec les indices d'efficacité alimentaire (Zhou et al., 2009, 2010) ou la

quantité de méthane érucitée (Kittelmann et al., 2014). Les proportions relatives des différentes séquences archéales ont été comparées entre deux groupements d'échantillons provenant de bovins en croissance efficaces (n=29) et inefficaces (n=29). (Zhou et al., 2009). Cette première analyse a révélé une dominance de *Methanobrevibacter ruminantium* NT7 dans les deux groupements d'échantillons et une proportion plus importante de *Methanosphaera stadtmanae* et *Methanobrevibacter* sp. strain AbM4 dans le groupement des animaux inefficaces ce qui a été confirmé par l'analyse par PCR quantitative des 58 échantillons séparément. L'abondance relative du genre *Methanobrevibacter* a également été rapportée comme étant plus importante chez les animaux inefficaces dans plusieurs autres études menées sur des bovins laitiers (Shabat et al., 2016; Xue et al., 2022) ou allaitants (Li & Guan, 2017; Lopes et al., 2021).

Cependant, l'abondance relative de l'espèce *Methanobrevibacter ruminantium* a été rapportée comme plus élevée chez des vaches laitières efficaces que chez leurs homologues inefficaces (en parallèle d'une augmentation de l'abondance relative du genre *Methanosphaera*) (Xie et al., 2022). Les liens entre le genre *Methanobrevibacter* et l'efficacité alimentaire semblent contradictoires mais il est possible que l'analyse à l'échelle du genre, voire même de l'espèce, ne représente pas correctement l'activité de la communauté archéale.

En effet, le genre *Methanobrevibacter* a récemment été divisé en clades présentant des caractéristiques métaboliques communes, l'un regroupant *Methanobrevibacter gottschalkii* et assimilés et l'autre regroupant *Methanobrevibacter ruminantium* et assimilés (Kittelmann et al., 2013). Du fait de la tendance à la co-abondance intra-clade, il a été suggéré que ces deux clades nommés SGMT (*smithii-gottschalkii-millerae-thaurei*) et RO (*ruminantium-olleyae*) puissent se développer dans des conditions différentes (King et al., 2011; St-Pierre & Wright, 2012). L'absence du gène codant pour la méthyl-coenzyme M réductase II (Mcr II) dans les génomes des archées assimilées à *Methanobrevibacter ruminantium*, suggère que le clade RO est plutôt adapté à des environnements peu riches en H₂, cette enzyme étant inductible chez *Methanobrevibacter smithii* quand la concentration en H₂ augmente au sein du rumen (Tapio et al., 2017; Wagner et al., 2017). Dans l'ensemble, aucun consensus sur les proportions relatives des représentants de ces deux clades en lien avec l'efficacité alimentaire ne ressort de la littérature (Freetly et al., 2015).

L'ordre des Methanomassiliicoccales est le deuxième ordre le plus représenté dans le rumen après celui des Methanobacteriales. Son association avec l'efficacité alimentaire n'est pas unanime (Li et al., 2019; Li & Guan, 2017).

iv. *Champignons*

Les champignons anaérobies, bien qu'en plus faible abondance que les bactéries ou les archées sont capables de dégrader les parois cellulaires très efficacement grâce à un vaste panel d'enzymes capables de cliver la cellulose et les hémicelluloses (Akin & Borneman, 1990; Couger et al., 2015; Ljungdahl, 2008). Les champignons anaérobies du rumen appartiennent à cinq phyla : Neocallimastigomycota et Ascomycota étant les plus importants et Basidiomycota, Mucoromycota et Zygomycota (ou Chytridiomycota) les plus minoritaires (Fliegerova et al., 2021; Kumar et al., 2015; Zhang et al., 2020a). La diversité fongique ruminale est similaire à celle des archées et bien inférieure à celle des bactéries (Kittelmann et al., 2013).

La littérature mettant en relation l'efficacité alimentaire et les populations fongiques du rumen est assez restreinte. Ainsi, dans l'étude multi-domaines de Lopes et al., un seul champignon, du genre *Buwchfawromyces*, a présenté une abondance différente entre les fractions solides ruminales des groupes de zébus de RFI différente (Lopes et al., 2021).

L'étude métataxonomique des populations microbiennes ruminales a permis d'identifier quelques liens entre des populations microbiennes et l'efficacité alimentaire. En particulier, la diversité microbienne ne semble pas être un critère absolu pour l'efficacité alimentaire et il semble que les profils archéaux et bactériens plus que l'abondance totale des microorganismes de ces règnes soient liés à l'efficacité alimentaire. Cependant, la plupart des études ayant examiné les liens entre efficacité alimentaire et communautés microbiennes ont été réalisées sur un petit nombre d'animaux soumis à des régimes très variés ce qui empêche de faire émerger une véritable conclusion.

L'effet potentiel des microorganismes sur l'efficacité alimentaire pourrait être lié à une modification de la digestion de la ration et potentiellement à une modification des produits de dégradation de ses composants. Le paragraphe suivant sera consacré aux métabolites ruminiaux, en particulier les AGV, et à leur potentiel impact sur l'efficacité alimentaire.

4. Activités microbiennes et leur potentiel impact sur l'efficacité alimentaire

a) Catabolisme des glucides au sein du rumen et synthèse préférentielle d'AGV

i. *La synthèse d'AGV au sein du rumen*

Dans le rumen, les polymères glucidiques qu'ils soient intracellulaires ou pariétaux sont fermentés par les microorganismes. Ils sont tout d'abord clivés en monomères glucidiques (glucose, mannose, arabinose, xylose...) par certaines bactéries, protozoaires et champignons anaérobies exprimant des amylases, des cellulases et des hémicellulases (Hobson & Stewart, 1997). Ces monomères peuvent pénétrer au sein des cellules microbiennes et subir une glycolyse anaérobie conduisant à la formation de pyruvate qui est rapidement transformé par des fermentations incomplètes aboutissant à la formation d'AGV et de gaz (H_2 , CO_2 , CH_4) (Figure I.2.3). Au cours de ce processus, des accepteurs d'électrons sont réduits et une partie des électrons et protons libérés est également prise en charge par des hydrogénases et convertie en H_2 (Kelly et al., 2022) qui sera en grande majorité éliminé par réduction de CO_2 en CH_4 par les méthanogènes (voir Chapitre 2, 4) b) Méthanogénèse, page 46). La perte de méthane représente à la fois une perte de carbone et une perte de potentiel réducteur, oxydé pour réduire le CO_2 , et autrement utilisé par les microorganismes et l'hôte pour produire de l'énergie.

Les principaux AGV dosés dans le rumen sont l'acétate, le propionate et le butyrate dont les proportions sont assez conservées entre espèces de ruminants et varient essentiellement en fonction de la ration distribuée (Bergman, 1990; Gleason et al., 2022). Par ordre d'importance, l'acétate représente 50 à 70% des AGV du rumen et approximativement la moitié de l'énergie représentée par les AGV (Bergman et al., 1965), le propionate 15 à 30% des AGV et 25% de l'énergie et le butyrate 6 à 14% des AGV et 20% de l'énergie (Balch & Rowland, 1957; Bergman et al., 1965; Morvay et al., 2011). Lorsque les ruminants sont nourris avec une très forte proportion de concentrés riches en amidon et pauvres en fibres, la proportion de propionate peut augmenter au-delà de ces valeurs au détriment de l'acétate (Sauvant et al., 2011). Par ailleurs d'autres substrats peuvent servir à la production d'AGV. En particulier, les acides aminés peuvent être déaminés et donner du valérate, de l'isovalérate et de l'isobutyrate qui représentent généralement moins de 5% du total (Robinson et al., 2010).

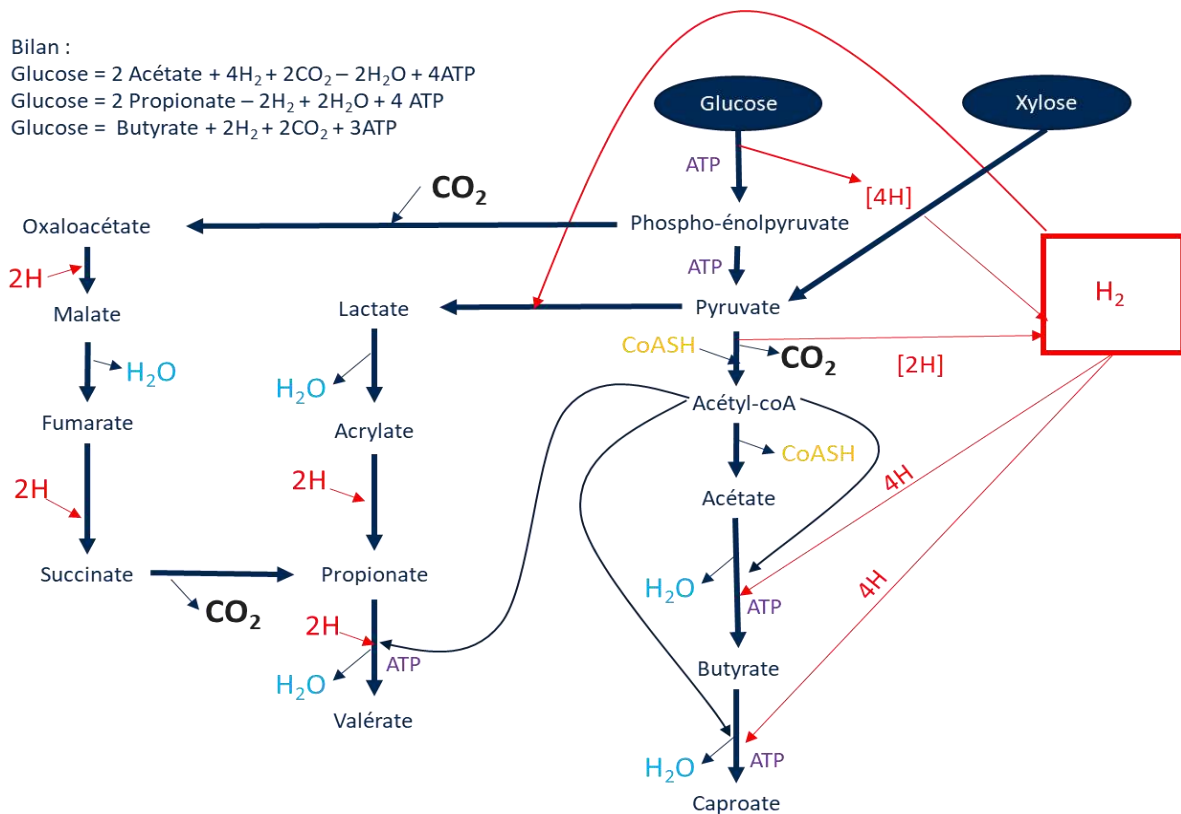


Figure I.2.3 : Synthèses d'AGV au sein du rumen et bilans (Sauvant et al. 2011, Baldwin et al. 2017)

Globalement 75% de l'énergie métabolisable des polymères glucidiques est récupérée par l'animal sous la forme d'AGV, le quart restant étant utilisé par les microorganismes ou perdu majoritairement sous forme de CH₄ (Bergman, 1990). L'absorption des AGV dans le rumen est essentiellement passive et concentration-dépendante mais peut aussi être active par l'intermédiaire de transporteurs des acides monocarboxyliques (MCT) (Ishaku & Abdullahi, 2010).

Les concentrations en AGV obtenues par dosage sont la résultante de la production des AGV et de leur absorption. De fait, la quantité totale d'AGV au sein du rumen dépend fortement de la proximité du dernier repas ainsi que des méthodes de prélèvement (Barcroft et al., 1943). En effet, lorsque le contenu ruminal est prélevé à l'aide d'une sonde œsophagienne, de la salive peut être aspirée à la fois dans le rumen et dans l'œsophage ou la cavité buccale ce qui peut fausser les résultats (Hall, 2015).

La partition des différents AGV au sein du rumen dépend de plusieurs facteurs interdépendants : la composition de l'aliment (en particulier la proportion de NDF par rapport à la matière organique) (Bauman et al., 1971; Ellison et al., 2017; Nozière et al., 2011), la dégradabilité ruminale des composants de la ration, la population microbienne (Hernandez-Sanabria et al., 2010; Zhang et al., 2020b) et les paramètres de l'environnement ruminal (présence d'inhibiteurs de certaines réactions par exemple) (Armentano & Young, 1983). Le profil en AGV n'est pas biaisé par le mode de prélèvement (Balch & Rowland, 1957) mais il est possible qu'il varie en fonction de la distance au dernier repas du fait des différences de vitesse de production et d'absorption des différents AGV : l'absorption des isoacides est plus lente que celle de l'acétate et du propionate qui sont, eux-même absorbés légèrement moins rapidement que le butyrate et le valérate (Gleason et al., 2022; Storm et al., 2012). Ces différences sont vraisemblablement liées au caractère lipophile des AGV, l'acétate étant plus dépendant du transport actif que les AGV à plus longue chaîne (Aschenbach et al., 2009) mais semblent également pH dépendantes (Gray, 1948).

Dans la plupart des études, c'est la proportion des différents AGV, et en particulier le ratio entre l'acétate non-glucogénique et le propionate glucogénique, qui sont étudiés.

ii. *Liens entre les profils en AGV et l'efficacité alimentaire*

Puisque les AGV sont la principale source d'énergie pour le ruminant, il semble raisonnable de supposer que la capacité du microbiote à produire des AGV et l'orientation des fermentations puissent être des déterminants majeurs de l'efficacité alimentaire (Bergman, 1990). En particulier, parmi les différentes voies de production des AGV, les voies aboutissant à la formation de propionate sont assez économes en carbone puisqu'elles n'impliquent pas de décarboxylation (en bilan) et sont consommatrices des électrons et protons libérés par les autres voies ce qui limite les pertes sous forme de gaz (Hobson & Stewart, 1997) (Figure I.2.3). Dans les études multi-omiques de Shabat et al. et Xue et al. la voie acrylique était surreprésentée dans les métagénomomes ou métatranscriptomes des animaux efficaces et l'acrylate, intermédiaire de production du propionate était présent à plus forte concentration dans le rumen des animaux efficaces (Shabat et al., 2016; Xue et al., 2022).

Bien que la littérature reliant les proportions molaires des différents AGV au sein du rumen et l'efficacité alimentaire ne soit pas absolument consensuelle, la majorité des études qui mettent en évidence une modification des paramètres fermentaires lie la concentration de propionate

(ou sa proportion) à l'efficacité que ce soit chez le bœuf en croissance (Herd et al., 2019), la génisse (Lawrence et al., 2011), la vache laitière (Shabat et al., 2016; Xie et al., 2022) ou les ovins en croissance (Ellison et al., 2017; Kittelmann et al., 2014; Liang et al., 2017). Au contraire, des études chez les bovins ont mis en évidence un rapport acetate/propionate plus élevé chez les animaux efficaces (Johnson et al., 2019; Krueger, 2009; McGovern et al., 2018)

Des études contradictoires ont associé la proportion d'isoacides avec l'efficacité (Arce-Recinos et al., 2022b, 2022a; Xie et al., 2022) ou l'inefficacité (Hernandez-Sanabria et al., 2010). Enfin, un grand nombre d'études n'est pas parvenu à mettre en évidence un quelconque lien entre les proportions des AGV et l'efficacité (Auffret et al., 2020; Ellison et al., 2019; Kern et al., 2016; Lam et al., 2018; Liu et al., 2022; Rius et al., 2012).

Concernant la concentration totale en AGV, Shabat et al. ont montré que les échantillons de jus de rumen provenant d'animaux efficaces étaient plus riches que ceux des animaux inefficients (Shabat et al., 2016) ce qui suggère une activité microbienne supérieure (Guan et al., 2008). Cependant, plusieurs études ont trouvé le contraire en particulier avec des régimes riches en concentrés (Hernandez-Sanabria et al., 2012; McGovern et al., 2020; Xie et al., 2022). Il est important de prendre en compte le fait que les AGV mesurés au niveau ruminal sont la résultante de la production d'AGV à partir des fermentations microbiennes des aliments et de l'absorption ruminale desdits AGV, les deux étant intimement liés (Aschenbach et al., 2011).

Une étude récente a montré des différences d'expression de gènes impliqués dans l'absorption des AGV entre animaux efficaces et inefficients (Elolimy et al., 2018). En particulier, les animaux efficaces avaient une expression plus forte de l'ARN messager codant pour la protéine SLC16A3 et les animaux inefficients pour le transporteur SLC9A2. Le transporteur SLC16A3 est un transporteur de divers acides monocarboxyliques tels que l'acétate, le butyrate, le lactate ou le pyruvate tandis que le transporteur SLC9A2 est une protéine impliquée dans l'antiport d'ions Na^+ et de protons et donc dans la régulation du pH. Une hypothèse serait que l'absorption des AGV soit moins forte chez les animaux inefficients et que cela provoque une activation de l'expression de SLC9A2, stabilisant le pH. En revanche, parmi les six gènes impliqués dans le métabolisme des AGV dont l'expression a été mesurée, aucun n'était lié à la RFI (Elolimy et al., 2018) contrairement à l'étude de Xue et al. qui mettait en évidence une augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse des AGV, majoritairement du propionate, chez les vaches laitières les plus efficaces et des enzymes impliquées dans la méthanogénèse chez les plus inefficientes (Xue et al., 2022). Cette dernière étude confirme, par métatranscriptomique, les analyses de profils en AGV observés dans les études précédentes.

L'expression d'une seule enzyme impliquée dans la synthèse d'acétate et une dans la synthèse de butyrate étaient augmentées modérément contre des augmentations plus importantes de quatre enzymes impliquées dans la production de propionate que ce soit par la voie lactique ou succinique (Xue et al., 2022).

b) Méthanogénèse et efficacité alimentaire

Le H₂ produit au cours de la fermentation des glucides peut être utilisé par les archées méthanogènes pour réduire le CO₂ issu des processus fermentaires en méthane : $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (Martin et al., 2010). Cette première voie, majoritaire dans le rumen, est appelée voie « hydrogénotrophe » et est réalisée par la plupart des méthanogènes (Danielsson et al., 2017; Hook et al., 2010). Les différentes voies de synthèse des AGV ne sont pas équivalentes quant à la production de H₂ (Figure I.2.3). De ce fait, d'assez fortes corrélations entre les émissions de méthane et l'acétate ($r = 0.58$, $p < 0.001$), le propionate ($r = -0.57$, $p < 0.001$) et le valérate ($r = -0.35$, $p < 0.001$) ont été mises en évidence, en particulier sous un régime riche en fourrages (Auffret et al., 2018). Ces liens justifient que dans certaines études l'éructation de méthane n'est pas mesurée mais déduite du profil en AGV (Arce-Recinos et al., 2022a; Moss et al., 2000).

Une seconde voie de production du méthane repose sur la réduction de groupements méthyles. Cette voie, qui peut prendre pour substrats les méthylamines ou le méthanol, est appelée voie « méthyloprote » (Carberry et al., 2014; Poehlein et al., 2018). Une troisième voie, appelée voie « acétotrophe » consomme une molécule d'acétate et de l'ATP pour former du méthane et du dioxyde de carbone sans consommer de dihydrogène cumulant ainsi tous les inconvénients pour l'hôte. Cette voie n'est réalisée que par deux genres d'archées : *Methanosarcina* et *Methanosaeta*, et est minoritaire dans le rumen (Megonigal et al., 2014).

Quelle que soit la voie empruntée, la méthanogénèse est un phénomène spontané dans l'environnement ruminal, chaud et anaérobie.

Au-delà des aspects environnementaux liés au méthane qui est un gaz à effet de serre à fort potentiel de réchauffement global, l'éructation de ce gaz représente une perte énergétique qui peut avoisiner 10% de l'énergie brute ingérée (Johnson et al., 2019; Johnson & Johnson, 1995; Van Nevel & Demeyer, 1996). Cependant, pour certains auteurs, l'augmentation de l'éructation de méthane est en réalité liée à une augmentation de la digestibilité de la matière organique

donc à une diminution de la perte fécale des nutriments et peut ne pas être associée de façon aussi simple à une diminution de l'efficacité alimentaire (Guinguina et al., 2020).

De fait, la plupart des études mettant en évidence une diminution des émissions de méthane par les animaux efficaces expriment cette diminution par une érucation globale plus faible en volume ou en masse par jour ou par kilogramme de poids métabolique/jour (Fitzsimons et al., 2013; Hegarty et al., 2007; Nkrumah et al., 2006; Xue et al., 2022). Mais, lorsque cette quantité est ramenée au kilogramme de MSI, (Methane Yield = $\text{gCH}_4/\text{kgMSI}$) les différences sont moins marquées ce qui suggère que le principal facteur impliqué dans la méthanogénèse est la quantité de MSI, nécessairement corrélée à la RFI par construction (Auffret et al., 2018; Buddle et al., 2011; Fox et al., 2018).

La quantité de méthane érucée ne dépend pas uniquement du profil archéal ou de la quantité de MSI, mais aussi de la composition des aliments. Ainsi, un régime riche en fourrages ou en betterave favorisera la synthèse d'acétate et de butyrate plutôt que de propionate et sera plus susceptible d'augmenter la quantité de CH_4 érucée (Beauchemin et al., 2008; Carberry et al., 2014; Münnich et al., 2018; Smith et al., 2021; Soder et al., 2016). Par ailleurs la capacité des méthanogènes à capturer le H_2 semble diminuer à pH inférieur à 6, même après addition d'hydrogène dans le milieu ce qui suppose que ce n'est pas seulement une compétition entre la synthèse de propionate et la méthanogénèse qui est en jeu (Kessel & Russell, 1996; Russell, 1998). La communauté microbienne ruminale a aussi son importance dans les réactions associées à la méthanogénèse, que ce soient les protozoaires dont l'abondance a été corrélée à l'érucation de méthane (Guyader et al., 2014) ou les bactéries dont certains genres comme *Ruminococcus*, *Coprococcus* ou *Eubacterium* produisant plus de H_2 ont été associés aux animaux fortement émetteurs de méthane tandis que d'autres comme *Fibrobacter*, *Olsenella* ou *Sharpea* l'ont été aux faiblement émetteurs (Kittelman et al., 2014; Tapio et al., 2017).

Enfin, si la réduction des émissions de méthane peut être recherchée à la fois sur le plan environnemental et sur celui de l'efficacité alimentaire, cette réduction n'est envisageable que si d'autres mécanismes se mettent en place pour prendre en charge le H_2 qui, autrement, risque de perturber les fonctions digestives et fermentaires du rumen (Jouany, 2008).

c) Acides gras longs, efficience alimentaire et lien avec le métabolisme de l'hôte

i. *Les AG longs au niveau ruminal*

Les acides gras (AG) à chaîne longue présents dans le rumen proviennent de deux sources, d'une part de l'alimentation, d'autre part de la synthèse microbienne d'acides gras intégrés dans les membranes cellulaires. Par ailleurs, les AG insaturés apportés par l'alimentation subissent souvent des transformations au sein du rumen, notamment une biohydrogénation. Cette biohydrogénation, initialement mécanisme de défense contre la toxicité des AG insaturés, pourrait également représenter un puits à hydrogène puisque leur réduction est effectuée à partir du H₂ ruminal (Castillo-Lopez & Dominguez, 2019). Cependant, cette consommation, estimée à 1% du H₂, est beaucoup moins importante que par la méthanogénèse ou la synthèse de propionate (Johnson & Johnson, 1995; Popova et al., 2011).

La biohydrogénation des AG ne peut avoir lieu que si leur fonction acide carboxylique est libre ce qui suppose une première étape d'hydrolyse pour ceux dont l'acide est estérifié. Par la suite, les AG polyinsaturés d'origine alimentaire, principalement l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) et l'acide alpha-linolénique (ALA, C18 :3 n-3), subissent des réactions d'isomérisation, d'hydrogénation et de réduction catalysées par des enzymes microbiennes. Les microorganismes les plus impliqués dans la biohydrogénation des lipides sont les bactéries et en particulier appartenant au genre *Butyrivibrio* (Fukuda et al., 2007). En particulier l'ALA et le LA sont isomérisés en diènes et triènes conjugués (c'est-à-dire en acides gras polyinsaturés dont les insaturations ne sont séparées que par une liaison) par la delta-12 isomérase puis réduits en acide vaccénique (C18:1t11) et en acide stéarique (C18:0). Cependant, d'autres voies existent, qui ne sont pas réalisées par le genre *Butyrivibrio* (Lourenço et al., 2010). En particulier, une isomérisation alternative du LA en acide linoléique conjugué (CLA) t10,c12 et sa réduction en C18:1t10 peut être réalisée par certaines bactéries comme *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002) ou *Cutibacterium acnes* (Wallace et al., 2007), en particulier dans des régimes riches en concentrés favorisant l'acidification du rumen (Alves et al., 2021).

Les réactions de biohydrogénation sont rarement complètes au niveau du rumen et le pourcentage de biohydrogénation dépend de l'AG considéré ainsi que des conditions physiologiques du rumen (Doreau et al., 2012). Ainsi, avec un régime riche en concentrés, la biohydrogénation est généralement moins importante (Alves et al., 2021).

La synthèse des AG microbiens est réalisée par les bactéries majoritairement, à partir des AGV et des squelettes carbonés issus de la déamination. Les AG d'origine microbienne ont la particularité d'être parfois impairs et ramifiés contrairement aux AG d'origine alimentaire. La ramification est dans la plupart des cas située sur le dernier carbone avant la fonction méthyle terminale, auquel cas on les qualifie d'iso-AG ou sur l'avant-dernier carbone, ils sont alors qualifiés d'anteiso-AG. Par ailleurs, au sein des membranes des bactéries anaérobies strictes on retrouve des plasmalogènes qui présente une liaison vinyl-éther en première position du glycérol et certaines bactéries sont également capables de convertir des AGMI en AG contenant un groupe hydroxyl- ou carbonyl- que l'on désigne avec le préfixe hydroxy- ou oxo- (Goldfine, 2010; Hudson et al., 1995).

ii. *Liens entre les AG longs et l'efficacité alimentaire*

Peu d'études se sont intéressées aux liens entre AG longs du rumen et efficacité alimentaire et elles reposent sur un nombre faible d'animaux. Toral et al. ont montré une accumulation d'acide stéarique (C18:0) au détriment des AG à 18 carbones mono- et poly-insaturés dans le rumen de brebis laitières efficaces en comparaison de leurs homologues inefficaces (Toral et al., 2021). Ces résultats sont cohérents avec ceux d'Artegoitia et al, dont l'étude métabolomique menée sur des taurillons divergeant par leur GMQ à ingestion identique a montré une proportion plus faible d'ALA et de LA dans le rumen des animaux à forte vitesse de croissance (Artegoitia et al., 2017). Enfin, l'étude de Xue et al. menée sur des vaches Holstein en lactation a identifié l'acide laurique C12 :0 comme potentiel marqueur biologique d'efficacité alimentaire sans que celui-ci soit particulièrement lié à un genre bactérien et sans autre explication (Xue et al., 2022).

Les CLA, en particulier les deux CLA majoritaires que sont le CLA_{cis9}, trans₁₁ et le CLA_{trans10}, cis₁₂, ont été rapportés comme limitant l'adipogénèse et la lipogénèse dans de nombreuses espèces, y compris de ruminants (Dirandeh et al., 2021; Martins et al., 2015; Park & Pariza, 2007; Shi et al., 2017; Trinchese et al., 2020). Chez les animaux laitiers, les CLA sont en partie responsables du syndrome de dépression de la matière grasse laitière et, chez les animaux allaitants, ils pourraient avoir un effet sur les variations de composition corporelle observées entre animaux efficaces et inefficaces (Zhang et al., 2017) (voir Chapitre 3 : 4) c) Composition Corporelle, page 60). En particulier, il semblerait que l'isomère CLA_{trans10},cis₁₂ possède une action anti-adipogénique plus marquée (Martins et al., 2015) possiblement par stimulation de l'expression de PPAR- α impliquée dans la bêta-oxydation des lipides et la

régulation de la glycémie (Trinchese et al., 2020) et par inhibition de gènes impliqués dans la lipogénèse (Shi et al., 2017). Dans une étude de supplémentation de jeunes bovins par des CLA rumino-protégés, un effet modéré de la supplémentation sur l'augmentation du FCE associée à une diminution du score d'engraissement (noté de 1 à 5) a été observé (Schiavon et al., 2019). Les animaux supplémentés tendaient à avoir une concentration sanguine en albumine et en protéines totales plus faible et avaient une urémie plus faible ce qui laisse supposer un effet des CLA sur le métabolisme protéique (Schiavon et al., 2019).

Ainsi les AG ruminiaux sont issus de la digestion mais sont susceptibles de jouer un rôle au niveau métabolique dont les liens avec l'efficacité alimentaire seront développés dans le chapitre suivant. Les liens des AG ruminiaux avec les AG du tissu adipeux des ruminants et avec la qualité nutritionnelle et organoleptique de la viande de ceux-ci ont été plus extensivement étudiés mais ne constituent pas à proprement parler des éléments d'efficacité alimentaire. Ils ne seront pas abordés dans ce manuscrit de thèse.

L'efficacité de la digestion pourrait contribuer, au moins en partie, à l'efficacité alimentaire. Chez les ruminants, celle-ci reposerait surtout sur le microbiote ruminal.

Des variations de communautés microbiennes ont été mises en évidence dans les multiples études s'étant intéressées aux liens entre microbiote ruminal et efficacité alimentaire, cependant, la plupart de ces études ont été réalisées sur un petit nombre d'animaux soumis à des régimes très variés ce qui empêche de faire émerger une véritable conclusion.

Ces différences de communautés microbiennes peuvent avoir un effet sur l'efficacité digestive de l'animal par une plus ou moins bonne valorisation des aliments. En particulier, sur le plan de la digestion des glucides, une augmentation de la proportion de propionate dans le rumen semble associée avec une meilleure efficacité alimentaire chez les ruminants en croissance.

Nous analyserons séparément les populations microbiennes ruminales dans deux régimes et choisirons une approche intégrant les quatre règnes suivants : archées, bactéries, protozoaires et champignons anaérobies, pour chercher un lien entre microbiote et efficacité alimentaire chez l'ovine, chez lequel très peu d'études ont été menées à ce jour. Nous réaliserons aussi des analyses métabolomiques pour avoir un aperçu des phénomènes se déroulant au sein du rumen et pouvant expliquer l'efficacité alimentaire.

Les premières études ayant tenté de quantifier l'importance de l'efficacité digestive sur l'efficacité alimentaire lui ont accordé une place assez peu importante au regard des phénomènes métaboliques qui seront abordés dans le chapitre suivant. Cependant, des différences de digestibilité de la matière organique et de ses divers constituants ont pu être observées entre animaux efficaces et inefficaces et, si certains résultats semblent parfois contradictoires, il est possible que les animaux efficaces soient en partie les animaux dont la capacité d'adaptation digestive à la ration est la meilleure (Figure I.2.4).

Les processus digestifs ne sont pas indépendants des processus métaboliques que ce soit par l'énergie nécessaire au processus de digestion et à l'entretien des tissus digestifs ou par les actions des produits des multiples réactions se déroulant dans le rumen sur les divers tissus de l'hôte.

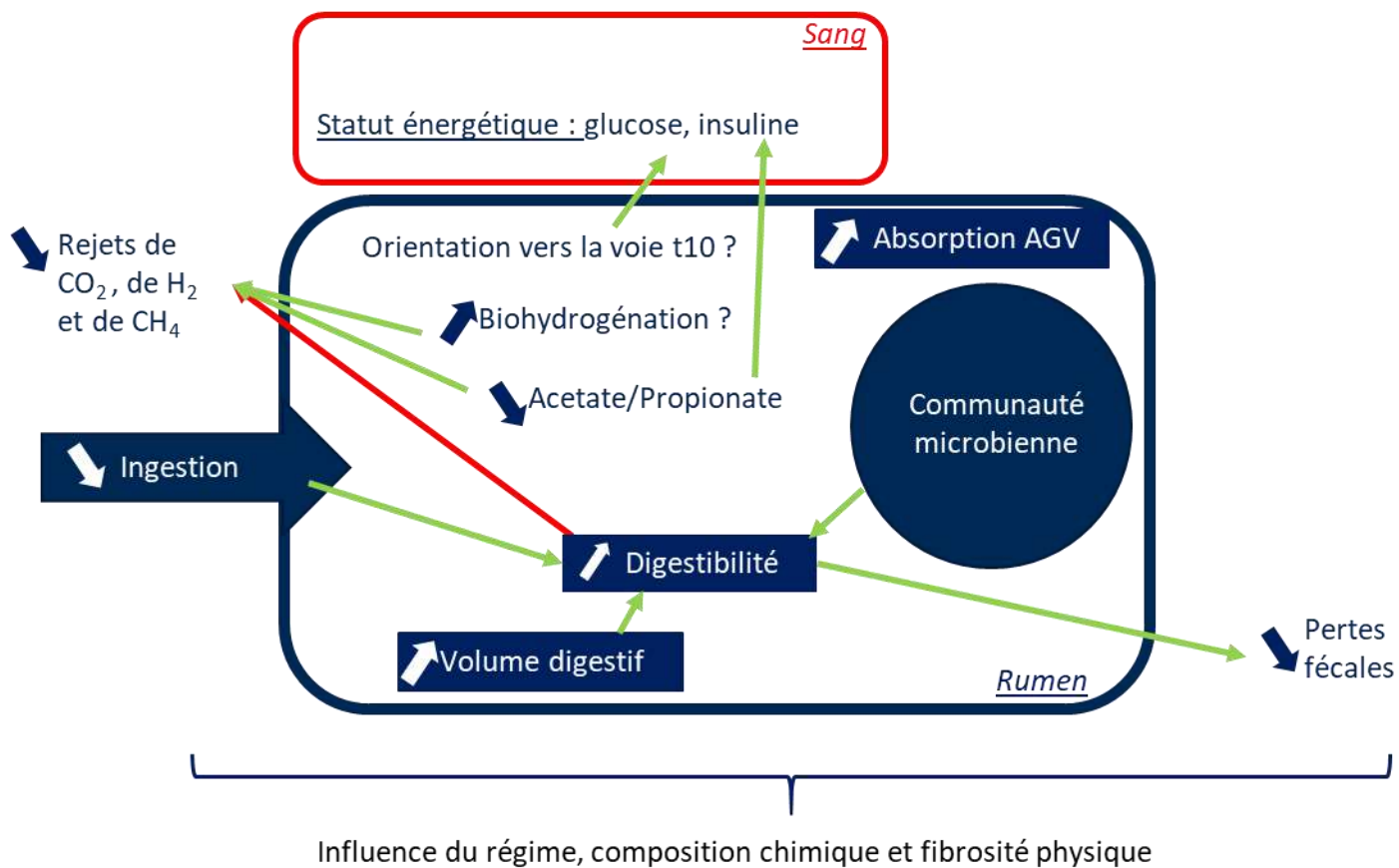


Figure I.2.4: Résumé des principaux facteurs qui pourraient expliquer l'efficacité alimentaire en lien avec l'efficacité digestive. Les flèches vertes et rouges témoignent d'une association positive ou négative entre déterminants. Ainsi, l'augmentation de la digestibilité apparente de la ration et la diminution des rejets gazeux sont tous deux des déterminants de l'efficacité alimentaire mais il existe un antagonisme entre eux. Les points d'interrogation représentent un manque de données dans la littérature.

Chapitre 3. Mécanismes métaboliques de l'hôte associés avec l'efficacité alimentaire

L'énergie ingérée par un animal est partiellement retenue : toute l'énergie absorbée n'est pas métabolisée par l'animal qui en perd par éructation ainsi que dans les urines. L'énergie métabolisable nette qui résulte de la soustraction de ces pertes à l'énergie digérée est utilisée pour l'entretien cellulaire, ainsi que pour la thermogénèse, qu'elle soit alimentaire (autrement appelée extra-chaleur), liée à l'activité de l'animal ou à sa régulation thermique.

1. Production de chaleur et efficacité alimentaire

La part de la production de chaleur par les divers mécanismes tissulaires, liés à la thermogénèse ou à l'activité, dans les variations interindividuelles d'efficacité alimentaire a été estimée à 56%, le reste étant associé à des variations de composition corporelle ou de digestion (Herd et al., 2004; Richardson & Herd, 2004).

Peu d'études ont concomitamment estimé l'efficacité d'animaux en croissance et leur production de chaleur mais elles semblent converger vers une production de chaleur plus importante par kilogramme de poids métabolique pour les animaux inefficients. Chaves et al. en 2015, en particulier, ont estimé la production de chaleur quotidienne de zébus efficaces et inefficients à partir de la mesure simultanée de la consommation d'oxygène et du nombre de battements cardiaques par minute pendant 10 à 15 minutes et de la mesure du rythme cardiaque moyen sur quatre jours (Chaves et al., 2015). Ils ont montré que les animaux efficaces avaient une consommation d'oxygène par battement cardiaque réduite par rapport aux inefficients. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur des taurillons, les animaux efficaces produisant 10% et 21% de chaleur en moins que les animaux moyens et les inefficients, respectivement (Nkrumah et al., 2006). D'autres travaux, chez des génisses avant ou après sevrage (Cabral da Silva et al., 2020; Leão et al., 2018; Paddock, 2010) ou sur des vaches en lactation (Huhtanen et al., 2021; Kennedy et al., 2021) confirment ces observations.

Une façon de catégoriser les productions de chaleur chez les mammifères est de considérer le métabolisme basal comme des pertes obligatoires et d'y ajouter des pertes « facultatives » liées à la thermorégulation, à l'activité et à l'extra-chaleur qui est la perte énergétique due aux phénomènes digestifs et métaboliques après ingestion d'une ration par un animal (Harper et al., 2002).

Bien que des études aient montré l'importance de la thermorégulation dans les pertes énergétiques chez des petits animaux associant les animaux capables de mieux réguler leur température à une meilleure efficacité alimentaire (Luiting et al., 1991), ce phénomène a moins d'importance chez les gros animaux (Herd & Arthur, 2009). De fait, les études liant les pertes thermiques par radiation à l'efficacité alimentaire sont rarement concluantes et quand elles le sont, elles se contredisent en fonction du mode de prise de température et de la zone de l'animal considérée (Brown, 2005; Martello et al., 2016; Montanholi et al., 2010; Thompson et al., 2018).

2. Activité des animaux et efficacité alimentaire

Le comportement, qu'il soit alimentaire ou non, ne sera pas abordé en détail dans cette synthèse bibliographique, les paramètres de comportement n'ayant pas été mesurés dans notre étude. Cependant, il est important de noter que, dans plusieurs études récentes et sur plusieurs espèces, des liens ont été établis entre le comportement des animaux et l'efficacité alimentaire (Herd et al., 2019; Marie-Etancelin et al., 2019; Metzler-Zebeli et al., 2017).

a) Activité

L'hypothèse d'un impact de l'activité physique, consommatrice d'énergie, sur l'efficacité alimentaire a assez tôt été avancée dans la littérature, et ce chez de nombreuses espèces : des poules (Akbar et al., 1985), aux porcs (Metzler-Zebeli et al., 2017) ou aux ruminants (Herd et al., 2004; Llonch et al., 2018; Pereira et al., 2016). En mesurant le temps passé debout et le nombre de pas quotidiens avec un accéléromètre, Llonch et al. ont montré que les taurillons inefficients tendaient à être plus mobiles que les taurillons efficaces (Llonch et al., 2018). L'ajout de paramètres d'activité physique dans le modèle de prédiction de la RFI chez les vaches laitières fortement productrices a amélioré la prédiction du modèle (Fischer et al., 2018; Martin et al., 2021). Cependant, d'autres analyses n'ont pas mis en évidence de différences

entre les animaux efficaces ou inefficaces que ce soit par rapport au temps passé debout ou au nombre de pas quotidiens (Asher et al., 2018; De La Torre et al., 2019; Hafla et al., 2013). Les variations d'activité ont probablement plus de poids dans les variations interindividuelles d'efficacité alimentaire dans les systèmes extensifs dans lesquels elles peuvent être plus marquées qu'en stabulation.

La comparaison des événements alimentaires et non alimentaires chez des génisses nourries avec une ration à base d'ensilage d'herbe a montré une diminution des comportements actifs non associés à l'alimentation chez les animaux efficaces (Fitzsimons et al., 2014).

b) Comportement alimentaire

Dans une étude établissant le comportement alimentaire d'agneaux de race Romane, qui sont les ancêtres des animaux utilisés dans notre étude (Partie 2), Marie-Etancelin et al. ont mis en évidence un lien assez fort (avec une corrélation génétique de -0,56) entre le temps écoulé entre deux visites successives aux distributeurs de concentrés et l'efficacité alimentaire. Les animaux les plus efficaces génétiquement ont tendance à faire moins de visites par jour aux automates (Marie-Etancelin et al., 2019). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau phénotypique sur des brebis de races diverses avec une corrélation positive significative entre le nombre de repas quotidiens et la RFI et ce à la fois autour de 300 jours de vie et autour de 500 jours de vie (Muir et al., 2018). Ces différences pourraient être liées, en partie, à une augmentation des pertes liées aux déplacements chez les animaux inefficaces. Cependant, chez des jeunes bovins, aucune différence de nombre de visites n'a été obtenue bien que les animaux efficaces passent moins de temps à manger que les inefficaces (Hafla et al., 2013; Kenny et al., 2018).

Par ailleurs, d'autres études menées sur des taurillons nourris avec un régime riche en concentrés ou riche en fourrages ne mettent en évidence aucune différence de durée d'ingestion ou de nombre de visites entre les animaux efficaces, consommant moins, et les animaux inefficaces ce qui suggère que, une fois ramenée à la quantité de MSI, les taurillons efficaces passeraient plus de temps à manger que les inefficaces (Llonch et al., 2018; Pereira et al., 2016). Cela pourrait être lié à une meilleure stabilité du pH ruminal par une salivation plus importante quand les animaux mangent plus lentement. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence d'un tri alimentaire dans le sens d'une plus forte ingestion d'éléments grossiers chez les animaux efficaces nourris avec des rations riches en concentrés (Dykier et al., 2020; Pereira et al., 2016). Ce tri permet une meilleure stabilité du pH ruminal et une meilleure digestion des

éléments fibreux par les animaux en diminuant la vitesse de transit (Fitzsimons et al., 2014). Cependant, ces résultats sont à nuancer. En effet dans l'étude de Dykier et al., les animaux qui triaient défavorablement les aliments grossiers étaient les animaux présentant une RFI positive mais parmi les animaux triant favorablement les aliments grossiers les trois catégories de RFI (fortement négative, moyenne et fortement positive) étaient assez équitablement représentées (Dykier et al., 2020). Par ailleurs, aucune différence de tri n'a été mise en évidence chez des taurillons Angus efficaces ou inefficaces nourris *ad libitum* ou à hauteur de 75% de l'*ad libitum*, les deux groupes d'animaux sélectionnant les éléments >4 mm plutôt que les fines (Andreini et al., 2020).

Le comportement alimentaire résulte des stimuli orexigènes et anorexigènes ainsi que du contexte de dominance entre les animaux qui est difficile à évaluer. En retour, il a un impact sur les variables digestives et métaboliques. Globalement, il semble que les animaux efficaces passent moins de temps à manger parce qu'ils mangent moins, que cela se caractérise par une diminution du temps total alloué à l'ingestion ou par un plus petit nombre de repas.

c) Extra-chaleur et ingestion

Une réduction de l'ingestion augmente globalement l'efficacité d'utilisation de l'énergie, notamment par diminution de l'extra-chaleur et des pertes urinaires et fécales. En effet, l'énergie consommée par le tube digestif, qui représente 15 à 30% des dépenses énergétiques de l'organisme, n'est pas fixe (Ortigues, 1991). Elle est dépendante de la quantité ingérée (Ferrell & Jenkins, 1998; Lines et al., 2014; Osuji et al., 1975) ainsi que de la composition et de la structure du régime avec une extra-chaleur digestive plus importante lors d'une augmentation de la teneur en fibres de la ration (Armstrong & Blaxter, 1956) ainsi que de la longueur des fibres (Osuji et al., 1975). Ainsi Mc Bride et Milligan ont montré sur des ovins qu'en passant d'une consommation alimentaire suffisante pour couvrir le besoin d'entretien à deux fois le besoin d'entretien, la consommation d'énergie au niveau du duodénum augmentait de 37% (McBride & Milligan, 1985). Susenbeth et al. ont estimé le besoin lié à la consommation d'aliment et à la rumination à 10 à 30% de l'énergie métabolisable selon si le fourrage était de bonne qualité ou constitué de paille non traitée (Susenbeth et al., 1998). Dans l'étude récente d'Andreini et al. les bouvillons les plus efficaces avaient non seulement une plus faible extra-chaleur que les inefficaces mais l'écart se creusait lorsque les animaux étaient restreints (Andreini et al., 2020).

La restriction alimentaire n'est, cependant, pas une bonne stratégie pour améliorer l'efficacité puisqu'elle impacte également les dépôts de gras et de muscle et augmente la dégradation des protéines en dessous d'un certain seuil (Andreini et al., 2020; Lobley et al., 1987). Les gains en tissu adipeux et en muscle diminuent de même que le GMQ lors de restrictions alimentaires. Le tissu adipeux semble plus impacté, ce qui résulte dans certaines études en une augmentation du pourcentage de protéines dans la carcasse chez les animaux restreints (Old & Garrett, 1987). Cependant, les efficacités d'utilisation de l'énergie pour le dépôt de graisse et de protéines chez les ruminants sont plutôt favorables au dépôt de matières grasses avec une efficacité de dépôt variant de 10 à 40% pour les protéines et de 50 à 80% pour les matières grasses respectivement en particulier du fait du coût du turnover protéique (Rikhardsson et al., 1991).

3. Processus systémiques

a) Battements cardiaques

Les animaux les plus efficaces en termes de RFI ont régulièrement un rythme cardiaque plus faible associé avec une consommation d'oxygène par battement cardiaque plus faible et ce à différents âges et stades physiologiques du veau nourri avec un aliment starter en plus du lait (Leão et al., 2018) aux génisses et taurillons (Cabral da Silva et al., 2020; Chaves et al., 2015; Hafla et al., 2013; Paddock, 2010).

b) Hormones

Dans la mesure où les hormones, et globalement tout le système endocrinien, sont impliqués dans la régulation de l'ingestion et dans les phénomènes d'anabolisme et de catabolisme, il semble logique que ce système joue un rôle dans l'efficacité alimentaire.

Chez les ruminants l'ingestion est contrôlée à la fois par des signaux centraux et périphériques et elle est, notamment, dépendante de paramètres environnementaux ou sociaux évoqués dans le Chapitre 1. Elle dépend de signaux hormonaux orexigènes et anorexigènes qui découlent du statut énergétique de l'animal ainsi que de signaux physiques liés à la tension au niveau du rumen ou à son osmolalité (Allen, 2014). En particulier, le neuropeptide Y (NPY) stimule la prise alimentaire et pourrait être associé avec une consommation exagérée dont on a vu qu'elle était plutôt caractéristique des animaux inefficients. Perkins et al. ont montré que les bouvillons efficaces (n=8) avaient une expression plus faible de NPY et de MC4R, un récepteur des mélanocortines, par rapport aux inefficients (n=8) (Perkins et al., 2014). Ces modifications

étaient associées, dans le tissu adipeux sous-cutané, à une augmentation de l'expression de la leptine fonctionnant dans une boucle de rétrocontrôle avec le NPY (Perkins et al., 2014). Ces résultats ont été reproduits à plus grande échelle sur deux groupes extrêmes de 30 canards (Zeng et al., 2016).

La leptine est une hormone synthétisée par le tissu adipeux qui a un rôle anorexigène. Sa concentration plasmatique est fortement corrélée à la masse adipeuse, en particulier viscérale, cette corrélation se renforçant au fur et à mesure de la prise de poids de l'animal (Altmann et al., 2006). De ce fait, sur des animaux jeunes, la concentration en leptine, en tant que régulateur de l'ingestion, est plutôt associée aux animaux consommant peu (Ehrhardt et al., 2003) tandis que chez des animaux plus âgés que ce soient des vaches laitières (Xi et al., 2016) ou des bovins allaitants (Foote et al., 2015; Nkrumah et al., 2007) la leptine, positivement corrélée avec la masse grasse, est retrouvée en concentration supérieure chez les inefficients. Dans la seule étude liant leptine et efficacité alimentaire chez les ovins à notre connaissance, la concentration en leptine dosée deux heures avant le deuxième repas de concentrés de la journée chez des ovins de 70 à 120 jours (24,5 à 40kg) était plus élevée chez les animaux efficaces (Montelli et al., 2021). Par ailleurs, une corrélation assez forte a été mise en évidence entre leptine et insuline et insulin-like growth factor I (IGF-I) chez les agneaux pré-sevrage (Ehrhardt et al., 2003).

Dans la littérature, les concentrations plasmatiques en IGF-1 ont été inconstamment reliées à l'efficacité alimentaire. Les premières études menées sur le sujet montraient initialement une corrélation plutôt positive entre l'IGF-1 et la RFI (Brown, 2005; Moore et al., 2005). Cependant, la ré-analyse de ces résultats avec addition de nouvelles données et séparation des animaux par catégories d'âge a montré un lien beaucoup moins fort voire une légère corrélation négative entre RFI et IGF-1 (Herd & Arthur, 2009). Les études plus récentes tendent plutôt à mettre en évidence des corrélations négatives entre IGF-1 et RFI, essentiellement dues aux corrélations positives entre l'hormone et le GMQ (Kelly et al., 2010a, 2013; Nascimento et al., 2015). De plus, des études ont montré que des SNP au niveau d'un intron du gène codant pour le récepteur à l'hormone de croissance étaient associés à une augmentation du poids vif et de l'efficacité alimentaire (Sherman et al., 2008b). Il est possible qu'une stimulation plus importante du récepteur à la GH induise une production plus importante d'IGF-1 associée à une augmentation du GMQ (Lemal et al., 1989).

Dans leur revue sur les mécanismes physiologiques de l'efficacité alimentaire chez les bovins allaitants, Cantalapiedra-Hijar et al. soulignent que les corrélations négatives entre RFI et IGF-1 ont plutôt été obtenues avec des régimes riches en fourrages tandis que les corrélations avec

des régimes riches en concentrés sont plus aléatoires (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Un autre facteur de confusion potentiel est l'âge des animaux qui détermine également leur composition corporelle. Ainsi la plus forte association négative entre RFI et IGF-1 a été retrouvée chez des agneaux de 70-120 jours (Montelli et al., 2021) tandis que, chez des animaux plus âgés, une augmentation de la concentration plasmatique en IGF-1 pourrait être associée avec des besoins d'entretien plus importants liés au maintien de la masse musculaire (Welch et al., 2013).

De la même façon, les nombreuses études qui ont comparé l'insulinémie et la glycémie de bovins et d'ovins ne sont pas parvenues à établir un lien clair entre celles-ci et l'efficacité alimentaire (Cabral da Silva et al., 2020; Elolimy et al., 2019; Fitzsimons et al., 2014; Kelly et al., 2010a; Xi et al., 2016). Tout au plus, une corrélation positive modérée est retrouvée entre la concentration en bêta-hydroxybutyrate (BHB) sanguin, opposé à la glycémie, et l'inefficacité (Cabral da Silva et al., 2020; Lawrence et al., 2011; Richardson et al., 2004). Cependant, ce lien est à considérer avec prudence car le BHB peut aussi provenir d'une conversion du butyrate ruminal dont l'absorption serait plus importante chez les inefficaces liée à l'augmentation de la MSI.

Enfin, les corticoïdes, connus pour être associés au stress, ont été proposés comme des marqueurs potentiels d'efficacité alimentaire même si les liens entre concentrations en corticoïdes et efficacité alimentaires ne font pas consensus. Dans les études de Knott et al., les ovins ayant la plus faible RFI présentaient des réponses à une stimulation par l'ACTH ou par l'insuline plus faible que les ovins inefficaces (Knott et al., 2008, 2010) tandis que dans l'étude de Curley et al., les animaux calmes, estimés par ailleurs plus efficaces, avaient une cortisolémie basale plus faible et une réponse à l'ACTH plus importante (Curley et al., 2008; Voisinet et al., 1997). De même, la cortisolémie ou les métabolites fécaux du cortisol, reflétant davantage la cortisolémie au cours du temps qu'une mesure ponctuelle, ont été corrélés positivement (Foote et al., 2016; Kelly et al., 2017) ou négativement (Gomes et al., 2013; Llonch et al., 2018; Montanholi et al., 2010; Richardson et al., 2004) à la RFI. Ces variations sont probablement dues aux variations nyctémérales de la concentration en cortisol et à l'importante variabilité interindividuelle de la concentration fécale en corticostérone. Le cortisol est également impliqué dans le métabolisme des protéines et des lipides et il est possible que son effet sur l'efficacité alimentaire passe par des variations de composition corporelle (Hill, 2012).

c) Composition corporelle

Nous avons déjà évoqué l'importance du volume du tube digestif dans la dépense énergétique associée à son entretien. D'autres études s'étant intéressées à la masse de différents organes entre animaux de différentes catégories de RFI ont mis en évidence une corrélation positive plus ou moins forte entre la masse absolue ou relative du foie et la RFI (Montanholi et al., 2017; Montelli et al., 2021; Taussat et al., 2019; Zhang et al., 2017). Le foie est un organe qui représente une faible part de la masse des animaux mais une part importante de l'activité métabolique et des dépenses énergétiques, cette part étant par exemple estimée à 20% du besoin d'entretien total dans le revue d'Ortigue (Ortigue, 1991).

Dans leur méta-analyse, Berry et Crowley ont montré que les animaux dont la RFI, estimée sans la composition corporelle, était plus élevée avaient, en moyenne, une carcasse plus grasse et une plus faible proportion de tissu maigre (Berry & Crowley, 2012). Ces résultats ont été confirmés par des études plus récentes (Asher et al., 2018; Fitzsimons et al., 2014; Herd et al., 2019; Kelly et al., 2019; Mao et al., 2013). En particulier, dans l'étude exhaustive de Herd et al., la composition corporelle a été identifiée comme le principal facteur explicatif de l'efficacité alimentaire avec, notamment, une épaisseur de tissu adipeux sous-cutané au niveau des côtes et de la croupe plus importante chez les bouvillons inefficaces (Herd et al., 2019).

Le lien entre RFI et quantité de muscle dans la carcasse est moins constant bien que fréquemment retrouvé, et négatif dans la plupart des cas (Elolimy et al., 2018; Kelly et al., 2010b, 2019; Nascimento et al., 2016; Nkrumah et al., 2007; Taussat et al., 2019). Ces observations ont poussé un certain nombre de chercheurs à inclure des données de composition corporelle dans leur modèle de régression de l'ingestion aboutissant à la RFI (Rosales Nieto et al., 2019; Tortereau et al., 2020). Les RFI ainsi obtenues sont alors indépendantes des variables de composition corporelle considérées.

L'effet de la composition corporelle sur l'efficacité alimentaire est probablement multiple. D'une part, à masse équivalente, un kilogramme de matière grasse nécessite beaucoup plus d'énergie à déposer qu'un kilogramme de muscle. Cette différence se réduit si on considère ces deux tissus en matière sèche et s'inverse si on considère le besoin en énergie métabolisable nécessaire pour déposer une quantité donnée de calories sous forme de l'un ou l'autre tissu. Ainsi, différentes études ont estimé la quantité d'EM nécessaire pour déposer une kcal de protéines à 5 à 10 kcal tandis que les besoins pour déposer une kcal de tissu adipeux sont de l'ordre de 1,2 à 2 kcal d'EM (Old & Garrett, 1985, 1987; DiCostanzo et al., 1991). Dans la

plupart des études, les dépôts adipeux sont évalués par échographie et évaluent le gras sous-cutané dont les régulations métaboliques ne sont pas les mêmes que pour le gras inter ou intramusculaire. Cela explique que très peu d'études ont mis en évidence des différences de graisse intramusculaire quand bien même des différences de tissu adipeux sous-cutané ou viscéral avaient été identifiées entre animaux efficaces et inefficaces (Lines et al., 2014; Montelli et al., 2021; Nascimento et al., 2016).

Enfin, sur le plan métabolique, bien que le dépôt massif de protéines nécessite moins d'énergie, la préservation du tissu musculaire et son entretien est beaucoup plus consommatrice en énergie que l'entretien du tissu adipeux puisqu'elle repose sur un équilibre permanent entre synthèse et dégradation protéique.

4. Processus cellulaires

a) Turnover protéique

Parmi les processus tissulaires impliqués dans les différences interindividuelles d'efficacité alimentaire il est probable que le turnover protéique ait un rôle important à jouer. En effet, le renouvellement permanent des protéines d'un organisme est un processus énergivore (Waterlow, 1995). Ce processus a été un des premiers suggérés par Richardson et Herd en 2004 pour expliquer les différences non digestives d'efficacité alimentaire (Richardson et al., 2004). Chez les ovins en croissance, le turnover protéique a été estimé comme responsable de près de 20% des dépenses énergétiques corporelles (Gill et al., 1989).

Le turnover protéique est la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines dont la résultante, positive en cas d'apports de nutriments suffisants et en situation d'anabolisme, est une accréation musculaire. Lorsque les ressources viennent à manquer où en cas de vieillissement et de résistance anabolique, il est possible que la dégradation des protéines prenne le pas sur la synthèse résultant en une sarcopénie (Coelho-Junior et al., 2022). La synthèse de protéines est favorisée notamment par la voie mTOR qui est activée par au moins deux stimulants physiologiques majeurs que sont l'insuline et la leucine (Tavares et al., 2015). Nous avons vu qu'aucun consensus n'était établi entre insulinoémie et efficacité alimentaire. Quant à la leucine, elle est rarement dosée en routine dans les études d'efficacité alimentaire.

L'estimation du turnover protéique peut se faire de différentes façons que ce soit par excréation urinaire de 3-méthyl-histidine (3MH), un acide aminé caractéristique des protéines

myofibrillaires, ou par utilisation d'un traceur isotopique stable comme la ^{13}C -leucine ou la ^{15}N -glycine (Guillet et al., 2008; Leverve et al., 1992). La méthode des traceurs permet de suivre à la fois l'incorporation de l'acide aminé marqué dans une protéine particulière et le catabolisme de cet acide aminé par mesure du CO_2 marqué ou de l'urée marquée selon l'isotope utilisé. Le turnover protéique est, lui, évaluable par dilution du traceur isotopique dans le pool plasmatique de l'acide aminé en question. L'urée urinaire pourrait également être considérée comme un marqueur de catabolisme protéique mais, dans la mesure où une part de l'ammoniac ruminal formé par la dégradation des matières azotées par les microorganismes est absorbée et transformée en urée au niveau du foie, ce marqueur est peu spécifique chez les ruminants.

Les quelques études ayant mesuré l'excrétion urinaire de 3MH n'ont pas mis en évidence de différence de catabolisme protéique entre les animaux efficaces et inefficaces (Castro Bulle et al., 2007; Gomes et al., 2013; Guarnido-Lopez et al., 2022; Richardson et al., 2004). De la même manière, les méthodes de traceur isotopique n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque différence de rétention de l'azote entre animaux efficaces et inefficaces (Lines et al., 2014). Enfin, une méthode reposant sur la disparition plasmatique de l'isotope ^{15}N et sur son apparition urinaire développée par Cantalapiedra et al., menée sur un échantillon conséquent de 588 bovins en croissance a montré une corrélation positive significative entre l'abondance relative d'isotope lourd et les indices d'efficacité alimentaire (RFI ou FCE) (Cantalapiedra-Hijar et al., 2016, 2019; Guarnido-Lopez et al., 2021). Cela suggère que le turnover protéique pourrait être impliqué dans l'efficacité alimentaire mais que la mise en évidence de ce phénomène nécessite des dispositifs à grande échelle (Guarnido-Lopez et al., 2021).

b) Cycle de l'urée

Comme mentionné plus haut, l'urée peut être un marqueur de dégradation protéique puisque les acides aminés issus de la dégradation des protéines entrent en partie dans la synthèse de nouvelles protéines mais sont également déaminés pour valoriser leur squelette carboné (Lobley, 2003; Lobley et al., 1987). Ainsi, même si peu d'études ont mis en évidence des différences en termes d'urée plasmatique, deux études métabolomiques menées par Jorge-Smeding et al. suggèrent que le cycle de l'urée pourrait être ralenti chez les animaux efficients (Jorge-Smeding et al., 2021, 2022). La première étude met également en avant une diminution de l'urémie chez les animaux efficients ainsi que de la concentration plasmatique en leucine, valine et isoleucine de ces animaux sous un régime à base d'ensilage de maïs (Jorge-Smeding et al., 2021). Dans la deuxième étude, menée sur des génisses nourries avec une ration presque uniquement composée d'ensilage d'herbe, l'urée ne différait pas mais les acides aminés ramifiés, la lysine et l'ornithine, acide aminé central du cycle de l'urée, étaient présents en plus faible quantité dans le plasma des animaux efficients (Jorge-Smeding et al., 2022). Ces résultats sont cohérents avec la méta-analyse de plusieurs études d'association pangénomique qui montre que les voies de dégradation des acides aminés à chaîne latérale ramifiée seraient associées à la RFI (Duarte et al., 2019). Ces voies ont également été rapportées dans l'étude transcriptomique de Khansefid et al. ayant mis en évidence une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse musculaire chez des bovins Angus efficients comparativement aux inefficients (Khansefid et al., 2017). Ainsi il est possible que la protéolyse augmentée chez les animaux inefficients soit responsable d'un relargage plus important d'acides aminés dans le plasma et d'un fonctionnement accéléré du cycle de l'urée dont les étapes sont consommatrices d'énergie.

Par ailleurs, le cycle de l'urée est relié au cycle citrique à plusieurs égards. D'une part, les acides aminés ramifiés peuvent aboutir à la formation de citrate *via* l'acétyl-CoA ou de succinyl-CoA *via* le méthylmalonate, ces deux acides étant des composants du cycle de Krebs. D'autre part, leur transamination se fait en parallèle d'une transamination de l'alpha-cétoglutarate, lui aussi composant du cycle de Krebs, en glutamate. Le glutamate peut être converti en N-acétylglutamate dans la mitochondrie et le N-acétylglutamate est le principal activateur de la synthèse de carbamoylphosphate, porte d'entrée du cycle de l'urée, à partir de bicarbonate et d'ammoniac issu de la déamination des acides aminés ou de l'absorption ruminale.

c) La chaîne de phosphorylation oxydative

i. *Fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative*

Le cycle citrique est un ensemble de réactions aboutissant à la formation de coenzymes réduits NADH, H⁺ et FADH₂ et d'ATP en parallèle d'une production de dioxyde de carbone. Les coenzymes réduits sont ensuite oxydés au niveau de la chaîne de phosphorylation oxydative composée de plusieurs complexes permettant un transfert d'électrons le long de la membrane interne de la mitochondrie. Au sein de chaque complexe des protons sont exportés depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire et serviront de force proton-motrice.

Ce gradient de protons est, par la suite, dissipé au niveau d'une ATP-synthase parfois nommée complexe V (CV) qui utilise l'énergie libérée par la dissipation du gradient de proton pour la réaction de phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP (Figure I.3.1).

Les électrons peuvent ne pas être correctement transportés depuis le complexe I (CI) ou le complexe II (CII), qui sont les points d'initiation de la chaîne de phosphorylation oxydative, vers le complexe III (CIII) ou du CIII vers le complexe IV (CIV). Ce phénomène, appelé fuite d'électrons, est responsable de la formation intra-mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La réduction de dioxygène forme un ion superoxyde (O⁻) qui peut par la suite être pris en charge par un système antioxydant (impliquant la Superoxyde Dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GSHPx)) ou former des ROS comme le radical hydroxyle HO.

Par ailleurs, une partie des protons peut rejoindre la matrice mitochondriale sans passer par le CV et dissiper le gradient de protons (Harper et al., 2002). Ces transferts qui se font par l'intermédiaire de protéines découplantes (UCP) sont notamment responsables de la production de chaleur dans le tissu adipeux brun où la première UCP a été découverte (Heaton et al., 1978; Nicholls, 1976). Au-delà de la perte de force proton-motrice potentiellement responsable d'une diminution de l'efficacité au niveau de la mitochondrie, ce découplage permet de fournir des protons nécessaires à la réduction de ROS et de rééquilibrer la membrane interne lorsque la capacité de phosphorylation est inférieure à la capacité de transferts d'électrons (Gnaiger, 2020; Ojano-Dirain et al., 2007).

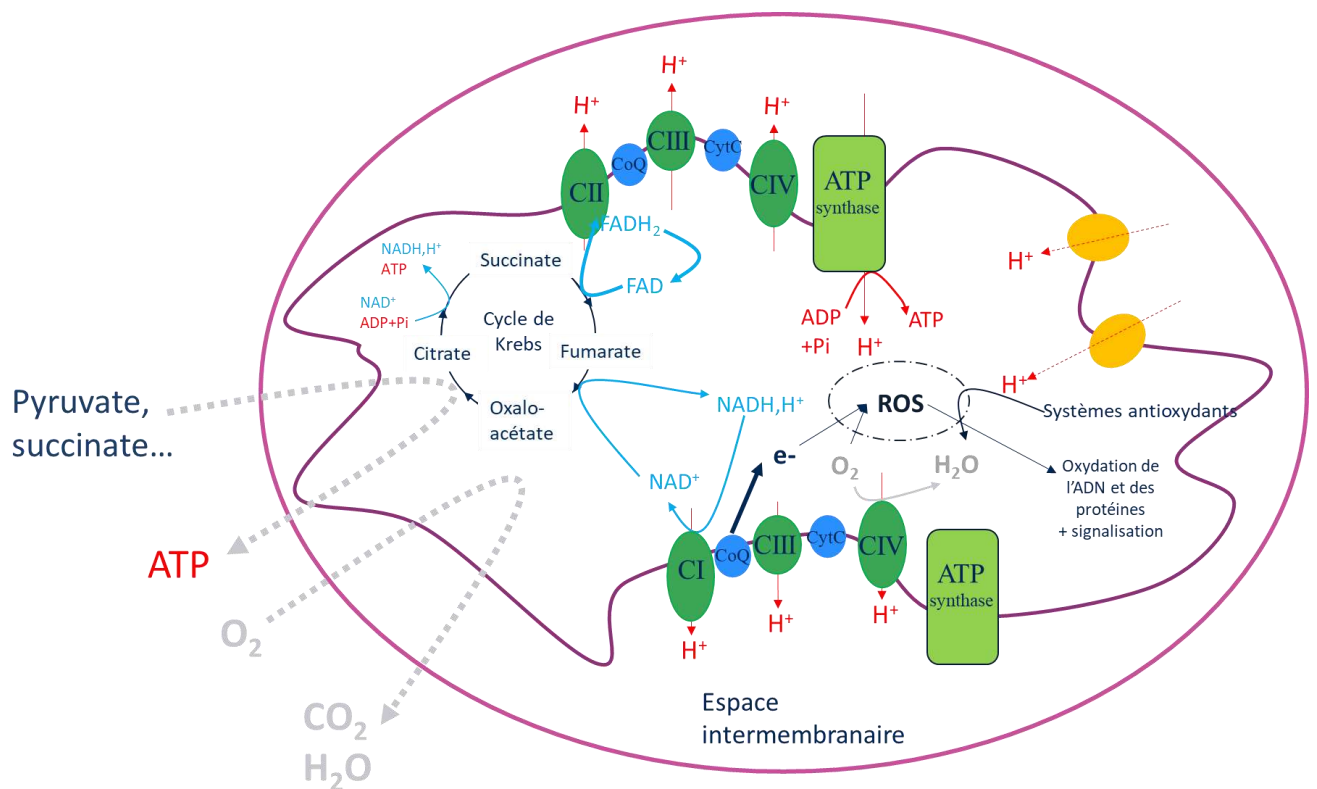


Figure 1.3.1 : Schéma simplifié des processus mitochondriaux aboutissant à la production d'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative.

ii. Fuite d'électrons, espèces réactives de l'oxygène et efficacité alimentaire

Les premières études ayant lié efficacité mitochondriale et efficacité alimentaire ont été menées chez des poulets de chair par isolation des mitochondries au niveau des muscles des membres ou de la poitrine (Bottje et al., 2002; Iqbal et al., 2004). Dans la plupart des cas l'indice d'efficacité utilisé était le FCR. Ces études ont montré que les oiseaux les plus efficaces avaient un meilleur couplage de leur chaîne de transport d'électrons (Iqbal et al., 2004; Ojano-Dirain et al., 2005). Ces phénomènes n'ont pas toujours été mis en évidence sur tous les complexes et leur localisation a parfois été rapportée comme tissu-dépendante mais dans l'ensemble, les volailles efficaces avaient toujours une fuite d'électrons plus faible (Bottje et al., 2002; Ojano-Dirain et al., 2004).

De même, chez les porcs, on retrouve dans les mitochondries isolées à partir des muscles semitendineux et semimembraneux d'animaux efficaces une augmentation de l'activité des CI et CII ainsi qu'une corrélation positive entre ROS et RFI (Grubbs et al., 2013b, 2013a).

Les études menées chez les bovins ont mis en évidence une activité de transfert d'électrons plus importante chez les bovins efficaces dans des conditions où le substrat était limitant (glutamate pour CI ou succinate pour CII) ou en conditions non limitantes mais également une production plus importante de peroxyde d'hydrogène dans le muscle long dorsal et dans le foie (Casal et al., 2018; Kolath et al., 2006; Lancaster et al., 2014).

Ce dernier résultat, en apparence contradictoire avec les observations précédentes sur les poulets et les porcs ne l'est pas réellement. En effet, une augmentation de l'activité respiratoire mitochondriale peut augmenter la production de ROS si elle est liée à une fourniture plus importante de substrat ou à une diminution si la demande d'ATP est importante et que la chaîne est globalement plus oxydée (Brand, 2016). Ainsi, ces études récentes tendent à montrer une activité plus importante aux niveaux des complexes I et II et une surexpression des protéines mitochondriales chez les animaux efficaces mais une activité de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase plus élevées chez les inefficaces (Casal et al., 2018, 2020; Fernandez et al., 2020). Ces augmentations d'activité peuvent résulter d'une meilleure utilisation de l'énergie et d'une moindre production de ROS chez les animaux efficaces ou de leur moins bonne gestion desdites ROS risquant de causer un stress oxydatif plus important (Kolath et al. 2006; Judson K. Grubbs et al. 2013; J. R. Russell et al. 2016).

Conformément aux premières études ayant comparé l'importance de l'efficacité digestive et de l'efficacité métabolique chez les ruminants, il semble qu'une part plus importante de l'efficacité alimentaire puisse être expliquée par des phénomènes extra-digestifs. Du moins, on retrouve plus d'uniformité dans les résultats avec en particulier une production de chaleur plus importante chez les animaux inefficients en lien avec une augmentation des besoins d'entretien.

L'évaluation de l'activité a permis de constater que, dans la plupart des cas, les animaux efficaces avaient une activité plus faible que ce soit sur le plan des activités alimentaires ou non alimentaires.

La composition corporelle semble un bon reflet de l'efficacité mais, comme pour les phénomènes hormonaux, il est possible que ses effets varient en fonction de l'âge et du statut physiologique des animaux. Un kilogramme de muscle est moins coûteux à déposer qu'un kilogramme de matière grasse lorsque le GMQ est élevé, mais plus coûteux à entretenir sur le long terme du fait du turnover protéique.

La plupart des études qui évaluent la production de chaleur et le métabolisme des animaux efficaces ou inefficients portent sur de petits effectifs. En effet la chambre calorimétrique est un dispositif contraignant, qui ajouté à la contrainte, déjà forte, de la mesure de la RFI, rend la généralisation à un grand nombre d'animaux difficile. De fait la plupart des publications évaluent les dépenses énergétiques par des moyens détournés.

Nous évaluerons, sur des animaux élevés en intérieur, le métabolisme de l'hôte par l'intermédiaire d'un dosage par RMN des petits métabolites plasmatiques. Cette approche permettra d'identifier des molécules associées à l'efficacité alimentaire et d'en déduire les processus métaboliques impliqués.

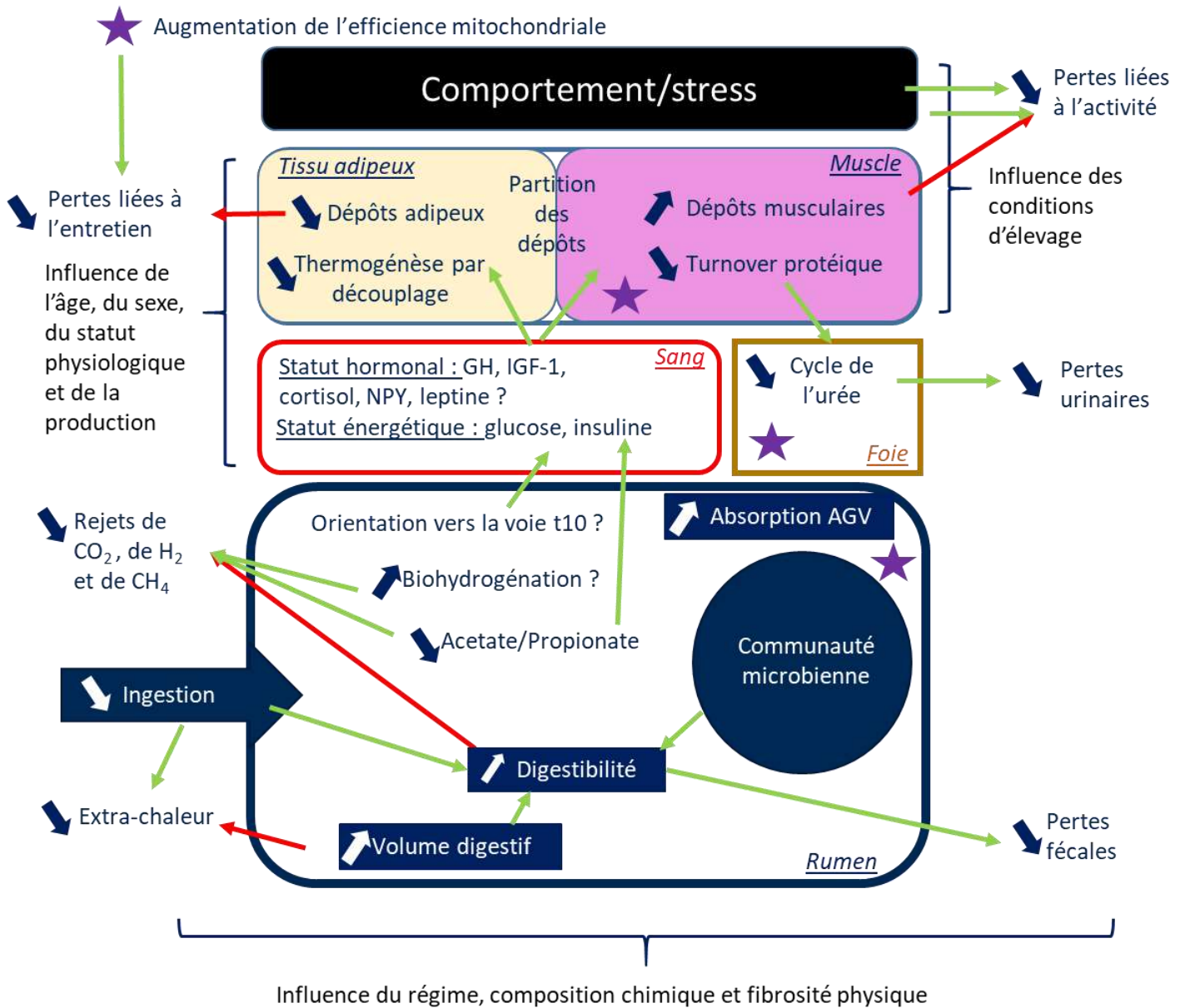


Figure I.3.2 : Schéma récapitulatif des principales explications avancées dans la littérature pour expliquer la variabilité interindividuelle d'efficacité alimentaire que ce soit au niveau digestif ou au niveau métabolique avec les potentielles interactions entre ces deux phénomènes. Les flèches vertes et rouges représentent des relations positives ou négatives entre les déterminants de l'efficacité alimentaire présentés. Les étoiles violettes représentent l'efficacité mitochondriale qui peut être évaluée dans de multiples tissus. Les points d'interrogation représentent un manque de données dans la littérature.

Conclusion et objectifs de la thèse

Les mécanismes impliqués dans l'efficacité alimentaire des ruminants sont encore assez méconnus bien que plusieurs pistes liées à l'efficacité digestive et à l'efficacité métabolique aient été avancées. Ces deux ensembles d'hypothèses sont complémentaires en cela que l'efficacité digestive explique les variations des rapports entre l'aliment apporté et ce qui est métabolisable par l'animal et l'efficacité métabolique explique la variabilité interindividuelle de l'utilisation de l'énergie métabolisable et des nutriments absorbés. Par ailleurs, les approches digestives et métaboliques sont aussi imbriquées puisque les produits de fermentation issus de la digestion ruminale peuvent avoir un effet majeur sur le métabolisme, en particulier par la priorisation de certaines voies métaboliques chez l'hôte au profit de certains tissus. Il est donc intéressant d'étudier simultanément ces deux volets de l'efficacité alimentaire.

- ➔ Les objectifs de cette thèse seront d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'efficacité alimentaire, en particulier en nous concentrant sur les phénomènes digestifs et métaboliques liés à l'individu pour lesquels aucun consensus n'a pu être obtenu soit par manque d'études soit par difficulté de comparaison entre études.

La plupart des travaux menés, que ce soit chez les bovins ou les ovins, qu'ils soient allaitants ou laitiers, reposent sur l'identification, au sein d'une population, des individus les plus extrêmes phénotypiquement ; et en leur comparaison, selon les paramètres choisis. Quelques études se basent également sur des lignées divergentes établies depuis plusieurs générations ce qui suppose des effectifs plus importants. Cependant, peu de recherches portent sur un plus grand nombre d'animaux en alliant la sélection divergente et la mesure des phénotypes sous divers régimes. En particulier, aucune étude de ce genre n'a été menée chez les ovins allaitants.

- ➔ Nous nous appuierons pour les besoins de cette étude sur des lignées sélectionnées de façon divergente sur la consommation résiduelle afin de maximiser la variation génétique et de pouvoir conserver un nombre important d'animaux lors de l'établissement de groupes de phénotypes extrêmes. Afin de limiter les effets environnementaux, nous travaillerons en bergerie, dans un même bâtiment et dans les mêmes conditions de logement. Par ailleurs, nous travaillerons sur une race unique et sur des agneaux mâles d'âge similaire et pré-pubères.

Dans les études où l'efficacité alimentaire a été estimée à différents stades de production et sous différents régimes, une corrélation assez faible entre les indices d'efficacité alimentaire aux différentes phases a été mise en évidence. Par ailleurs, les déterminants de l'efficacité

alimentaires identifiés dans cet état de l'art semblent varier en fonction du régime distribué aux animaux, en particulier les éléments ayant trait à la composition du microbiote ruminal et à l'efficacité digestive.

- Pour cette raison nous suivrons des ovins allaitants nourris successivement avec deux régimes, tous deux distribués par des distributeurs automatiques, le premier constitué de 100% de concentrés, régime sous lequel s'opère la sélection génétique, et le second constitué d'un tiers de concentrés et de deux tiers de foin.

Ce dispositif devrait nous permettre de répondre aux trois hypothèses qui émergent de l'état de l'art réalisé :

- Chez les ruminants, une partie de l'efficacité alimentaire semble reposer sur la digestion des aliments par le microbiote ruminal ; dont la communauté pourrait être orientée pour réduire les pertes digestives et favoriser les produits d'intérêts, qu'ils soient précurseurs ou modulateurs, pour le métabolisme de l'hôte.
- L'autre partie de l'efficacité alimentaire est expliquée par l'efficacité métabolique, potentiellement en lien avec les produits microbiens.
- Les phénomènes liés à l'efficacité alimentaire sont dépendants de la ration distribuée aux animaux.

Partie II. : Etude expérimentale

Afin de répondre à nos hypothèses, nous évaluerons dans un premier temps la communauté microbienne ruminale dans son ensemble par analyse des populations de procaryotes et d'eucaryotes ruminants ainsi que par leur lien direct avec la production d'acides gras volatils, principaux substrats énergétiques chez les ruminants. Nous explorerons également les potentielles interactions entre les métabolites ruminants, y compris issus du métabolisme des acides gras, et l'efficacité alimentaire et les liens potentiels entre métabolites ruminants et métabolisme de l'hôte par dosage des métabolites plasmatiques. Afin de limiter les effets environnementaux, nous travaillerons sur une race unique et sur des agneaux mâles prépubères d'âge comparable. Ces analyses seront réalisées sous deux régimes différents, l'un composé exclusivement de concentrés enrichis en fibres et l'autre constitué d'un mélange de concentrés et de foin (1/3, 2/3) (Figure II.0.1).

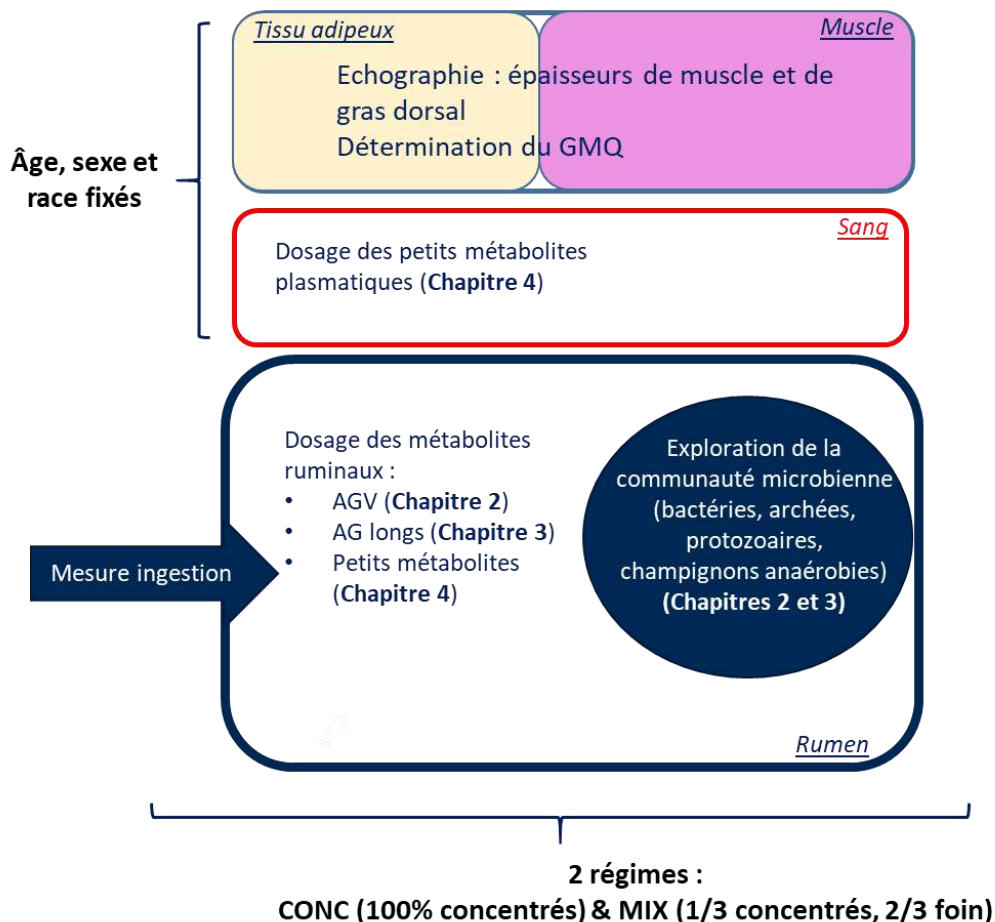


Figure II.0.1 : Résumé des analyses réalisées dans cette partie expérimentale.

Chapitre 1. Construction du dispositif expérimental

1. Initiation des lignées

La sélection des lignées divergentes sur la consommation alimentaire résiduelle a été initiée en 2016. Elle se base sur le phénotypage annuel d'agneaux mâles de race Romane sur l'UE INRAE P3R depuis 2009. Les paramètres génétiques de la consommation résiduelle et ses composantes ont été estimés sur le sous-ensemble des agneaux phénotypés entre 2009 et 2016. Cette population initiale est constituée de 951 agneaux mâles âgés de 70 jours en moyenne (60-90j) qui ont été phénotypés pendant 8 semaines après une période d'adaptation de 14 jours (Ricordeau et al., 2020). Les poids des agneaux en début de période de phénotypage et en fin de période de phénotypage sont mesurés et leur GMQ est calculé en divisant le gain de poids total sur la période par le nombre de jours qui la composent. La composition corporelle des animaux est estimée par échographie du muscle long dorsal (*longissimus dorsi*) et de l'épaisseur de gras dorsal mesurée au niveau de la dernière côte flottante (13^{ème} côte) à un centimètre de la colonne vertébrale. Le poids métabolique, le GMQ et les épaisseurs de gras dorsal et de muscle dorsal sont intégrés comme paramètres d'une régression linéaire de l'ingestion quotidienne moyenne dont le résidu (RFI) est la mesure d'efficacité alimentaire utilisée. Les paramètres génétiques de la consommation alimentaire résiduelle sont estimés à l'aide du logiciel ASReml (Gilmour et al., 2009) sous un modèle animal en prenant en compte les phénotypes des animaux ainsi que leur pedigree. Parmi les béliers phénotypés en 2013 et 2014, les 12 béliers présentant les valeurs génétiques extrêmes (6RFI+ et 6RFI-) ont été utilisés comme reproducteurs pour initier les lignées divergentes.

La sélection est effectuée sur la voie mâle. Ainsi, parmi les descendants des béliers fondateurs, des béliers extrêmes appartenant à la première génération de sélection ont été choisis comme pères des agneaux de la deuxième génération, nés en 2017-2018 et ainsi de suite. Les femelles, de race Romane elles aussi, ont été choisies de façon à limiter l'accroissement de consanguinité. Les animaux inclus dans cette thèse appartiennent à la deuxième génération de sélection pour les animaux prélevés et phénotypés en 2018 et à la troisième génération de sélection pour les animaux prélevés et phénotypés en 2019 et 2020. Les animaux de 2018, 2019 et 2020 sont issus de 15, 12 et 11 pères, respectivement.

2. Mise en place du dispositif expérimental

Le protocole expérimental se déroule en deux phases successives. Entre l'âge de 12 et 18 semaines, selon l'année, les agneaux mâles sont répartis en 4 à 6 lots en fonction de leur poids en début de période d'adaptation (Figure II.1.1). Pendant cette première phase, ils sont nourris avec un régime constitué de 100% de concentrés enrichis en fibres auquel ils ont été habitués par transition pendant les deux semaines précédant la période de contrôle. Au cours de cette période de contrôle, pendant six semaines, ils suivent le protocole de phénotypage présenté précédemment : leur ingestion quotidienne est enregistrée à l'aide de distributeurs automatiques de concentrés (phase CONC). Leurs poids d'entrée et de fin de contrôle sont enregistrés et une échographie dorsale est réalisée à l'issue des six semaines. La RFI est calculée à l'issue des 6 semaines de contrôles et les phénotypes obtenus complètent les données collectées depuis 2009 afin de réévaluer les paramètres génétiques.

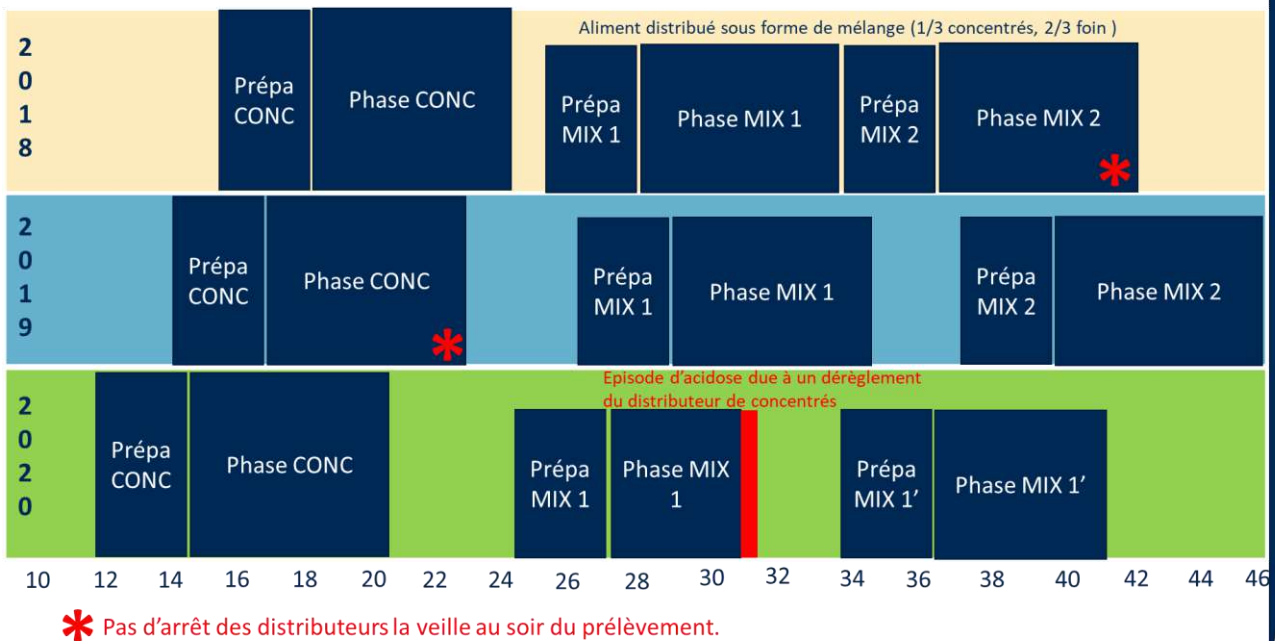


Figure II.1.1 : Schéma du dispositif expérimental. Les phases notées «Prépa »sont les phases d'habituement au nouvel aliment. Les astérisques représentent les absences de mise à jeun des animaux et la boîte rouge un épisode d'acidose ayant occasionné un report du chantier de prélèvements.

Les animaux présentant les valeurs d'index génétique les plus extrêmes pour la RFI ont été conservés et suivis lors d'une deuxième période de mesure au cours de laquelle ils ont été nourris avec une ration mixte constituée de deux tiers de foin de dactyle et d'un tiers d'aliment complémentaire sous forme de granulés (phase MIX). En 2018, la ration était distribuée sous forme de ration mélangée par des distributeurs automatiques de fourrage. En 2019 et 2020, les fourrages et les concentrés étaient distribués séparément par des distributeurs spécifiques et la quantité de concentrés par animal était plafonnée à 700g en accord avec les besoins déterminés pour permettre une croissance de 125g/jour.

Au cours de la phase MIX, les animaux ont été séparés en deux périodes du fait du nombre limité de distributeurs de fourrage. Ainsi, chaque année, la moitié des animaux conservés a été suivie à l'été et l'autre à l'automne.

À l'exception de cette séparation, au sein de chaque phase (CONC ou MIX) les animaux étaient dans les mêmes conditions de logement, température et hygrométrie pour limiter les effets environnementaux identifiés dans la Partie I, page 12 et étaient tous des mâles d'âge similaire au sein de chaque période pour limiter les effets liés au statut physiologique des animaux (voir page 14). Lors de la phase CONC, les animaux étaient logés sur paille tandis qu'au cours de la phase MIX ils étaient logés sur copeaux.

Pour chaque année de sélection, trois chantiers de prélèvements de contenu sanguin et ruminal étaient prévus (un pour la phase CONC et deux pour la phase MIX) mais la survenue d'un épisode d'acidose lié à un dérèglement des distributeurs automatiques de concentrés (indiqué par une boîte rouge sur la Figure II.1.1) a reporté à l'automne 2020 le chantier prévu à l'été 2020. Ce sont, ainsi, 8 chantiers de prélèvements qui ont été réalisés sur les 9 prévus initialement.

3. Régimes

Au cours de la phase CONC, l'intégralité de l'apport alimentaire se composait d'un aliment complet concentré constitué de pulpe de betterave, de son de blé, d'orge, de maïs, de tourteaux de colza et de tournesol et de luzerne déshydratée. Ces concentrés ont été formulés, chaque année, à façon, par SOREAL Nutrition Animale (Vonnas, France) de façon à apporter 0,77 UFV/kgMS et contenir 17,5% de Matières Azotées Totales (MAT).

Au cours de la phase MIX, l'aliment complémentaire concentré, produit chaque année par SOREAL Nutrition Animale (Vonnas, France) était composé d'un mélange de céréales et de co-produits céréaliers et formulés de manière à apporter 0,85 UFV/kgMS et contenir 18% de MAT. Le fourrage distribué était un foin de dactyle de l'année précédente. Les compositions chimiques des différents aliments de la ration sont présentées dans le Tableau II.1.1.

Tableau II.1.1 : Composition des aliments distribués au cours des deux phases. C= concentré, F=foin.

	Phase CONC			Phase MIX						
	2018	2019	2020	C_2018	C_2019	C_2020	F_2018	F_2019 Eté	F_2019 Automne	F_2020 Automne
MS (g/kg)	905	888	883	882	874	894	914	914	916	900
MAT (%MS)	17.3	17.7	17.6	18.2	18.4	17.6	6.5	8.6	6.7	9.4
Cellulose brute (%MS)	14.9	14.7	14.5	10.9	10	10.2	37.3	35.5	35.6	38.0
Matières Grasses (%MS)	1.9	3.4	2.5	4	0.35	3.6				

4. Matériel et Méthodes

a) Prélèvements

Théoriquement, les distributeurs automatiques d'aliments étaient coupés la veille du prélèvement autour de 21h afin d'assurer une « mise à jeun » d'au moins dix heures à tous les animaux et de standardiser les conditions de prélèvement en limitant les variations de communauté microbienne et de métabolites liés à la proximité du repas ; cela permet également de comparer les résultats obtenus avec ceux d'études dans lesquelles les prélèvements ont été effectués à l'abattoir sur des animaux à jeun (Kim et al., 2019) . Les distributeurs d'eau étaient, quant à eux, arrêtés environ deux heures avant le début des sessions de prélèvements. Cependant, lors de la deuxième période de la phase MIX de 2018 et lors de la phase CONC de

2019, les distributeurs d'aliments n'ont pas été arrêtés et les animaux ont pu continuer à manger jusqu'au matin du prélèvement. Ces deux évènements sont marqués par un astérisque rouge sur la Figure II.1.1

Les principales hypothèses des variations interindividuelles d'efficacité alimentaire étant des différences de digestion et de produits fermentaires ainsi que des différences au niveau du métabolisme, deux catégories d'échantillons ont été prélevées : des échantillons de contenu ruminal destinés à l'étude de la communauté microbienne dans son ensemble ainsi que de divers produits du métabolisme microbien, et des échantillons de sang destinés à l'étude de la valence métabolique de l'efficacité alimentaire.

Les prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés à l'aide d'une sonde gastrique médicale reliée à une pompe électrique. La sonde était rincée à l'eau chaude entre les animaux de manière à éviter la contamination d'un échantillon à l'autre et désinfectée avec une solution de glutaraldéhyde (Steranios 2%) avant et après chaque session. La pompe était arrêtée lors de la remontée de la sonde le long de l'œsophage pour limiter la contamination salivaire. Le contenu ruminal a ensuite été aliquoté en plusieurs tubes : deux microtubes de 2 μ L destinés respectivement au séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S ou 18S et à l'étude du métabolome ruminal par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN); un pot droit de 60mL pour l'analyse des AG longs du rumen par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et un tube de 5 mL en polypropylène contenant 0,2 mL d'une solution à 25% (v/v) d'acide sulfurique concentré pour analyse des AGV du rumen par CPG. Immédiatement à la suite de l'aliquotage, les microtubes ont été plongés dans de l'azote liquide puis transférés et stockés dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les tubes et pots destinés aux analyses par CPG ont été transférés dans un congélateur à -20°C.

Des prélèvements sanguins ont également été effectués afin d'étudier le métabolome plasmatique par RMN. Les prélèvements ont été réalisés à la veine jugulaire à l'aide de vacutainers et de tubes contenant de l'héparine de lithium. Ils ont ensuite été centrifugés à 2 400 g pendant 10 minutes à 4°C de façon à séparer le plasma du culot cellulaire puis le plasma a été transféré dans des microtubes de 2 μ L immédiatement plongés dans de l'azote liquide avant transfert dans un congélateur à -80°C.

b) Analyse de la communauté microbienne ruminale par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ou l'ARNr 18S

i. *Extraction*

À la suite du prélèvement les échantillons de contenu ruminal ont été stockés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN réalisée à l'aide du kit « ZR-96 Soil Microbe DNA Kit » (Zymo Research, Irvine, États-Unis d'Amérique) sur 85 µL de la phase liquide de l'échantillon en suivant les recommandations du fabricant. Le protocole détaillé est disponible en Annexe 2.

ii. *Amplification*

L'amplification du gène codant pour l'ARN 16S pour identification des bactéries et des archées et celle du gène codant pour l'ARN 18S pour identification des eucaryotes ruminants ont été réalisées séparément. L'ADN purifié a été centrifugé à 1000 g pendant une minute puis, pour l'ADN codant pour l'ARNr 16S, il a été dilué au centième avant d'être centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Un microlitre de la solution contenant l'ADN a été prélevé et ajouté au mélange de nucléotides, d'amorces et de Taq ADN polymérase (dont la composition est précisée en Annexe 2) puis placé dans un thermocycleur « Uno-96 » (OZYME, Saint-Cyr l'École, France) pour amplification suivant un programme constitué de trois étapes (dénaturation à 94°C, hybridation à 65°C, extension à 72°C) d'une minute chacune, répétées 30 fois. À l'issue de l'amplification, la présence d'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose avec tampon TBE (Tris, Borate, EDTA). Les échantillons amplifiés ont ensuite été apportés à la plateforme de séquençage GeT-PlaGE (INRAE, Toulouse, France, doi: 10.15454/1.5572370921303193E12) où une deuxième amplification a été réalisée en utilisant des amorces auxquelles des séquences « étiquettes » ont été ajoutées. Cette 2^{ème} PCR a été réalisée indépendamment pour chaque puits et chaque échantillon a reçu une étiquette individuelle. Une fois cette deuxième polymérisation réalisée, les échantillons ont été groupés et séquencés en une seule fois sur un séquenceur Miseq (Illumina, San Diego, États-Unis d'Amérique).

iii. Séquençage

Brièvement les séquences obtenues à l'issue de la deuxième PCR contiennent, en plus de leurs étiquettes, des adaptateurs communs qui permettent l'adhésion aux nano-pores d'une cellule de flux qui sont couverts d'oligonucléotides complémentaires adaptateurs. Lorsqu'un fragment d'ADN arrive dans le nano-pore il s'hybride avec l'oligonuclotide de la cellule de flux et sert de support à la production du brin complémentaire. Le fragment d'origine est ensuite éliminé et le brin complémentaire s'hybride en formant un pont avec l'oligonucléotide complémentaire de la cellule de flux et sert de support à la synthèse de son brin complémentaire. Les deux brins pontés sont ensuite dénaturés et l'amplification par pontage recommence jusqu'à obtention d'un cluster de brins d'ADN identiques ou complémentaires au fragment originel. Ces derniers sont clivés avant le séquençage, réalisé par adjonction de nucléotides qui portent des groupes « stop » bloquant la polymérisation et chacun un fluorophore spécifique. Lorsque le même nucléotide est incorporé par tout le cluster en même temps, un signal lumineux correspondant au fluorophore du nucléotide incorporé est émis et détecté par une caméra (Figure II 1.2).

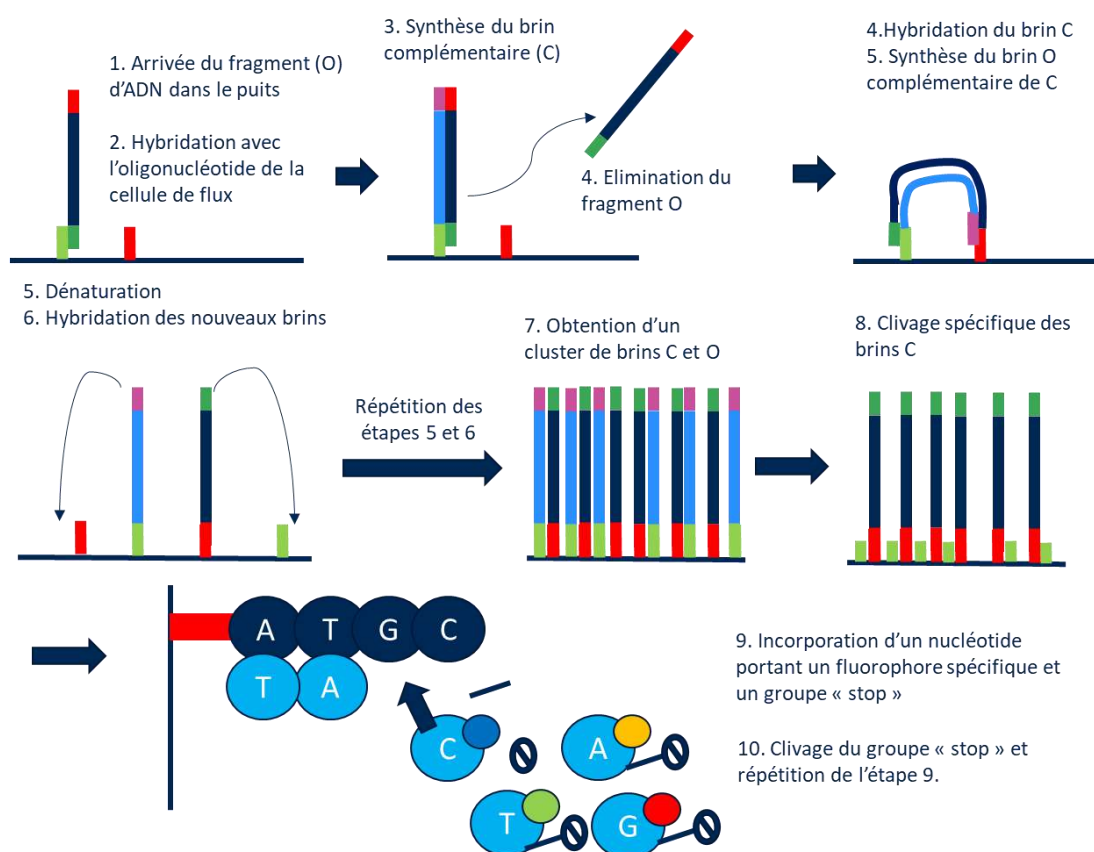


Figure II 1.2 : Représentation schématique des processus d'amplification en pont et de séquençage des clusters sur une cellule de flux.

Les données issues du séquençage ont été démultiplexées, c'est-à-dire réaffiliées à leur échantillon d'origine grâce aux étiquettes, avant le traitement bioinformatique.

iv. Traitement bioinformatique

À l'issue du séquençage, des lectures « Forward » et « Reverse » d'environ 250 nucléotides ont été obtenues et traitées à l'aide du logiciel FROGS (Escudié et al., 2018).

Pre-process :

Dans un premier temps, les lectures obtenues grâce aux amorces « Forward » et « Reverse » ont été jointes pour former des séquences plus longues. Cette jonction se fait par recouvrement de séquences et, de fait, la longueur totale de la séquence équivaut à la somme des longueurs des fragments amputée de la zone de superposition.

Pour les séquences obtenues à partir des amorces 18S, les lectures « Forward » et « Reverse » ne se recoupaient pas et un outil de combinaison artificielle consistant à insérer arbitrairement 100 nucléotides non identifiés (N) a été utilisé. Ainsi, pour les étapes suivantes, et en particulier l'affiliation, l'information contenue dans les séquences est conservée. Les nucléotides N peuvent rendre l'affiliation moins précise et occasionner des affiliations multiples dues aux incertitudes du nombre réel de nucléotides séparant les deux lectures et de la séquence de ces nucléotides.

Après cette étape, dite de dé-réplication, une deuxième étape consiste à éliminer les séquences dé-répliquées ne contenant pas les bonnes amorces, celles contenant des nucléotides ambigus (c'est-à-dire lorsque le signal fluorescent émis lors de l'élongation n'est pas précisément attribuable à un nucléotide particulier), ou celles ne présentant pas la bonne longueur.

Clustering :

L'étape suivante est l'étape de clusterisation. Les séquences sont agglomérées selon leur degré d'identité. Une approche classique est de considérer une séquence comme un centroïde et de comparer les autres séquences à celle-ci en considérant un seuil global de différence à partir duquel la nouvelle séquence sera rejetée du cluster. Ce seuil est généralement fixé à 3% lorsque les clusters se veulent représentatifs d'espèces (Schloss & Handelsman, 2006) mais quelques auteurs préconisent de le réduire à 1% (Acinas et al., 2004). Le principal défaut de cette méthode est l'absence de réévaluation du centroïde après définition qui rend la clusterisation sensible au choix de la première séquence. La méthode utilisée dans le logiciel FROGS est celle développée

par Mahé et collaborateurs (Mahé et al., 2014). Cette méthode, appelée Swarm, considère les amplicons comme des éléments appartenant à un espace et définit la distance entre deux séquences par le nombre de nucléotides qui diffèrent entre les deux. Un cluster est créé à partir de la première séquence disponible. Ensuite, toutes les séquences présentant au plus d différences sont agglomérées au cluster et deviennent des nouveaux points de départ. Cette méthode fonctionne à partir de l'hypothèse selon laquelle les clusters sont séparés dans l'espace par des zones vides et ne forment pas un vaste agglomérat. Dans la mesure où la séquence choisie comme point de départ ne restera pas nécessairement au centre du cluster, cette méthode est indépendante du tirage initial. La clusterisation a été utilisée avec un nombre maximal de différences d égal à 1. Pour compenser la tendance de la première version du Swarm à sur-compartimenter les clusters, l'option « fastidious », permettant de relier deux clusters de taille réduite (singletons et doubletons) non contigus mais qui le seraient si une séquence présentant une modification d'écart avec les deux avait été obtenue, a été utilisée (Mahé et al., 2015). Ce dispositif sert à compenser la perte d'un potentiel intermédiaire, obtenu lors des PCR mais non séquencé.

Élimination des chimères :

Au cours du processus de polymérisation lors des PCR et du séquençage, il est possible qu'un fragment d'ADN issu d'une réplification avortée serve d'amorce au cycle suivant. Cela aboutit à la formation de chimères contenant une partie de séquence appartenant à une première espèce et une partie de séquence appartenant à une seconde espèce. Pour éliminer les chimères, le logiciel FROGS procède à une validation croisée. Une séquence est considérée chimérique uniquement si les fragments composant l'hybride sont des morceaux de séquences qui font aussi partie de l'échantillon (Escudié et al., 2018; Schloss et al., 2011).

Filtres :

De très nombreux clusters, après déchimérisation, contiennent très peu de séquences, voire une seule séquence auquel cas ils sont qualifiés de singletons. Ils peuvent être occasionnés par des erreurs de séquençage propres à certains échantillons par exemple. Des filtres peuvent être utilisés pour limiter la présence de ces singletons. Ainsi, Bokulich et al recommandent l'utilisation d'un seuil à 0,005% du total des séquences pour déterminer les clusters qui seront laissés de côté et considérés artéfactuels (Bokulich et al., 2013). Il est également possible de

filtrer les séquences identifiées en comparaison d'une banque de contaminants ou de définir un seuil de prévalence pour le cluster.

L'ensemble du processus bioinformatique a été appliqué séparément pour le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et pour le séquençage du gène codant pour l'ARNr 18S mais pour chacun, les échantillons de la phase CONC et de la phase MIX ont été traités ensemble afin d'homogénéiser les numéros des clusters obtenus.

Affiliation :

Les clusters formés au cours du processus sont affiliés grâce aux données taxonomiques contenues dans les banques SILVA 16S (version 132) et 18S (version 138.1) respectivement. Chaque cluster forme alors une Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU), il se voit attribuer une appartenance à des niveaux taxonomiques plus ou moins précis.

À l'issue de ce processus, on obtient une table d'abondance d'OTUs par échantillon. La quantité de séquences obtenues par échantillon est variable et dépend des conditions de prélèvement (dilution salivaire lors de prélèvements ruminiaux par exemple) et des conditions analytiques (efficacité de la polymérisation). Lorsqu'un microorganisme est identifié dans très peu d'échantillons cela résulte en un grand nombre de zéros dans la table d'abondance. Si, de surcroît, le microorganisme est relativement peu abondant, il peut s'avérer difficile de conclure qu'un microorganisme est plus abondant dans un groupe que dans un autre lors de comparaisons. En effet, la présence d'un microorganisme dans une faible proportion des échantillons d'un groupe et son absence de ceux de l'autre peut provenir d'un hasard d'échantillonnage, et donc ne pas avoir de signification biologique. Pour cette raison, les OTUs ont été considérées au niveau taxonomique du genre qui permet de regrouper des séquences phylogénétiquement proches mais présentes chez peu d'individus. Cette approche permet également une meilleure comparaison avec la littérature puisqu'un plus grand nombre de séquences sont affiliées à l'échelle du genre qu'à l'échelle de l'espèce et que la plupart des études menées sur le microbiote présentent les abondances relatives des différents genres. De plus, un filtre sur la prévalence a été appliqué aux tables d'abondance des genres afin de ne pas dégager de conclusions potentiellement erronées à partir d'un faible nombre d'observations. Le niveau de ce filtre a été choisi pour conserver une majorité de séquences (>95%) tout en réduisant la proportion de zéros dans les tables d'abondance (<20%) ce qui a conduit à conserver les genres présents dans au moins 20% des échantillons. Ce filtre a été appliqué après

vérification qu'aucun genre présentant une prévalence proche du seuil n'était absolument exclusif à un des groupes considérés.

c) Analyse des AGV par CPG

Les AGV du contenu ruminal ont été dosés, conformément à la méthode de Playne (Playne, 1985), à l'aide d'un chromatographe (Agilent 7890A, Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis d'Amérique) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne de 30 m. Le détail de l'analyse est présenté en Annexe 3.

L'utilisation d'un standard interne (acide 4-méthylvalérique à 0,2% (v/v)) a permis d'obtenir des concentrations en mmol/L des six AGV (acétate, propionate, butyrate, valérate, isobutyrate et isovalérate). Cependant, du fait de la potentielle dilution salivaire des échantillons et au caractère dynamique de la production des AGV, nous avons choisi de travailler sur leurs proportions et de les traiter de façon compositionnelle.

d) Analyse des acides gras longs par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des acides gras longs par CPG a été adaptée de la méthode de Alves et al. 2013 (Alves et al., 2013) et menée au laboratoire de productions animales de la faculté de médecine vétérinaire de Lisbonne (FMV Lisboa). Brièvement, cette méthode consiste en une méthylation en deux temps (basique puis acide) des AG, en l'extraction des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) et en leur analyse par chromatographie en phase gazeuse sur chromatographe Shimadzu GC 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne de 100 m. Le détail de l'analyse est présenté en Annexe 4.

L'addition d'un standard interne (acide nonadécanoïque, C19 :0) au avant méthylation permet d'obtenir des concentrations absolues mais, du fait de la dilution salivaire potentielle, les pourcentages des différents EMAG ont été calculés de façon à traiter le profil en acide gras de façon compositionnelle.

e) Traitement des données compositionnelles issues de l'analyse des AGV et des AG longs et des séquençages microbiens.

i. *Nature et représentativité de l'échantillons*

La nature du prélèvement peut résulter en des concentrations en AGV ou AG longs plus ou moins importantes selon que de la salive a été pompée ou non au court du prélèvement. Pour cette raison, les profils en AG et AGV, particulièrement lorsqu'ils sont obtenus à l'aide d'une sonde et non à l'abattoir, sont exprimés en pourcentages des différents AGV et AG totaux, respectivement. De la même manière, au cours d'une extraction d'ADN, la quantité d'ADN récupérée peut être variable selon les échantillons et les résultats des analyses de microbiote peuvent témoigner d'importantes variations de profondeur de séquençage. Dans l'un ou l'autre cas, la quantification absolue des AGV, des AG ou des microorganismes n'est pas permise et les résultats sont exprimés sous la forme de valeurs dépendantes les unes des autres. Ainsi on exprimera ces données sous la forme de compositions dont les différents éléments ont une importance relative variable.

ii. *Traitement des données compositionnelles*

Il est important de considérer la nature compositionnelle des données notamment si l'on souhaite travailler avec des corrélations intra-prélèvement. Un exemple flagrant est donné par Aitchison dans son « Concise Guide to Compositional Analysis » (Aitchison, 2005). Dans cet exemple, deux scientifiques travaillent sur des échantillons appariés supposément identiques et étudient la part animale, végétale et minérale des échantillons, l'un en les déshydratant au préalable (chercheur B) et l'autre en ne les déshydratant pas (chercheur A) (Figure II.1.3). Les deux scientifiques cherchent alors à corréler la partie animale et la partie végétale. La sous-composition déshydratée est, en termes de partie animale et de partie végétale, strictement similaire à la composition non déshydratée. Pourtant les corrélations entre deux parties de la composition ne seront pas les mêmes selon si l'eau est conservée ou non avec, par exemple, une corrélation de 0,64 obtenue par le chercheur A à partir de 4 échantillons tandis que le chercheur B obtient une corrélation fortement négative de -0,87.

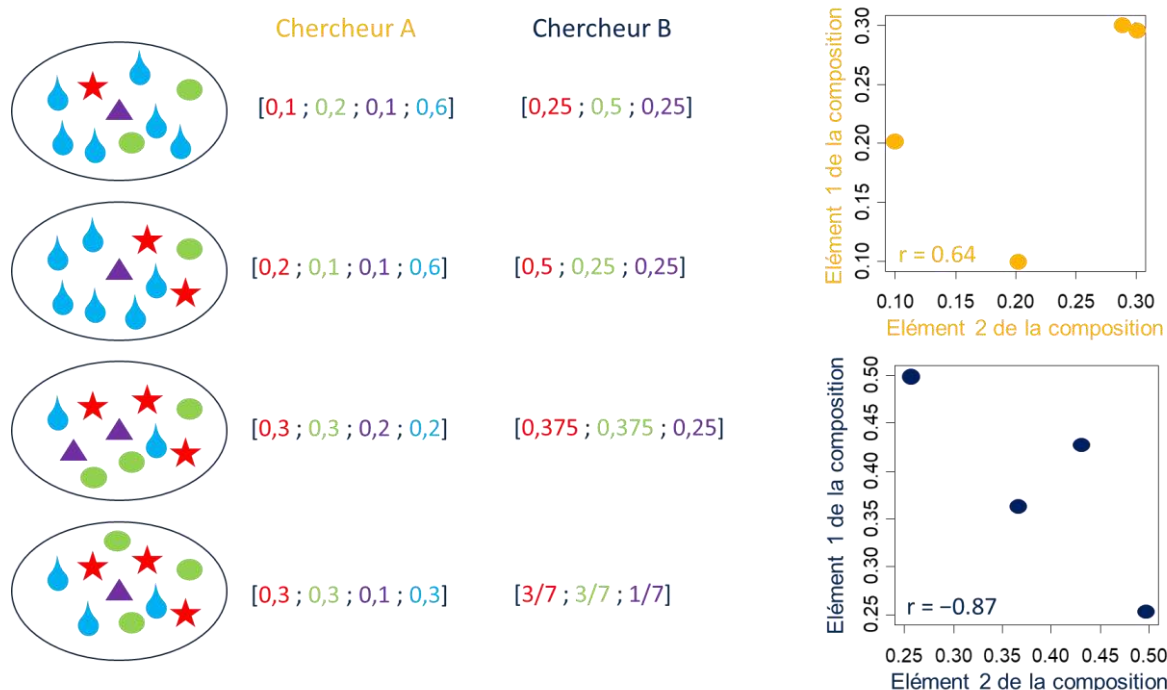


Figure II.1.3: Illustration de l'incohérence des corrélations lors de la manipulation de données compositionnelles. Le chercheur A et le chercheur B ont les mêmes échantillons et réalisent une analyse des corrélations entre la partie animale (en rouge) et la partie végétale (en vert) soit en déshydratant (chercheur B), soit en ne déshydratant pas (chercheur A) les échantillons.

Cet exemple illustre que les données compositionnelles ne peuvent pas être traitées par des approches statistiques classiques par l'incohérence des résultats obtenus avec différentes sous-compositions. Cette incohérence est particulièrement vérifiée pour des compositions comptant peu d'éléments puisque la détermination de l'abondance relative d'un élément par un autre est plus forte dans ce cas-là (Greenacre et al., 2021).

Une autre limite des données compositionnelles est leur appartenance à l'intervalle borné $[0,1]$. Cette limite peut être levée par l'utilisation de logarithmes des ratios entre composants qui permet de quitter cet intervalle tout en préservant les liens entre les éléments de la composition. Le dénominateur choisi peut être un des éléments de la composition, choisi arbitrairement : on parle alors d'ALR (pour Additive Log-Ratio). Cette approche présente l'inconvénient de ne pas être une isométrie ce qui signifie que les distances entre les points images obtenus après transformation ne sont pas identiques aux distances entre les points antécédents.

Une autre approche commune en traitement de données compositionnelles est la transformation CLR (pour Centered Log-Ratio) qui consiste à prendre pour dénominateur la moyenne géométrique des éléments de la composition. Soit une composition $\{x = [x_1, x_2, x_3, \dots, x_{D-1}, x_D] \in R^D\}$, après transformation clr, cette composition sera :

$clr(x) = [\log\left(\frac{x_1}{g(x)}\right), \log\left(\frac{x_2}{g(x)}\right), \dots, \log\left(\frac{x_D}{g(x)}\right)]$ avec $g(x) = (\prod_{i=1}^D x_i)^{\frac{1}{D}}$. Contrairement à la transformation ALR, la transformation CLR préserve les distances de la composition originale, mais elle conserve aussi la dépendance forte entre les éléments de la composition puisque la somme des coordonnées CLR est 0.

Enfin, l'approche ILR (pour Isometric Log-Ratio) repose sur la construction de balances par une série de séparations binaires des variables, les valeurs +1 et -1 seront attribuées à l'un et l'autre groupes de variables. À chaque étape, la coordonnée ILR est le quotient de la moyenne géométrique des variables affublées de la valeur +1 par la moyenne géométrique des variables affublées de la valeur -1, normalisé par un coefficient k qui dépend du nombre de variables qui ont reçu la valeur +1 ($\#_+$) et -1 ($\#_-$), respectivement : $k = \sqrt{\frac{\#_+ \times \#_-}{\#_+ + \#_-}}$. En résulte, à partir de n variables initiales, un total de n-1 coordonnées ILR. La répartition des variables à chaque étape peut être aléatoire ou guidée par des raisons biologiques. L'intérêt principal de la transformation ILR est de s'affranchir de la contrainte sur la somme des coordonnées mais l'interprétation des coordonnées, si elle est réalisable lorsque le nombre de variables est restreint (dans l'analyse des AGV par exemple (Palarea-Albaladejo et al., 2017)), devient compliquée lorsque le nombre de variables augmente. De fait, l'approche CLR sera privilégiée pour traiter les données compositionnelles dans le reste de ce travail.

Dans le cas des analyses de communautés microbiennes il est assez courant qu'un microorganisme ne soit pas observé dans un échantillon ce qui implique que les tables d'abondance soient riches en zéros. En théorie, ces zéros peuvent être considérés de deux façons. Soit ils sont « essentiels » et représentent une véritable absence qui pourrait permettre de séparer des groupes d'individus par la prévalence du microorganisme ou témoignent d'une subdivision trop importante des catégories, soit ce sont des « faux zéros » issus du hasard d'échantillonnage lorsque la profondeur de séquençage est faible. Les premiers sont porteurs d'une véritable information tandis que les seconds devraient être transformés. En pratique, il est très difficile de savoir si, avec une profondeur de séquençage plus importante, le microorganisme absent aurait pu être détecté donc tous les zéros seront transformés.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour remplacer ces zéros sans bouleverser les relations entre les éléments de la composition. En particulier, l'approche GBM (Geometric Bayesian-Multiplicative replacement) repose sur l'imputation bayésienne des zéros arrondis et une multiplication des autres valeurs pour préserver les ratios entre les éléments. C'est cette approche, décrite par Daunis-i-Estadella et al. (Daunis-i-Estadella & Martin-Fernandez, 2008) que nous avons utilisée, à l'aide du package zCompositions de R (Palarea-Albaladejo & Martín-Fernández, 2015).

Dans le cas des analyses d'AGV, aucun pic n'était inférieur au seuil de détection et aucune imputation préalable des zéros n'a été nécessaire. Lors des analyses d'AG, certains pics étaient difficilement intégrables et ont été considérés comme des « faux zéros » liés à un seuil de détection trop élevé, ces zéros ont été imputés. Enfin, le filtre sur l'abondance relative des clusters (filtre de Bokulich) et le filtre appliqué sur la prévalence au niveau du genre nous ont conduits à considérer les zéros restants dans la table d'abondance comme dus à un hasard d'échantillonnage et à supposer que les genres associés auraient pu être observés avec un effort d'échantillonnage plus important. De fait, ces zéros ont été imputés par l'approche GBM.

f) Analyse en spectrométrie RMN des métabolomes ruminal et plasmatique

i. *Acquisition des spectres*

Les analyses en spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ont été menées à la plateforme MetaToul- AXIOM de l'unité Toxalim d'INRAE avec un spectromètre Bruker AVANCE III HD 600 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Allemagne). Le protocole de préparation des échantillons et les paramètres d'acquisition des spectres sont présentés en Annexe 5.

ii. *Traitement des spectres*

Aspects théoriques des spectres RMN

L'acquisition des spectres résulte en un ensemble de pics correspondant aux résonances des protons des molécules présentes dans l'échantillon. Pour chaque molécule, le spectre contient autant de groupes de pics que de types de protons différents. Ces pics peuvent être simples ou arrangés en doublets, triplets ou divers multiplets en fonction du nombre de protons voisins du type de protons considéré selon la règle dite « n+1 ». Ainsi, si un ou plusieurs protons équivalents ont un proton voisin, le pic est un doublet, s'ils ont deux protons voisins, le pic est un triplet, etc.

Le déplacement chimique auquel ces groupes de pics apparaissent est lié à l'électronégativité locale dans la molécule. Le tétraméthylsilane (TMS), souvent utilisé comme référence, est formé d'un atome de silicium substitué par quatre groupes méthyles et a un déplacement chimique nul. Il en est de même pour le 3-triméthylsilylpropionate (TSP), souvent utilisé comme référence dans les solutions aqueuses et qui présente aussi des pics avec un déplacement chimique plus important en plus du pic à 0 ppm. Sur la Figure II.1.4, représentant l'acide isovalérique, on retrouve 4 groupes de protons, le premier (en jaune) constitué des 6 protons équivalents appartenant aux deux groupes méthyles ayant un unique voisin et formant donc un doublet sur le spectre, le deuxième (en vert) constitué de leur voisin qui, possédant 8 voisins (respectivement 6 dans les groupes méthyles et deux portés par le carbone en α de la fonction acide carboxylique), présente un nonuplet sur le spectre, le troisième (en violet) constitué des deux protons sur le carbone α ayant un unique voisin et formant un doublet et enfin le quatrième (en bleu) présent dans la fonction acide carboxylique formant un singulet avec un déplacement chimique plus important, non représenté sur la Figure II.1.4.

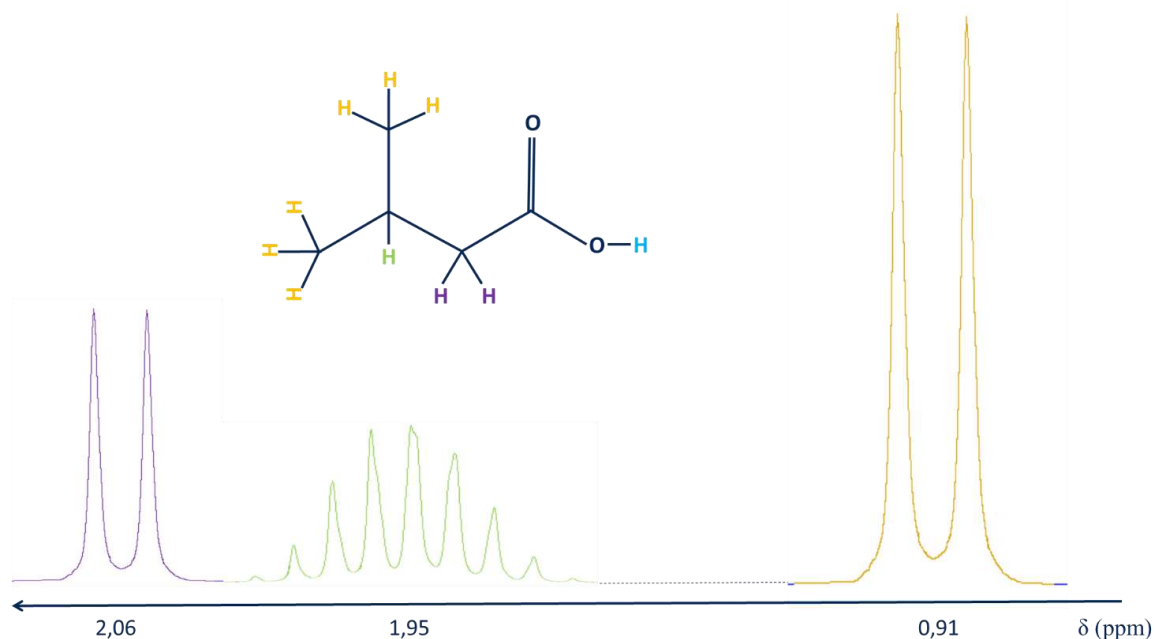


Figure II.1.4 : Représentation schématique d'une partie du spectre de l'acide isovalérique.

Obtention pratique des spectres RMN

Dans la pratique, nous n'avons pas analysé de composés purs donc les spectres obtenus ne sont pas aussi nets que celui présenté ci-dessus. La première étape à l'obtention du spectre est de calibrer le déplacement chimique pour que le 0 corresponde avec la référence utilisée.

Dans les échantillons de contenu ruminal, le TSP ajouté au cours de la préparation des échantillons (Annexe 5) a pu être utilisé pour calibrer le 0. Dans les échantillons de plasma, le TSP ayant complexé avec les protéines, nous nous sommes basés sur la présence d'un doublet caractéristique dans le spectre du glucose (à $\delta = 5,24$ ppm), présent en quantité suffisante dans tous les échantillons de plasma, pour calibrer les spectres (Wallmeier et al., 2017). Dans le cas où il n'y a aucune complexation du standard avec les molécules de l'échantillon, sa concentration peut être utilisée pour calculer celles des métabolites identifiés (Mercier et al., 2011).

Dans une dernière étape, la symétrie des pics a été vérifiée et une correction de phase a été appliquée pour éviter les distorsions pouvant affecter l'intégralité du spectre ou des régions spécifiques, en particulier à proximité du signal du solvant.

La calibration et la correction de phase ont été réalisées dans le logiciel TopSpin (Bruker Biospin, Rheinstetten, Allemagne).

iii. *Traitement bioinformatique*

Normalisation et débruitage des spectres

Le traitement bio-informatique des échantillons a été réalisé à l'aide du package ASICS (Automatic Statistical Identification in Complex Spectra) de R, développé par Tardivel et al. (Tardivel et al., 2017). Ce package applique une procédure totalement automatisée de traitement des spectres RMN pré-traités et permet l'identification des molécules présentes dans un échantillon et leur quantification à partir d'une base de 191 métabolites dont le déplacement chimique est connu dans les conditions de température et de pH standard.

Une normalisation des spectres est réalisée pour ramener l'aire totale du spectre à une somme constante, dans notre cas à 1. Par ailleurs, selon la nature de l'échantillon, une zone peut être exclue des quantifications. Dans notre cas, que ce soit pour les échantillons de plasma ou de rumen, il a été nécessaire d'exclure la zone correspondant à la résonance de l'eau, matrice des deux types d'échantillons et présente dans le tampon (entre 4,5 et 5,1 ppm). Du fait de l'intensité du pic associé au solvant, la détection et la quantification des molécules résonnant dans cette zone est impossible.

En RMN, comme dans la plupart des analyses, un bruit constitué de pics de petite taille, qui peuvent être des artefacts ou des molécules présentes en quantités extrêmement faibles, est observé. Tout pic d'amplitude inférieure à un certain seuil défini à l'observation du spectre et noté ρ_1 est considéré comme du bruit et ramené à zéro (Lefort et al., 2021). Dans notre cas, ρ_1 a été fixé à 0,015 pour les échantillons plasmatiques et ruminiaux. De cette façon le spectre est simplifié et présente deux types de régions, des régions d'intensité de signal nulle et des pics qui vont être sélectionnés et identifiés subséquentement.

Sélection des pics

La présence d'un métabolite dans un échantillon est détectée par la présence concomitante de tous les pics associés à cet échantillon. Une première étape de sélection des potentiels métabolites présents se base sur cette propriété. Ainsi, tous les spectres de référence pour lesquels un ou plusieurs pics manquent dans le spectre complexe analysé sont ôtés de la librairie réduite. Une marge de sécurité est tolérée pour l'alignement des spectres complexes avec la référence de façon à ne pas éliminer un métabolite potentiel pour un décalage mineur d'un des pics de son spectre. Dans notre cas, cette tolérance a été fixée à un décalage de 0,01 ppm.

Le spectre complexe est ensuite aligné contre un spectre de référence construit à partir des spectres simples contenus dans la librairie réduite. Lors du pré-traitement le déplacement

chimique des différents pics a été calibré sur un standard mais il est possible qu'il y ait un décalage au sein du spectre. Pour cette raison, il est nécessaire, en seconde intention, de diviser le spectre en sous-parties dont le décalage va pouvoir être corrigé localement (Wong et al., 2005) (Figure II.1.5).

Les étapes successives d'alignement, que ce soit lors du pré-traitement ou des ajustements global et locaux, aboutissent à une superposition des pics d'un métabolite dans le spectre complexe avec les pics du spectre simple de ce métabolite.

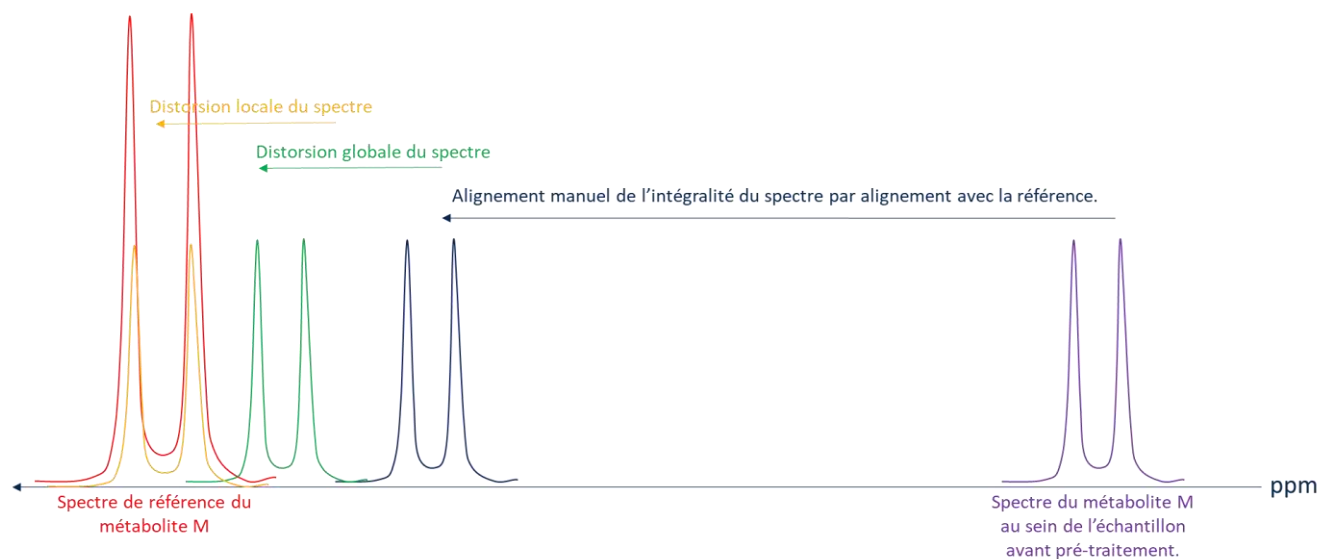


Figure II.1.5 : Alignement progressif du spectre d'un métabolite M appartenant au spectre complexe d'un échantillon au spectre de référence du métabolite M, d'après Lefort et al. (2021).

Quantification relative des métabolites

La quantification des métabolites se fait en trois étapes (Lefort, 2021). Pour résumer, une première étape consiste à estimer le spectre complexe par une combinaison linéaire des spectres de la librairie réduite, un coefficient étant attribué à chacun. Une deuxième étape consiste à déterminer parmi les coefficients obtenus lesquels ne sont pas statistiquement différents de 0 en utilisant le Family-Wise Error Rate (FWER). Pour les métabolites dont les coefficients n'ont pas été considérés nuls à l'étape précédente, une troisième étape consiste en la ré-estimation de ces coefficients en n'intégrant que les métabolites sélectionnés au modèle linéaire. À la suite de ces trois étapes, les quantifications relatives sont obtenues en divisant les coefficients obtenus par le nombre de protons contenus dans les molécules identifiées. Cette approche suppose qu'il n'existe aucune somme de deux ou plusieurs métabolites dont la combinaison linéaire soit exactement le spectre d'un autre métabolite.

Conformément aux recommandations des auteurs du package ASICS, les données issues de la spectrométrie RMN n'ont pas été considérées compositionnelles (Chapitre 4.1).

g) Statistiques

i. Identification des facteurs de variation majeurs non associés à l'efficiency alimentaire et correction statistique

Afin de décrire nos jeux de données (métabolomes plasmatique et ruminal par RMN, analyses chromatographiques des AGV et des AG longs du rumen et séquençages de l'ADN codant pour les ARNr 16S et 18S) et d'identifier les différents facteurs susceptibles de les influencer, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées. Les données de microbiote serviront d'illustration des principaux facteurs de variation environnementaux et expérimentaux identifiés par ACP. Sur la Figure II.1.6, l'effet année, visible avant transformation des données en coordonnées CLR est encore plus évident après.

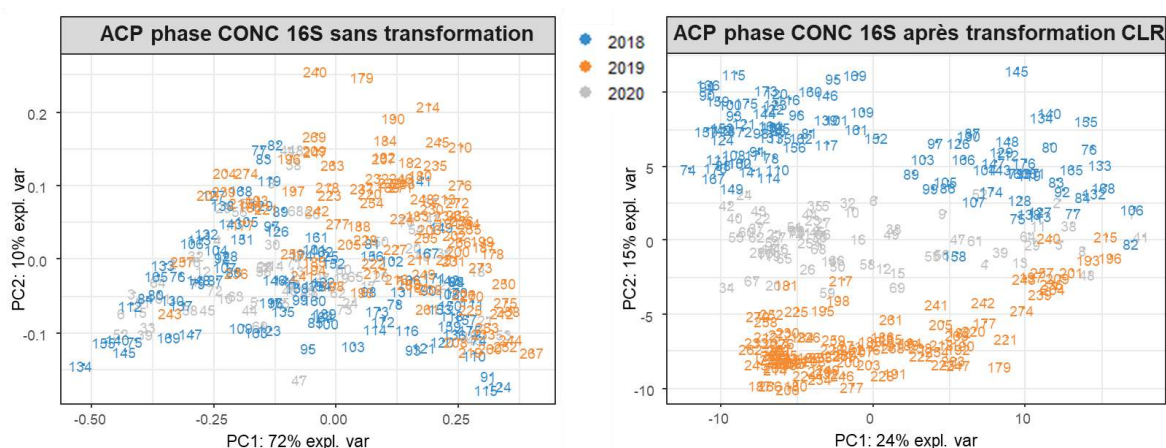


Figure II.1.6 : Analyse en composante principale des genres microbiens obtenues par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S à partir des prélèvements sur les animaux recevant le régime CONC avant (A) et après (B) transformation CLR mettant en évidence un effet fort de l'année de prélèvement.

Par ailleurs, au régime MIX, un effet de la période de prélèvement ressort assez nettement sur l'analyse en composante principale que ce soit pour les communautés eucaryotes ou procaryotes ou pour les profils d'AG. En complément de l'ACP, une analyse par t-Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE), reposant sur la minimisation de la distance entre échantillons similaires plutôt que sur la maximisation de la variation au sein des jeux de données, a permis d'obtenir une meilleure résolution de l'effet période, masqué par l'effet année en ACP (van

der Maaten & Hinton, 2008). La « perplexité » du modèle t-SNE, qui correspond au nombre de voisins optimal pour chaque point a été fixée à la racine carrée du nombre d'échantillons en accord avec les valeurs empiriques de la littérature (Cao & Wang, 2017; Xu et al., 2020).

Les analyses discriminantes ou d'association ont été réalisées sur les résidus de modèles linéaires des différentes variables par les effets que l'on souhaitait corriger, à savoir : l'année, le lot auquel appartenaient les animaux, et un facteur binaire « mise à jeun » en phase CONC et l'année, la période, le lot et le facteur binaire « mise à jeun » en phase MIX. Dans le cas des phénotypes zootechniques (consommation, poids, GMQ, épaisseurs de gras et de muscle dorsaux), l'effet « mise à jeun » n'a pas été pris en compte puisque ces phénotypes, mesurés avant les prélèvements, n'en dépendaient pas.

ii. *Analyses multivariées*

Dans la plupart des cas, les données compositionnelles nécessitent des approches multivariées qui permettent de prendre en compte les variables dans leur globalité et, en particulier, leurs relations d'interdépendance. Des approches univariées (en particulier ANOVA et corrélations entre jeux de données) ont été utilisées en complément des approches multivariées afin de pouvoir donner un poids à chaque variable mais ont toujours été interprétées en parallèle des analyses multivariées.

Les relations entre les différents jeux de données ont été explorées par régression PLS des jeux de données deux à deux à l'aide du package MixOmics (Rohart et al., 2017) et cette approche a été complétée par le calcul de corrélations de Pearson. Pour les analyses impliquant les communautés microbiennes, une sélection préalable des variables a été effectuée à l'aide de la fonction `tune.spls` de `mixOmics`.

Les analyses discriminantes, qui constituent le cœur de ce travail, consistent à décrire, expliquer ou prédire, à partir d'un ensemble de variables explicatives, l'appartenance d'une observation à un groupe. Dans notre cas, les groupes à discriminer sont les lignées génétiques et les groupes phénotypiques d'efficacité alimentaire qui sont le reflet de l'efficacité alimentaire réelle des animaux. Comparativement à d'autres analyses discriminantes comme la LDA (Linear Discriminant Analysis), la PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) est moins sensible à la multicollinéarité des données, inévitable lorsqu'on travaille sur des données compositionnelles (Naes & Mevik, 2001). La PLS-DA est une approche multivariée très

adaptée lorsque les observations doivent être classées en fonction d'un nombre réduit de groupes prédéterminés à partir d'un nombre important de variables. Dans le cadre d'une PLS-DA, un premier jeu de données contient les variables à partir desquelles la discrimination est réalisée tandis qu'un second jeu de données est composé d'une variable unique, appelée variable indicatrice, prenant une valeur numérique différente pour chaque groupe considéré. Il s'agira alors pour la classification d'établir, à partir des covariances, la meilleure manière de prédire l'appartenance à un groupe (Brereton & Lloyd, 2014).

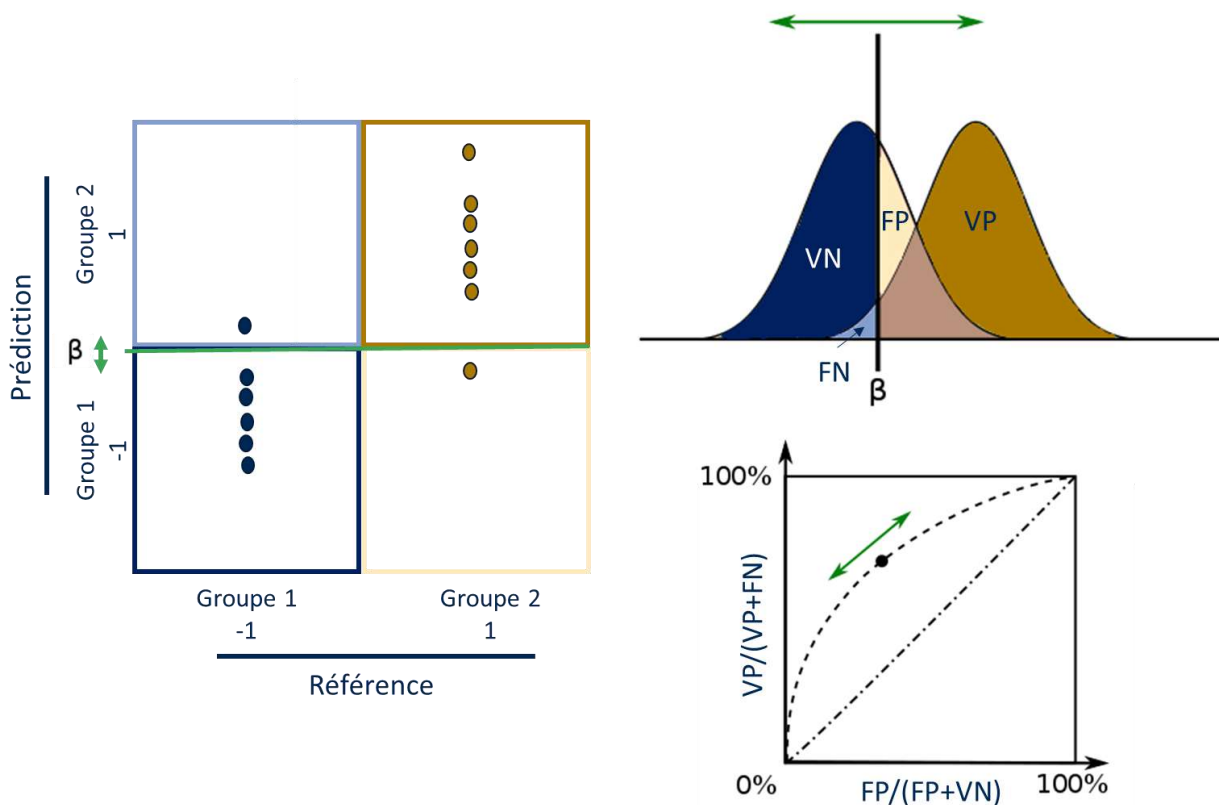


Figure II.1.7 : Illustration de l'approche PLS-DA et de la détermination du meilleur modèle par AUROC.

Cependant, toutes les observations d'un groupe ne sont pas identiques et totalement différentes de celles de l'autre groupe et les échantillons de l'un et l'autre groupe se répartissent de part et d'autre de la valeur moyenne attribuée au groupe. On utilise alors un seuil, noté β sur la Figure II.1.7, qui permet d'estimer le groupe prédit d'une observation à partir du modèle. Si la discrimination était parfaite les vrais positifs (VP) représenteraient l'intégralité des positifs et les faux positifs (FP) n'existeraient pas. La proportion de VP et de FP à différents seuils sert à construire la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). Une courbe ROC diagonale

représente une discrimination totalement aléatoire, il n'existe alors pas de seuil qui permette de maximiser les VP tout en minimisant les FP. L'aire sous la courbe ROC (AUROC) est un moyen d'évaluer la qualité de la discrimination.

Lorsqu'un très grand nombre de variables est utilisé pour classer un plus petit nombre d'échantillons, il peut arriver qu'une discrimination émerge dans un jeu de données sans qu'il y ait de différence réelle entre les deux groupes sur le plan biologique (Ruiz-Perez et al., 2020). Cet effet, appelé sur-ajustement, implique qu'il faille vérifier la fiabilité des modèles, par exemple par test de permutation et de validation croisée, en plus d'étudier leur qualité de discrimination par AUROC (Lee et al., 2018).

Enfin, afin de d'obtenir un poids relatif des différentes variables dans la discrimination, la valeur VIP (Variable Importance in Projection) a été calculée pour le modèle PLS-DA sélectionné. Classiquement, le seuil de 1 a été utilisé pour opérer une sélection des variables pour des analyses ultérieures (Cho et al., 2008; Galindo-Prieto, 2017). Pour qualifier l'importance des différentes variables, des seuils plus élevés ont été proposés, dépendamment du nombre d'échantillons, de variables explicatives, de composantes ainsi que de la différence inter-groupes attendue (Akarachantachote et al., 2014). Le seuil de 1,5 a été proposé dans plusieurs études métabolomiques pour identifier les variables jouant un rôle majeur dans la discrimination et c'est le seuil que nous avons retenu (Du et al., 2018; Matysiak et al., 2014).

Une autre approche pour sélectionner les variables les plus impliquées dans une discrimination dans le cas de données compositionnelles a été proposée par Rivera-Pinto et al. (Rivera-Pinto et al., 2018). Cette méthode propose de déterminer la balance optimale pour la classification d'échantillons entre deux groupes (par AUROC). Les balances sont similaires aux coordonnées ILR présentées plus tôt. Brièvement, l'algorithme commence par chercher la meilleure combinaison de deux variables (X_1 et X_2) telle que la valeur prise par $\frac{1}{2} \times \log\left(\frac{X_1}{X_2}\right)$ discrimine au mieux les deux groupes puis ajoute des variables au numérateur et/ou au dénominateur jusqu'à ce que l'ajout n'améliore plus la discrimination. Cette méthode a été utilisée à la fois pour discriminer les groupes et pour sélectionner les variables dans les PLS-DA des données de séquençage.

Chapitre 2. Existe-t-il des liens directs entre la communauté microbienne des agneaux et leur efficacité alimentaire ?

Objectifs :

L'objectif de ce chapitre est de comparer les microbiotes ruminants et les activités microbiennes entre groupes d'animaux à deux régimes différents. Les groupes seront définis dans un premier temps sur la base de la lignée génétique à laquelle chaque animal appartient. Dans un second temps, les groupes d'animaux seront définis sur une base phénotypique et non plus génétique : les animaux phénotypiquement efficaces seront comparés aux animaux phénotypiquement moins efficaces. Les différences entre groupes seront recherchées au niveau du microbiote ruminal et de l'activité microbienne évaluée, ici, par le dosage des acides gras volatils ruminants.

Une approche métataxonomique par métabarcoding a été mise en place pour étudier les bactéries et les archées par l'intermédiaire d'un séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et les eucaryotes ruminants par séquençage du gène codant pour l'ARNr 18S. Les données de séquençage obtenues, considérées comme compositionnelles, ont été log-transformées par la méthode CLR après remplacement des zéros par approche.

Les données ont été analysées au rang taxonomique du genre dans la mesure où très peu d'OTUs ont été affiliées jusqu'à l'espèce et où les rangs taxonomiques supérieurs regroupent des microorganismes trop différents pour réellement permettre une interprétation biologique.

Conclusions :

Que ce soit pour la communauté eucaryote ou pour la communauté procaryote, les liens entre populations microbiennes et efficacité alimentaire dépendent de la ration distribuée aux animaux. Ainsi, les genres microbiens associés aux animaux efficaces ou inefficaces diffèrent d'un régime à l'autre et sont parfois contradictoires entre les deux régimes. Concernant les produits de fermentation microbienne, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre les phénotypes mesurés et le profil en AGV, quel que soit le régime.

1. Associations entre les procaryotes du rumen et leur activité et l'efficacité alimentaire

Feed efficiency in Romane lambs cannot be explained by sequencing rumen prokaryotes nor by their fermentation products.

Florian Touitou¹, Annabelle Meynadier^{1,†}, Yves Farizon¹, Didier Marcon², Flavie Tortereau^{1,†}

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²INRAE, Experimental Unit P3R, F-18390 Osmoy, France;

[†]These authors have contributed equally and share senior authorship.

*Correspondence: Florian Touitou, florian.touitou@envt.fr

Keywords: Bacteria, archaea, feed efficiency, volatile fatty acids

Abstract: Feed efficiency has been studied for some decades now but is still not fully understood. Multiple phenomena such as digestive efficiency and metabolic use of the nutrients are likely involved but the mechanisms underlying differences between efficient and inefficient animals are still to be unfolded. The objective of this study was to use microbiota data in association with host phenotypes and ruminal volatile fatty acid (VFA) profiles to try to explain variations in feed efficiency in Romane lambs divergently selected on feed efficiency (lines rfi+ and rfi- for inefficient and efficient animals, respectively). Ruminal fluid was sampled twice per lamb, at least 3 months apart, under two different diets. The first diet consisted of a typical fiber-enriched 100% concentrate diet (CONC) and the second one consisted in a 1:2 concentrate to forage diet (MIX). The experiment was conducted over 3 successive years between 2018 and 2020. Under the CONC diet two genera were differentially abundant between genetic lines: *Coprococcus 1* and [*Ruminococcus*] *gouvreauii* group while under the MIX diet no genus was differentially abundant between lines nor between phenotypes when all years were analyzed together. Some year-specific genera discriminating efficient and inefficient animals were found. No difference in terms of VFA profile was highlighted neither during CONC phase nor during MIX phase suggesting that the potential effect of microbial differences on digestive efficiency does not rely on differences in VFA synthesis and/or absorption.

1. Introduction

Feed efficiency stems from multiple phenomena including animal's metabolism and digestive efficiency. In ruminants, digestive efficiency is closely dependent on the interaction between ruminal microbes and the feed. Indeed, microorganisms such as bacteria allow digestion of cell wall carbohydrates which are the predominant source of energy in forages that serve as the basis of ruminant nutrition. Digestion of carbohydrates in the rumen essentially results in the production of Volatile Fatty Acids (VFA) that account for around 70% of the daily energy requirements in ruminants (Bergman, 1990). Ruminal microorganisms are also responsible for the synthesis of 50 to 70% of the proteins digested in the small intestine depending on the diet (Jarrige, 1978; Storm et al., 1983) with a microbial amino acid profile that varies with the composition of the rumen microbial community (Sok et al., 2017).

Feed efficiency is mainly studied by comparing animals' feed intake and their production, either using Feed Conversion Ratio (FCR) or Residual Feed Intake (RFI) defined as the difference between an animal's actual feed intake and its estimated feed requirements for maintenance and growth (Archer et al., 1999; Koch et al., 1963). RFI presents the advantages of being independent of the animal's weight and Average Daily Gain (ADG) by construction and has been found to be moderately heritable in cattle (Arthur et al., 2001) and sheep (Mucha et al., 2022). Previous studies estimated that digestion contributed significantly to the variation in RFI in beef cattle (Herd et al., 2004). Some studies have tried to link ruminal digestion and feed efficiency either comparing abundances of specific microorganisms (Guan et al., 2008; Liang et al., 2017), or bacterial and archaeal compositions of the rumen microbiota (Li et al., 2019; Xie et al., 2022) but resulting identified taxa are inconsistent throughout the literature. Another way to enhance digestive efficiency is to mitigate carbon losses by methane and carbon dioxide production during fermentation and eructation (Hegarty et al., 2007; Nkrumah et al., 2006). Methane eructation has been found to be responsible for a reduced-carbon loss resulting in an energy loss in beef cattle ranging from 2-3% of the energy intake in concentrate-based diets to nearly 12% of energy intake in forage-based diets (Johnson & Johnson, 1995; McDonnell et al., 2016). Similar losses have been found in sheep, with a higher methane eructation under a fiber-rich diet than under a concentrate-rich diet (Yurtseven et al., 2009). Methane production highly depends on the orientation of ruminal digestion toward acetate production or toward propionate production which have been inconsistently reported as differentially abundant in efficient and inefficient animals, mostly with an increase in propionate proportion in efficient animals (Herd et al., 2019; Shabat et al., 2016). VFA can also be associated with feed efficiency due to metabolic effects influencing growth and tissue deposition (Abdul-Razzaq & Bickerstaffe, 1989; Bergman, 1990). Since microorganisms are responsible for the production of VFA in the rumen they have often been analyzed jointly. Conflicting relationships between RFI and microbiota composition or molar proportions of VFA can be found in the literature (Johnson et al., 2019; Lawrence et al.,

2011; Li & Guan, 2017; Shabat et al., 2016). Anyway, in most of the experiments studying rumen microbiota across diets, the diet is always the most important factor involved (Carberry et al., 2012; McGovern et al., 2020). Since most of the rumen bacteria thrive on specific substrates, it seems unlikely that an efficient microbiota under a concentrate-rich diet would be the same as with a forage-rich diet (Castillo-González et al., 2014; Moraïs & Mizrahi, 2019).

The main purpose of our study is to investigate differences in rumen microbial communities and activities in animals genetically selected for their feed efficiency (line rfi-) or inefficiency (line rfi+) and phenotyped under a 100% concentrate diet, and to assess whether these differences still exist under a mixed diet.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Since 2015, a divergent genetic selection on RFI has been led at the INRAE experimental unit P3R in Bourges (<https://doi.org/10.15454/1.5483259352597417E12>). The divergent selection has been described elsewhere (Tortereau et al., 2020) but, in short, every year, 3-month old male lambs were phenotyped during a 6-week feeding intake trial during which their feed intake of a 100% concentrate diet was automatically registered at each visit to the feeder and averaged on a daily basis to calculate their RFI. Breeding values for RFI were estimated as described in (Tortereau et al., 2020) and both the most the least efficient rams were kept as sires to produce the next generation of the efficient and inefficient divergent lines (rfi- line and rfi+ line respectively). Each year, about 14 males were used as sires (7 per RFI line).

A total of 277 lambs belonging to the 2nd (n=103) and 3rd (n=174) generations of divergent selection were bred in respectively 6, 5 and 4 pens in 2018 (the 103 lambs of the 2nd generation), 2019 (101 of the 3rd generation) and 2020 (73 lambs of the 3rd generation) based on their body weight at the beginning of the 2-week period of adaptation to the diet. Animals were 121±12 days old at the start of the 6-week phenotyping period. Under a 100% concentrate diet (CONC phase), the measured phenotypes were End-Phase Metabolic Body Weight (E-MW_c), and body composition parameters (Back Fat Thickness (BFT_c) and longissimus dorsi Muscle Depth (MD_c)) measured by ultrasound at the end of the trial. The calculated traits were Average Daily Gain (ADG_c) and RFI_c.

In 2018, 2019 and 2020, after the CONC phase phenotyping, part of the lambs (~60% of the animals having the most extreme breeding values) were also phenotyped under a mixed diet (containing two thirds of orchard hay and one third of concentrate). In 2018, this ration was distributed as a TMR through two automatic forage feeders, while in 2019 and 2020 forage and concentrate were distributed separately which allowed for a better estimation of each constituent's consumption. Due to the availability of forage

feeders, this second phase (MIX phase) was carried out in two separate periods: in the summer, animals (29 in 2018, 36 in 2019) were 204 ± 7 days old and in the fall, animals (29 in 2018, 35 in 2019, 38 in 2020) were 263 ± 18 days old. During the MIX phase, animals were housed in two pens per period with a density of fifteen animals per pen in 2018 and twenty in 2019 and 2020. Animals were housed on litter chips to avoid straw consumption that would falsify the measured feed intake. Animals were phenotyped at the end of the MIX phase similarly to the CONC phase. The measured phenotypes were $E-MW_M$, BFT_M and MD_M , and the calculated traits were ADG_M and RFI_M .

2.2 Diet

During CONC phase, animals had *ad libitum* access to a 100% concentrate diet. The commercial concentrate contained beet pulp, wheat bran, barley grain, corn, rapeseed meal, sunflower meal and pelleted lucerne and was fed through automatic feeders. During the MIX phase, the diet consisted in a mixed ration with approximately two thirds of orchard hay and one third of a commercial concentrate made up of wheat, barley, wheat bran and rapeseed meal. Chemical composition of feed was determined according to the Association of Official Analytical Chemists (Association of Official Analytical Chemists, 1998) procedures (Association of Official Analytical Chemists, 1998); Neutral Detergent Fibre was determined according to the procedure of Van Soest et al. (1991) (Van Soest et al., 1991). The resulting analyses are presented in Table S1. The MIX diet was calculated to enable a growth of 125g/day according to INRA standards (INRA, 2018) and in 2019 and 2020 the concentrate consumption was limited to 700g/day to match animals' requirements and the animals' consumption observed in 2018.

2.3 RFI calculation and group attribution

Two RFI traits were calculated: one per diet. C and M subscripts will be used throughout this study to describe phenotypes and features associated with the CONC and the MIX phases, respectively. For each lamb (i), $RFI_{C,i}$ was calculated using a multiple linear regression of Average Daily Feed Intake ($ADFI_C$) on $E-MW_C$, ADG_C , BFT_C and MD_C (1). To compensate for the difference in growth status and climate between the summer and the fall periods of the MIX phase, a period effect was added to the RFI_M calculation model during this phase (2).

$$(1) ADFI_{C,i} = \mu + \beta_1(E-MW_{C,i})^{0.75} + \beta_2ADG_{C,i} + \beta_3MD_{C,i} + \beta_4BFT_{C,i} + RFI_{C,i}$$

$$(2) ADFI_{M,i} = \mu + \beta_1(E-MW_{M,i})^{0.75} + \beta_2ADG_{M,i} + \beta_3MD_{M,i} + \beta_4BFT_{M,i} + \text{Period}_M + RFI_{M,i}$$

Phenotypic RFI (pRFI) groups were constituted within each phase (CONC and MIX): $pRFI_{+C}$ (or $pRFI_{+M}$) and $pRFI_{-C}$ (or $pRFI_{-M}$) groups gathered animals having a RFI_C (or RFI_M) higher than 0.5 standard deviation (SD) or lower than -0.5 SD respectively.

Another classification was obtained by jointly considering $pRFI_C$ and $pRFI_M$ for the 167 animals that have been kept from phase CONC to phase MIX. In order not to discard too many animals, all lambs with $pRFI_C$ and $pRFI_M$ higher than 0.25 SD or lower than 0.25 SD were kept.

2.4 Sampling

277 and 167 animals were sampled during the CONC phase and the MIX phase, respectively. Feeders were stopped the night prior to the sampling resulting in at least ten to eleven hours of fasting and the drinking devices were stopped two hours before the sampling started to avoid an excessive dilution of ruminal content. However, during the CONC phase of 2019 and the fall period of the MIX phase of 2018, the automatic feeders were not successfully stopped and animals had access to the feed until the beginning of the sampling.

Rumen fluid was sampled using a medical gastric probe and a vacuum pump. For microbiota analyses, rumen fluid was transferred into 2mL microtubes and immediately frozen into liquid nitrogen before being relocated into a -80°C freezer for conservation. For VFA analyses it was transferred to 5 mL propylene tubes containing 0.2mL of 25% v/v sulfuric acid before being stored to a -20°C freezer. One microbiota sample from the 2018 MIX phase broke during the freezing process.

2.5 Microbiota analyses

2.5.1 Extraction

DNA extraction was performed using ZR-96 Soil Microbe Quick-DNA Kit (Zymo Research, Irvine, United States of America) that showed high performances in extracting DNA from livestock digestive content (Wegl et al., 2021). Samples from 2018 and 2019 were extracted and put into plates at the same time while samples from 2020 were extracted later on. Four different plates were used for the samples from 2018 and 2019 and 2 more for samples from 2020. DNA was extracted from all the 277 samples from the CONC phase but only for 163 samples from the MIX phase. Indeed, in 3 samples from the 2018 MIX phase, no sequences were obtained.

2.5.2 Probes and polymerization

Amplicon library preparation was performed by PCR amplification of the 16S rRNA gene of ruminal archaea and bacteria. The 16S rRNA V4-V5 regions of the extracted DNA were amplified using the following primers: 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA) and 928R (5'-CCCGYCAATTCMTTRAGT) (Fadeev et al., 2021; Parada et al., 2016; Smith et al., 2020). The first amplification consisted of 30 cycles.

2.5.3 Sequencing

Barcoding was carried out with a 6-bp identifier added to the primer 928R during a second amplification (12 cycles). After this amplification samples were pooled for multiplex sequencing on an Illumina MiSeq cartridge (Illumina, San Diego, California, USA) at the Genomic and Transcriptomic platform (INRAE, Toulouse, France, doi: 10.15454/1.5572370921303193E12). Two pools of samples were analyzed, the first one containing samples from 2018 and 2019 and the second one containing samples from 2020 (Figure II.2.1).

2.5.4 Bioinformatic processing

Since Illumina MiSeq technology (Illumina, San Diego, California, USA) allows for 250bp reads, forward and reverse primer reads could be stitched together to generate full-length reads of the V4-V5 region for 16S rRNA. Amplicons that did not contain both 5' and 3' primers, that were too short or too long (<380 bp or > 500 bp) or that presented ambiguous bases were discarded. Amplicons were then clustered into Operational Taxonomy Unit (OTUs) using the Swarm algorithm inside FROGS (Escudié et al., 2018) that progressively agglomerates sequences differing by a certain number of bases: we chose the parameters for a distance equal to 1 and the fastidious option as recommended in Swarm v2 (Mahé et al., 2014, 2015). Next, OTUs that appeared to be chimeras were removed and all OTU representing less than 0.005% of all sequences were removed as advised by Bokulich et al. (Bokulich et al., 2013). Finally, OTUs were affiliated using the Silva 132 16S reference database. The resulting dataset was split into two distinct datasets containing sequenced samples from phases CONC and MIX, respectively.

2.5.5. Filtering

To deal with putative contaminations or with very rare taxa that could bias discriminant analysis by an unbalanced prevalence between conditions, OTUs were filtered, using a 20% prevalence threshold within diet (Cao et al., 2021; Nearing et al., 2022). This threshold was chosen since it allowed to keep more than 95% of the sequences while reducing the percentage of zeroes to less than 50%.

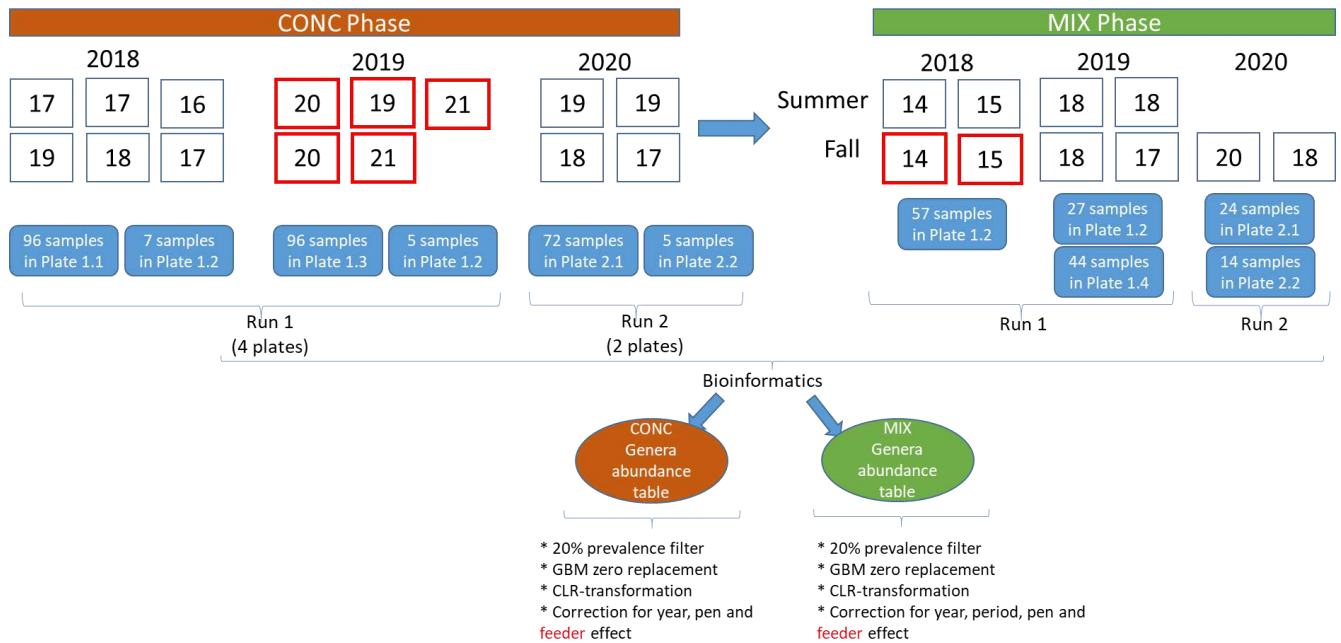


Figure II.2.1 : Sample processing from collection to creation of genus abundance tables. Samples from 2018 and 2019 were analyzed in the same sequencing run but extraction was performed in four plates and samples from 2020 were analyzed in a second run and separated in two plates. In the 2019 CONC phase and during the fall period of the 2018 MIX phase feeders were not stopped prior to sampling (indicated in red).

2.6 Short-Chain Fatty Acid Analyses

Samples were centrifuged at 2,880g for 20min to get rid of particles. Then 1mL of supernatant was transferred to a 2mL micro-tube containing 200 μ L of 25% w/v metaphosphoric acid in water. The microtubes were then centrifuged at 20,000g for 15 min at 4°C and 100 μ L of the supernatant was transferred into injection glass vials containing 75 μ L of 4-methylvaleric at 0.2% v/v used as a standard and 900 μ L of ultrapure water. Short-chain fatty acids were measured using a gas chromatographer Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa-Clara, United States of America) equipped with a flame-ionization detector. Separation was performed on a DB-FFAP column (ref. 125-3232, Agilent Technologies, Santa-Clara, United States of America). Temperature of injection was 250°C and nitrogen (N₂) was used as a carrier gas at a constant flow rate of 4mL/min. Due to potential saliva dilution and the differential in absorption linked to fasting time, individual VFA were expressed as percentages of total VFA.

2.7 Calculations

Both sequencing data and VFA data are compositional and were therefore treated as recommended by Aitchison et al (Aitchison, 2020). This approach, has already been applied to microbiota data and allows for filtering, if necessary, without changing the outcome since it relies on ratios between components (Martinez Boggio et al., 2021). It is also a good way to deal with unequal sequencing depth or saliva dilution of the VFA samples since we are more interested in the relations between parts than in the total.

Microbiota are high-dimensional, undetermined and often contain a lot of zeroes which requires a first step of zeroes imputation. Null abundances of OTUs were imputed using the Geometric Bayesian Multiplicative (GBM) procedure based in the assumption that zeroes present in the dataset were rounded zeroes (Daunis-i-Estadella & Martín-Fernandez, 2008) and then a Centered Log Ratio (CLR) transformation was applied : $CLR(x_i) = \ln\left(\frac{x_i}{g(x)}\right)$ with x_i being the abundance of the i-th part and $g(x) = \left(\prod_{i=1}^p x_i\right)^{1/p}$ being the geometric mean of the p parts of the p-composition. For VFA compositions, no zero replacement was necessary and compositions were CLR-transformed before subsequent analyses.

2.8 Statistical analyses

2.8.1 Multivariate analyses

2.8.1.1 Separate analysis of the two phases

At first Principal Component Analyses (PCA) were performed to identify if experimental factors such as year, pen or other factors presented on Figure II.2.S1 could be responsible for a large part of the variance in either the CONC or the MIX microbiota datasets.

During phase CONC the factor responsible for the largest part of the explained variance in PCA was the Year of sampling. During phase MIX, both Year and Period were responsible for the largest part of the variation (Figure II.2.S1). Thus, prior to subsequent analyses, microbiota datasets were corrected for these effects as well as an additional effect which accounted for the times feeders did not stop before sampling (feeder_effect) and a pen effect (pen%in%year or pen%in%period, for CONC and MIX phases, respectively) was also added to the correction model from which residuals were extracted, resulting in the two following models:

CONC phase: $CLR(\text{Genus}_i) \sim \mu + \text{year} + \text{pen\%in\%year} + \text{feeder_effect} + \text{resid}(CLR(\text{Genus}_i))$

MIX phase: $CLR(\text{Genus}_i) \sim \mu + \text{year} + \text{pen\%in\%period} + \text{feeder_effect} + \text{period\%in\%year} + \text{resid}(CLR(\text{Genus}_i))$

Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) from the mixOmics packages in R (Rohart et al., 2017) was used as a supervised multivariate analysis to maximize between-class variance, either considering genetic lines or other groupings prior and after selection of variables using the Selbal package from R (Rivera-Pinto et al., 2018). Area Under the Receiver Operating Characteristics (AUROC) was used to select the number of components to take into account in the PLS-DA and a subsequent permutation significance test based on cross-validation using RVAideMemoire package in R was performed to assess the quality of the discrimination (Westerhuis et al., 2008).

VFA were analyzed after correction with the same models as for microbiota genera. PLS-DA was performed without prior selection of variables since the VFA datasets had only 6 variables and there was no risk of overfitting.

Partial Least Squares (PLS) regressions were applied between microbial compositions, VFA datasets and phenotypes within diets to explore relationships between microbial genera and fermentation products as well as potential links between microbial genera or VFA and phenotypes.

2.8.1.2 Combined analyses

To investigate the potential link between a change in the ruminal genera composition and a change in RFI when animals are fed with different diets, we used two different strategies.

First we applied a multilevel PLS-DA to all samples coming from animals from which microbiota was sequenced both in phase CONC and in phase MIX to discriminate the 4 groups presented in 3.1 with the phase as the multilevel parameter (Liquet et al., 2012).

The other strategy was to compute Aitchison distances between samples from the CONC phase and from the MIX phase and to compare one animal versus itself or versus other animals to determine if some animals kept a more constant microbiota and if these animals belonged to one specific group. To do so we computed the ratio of the distance between each CONC sample and its associate MIX sample over the average distance of the CONC sample and every MIX sample. A ratio lower than one would testify to a higher similarity between samples from the same animal.

2.8.2 Univariate analyses

Analysis of variance (ANOVA) was applied to each CLR-transformed VFA in all samples from CONC and MIX phases jointly to assess the effects of the diet, the year, the period and the pen on ruminal fermentation. This kind of analysis was not performed on microbiota data. CONC and MIX microbial compositions were found

highly different using PCA and determining differences in individual microbial genera between diets is beyond our scope.

Within each phase, ANOVA taking into account the efficiency groups (either the genetic lines or the pRFI groups) and the main fixed effects identified by PCA was used to detect differentially expressed features (either genera or VFA) diets and Benjamini-Hochberg correction of the p-values for multiple testing was applied to prevent false discoveries (Benjamini & Hochberg, 1995).

Models used were the following:

(CONC): $\text{CLR}(\text{VOI}) \sim \mu + \text{year} + \text{pen}\% \text{in}\% \text{year} + \text{feeder_effet} + \text{GOI} + \varepsilon_i$

(MIX): $\text{CLR}(\text{VOI}) \sim \mu + \text{year} + \text{pen}\% \text{in}\% \text{period} + \text{feeder_effet} + \text{GOI} + \text{period}\% \text{in}\% \text{year} + \varepsilon_i$

Variables of interest (VOI) were CLR-transformed genera and VFA and groups of interest (GOI) were either genetic lines or phenotypic groups.

Pearson correlations were calculated between microbial genera and VFA or phenotypes and between these latter two datasets. Correlations were considered significant if their p-value was less than 0.05 after multiple testing correction using Benjamini-Hochberg approach.

3. Results

3.1 Zootechnical parameters

A total of 277 animals (135 from line rfi- and 142 from line rfi+) were phenotyped for 6 weeks, first under a 100% concentrate diet (CONC phase). Then, 167 animals with extreme breeding values were kept and phenotyped under a mixed diet (MIX phase). Their phenotypes have been described in details in Touitou et al. (Touitou et al., 2022). In short, animals from different divergent lines differed in ADFI_c and RFI_c but did not differ in weight, growth or body composition except for a slight increase in *longissimus dorsi* MD in rfi+ animals. During phase MIX animals from different divergent lines did not differ in any phenotype except for a small increase in BFT_M in rfi- animals (Touitou et al., 2022).

A total of 180 extreme animals out of the 277 for the CONC phase and 107 extreme animals out of the 167 in the MIX phase belonged to extreme phenotypic groups. In phase CONC, most of the phenotypically efficient animals were from line rfi- and most of the phenotypically inefficient animals were from line rfi+ (Figure II.2.2) while in phase MIX the same proportion of animals from both lines belonged to each phenotypic group.

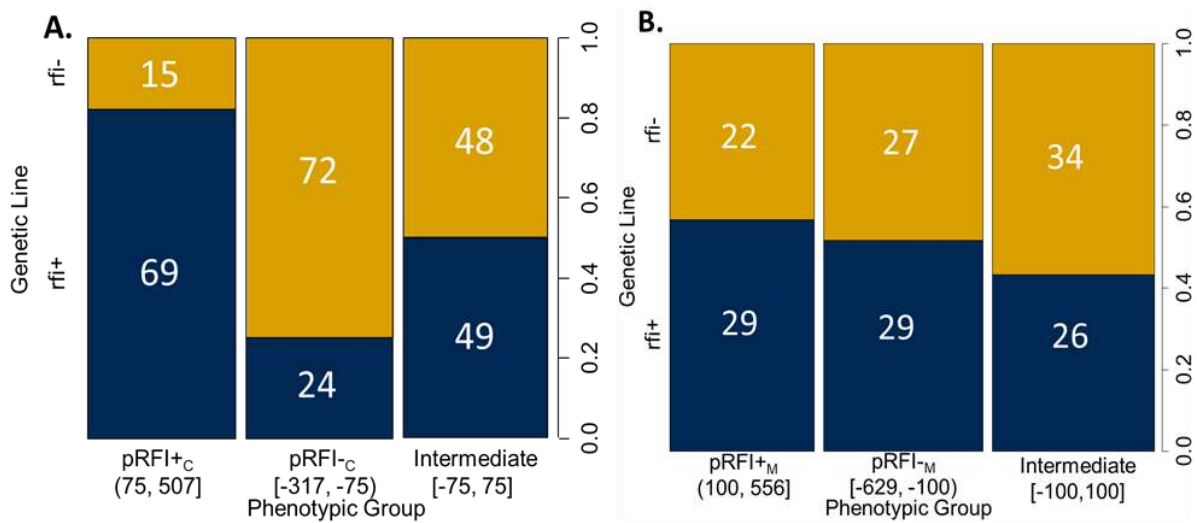


Figure II.2.2: Percentages and numbers of animals from each line (*rfi*- and *rfi*+ in gold and blue respectively) belonging to each phenotypic group *pRFI*⁺ and *pRFI*⁻ or to the intermediate group in each of the phases: A. CONC phase, B. MIX phase.

When groups were made by considering both *RFI_C* and *RFI_M* with 0.25 SD it resulted in keeping 119 animals out of the 167 total: 34 Inefficient/Inefficient (Group A), 32 Inefficient/Efficient (Group B), 27 Efficient/Efficient (Group C) and 26 Efficient/Inefficient (Group D) (Figure II.2.3).

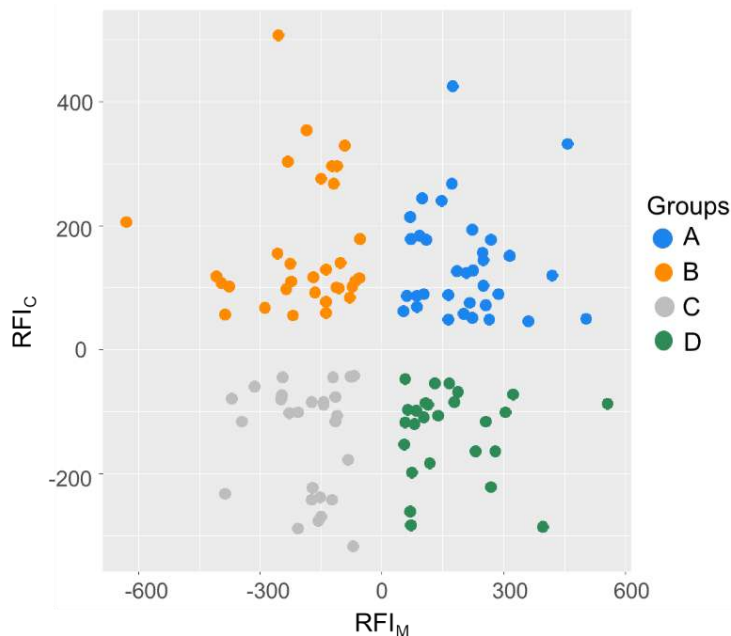


Figure II.2.3: Phenotypic RFI in phases CONC/MIX of animals belonging to each of the four efficiency groups. Group A= Inefficient/Inefficient, Group B= Inefficient/Efficient, Group C= Efficient/Efficient and Group D=Efficient/Inefficient.

3.2 Microbiota

3.2.1 Microbiota compositions

The sequencing of microbiota 16S rDNA amplicons from ruminal samples yielded 4,564,555 and 2,239,165 sequences after data cleaning in the 277 samples from the CONC phase and the 163 samples from the MIX phase respectively. These sequences were affiliated to 1403 OTUs. Subsequent filtering on prevalence resulted in keeping 535 OTUs (38.1%) in phase CONC and 1039 OTUs (74.1%) in phase MIX while keeping respectively 97.6% and 98.8% of the sequences and reducing the proportions of zeroes from 74% to 48.4% and from 50.6% to 35.3% in phase CONC and phase MIX respectively.

The 535 OTUs from the CONC phase samples belonged to 121 genera from 11 bacterial phyla and 1 archeal phylum, with Bacteroidetes and Firmicutes representing 50% and 44% of the total sequences respectively and Euryarchaeota being the third most abundant phylum (Figure II.2.4A). Nearly all of the OTUs belonging to the Bacteroidetes phylum were classified in the two genera *Prevotella_1* and *Prevotella_7* (46.6% and 43.6% respectively). The main genus in the Firmicutes was *Lachnospiraceae_NK3A20_group* (27.6%). Euryarchaeota OTUs belonged to two genera: *Methanobrevibacter* (70.9%) and *Methanosphaera* (29.1%).

The 1039 OTUs from the MIX phase samples kept after filtering belonged to 249 genera from 13 bacterial phyla and 1 archeal phylum, with Bacteroidetes and Firmicutes representing 42.3% and 48.6% of the sequences respectively, Euryarchaeota being, again, the third most abundant phylum (Figure II.2.4B). *Prevotella_1* and *Rikenellaceae_RC9_gut_group* were the two most represented genera of the Bacteroidetes phylum (47.1% and 19.0% of the sequences in the phylum respectively), *Christensenellaceae R 7 group* was the most abundant genus in the Firmicutes phylum (35.4% of the sequences in the phylum) followed by *Ruminococcaceae_NK4A214_group* (10.9%) and *Methanobrevibacter* was by far the most abundant genus in the archaeal phylum Euryarchaeota, representing 96.0% of the sequences in this phylum.

A hundred genera were kept in both CONC and MIX microbiota datasets.

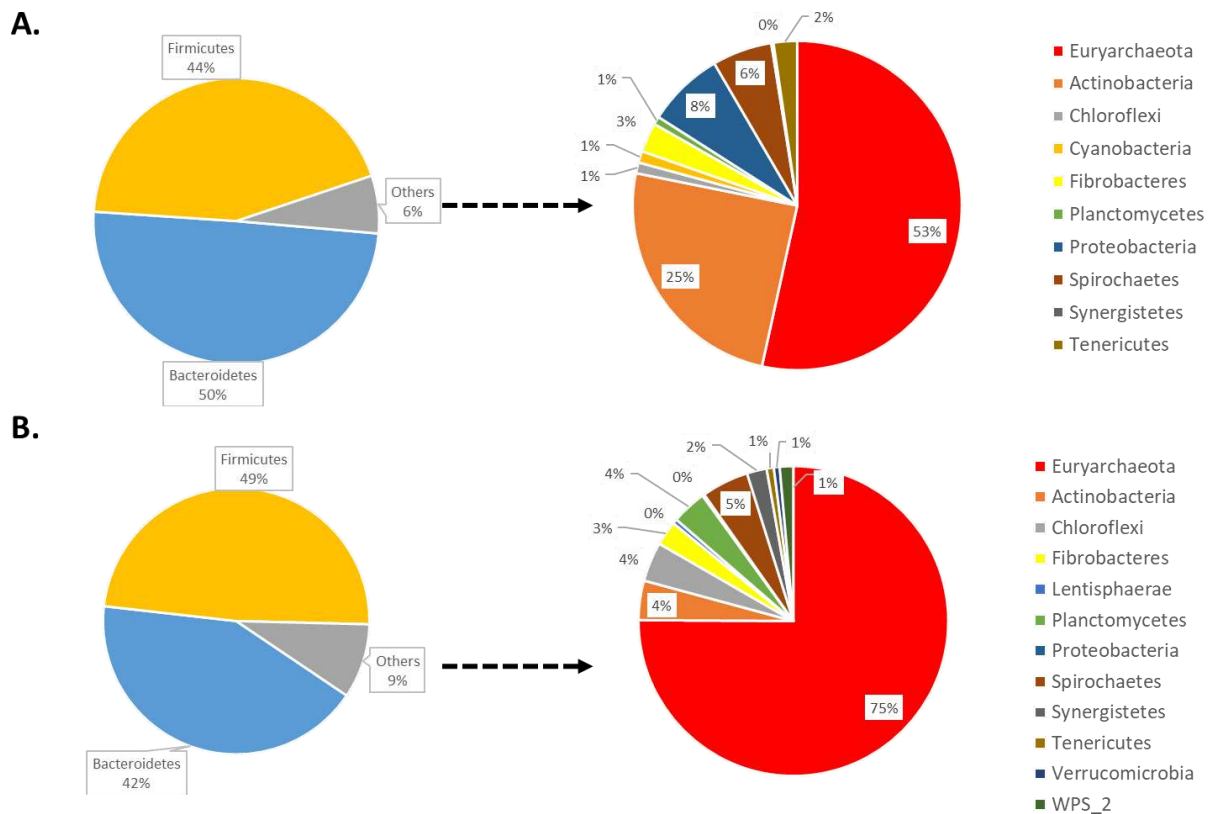


Figure II.2.4 : Main phyla identified in CONC samples (A) and MIX samples (B) after filtering. On the left, the two main phyla Bacteroidetes and Firmicutes and, on the right, the proportions of the other phyla.

3.2.2 Associations between microbial genera and Feed Efficiency groups

3.2.2.1 CONC phase

Two different PLS-DA were applied to investigate the influence of the rfi genetic line and of phenotypic RFI extreme groups in the microbiota genera composition. AUROC reached its maximum at 0.90 and 0.99 when eight components were kept respectively for the PLS-DA on lines or on phenotypic groups. Without selecting variables with selbal, no discrimination was found between the two lines according to the permutation test ($p > 0.1$) while a tendency was found between the two phenotypic groups ($p = 0.07$).

When selection of the variables on balances was applied, 20 genera out of the 121 were kept to discriminate lines and 30 genera were kept to discriminate phenotypic groups (Figure II.2.5) resulting in a significant discrimination ($p < 0.001$) in both cases as assessed by permutation test. Amongst the genera that were selected in one of the two discriminant analyses, 9 of them were common to both discriminations.

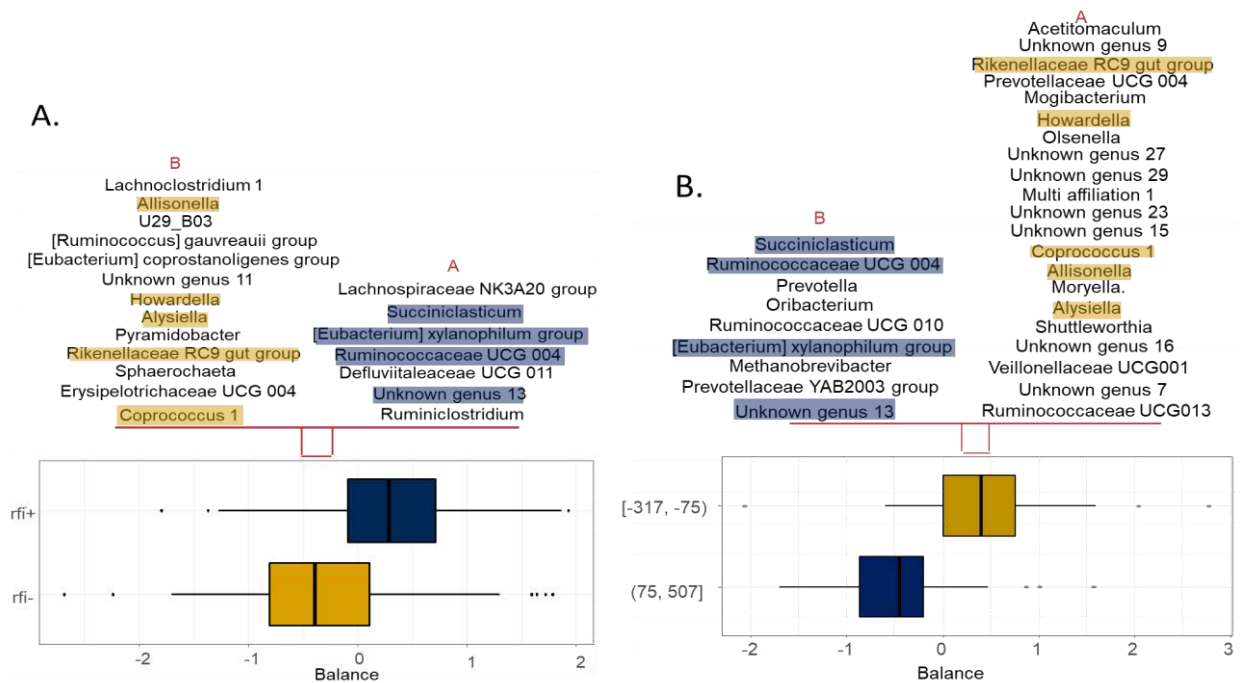


Figure II.2.5 : Description of the global balances of rumen microbial genera for genetic lines (A) and phenotypic groups of efficiency (B). Efficient animals (line rfi- and pRFI-c group) and inefficient animals (rfi+ and pRFI+c) are represented in gold and blue respectively. Genera that are common to both discrimination of efficiency lines and phenotypic groups are highlighted in gold and blue for efficient and inefficient groups respectively.

Only two genera tended to be differentially abundant between lines when ANOVA was applied on genera after multiple testing correction was carried on: *Coprococcus_1* ($p=0.08$) and *Ruminococcus_gauvrei_group* ($p=0.08$). No genus was differentially abundant between phenotypic groups.

When discriminant analyses were performed within years, PLS-DA discriminating the genetic lines or phenotypic groups were not significant in 2018 and 2019 but discriminated lines in 2020 ($p=0.03$) and tended to discriminate phenotypic groups the same year ($p=0.1$). In the global balances discriminating phenotypic groups from 2020 samples, 2 archaeal genera, *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera*, were associated with pRFI+c and pRFI-c groups respectively.

Selbal consistently revealed 1 genus, 3 genera and 1 genus in common between genetic lines and efficiency groups in 2018, 2019 and 2020, respectively. All these genera were associated with efficient animals (belonging to rfi- line and pRFI- group) (Tableau II.2.1).

Tableau II.2.1 : Number of genera that were kept in the groups of taxa that formed the global balances between lines (rfi- and rfi+) or phenotypic groups (pRFI-c and pRFI+c) within each year and common genera for efficient (-) and inefficient (+) lambs.

	rfi+	rfi-	pRFI+c	pRFI-c	Genera commonly kept between lines and phenotypic groups
2018	2	11	9	3	1(-) <i>p1088a5 gut group</i>
2019	1	10	6	14	3 (-) <i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i> <i>Rikenellaceae RC9 gut group</i> <i>Bacteroidales / UG 8</i>
2020	6	6	1	5	1(-) <i>Ruminococcaceae UCG 013</i>

Some genera belonged to the same group (either genetic or phenotypic) in several years such as *[Ruminococcus] gauvreauii group* which was associated with line rfi- in both 2018 and 2019 and to pRFI- group in both 2019 and 2020, or *Methanobrevibacter* associated with pRFI+ group in both 2019 and 2020 and *Lachnospiraceae NKA320* associated with the same group in 2018 and 2019 (Figure II.2.6).

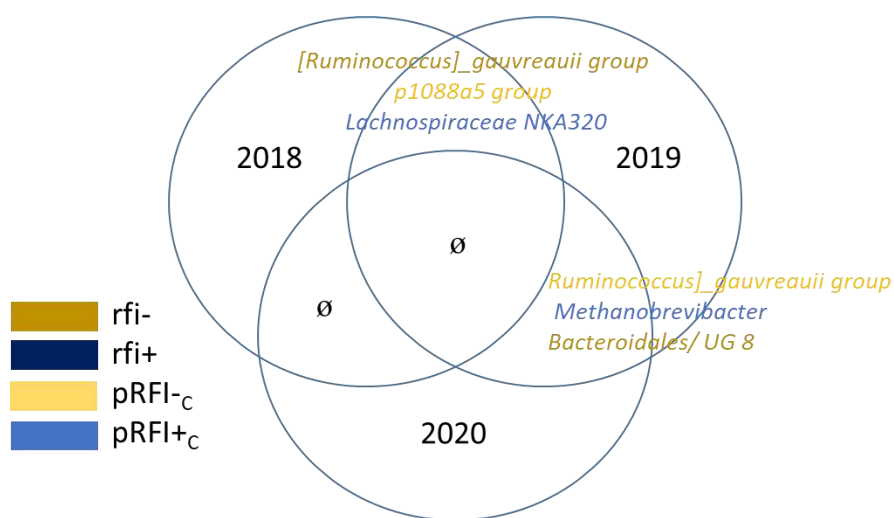


Figure II.2.6 : Rumen microbial genera associated with the same group either genetic or phenotypic in several years according to selbal analyses within years.

ANOVA identified one genus that tended to be differentially expressed between the lines in 2018: *[Ruminococcus] gauvreauii group* ($p=0.09$). No genus even tended to be differentially expressed in 2019. In 2020, 19 genera were differentially expressed between lines and 3 of them were also differentially expressed between phenotypic groups: *Dialister* ($p_{\text{line}}=0.009$, $p_{\text{phen}}=0.031$), *Ruminococcaceae UCG-013* ($p_{\text{line}}=0.009$, $p_{\text{phen}}=0.029$) and *Coprococcus 1* ($p_{\text{line}}=0.030$, $p_{\text{phen}}=0.031$) while 15 genera tended to be differentially expressed between lines and/or phenotypic groups.

Differentially abundant genera that had a high prevalence (>70%) are shown in Tableau II.2.2. All genera that were differentially abundant or tended to be differentially abundant are shown in Tableau II.2.S2

Tableau II.2.2 : Relative abundances of rumen microbial genera (with prevalence >70%) differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in phase CONC. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the results of ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR. Mean relative abundances (SD) are indicated instead of CLR-transformed abundances for a matter of clarity.

CONC phase	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative	abundance	p_{line}	%*	Relative	abundance	p_{phen}	% *
	rfi+	rfi-			pRFI+c	pRFI-c		
All samples	N=277				N=180			
Coprococcus_1	0.15 (0.16)	0.21 (0.17)	0.08	98	0.15 (0.13)	0.19 (0.15)	0.92	98
Ruminococcus gauvreauii group	1.62 (1.22)	2.18 (1.75)	0.08	100	1.63 (1.10)	2.08 (1.85)	0.95	100
2018	N=102				N=63			
Ruminococcus gauvreauii group	1.26 (0.92)	2.04 (1.70)	0.09	100	1.25 (1.07)	1.84 (1.67)	0.29	100
2019	N=101				N=67			
2020	N=73				N=50			
Dialister	0.58 (0.38)	0.28 (0.32)	0.009	92	0.52 (0.44)	0.30 (0.31)	0.031	92
Lachnospira	0.16 (0.12)	0.08 (0.11)	0.009	85	0.14 (0.13)	0.098 (0.13)	0.075	90
Ruminococcaceae UCG 013	0.25 (0.31)	0.55 (0.67)	0.009	100	0.27 (0.45)	0.41 (0.34)	0.029	100
Succinivibrionaceae UCG 001	0.84 (1.02)	0.33 (0.75)	0.015	96	0.76 (1.07)	0.25 (0.37)	0.075	96
Agathobacter	0.55 (0.43)	0.32 (0.36)	0.016	93	0.56 (0.49)	0.24 (0.30)	0.075	92
Erysipelotrichaceae UCG 002	3.25 (4.70)	1.61 (3.22)	0.016	97	4.47 (5.68)	0.81 (1.18)	0.075	98
Prevotella 9	1.47 (2.35)	0.66 (0.86)	0.016	95	1.52 (2.70)	0.52 (0.70)	0.075	96
Erysipelotrichaceae UCG 004	0.13 (0.25)	0.48 (0.80)	0.021	90	0.12 (0.22)	0.51 (0.88)	0.19	90
Moryella	0.059 (0.047)	0.13 (0.13)	0.025	97	0.068 (0.089)	0.12 (0.11)	0.072	96
Prevotellaceae UCG_003	0.5 (1.01)	1.53 (2.22)	0.025	95	0.73 (1.63)	1.63 (2.33)	0.17	94
Coprococcus 1	0.16 (0.12)	0.23 (0.14)	0.030	100	0.15 (0.11)	0.24 (0.16)	0.031	100
Lachnoclostridium 1	0.09 (0.06)	0.18 (0.13)	0.032	100	0.12 (0.12)	0.16 (0.12)	0.17	100
Prevotella 1	26.5 (19.8)	34.2 (13.4)	0.040	100	23.4 (17.7)	37.2 (15.5)	0.11	100
Howardella	0.044 (0.025)	0.060 (0.031)	0.042	100	0.045 (0.028)	0.053 (0.026)	0.096	100
Blautia	0.079 (0.062)	0.042 (0.042)	0.047	81	0.074 (0.067)	0.040 (0.043)	0.24	78

‡ When a difference occurs ($p < 0.1$), the group in which the relative abundance of a genus is higher is in bold ; * Prevalence ; † UG=Unknown genus.

3.2.2.2 MIX phase

As for CONC phase, two PLS-DA were used to discriminate lines and phenotypic groups by microbiota genera composition. AUROC reached 1 when four components were kept in both PLS-DA. However, the permutation tests led to the conclusion that groups (lines or phenotypic groups) did not differ in their microbial composition. Selecting variables using balances resulted in keeping 41 genera to significantly discriminate lines and only 6 genera to significantly discriminate phenotypic groups (p -value <0.001) (Figure II.2.7). When univariate analyses were conducted on genera with ANOVA, no genus was found differentially abundant after multiple testing correction.

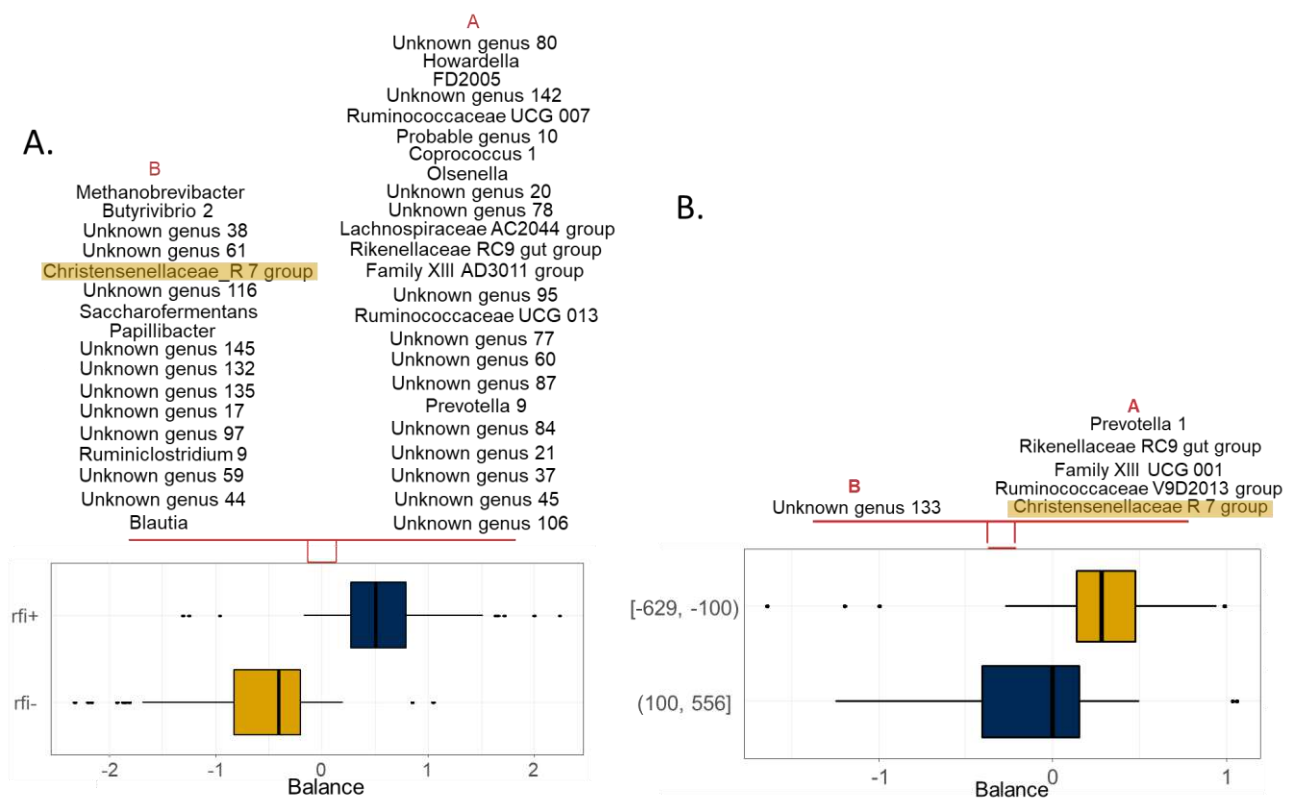


Figure II.2.7 : Description of the global balances of rumen microbial genera for genetic lines (A) and phenotypic groups of efficiency (B). Line $r_{fi}+$ and $pRFI_{+M}$ group are represented in blue while line $r_{fi}-$ and $pRFI_{-M}$ group are represented in gold. Genera that are common to both discrimination of efficiency lines and phenotypic groups are highlighted in gold and blue for efficient and inefficient groups respectively.

When PLS-DA analyses were performed within years, the best overall discrimination was obtained between lines in 2019 ($p=0.09$). Global balance between genetic lines resulted in 1, 4 and 4 genera being associated with line rfi- in 2018, 2019 and 2020 respectively and 3, 8 and 6 genera being associated with line rfi+, respectively. Among these genera, only one: *probable genus 10*, belonging to the *Lachnospiraceae* family, was associated with line rfi+ in 2018 and 2020. Similarly, none of the 1, 6 and 1 genera that were associated with pRFI-M group or of the 2, 3 and 3 genera that were associated with pRFI+M group (for 2018, 2019 and 2020 respectively) was consistently retrieved across years. Furthermore, no genus was commonly selected in selbal discriminating lines and phenotypic groups, no matter the year.

No genus was differentially abundant neither in genetic lines nor in phenotypic groups according to ANOVA conducted on 2018 and 2020 MIX datasets. Only one genus differed between lines in 2019: *Ruminoclostridium 9* ($p_{\text{Line}}=0.029$); 50 genera were differentially expressed between phenotypic groups in 2019, one of them being *Ruminoclostridium 9* ($p_{\text{phen}}=0.022$). Many of the other 49 differentially abundant genera were unidentified genera from *family F082* or *family Bacteroidales BS11 gut group* belonging to phylum Bacteroidetes and were more abundant in inefficient animals (pRFI+M) while efficient animals had higher relative abundances of genera belonging to phylum Firmicutes such as *Butyrivibrio 2* or *Christensenellaceae R7 group*. Only genera with a prevalence higher than 70% are shown in Tableau II.2.3. All genera that were differentially abundant or tended to be differentially abundant are shown in Tableau II.2.S3.

Tableau II.2.3 : Relative abundances of rumen microbial genera (with prevalence >70%) differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in phase MIX. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR. Mean relative abundances (SD) are indicated instead of CLR-transformed abundances for a matter of clarity.

MIX PHASE	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) \downarrow		P_{line}	%*	Relative abundance (%) \downarrow		P_{phen}	%*
	rfi+	rfi-			pRFI+M	pRFI-M		
All samples	N=166				N=106			
2018	N=54				N=34			
2019	N=71				N=44			
<i>Ruminoclostridium 9</i>	0.11 (0.13)	0.43 (0.68)	0.029	97	0.10 (0.08)	0.79 (0.95)	0.022	95
<i>Anaerovibrio</i>	0.080 (0.085)	0.11 (0.14)	0.99	89	0.052 (0.070)	0.22 (0.15)	8.0×10^{-5}	91
<i>Prevotellaceae UCG 001</i>	1.48 (1.21)	1.75 (1.44)	0.72	100	2.10 (1.12)	0.64 (0.68)	9.4×10^{-5}	100
<i>Treponema 2</i>	0.60 (0.46)	0.63 (0.52)	0.99	100	0.41 (0.36)	0.74 (0.37)	4.7×10^{-4}	100
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	7.02 (2.48)	7.23 (4.68)	0.99	100	6.31 (2.01)	9.97 (7.83)	1.4×10^{-3}	100
<i>Flexilinea</i>	0.34 (0.15)	0.34 (0.20)	0.94	100	0.29 (0.15)	0.42 (0.17)	0.0017	100
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	0.073(0.085)	0.093(0.11)	0.95	87	0.12 (0.11)	0.027 (0.035)	0.0019	89
<i>F082/UG 35‡</i>	0.28(0.20)	0.31(0.23)	0.99	94	0.34 (0.20)	0.15 (0.15)	0.0019	95
<i>Acetitomaculum</i>	1.09(0.73)	1.08(0.76)	0.97	100	1.21 (0.67)	0.57 (0.50)	0.0022	100
<i>Selenomonas 1</i>	0.44(0.41)	0.58(0.68)	0.97	100	0.29 (0.25)	1.21 (0.94)	0.0022	100
<i>F082/ UG83‡</i>	0.045(0.054)	0.056(0.070)	0.99	68	0.063 (0.063)	0.012 (0.038)	0.0022	70
<i>F082/ UG 59‡</i>	0.095(0.11)	0.063(0.096)	0.71	65	0.12 (0.12)	0.034 (0.074)	0.0056	70
<i>F082/ UG63‡</i>	0.068(0.10)	(0.77(0.12)	0.97	61	0.11 (0.13)	0.026 (0.041)	0.0062	70
<i>Christensenellaceae_R_7_group</i>	16.1 (4.18)	16.8(4.43)	0.97	100	15.38 (4.18)	16.46 (4.88)	0.0073	100

MIX PHASE	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) _↓		P _{line}	%*	Relative abundance (%) _↓		P _{phen}	%*
	rfi+	rfi-			pRFI+ _M	pRFI- _M		
F082/ UG 60‡	0.045(0.053)	0.041(0.048)	0.99	75	0.056 (0.055)	0.016(0.032)	0.0079	77
Lachnospiraceae_AC2044_group	0.46 (0.28)	0.45 (0.29)	0.97	100	0.58 (0.30)	0.28 (0.22)	0.010	100
Bacteroidales_RF16_group / UG 22	0.052 (0.077)	0.090 (0.14)	0.64	69	0.086 (0.12)	0.025 (0.051)	0.013	72
Ruminiclostridium_6	0.34 (0.23)	0.38 (0.18)	0.97	100	0.34 (0.14)	0.51 (0.29)	0.017	100
Methanomethylophilaceae/UG 1	0.13 (0.11)	0.15 (0.15)	0.97	100	0.11 (0.11)	0.22 (0.14)	0.017	100
Family_XIII_AD3011_group	0.54 (0.30)	0.52 (0.25)	0.99	100	0.60 (0.28)	0.33 (0.21)	0.021	100
Lachnospiraceae_NK3A20_group	2.14(1.48)	1.96(1.06)	0.97	100	1.72 (1.32)	2.07 (0.93)	0.025	100
Oscillospira	0.042(0.063)	0.044(0.079)	0.99	77	0.023 (0.037)	0.053 (0.070)	0.026	77
Ruminococcus_1	2.09(1.07)	1.41(1.07)	0.56	100	2.70 (1.14)	1.63 (0.87)	0.031	100
F082/ UG 40	0.048(0.056)	0.095(0.20)	0.97	73	0.11 (0.20)	0.031 (0.080)	0.031	70
Butyrivibrio_2	1.43(0.49)	1.56(0.73)	0.97	100	1.45 (0.46)	1.78 (0.70)	0.033	100
Prevotellaceae_Ga6A1_group	0.080(0.11)	0.070(0.10)	0.97	90	0.045 (0.066)	0.16(0.18)	0.033	86
Bacteroidales BS11 gut group/ UG9	0.13(0.13)	0.096(0.087)	0.97	86	0.14 (0.11)	0.058(0.078)	0.033	82
Lachnospiraceae/ UG150‡	0.040(0.035)	0.046(0.035)	0.97	90	0.054 (0.038)	0.023 (0.029)	0.036	89
2020	N=38				N=26			

When a difference occurs ($p < 0.1$), the group in which the relative abundance of a genus is higher is in bold, ‡UG = unknown genus.

3.2.2.3 Associations between phenotypic groups and rumen microbiota over the two phases

The permutation test of the multilevel PLS-DA discriminating the four phenotypic groups described in 2.3 highlighted that the ruminal microbiota composition was not significantly different between the four groups ($p > 0.1$) (Figure II.2.8).

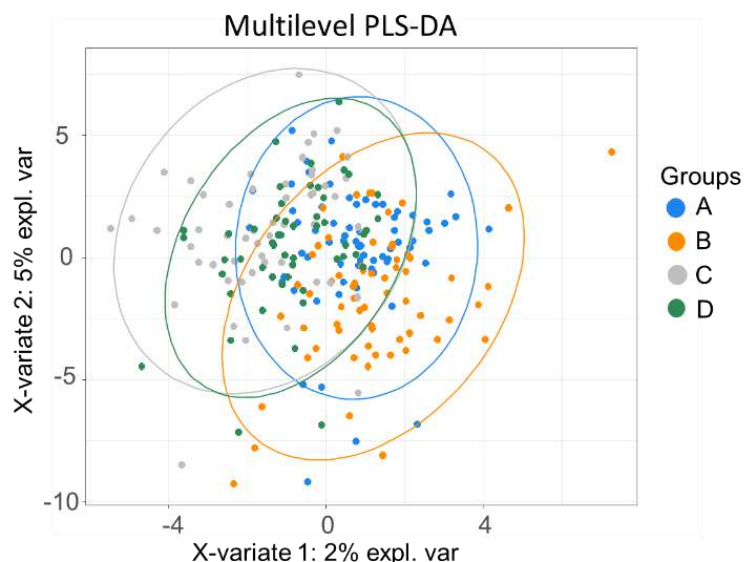


Figure II.2.8 : Graphical output of the two first components of the Multilevel PLS-DA of rumen microbial compositions discriminating the four groups of phenotypic efficiency: A=pRFI+c/pRFI+_M ; B=pRFI+c/pRFI-_M ; C=pRFI-c/pRFI-_M ; D=pRFI-c/pRFI+_M. Each of the 163 animals was sequenced twice which was considered as repeated measures in the multilevel design

The other strategy was to compute Aitchison distances between samples from the CONC phase and from the MIX phase and to compare one animal versus itself or versus other animals to determine if some animals kept a more constant microbiota and if these animals belonged to one specific group. The mean ratio in each group was not significantly lower than 1, meaning that microbiota profiles for the same animal under different diets were not closer than with other animals (Figure II.2.9). No genus differed between the four groups when univariate analyses were applied.

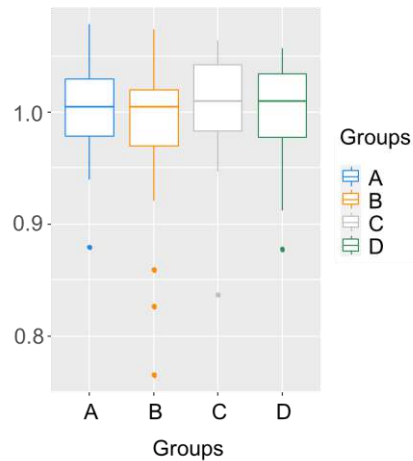


Figure II.2.9 : Average ratio of Aitchison distances between the microbial composition of a sample in phase CONC and that of the sample from the same animal in phase MIX and the average distance of the sample in phase CONC with all samples in phase MIX in the four groups of phenotypic efficiency: $A=pRFI+c/pRFI+M$; $B=pRFI+c/pRFI-M$; $C=pRFI-c/pRFI-M$; $D=pRFI-c/pRFI+M$.

3.3 Volatile Fatty Acids

3.3.1 VFA profiles

In both diets the main VFA was acetate representing 63.7% and 70.3% of total VFA in phase CONC and MIX respectively, the proportion being different between diets ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) and years ($p = 1.1 \times 10^{-10}$) (Figure II.2.10). The second most abundant VFA was propionate, which varied between diets ($p = 1.7 \times 10^{-8}$), representing 18.2% and 16.5% of total VFA in phase CONC and MIX respectively. Propionate relative abundance did not differ between years. Butyrate differed mostly between years ($p = 1.5 \times 10^{-5}$), being higher in 2019 than in the other years and slightly between diets ($p = 0.05$) being higher in phase CONC than in phase MIX. Valerate behave as propionate did, being relatively more abundant in phase CONC than in phase MIX ($p < 2.2 \times 10^{-16}$). Isobutyrate and isovalerate did not have different relative abundances between diets, neither did they between years.

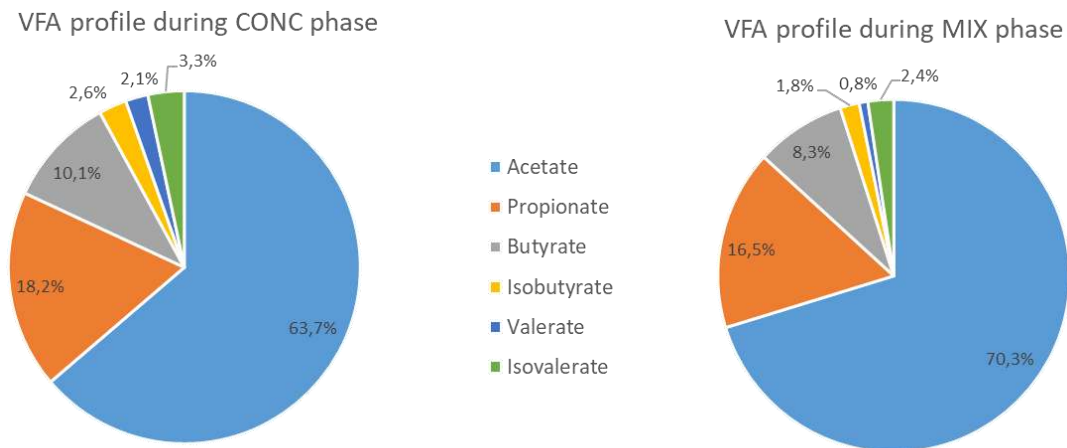


Figure II.2.10 : Volatile Fatty Acid profiles in ruminal fluid samples during phase CONC and MIX expressed as percentages of the total VFA concentration.

3.3.2 VFA discrimination of efficiency groups

No discrimination between the genetic line was found using VFA profiles either in phase CONC or in phase MIX (AUROC = 0.58 and 0.60 for the best PLS-DA model in phase CONC and phase MIX respectively), nor using ANOVA.

Similarly, no difference was observed between phenotypic RFI groups either in phase CONC or in phase MIX and ANOVA did not highlight any difference in VFA relative abundances between the phenotypic RFI groups in either of the two phases.

3.4 Correlations between datasets

3.4.1 Microbiota profiles and VFA

PLS regressions between microbiota genera profiles and VFA profiles did not highlight strong correlations between the two datasets either during phase CONC or during phase MIX. The highest correlation in phase CONC was between genus *Megasphaera* and the proportion of acetate ($r=0.32$, $p=6.6 \times 10^{-8}$) while in phase MIX the highest correlations were between the proportion of isobutyrate and both an *unknown genus* from family F082 ($r=0.33$, $p=2.5 \times 10^{-5}$) and genus *Papillibacter* ($r=0.33$, $p=1.6 \times 10^{-5}$) (Figure II.2.S2). No correlation involving either *[Ruminococcus] gauvreauii* group or *Coprococcus 1* and VFA was higher than 0.2.

Higher correlations were obtained when data from different years were analyzed separately. In particular, in phase CONC, valerate was correlated to several genera

such as *Lachnospiraceae NK3A20 group* ($r=0.55$, $p= 9.8 \times 10^{-7}$) and *Prevotella 7* ($r=0.56$, $p= 6.7 \times 10^{-7}$) in 2019 and butyrate was correlated with *Methanobrevibacter* ($r=0.60$, $p=1.1 \times 10^{-5}$) and *Christensenellaceae R7 group* ($r=0.54$, $p=8.3 \times 10^{-5}$) in 2020. Amongst the numerous genera that were differentially abundant between the lines in year 2020, those that were more abundant in line rfi+ showed high correlations with acetate such as *Dialister* ($r=0.49$, $p=5.6 \times 10^{-4}$) or *Prevotella 9* ($r=0.44$, $p=2.4 \times 10^{-3}$) and those that were more abundant in line rfi- had higher correlation with butyrate like *Ruminococcaceae UCG 13* ($r=0.47$, $p=1.0 \times 10^{-3}$) or with propionate like *unknown genus 27* belonging to an unknown family of order Bacteroidales ($r=0.41$, $p=6.1 \times 10^{-3}$) (Figure II.2.S3).

During phase MIX, highest correlations were between *Saccharofermentans* and valerate ($r=0.52$, $p=0.01$) in 2018 and between valerate and *Fretibacterium* and *Bacteroidales RF 16/ unknown genus 12* ($r=0.61$, $p= 0.018$ and $r=0.66$, $p=0.008$ respectively), as well as between *F082/ unknown genus 40* and isobutyrate ($r=0.65$, $p=0.008$) in 2020. No genus was significantly correlated with VFA in 2019 and, hence, none of the genera that were associated with the genetic lines or with the phenotypic group in phase MIX showed a correlation with any of the VFA (Figure II.2.S4).

3.4.2 Microbial genera and phenotypes

PLS regressions between microbial genera and phenotypes did not highlight any strong association neither in phase CONC nor in phase MIX. Highest significant correlations during phase CONC were positive correlations between *Prevotella 7* and $ADFI_c$, ADG_c and $E-MW_c$ ($r=0.27$, $p= 2.8 \times 10^{-4}$; $r=0.35$, $p= 9.4 \times 10^{-7}$; $r=0.24$, $p= 1.1 \times 10^{-3}$ respectively). No significant correlation was found between any of the phenotypes and any of the microbial genera in phase MIX.

3.4.3 VFA and phenotypes

Correlations between VFA and phenotypes were very poor with the highest positive correlation in phase CONC being between valerate and BFT_c ($r=0.19$, $p=0.02$). In phase MIX, no positive correlation was found between phenotypes and VFA profile and the highest negative correlation was between acetate and $ADFI_M$ ($r= - 0.30$, $p=0.002$).

4. Discussion

The main purpose of the experiment was to study the links between rumen prokaryotes, their fermentative activity and feed efficiency. To do so, we tried to discriminate efficient and inefficient animals either using divergent lines, which has not been done elsewhere in lambs to the extent of our knowledge, and phenotypic groups with larger number of animals than what has been done previously in the literature (Liang et al., 2017; Perea et al., 2017). Phenotypic RFI was calculated under two different diets, the first one being the 100% concentrate diet used during the selection of efficient and inefficient animals and the second one being a forage-rich diet.

4.1 Overall description of microbial compositions and VFA profiles across diets

Under the 100% concentrate diet, Bacteroidetes represented half of the prokaryotes identified by sequencing in the rumen of Romane lambs. Later on, when fed a 67% hay, 33% concentrate diet, Firmicutes represented nearly half of the prokaryotes. The ruminal microbiota compositions from Romane lambs were consistent with previous reports showing that nearly all sequences in the rumen belong to these two phyla (Global Rumen Census Collaborators et al., 2015; Jami & Mizrahi, 2012) and that the relative abundances of Firmicutes and Bacteroidetes are lower and higher, respectively, under a starch-enriched concentrate-based diet than under a NDF-rich diet (Zened et al., 2013). The higher relative abundance of archaeae under a mixed diet is also consistent with previous reports showing a strong positive correlation of relative abundances of methanogens with the diet's fiber content (Belanche et al., 2019; Thomas et al., 2022). Similarly, VFA proportions varied between diets with acetate being relatively more abundant under a mixed diet and propionate being relatively more abundant under a 100% concentrate diet (Liu et al., 2019a; Penner et al., 2009).

4.2 Associations between rumen prokaryotes and feed efficiency

Many studies in the literature have chosen to focus on a small number of extreme animals, therefore augmenting the potential variation between efficient and inefficient ones but also reducing the power of their conclusions, since variations observed in one out of the few selected animals can lead to observable differences. Working with smaller groups of animals to get rid of the important year effect on microbiota compositions also reduced the size of our population which dragged down the interpretability and extrapolability of our results. A recent study showed a low consistency of the rumen microbiota with large differences between two samples taken a week apart on the same ewes (Fresco et al., 2022). Similarly, in a microbial community transplantation experiment, control animals that had not been transplanted had a different microbiota composition between the first day of

experiment and the sample taken a month later under the same dietary and sampling conditions (Zhou et al., 2018). Hence, inconsistencies between studies trying to link rumen microbiota and feed efficiency may reside in the dynamic nature of rumen microbiota, which is sensitive to the environment but also to batch effects (Wang & LêCao, 2020). This could also explain the lack of correlations between microbial genera issued from a one-off sampling and phenotypes that are either the result of an evolving phenomenon such as BFT or MD or an average on several weeks such as ADFI or ADG (Le Graverand et al., under review).

4.2.1 CONC phase

When all the microbiota samples from the 3 years were analyzed simultaneously neither the lines nor the phenotypes could be clearly discriminated using PLS-DA which is consistent with the absence of difference in β -diversity evidenced by Perea et al. on fewer lambs differing in phenotypic RFI (Perea et al., 2017). Only two genera tended to be differentially abundant between the lines in phase CONC, both being relatively more abundant in line rfi-. *[Ruminococcus] gauvreauii* group and *Coprococcus 1* both belong to the *Lachnospiraceae* family, which is one of the major family in the rumen, representing 23% of the sequences in the CONC phase in our study. *Coprococcus* had already been found as the main genus discriminating efficient animals in the ancestors of the lambs we used in our study when they were fed the same diet (Marie-Etancelin et al., 2021). *Coprococcus* has also been reported as being relatively more abundant in the ruminal liquid of efficient dairy cows compared to their inefficient counterparts (Jewell et al., 2015). Furthermore, in a transfaunation study, three out of the four high-RFI steers that were transfaunated with ruminal content from low-RFI steers had an increase of *Coprococcus 1* relative abundance but RFI reevaluation was not performed after transfaunation (Zhou et al., 2018).

[Ruminococcus] gauvreeii group was also associated with efficient animals in the study from Marie-Etancelin et al. but when fed the MIX diet (Marie-Etancelin et al., 2021). After variable selection using Selbal, some genera were common in the global balance discriminating lines and in the one discriminating phenotypic groups in phase CONC. Among these genera, in addition to *Coprococcus 1*, four genera were associated with efficient animals: *Allisonella*, *Alysiella*, *Howardella* and *Rikenellaceae RC9* group, while four genera were associated with inefficient animals: *[Eubacterium] xylanophilum* group, *Ruminococcaceae UCG 004* group, *Succiniclasticum* and an unknown genus from *Veillonellaceae* family. *[Eubacterium] xylanophilum* group was also associated with the inefficient ancestors of our animals (Marie-Etancelin et al., 2021).

Very few genera were components of the balances discriminating either the lines or the phenotypes in multiple years of experiment. Among them, *[Ruminococcus] gauvreauii* group was associated with line rfi- in 2018 and 2019 and with pRFI-c group in 2019 and 2020 in addition to being the only genus discriminating lines in univariate

analyses in 2018. [*Ruminococcus*] *gauvreauii* strain CCRI 16110 was, in addition to *Prevotella ruminicola* isolate L16 which belongs to genus *Prevotella 1*, the only microbe associated with Low-RFI group in the study from Hernandez-Sanabria et al. based on DGGE analysis after amplification of the V2-V3 region of the bacterial 16S rRNA gene and led on Angus and Hereford steers fed a high-concentrate diet (Hernandez-Sanabria et al., 2010). This is consistent with the fact that *Prevotella 1* was one of the genera whose abundance was higher in line rfi- than in line rfi+ and that tended to be more abundant in pRFI-c group than in pRFI+c group, but only in 2020. [*Ruminococcus*]*_gauvreauii* group has been associated with increased rumen concentrations of VFA and could influence feed efficiency by this mean (Yin et al., 2021).

To a lesser degree, 2 other genera are common between 2 years for phenotypic groups. *Lachnospiraceae* NK3A20 group was associated with pRFI+c group in 2018 and 2019 and despite not being directly linked to inefficient animals in the study from Marie-Etancelin et al., it was linked to an increased feeding rate, elsewhere found higher in inefficient animals (Marie-Etancelin et al., 2021; Marie-Etancelin et al., 2019).

Methanobrevibacter was associated with pRFI+c group in 2019 and 2020 in accordance with previous reports linking *Methanobrevibacter* species such as *Methanobrevibacter ruminantium* (Xie et al., 2022), *Methanobrevibacter millerae* or *Methanobrevibacter olleyae* (McLoughlin et al., 2020) to inefficiency. Numerous studies have shown that methane emissions and therefore energy loss as methane are dependent on archeal composition rather than on absolute methanogens abundance (Danielsson et al., 2012; Shi et al., 2014). *Methanobrevibacter* is the main genus involved in methanogenesis from carbon dioxide but different species belonging to this genus have been found to be competing in the rumen with some of them being associated with low methane emissions and other with higher methane emissions (Danielsson et al. 2017). In our study, none of the sequences belonging to genus *Methanobrevibacter* were affiliated to a precise species. Similarly, *Methanosphaera*, whose abundance was previously linked to decreased methane emissions (Carberry et al., 2014), was numerically more abundant in pRFI-c group in our study (Tableau II.2.S2) and was selected in the global balances associated with rfi- in 2019 and with pRFI-c group in 2020. This is consistent with a decrease in methanol concentration in the rumen of pRFI-c animals in Touitou et al. since methanol is the main substrate for the growth of species belonging to *Methanosphaera* genus (Fricke et al., 2006; Touitou et al., 2022).

Furthermore, other genera that were reported as associated with efficient animals under a concentrate-rich diet were not differentially abundant between lines or phenotypes in our study. We can mention *Fibrobacter* in steers (Auffret et al., 2020; McGovern et al., 2018) or sheep (Li et al., 2022), or *Acidaminococcus* in steers when efficiency was evaluated using RFI (Auffret et al., 2020) or FCR (Myer et al., 2015a). The fact that the closest results to our study were obtained in another study with

animals sharing the same genetic background suggest that the way microbiota impacts feed efficiency could differ between species or even breeds.

4.2.2. MIX phase

In phase MIX, nearly all of the differences (either global or year-specific) were found in phenotypic groups and not in lines. This could be due to the fact that more than 50% of the animals changed phenotypic groups between the two diets as reported previously with growing heifers during two successive periods under the same diets (Durunna et al., 2012) or in cattle fed different successive diets going from concentrate to pasture (Oliveira et al., 2018) or from grass to high-concentrate diet (Lahart et al., 2020). Thus, microbiota seems to be more closely linked to actual efficiency than to the animal itself, as highlighted by the lack of similarity in the microbial community between two samplings on a same animal, showed using Aitchison distances, or to previous efficiency as evidenced by the absence of link between microbiota and groups based on both RFI_C and RFI_M

Two genera were common between global balances discriminating lines and phenotypic groups in phase MIX: *Christensenellaceae R7 group* (line rfi-; pRFI_M) and *Rikenellaceae RC9 gut group* (Line rfi+, pRFI_M); three other genera were associated with efficient animals: *Prevotella 1, Family XIII UCG 001* and *Ruminococcaceae V9D2013 group*. *Rikenellaceae RC9 gut group* has been quite consistently associated with efficient animals under mixed rations in the literature either in bulls (Andrade et al., 2022), heifers (Liu et al., 2022) and sheep (Li et al., 2022) and has been showed to be decreased when the proportion of concentrates increases (Liu et al., 2021; Zened et al., 2013). Similarly, *Christensenellaceae R7 group* relative abundance decreases when the amount of concentrates in a ration increases (Liu et al., 2019b; Pang et al., 2022). Since both these genera have been associated with an increase in VFA production *in vitro*, it can be hypothesized that they are partly responsible for the phenotypic efficiency of animals in phase MIX (Wei et al., 2022).

No genus was found to be differentially expressed between either the lines or the phenotypic groups in phase MIX using univariate analyses. In 2019, the only genus that discriminated the lines using ANOVA was *Ruminiclostridium 9* and it was also differentially abundant between phenotypic groups as well as *Ruminiclostridium 6*, both being more abundant in pRFI_M animals. *Ruminiclostridium* has been found to be more abundant in low-RFI heifers fed a 50/50 concentrate to forage diet (Liu et al., 2022). *Oscillospira* that also belongs to the Oscillospiraceae family was associated with efficient animals in our study too, as well as in Marie-Etancelin et al. (Marie-Etancelin et al., 2021) when animals were fed the same diet. A lot of the unknown genera that have been associated with phenotypically inefficient animals belonged to family F082 and Bacteroidales BS11 gut group that have both been reported to be increased when the proportion of concentrates increases (Ma et al., 2022). These genera were often

absent from around 30-40% of the samples and had 10-times higher relative abundances in pRFI_{M+} than in pRFI_{M-} animals which could explain a decrease in digestive efficiency in pRFI_{M+} animals due to a lesser good adaptation of these animals to a diet containing 67% of forage. On the other hand, some genera were quite consistently associated with efficient animals. *Lachnospiraceae NK3A20 group* was identified in all 2019 MIX samples and had a higher abundance in RFI- animals in our study as well as in efficient heifers fed a 50/50 concentrate to forage diet (Liu et al., 2022). The Lachnospiraceae family was also associated with low-RFI lactating cows (Jewell et al., 2015; Rius et al., 2012) and *Lachnospiraceae NK3A20 group* was reported as being more abundant when *Christensenellaceae R7 group* and *Rikenellaceae RC9 gut group*, that were more abundant in 2019 pRFI_{M-} animals in our study, are abundant as well (Huang et al., 2021). Only one unknown archaeal genus belonging to *Methanomethylophilaceae* was differentially expressed between phenotypes in 2019 being more abundant in pRFI_{M-} animals. However, the same genus was selected by Selbal as associated with pRFI_{M+} animals in 2020. Other inconsistencies such as the relative abundance of *[Eubacterium] xylophilum* in group pRFI_{M+} in 2019 while this genus was associated with efficient animals in Marie-Etancelin et al. under the same diet highlight the complexity of microbiota studies (Bowen et al., 2020).

4.3 VFA and feed efficiency

The link between feed efficiency and ruminal microbiota can be made via the products of microbial metabolism in the rumen. Furthermore, functional redundancy could explain a lack of link between microbes and feed efficiency. Therefore, in a first approach, we measured VFAs that are closely related to energy metabolism in ruminants. Whatever the diet, we did not find any difference in VFA profile between efficient and inefficient animals which is consistent with many other studies (Auffret et al., 2020; Clemmons et al., 2021; Fitzsimons et al., 2014; Lam et al., 2018; Liu et al., 2022; Rius et al., 2012). Conversely some studies led on high-concentrate diets show conflicting results such as increased concentrations of both propionate and butyrate in efficient Hu lambs compared to inefficient ones (Liang et al., 2017) or an important increase in butyrate concentration in efficient steers fed on a finishing diet mostly made up of cereals (Guan et al., 2008). Some of these studies might suffer from a potential bias since they expressed VFA as mmol/L, not taking into account potential saliva dilution when sampling was performed using an oesophageal probe. However, other studies expressing VFA as percentages made the same observations under similar diets either in 12 Pelibuey sheep (Arce-Recinos et al., 2022a), 8 Rambouillet sheep (Ellison et al., 2017) or 58 Angus steers in which propionate proportion was moderately negatively correlated with midparent breeding value for RFI. On the other hand, McGovern et al. found a higher propionate proportion and a lower acetate to propionate ratio in inefficient bulls when fed 3kg grass silage and concentrate *ad libitum* (McGovern et al., 2018). Concerning rarer VFA, we found a slightly higher

proportion of isobutyrate in line rfi- (even though not significant when considered in phenotypic groups) as did Arce-Recinos et al. (Arce-Recinos et al., 2022a) but these results are in contradiction with those from Hernandez-Sanabria et al. where isoacids were more abundant in high-RFI animals (Hernandez-Sanabria et al., 2010). Under a mixed diet, the discrepancies between studies are even bigger with propionate being associated with inefficient (Johnson et al., 2019; Krueger, 2009) or efficient animals (Lawrence et al., 2011; Shabat et al., 2016; Xie et al., 2022). Most of the time, studies that found differences between groups were led on a small number of animals and significance was not corrected for false discovery rate.

5. Conclusion

In the same way that microbial genera are heavily influenced by the experimental conditions upon sampling, VFA proportions, for example, are linked to the feed lastly ingested and to the time that has elapsed since then. On the one hand, this could explain the weak correlations between VFA or microbial genera resulting from a one-off sampling and phenotypes. On the other hand, since microbiota genera and VFA were obtained from the same initial samples, it explains the higher correlations that can be found between genera and VFA. In our study, no difference in VFA, nor ruminal bacteria and archaeae communities, between efficient and inefficient animals was found, whatever the diet. On the scale of genera, very slight differences were observed, but inconsistencies of results between our three years on the one hand and with other studies in the literature on the other hand, prevent any clear conclusion. If animals differing in feed efficiency were to differ in rumen metabolism they would either differ in total VFA synthesis, which could not be evaluated here due to potential saliva dilution or in non-VFA metabolites. Another study led on rumen metabolites measured by NMR did not find any difference between efficient and inefficient animals (Touitou et al., 2022) suggesting that the main factor responsible for feed efficiency in Romane lambs may not be digestive efficiency. Digestibility studies could be a good way to confirm this assessment in future generations of selection.

References:

- Abdul-Razzaq, H. A., et R. Bickerstaffe. 1989. « The Influence of Rumen Volatile Fatty Acids on Protein Metabolism in Growing Lambs ». *British Journal of Nutrition* 62 (2): 297-310. <https://doi.org/10.1079/BJN19890031>.
- Aitchison, J. 2020. « The Statistical Analysis of Compositional Data », 40.
- Andrade, Bruno G. N., Flavia A. Bressani, Rafael R. C. Cuadrat, Tainã F. Cardoso, Jessica M. Malheiros, Priscila S. N. de Oliveira, Juliana Petrini, et al. 2022. « Stool and Ruminal Microbiome Components Associated With Methane Emission and Feed Efficiency in Nelore Beef Cattle ». *Frontiers in Genetics* 13 (mai): 812828. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.812828>.
- Arce-Recinos, Carlos, Nadia Florencia Ojeda-Robertos, Ricardo Alfonso Garcia-Herrera, Jesús Alberto Ramos-Juarez, Ángel Trinidad Piñeiro-Vázquez, Jorge Rodolfo Canul-Solís, Luis Enrique Castillo-Sanchez, Fernando Casanova-Lugo, Einar Vargas-Bello-Pérez, et Alfonso Juventino Chay-Canul. 2022. « Residual Feed Intake and Rumen Metabolism in Growing Pelibuey Sheep ». *Animals* 12 (5): 572. <https://doi.org/10.3390/ani12050572>.
- Archer, J. A., E. C. Richardson, R. M. Herd, et P. F. Arthur. 1999. « Potential for Selection to Improve Efficiency of Feed Use in Beef Cattle: A Review ». *Australian Journal of Agricultural Research* 50 (2): 147. <https://doi.org/10.1071/A98075>.
- Arthur, P F, J A Archer, D J Johnston, R M Herd, E C Richardson, et P F Parnell. 2001. « Genetic and Phenotypic Variance and Covariance Components for Feed Intake, Feed Efficiency, and Other Postweaning Traits in Angus Cattle. » *Journal of Animal Science* 79 (11): 2805. <https://doi.org/10.2527/2001.79112805x>.
- Association of Official Analytical Chemists. 1998. « Animal Feed Official Methods Analysis, 16th edn. AOAC, Gaithersburg, MA. »
- Auffret, Marc D., Robert D. Stewart, Richard J. Dewhurst, Carol-Anne Duthie, Mick Watson, et Rainer Roehe. 2020. « Identification of Microbial Genetic Capacities and Potential Mechanisms Within the Rumen Microbiome Explaining Differences in Beef Cattle Feed Efficiency ». *Frontiers in Microbiology* 11 (juin): 1229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01229>.
- Belanche, Alejandro, Alison H. Kingston-Smith, Gareth W. Griffith, et Charles J. Newbold. 2019. « A Multi-Kingdom Study Reveals the Plasticity of the Rumen Microbiota in Response to a Shift From Non-Grazing to Grazing Diets in Sheep ». *Frontiers in Microbiology* 10 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00122>.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodol.)* 1995, 57, 289–300.
- Bergman, E. N. 1990. « Energy Contributions of Volatile Fatty Acids from the Gastrointestinal Tract in Various Species ». *Physiological Reviews* 70 (2): 567-90. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>.
- Bokulich, Nicholas A, Sathish Subramanian, Jeremiah J Faith, Dirk Gevers, Jeffrey I Gordon, Rob Knight, David A Mills, et J Gregory Caporaso. 2013. « Quality-Filtering Vastly Improves Diversity Estimates from Illumina Amplicon Sequencing ». *Nature Methods* 10 (1): 57-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>.
- Bowen, Jenna M., Paul Cormican, Susan J. Lister, Matthew S. McCabe, Carol-Anne Duthie, Rainer Roehe, et Richard J. Dewhurst. 2020. « Links between the Rumen Microbiota, Methane Emissions

and Feed Efficiency of Finishing Steers Offered Dietary Lipid and Nitrate Supplementation ». Édité par Alex V. Chaves. PLOS ONE 15 (4): e0231759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231759>.

Cao, Quy, Xinxin Sun, Karun Rajesh, Naga Chalasani, Kayla Gelow, Barry Katz, Vijay H. Shah, Arun J. Sanyal, et Ekaterina Smirnova. 2021. « Effects of Rare Microbiome Taxa Filtering on Statistical Analysis ». *Frontiers in Microbiology* 11 (janvier): 607325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607325>.

Carberry, Ciara A., David A. Kenny, Sukkyan Han, Matthew S. McCabe, et Sinead M. Waters. 2012. « Effect of Phenotypic Residual Feed Intake and Dietary Forage Content on the Rumen Microbial Community of Beef Cattle ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (14): 4949-58. <https://doi.org/10.1128/AEM.07759-11>.

Carberry, Ciara A., David A. Kenny, Alan K. Kelly, et Sinéad M. Waters. 2014. « Quantitative Analysis of Ruminal Methanogenic Microbial Populations in Beef Cattle Divergent in Phenotypic Residual Feed Intake (RFI) Offered Contrasting Diets ». *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5 (1): 41. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-41>.

Castillo-González, Ar, Me Burrola-Barraza, J Domínguez-Viveros, et A Chávez-Martínez. 2014. « Rumen Microorganisms and Fermentation ». *Archivos de Medicina Veterinaria* 46 (3): 349-61. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300003>.

Clemmons, Brooke A., Sung B. Shin, Timothy P. L. Smith, Mallory M. Embree, Brynn H. Voy, Liesel G. Schneider, Dallas R. Donohoe, Kyle J. McLean, et Phillip R. Myer. 2021. « Ruminal Protozoal Populations of Angus Steers Differing in Feed Efficiency ». *Animals* 11 (6): 1561. <https://doi.org/10.3390/ani11061561>.

Danielsson, R., A. Schnürer, V. Arthurson, et J. Bertilsson. 2012. « Methanogenic Population and CH₄ Production in Swedish Dairy Cows Fed Different Levels of Forage ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (17): 6172-79. <https://doi.org/10.1128/AEM.00675-12>.

Danielsson, Rebecca, Johan Dicksved, Li Sun, Horacio Gonda, Bettina Müller, Anna Schnürer, et Jan Bertilsson. 2017. « Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure ». *Frontiers in Microbiology* 8 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>.

Daunis-i-Estadella, Josep, et Josep Antoni Martín-Fernandez. 2008. « Bayesian Tools for Count Zeros in Compositional Data Sets ».

Durunna, O. N., M. G. Colazo, D. J. Ambrose, D. McCartney, V. S. Baron, et J. A. Basarab. 2012. « Evidence of Residual Feed Intake Reranking in Crossbred Replacement Heifers ». *Journal of Animal Science* 90 (3): 734-41. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4264>.

Ellison, M.J., G.C. Conant, W.R. Lamberson, R.R. Cockrum, K.J. Austin, D.C. Rule, et K.M. Cammack. 2017. « Diet and Feed Efficiency Status Affect Rumen Microbial Profiles of Sheep ». *Small Ruminant Research* 156 (novembre): 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.009>.

Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, et Géraldine Pascal. 2018. « FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution ». Édité par Bonnie Berger. *Bioinformatics* 34 (8): 1287-94. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.

Fitzsimons, C., D. A. Kenny, A. G. Fahey, et M. McGee. 2014. « Feeding Behavior, Ruminal Fermentation, and Performance of Pregnant Beef Cows Differing in Phenotypic Residual Feed Intake Offered Grass Silage1 ». *Journal of Animal Science* 92 (5): 2170-81. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7438>.

Fresco, Solène, Christel Marie-Etancelin, Annabelle Meynadier, et Guillermo Martinez Boggio. 2022. « Variation in Rumen Bacteria of Lacaune Dairy Ewes From One Week to the Next ». *Frontiers in Microbiology* 13 (juin): 848518. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.848518>.

Fricke, Wolfgang F., Henning Seedorf, Anke Henne, Markus Krüer, Heiko Liesegang, Reiner Hedderich, Gerhard Gottschalk, et Rudolf K. Thauer. 2006. « The Genome Sequence of *Methanosphaera stadtmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 188 (2): 642-58. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.642-658.2006>.

Global Rumen Census Collaborators, Gemma Henderson, Faith Cox, Siva Ganesh, Arjan Jonker, Wayne Young, et Peter H. Janssen. 2015. « Rumen Microbial Community Composition Varies with Diet and Host, but a Core Microbiome Is Found across a Wide Geographical Range ». *Scientific Reports* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/srep14567>.

Guan, Le Luo, Joshua D. Nkrumah, John A. Basarab, et Stephen S. Moore. 2008. « Linkage of Microbial Ecology to Phenotype: Correlation of Rumen Microbial Ecology to Cattle's Feed Efficiency ». *FEMS Microbiology Letters* 288 (1): 85-91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01343.x>.

Herd, R. M., V. H. Oddy, et E. C. Richardson. 2004. « Biological Basis for Variation in Residual Feed Intake in Beef Cattle. 1. Review of Potential Mechanisms ». *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44 (5): 423. <https://doi.org/10.1071/EA02220>.

Herd, Robert M, Jose I Velazco, Helen Smith, Paul F Arthur, Brad Hine, Hutton Oddy, Robin C Dobos, et Roger S Hegarty. 2019. « Genetic Variation in Residual Feed Intake Is Associated with Body Composition, Behavior, Rumen, Heat Production, Hematology, and Immune Competence Traits in Angus Cattle¹ ». *Journal of Animal Science* 97 (5): 2202-19. <https://doi.org/10.1093/jas/skz077>.

Hernandez-Sanabria, Emma, Le Luo Guan, Laksiri A. Goonewardene, Meiju Li, Denis F. Mujibi, Paul Stothard, Stephen S. Moore, et Monica C. Leon-Quintero. 2010. « Correlation of Particular Bacterial PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Patterns with Bovine Ruminant Fermentation Parameters and Feed Efficiency Traits ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (19): 6338-50. <https://doi.org/10.1128/AEM.01052-10>.

Huang, Chun, Fei Ge, Xixi Yao, Xian Guo, Pengjia Bao, Xiaoming Ma, Xiaoyun Wu, Min Chu, Ping Yan, et Chunnian Liang. 2021. « Microbiome and Metabolomics Reveal the Effects of Different Feeding Systems on the Growth and Ruminant Development of Yaks ». *Frontiers in Microbiology* 12 (juin): 682989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682989>.

INRA, 2018. *Alimentation des Ruminants*. Éditions Quæ. Versailles, France.

Jami, Elie, et Itzhak Mizrahi. 2012. « Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals ». Édité par Purificación López-García. *PLoS ONE* 7 (3): e33306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033306>.

Jarrige, Robert. 1978. *Principes de la nutrition et de l'alimentation des ruminants: besoins alimentaires des animaux, valeur nutritive des aliments*. Actualités scientifiques et agronomiques. Versailles: INRA.

Jewell, Kelsea A., Caroline A. McCormick, Christine L. Odt, Paul J. Weimer, et Garret Suen. 2015. « Ruminant Bacterial Community Composition in Dairy Cows Is Dynamic over the Course of Two Lactations and Correlates with Feed Efficiency ». Édité par M. W. Griffiths. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (14): 4697-4710. <https://doi.org/10.1128/AEM.00720-15>.

- Johnson, Jocelyn R, Gordon E Carstens, Wimberly K Krueger, Phillip A Lancaster, Erin G Brown, Luis O Tedeschi, Robin C Anderson, Kristen A Johnson, et Arie H Brosh. 2019. « Associations between Residual Feed Intake and Apparent Nutrient Digestibility, in Vitro Methane-Producing Activity, and Volatile Fatty Acid Concentrations in Growing Beef Cattle1 ». *Journal of Animal Science* 97 (8): 3550-61. <https://doi.org/10.1093/jas/skz195>.
- Johnson, K. A., et D. E. Johnson. 1995. « Methane Emissions from Cattle ». *Journal of Animal Science* 73 (8): 2483-92. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>.
- Koch, Robert, M., L.A Swiger, Doyle Chambers, et K.E Gregory. 1963. « Efficiency of Feed Use in Beef Cattle ».
- Krueger, Wimberly K. 2009. « Understanding beef cattle efficiency : I) Understanding physiological and digestive factors affecting residual feed intake and II) tannin supplementation : effects on animal performance, fermentation and carcass traits ».
- Lahart, B., R. Prendiville, F. Buckley, E. Kennedy, S.B. Conroy, T.M. Boland, et M. McGee. 2020. « The Repeatability of Feed Intake and Feed Efficiency in Beef Cattle Offered High-Concentrate, Grass Silage and Pasture-Based Diets ». *Animal* 14 (11): 2288-97. <https://doi.org/10.1017/S1751731120000853>.
- Lam, S., J. C. Munro, M. Zhou, L. L. Guan, F. S. Schenkel, M. A. Steele, S. P. Miller, et Y. R. Montanholi. 2018. « Associations of Rumen Parameters with Feed Efficiency and Sampling Routine in Beef Cattle ». *Animal* 12 (7): 1442-50. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002750>.
- Lawrence, P., D. A. Kenny, B. Earley, D. H. Crews, et M. McGee. 2011. « Grass Silage Intake, Rumen and Blood Variables, Ultrasonic and Body Measurements, Feeding Behavior, and Activity in Pregnant Beef Heifers Differing in Phenotypic Residual Feed Intake1 ». *Journal of Animal Science* 89 (10): 3248-61. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3774>.
- Leong, Claudia, Jillian J Hazzard, Anne-Louise M Heath, Gerald W Tannock, Blair Lawley, Sonya L Cameron, Ewa A Szymlek-Gay, et al. 2019. « Using Compositional Principal Component Analysis to Describe Children's Gut Microbiota in Relation to Diet and Body Composition ». *The American Journal of Clinical Nutrition*, novembre, nqz270. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz270>.
- Li, Fuyong, et Le Luo Guan. 2017. « Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle ». Édité par Andrew J. McBain. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (9): e00061-17, /aem/83/9/e00061-17.atom. <https://doi.org/10.1128/AEM.00061-17>.
- Li, Fuyong, Thomas C. A. Hitch, Yanhong Chen, Christopher J. Creevey, et Le Luo Guan. 2019. « Comparative Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Reveal the Breed Effect on the Rumen Microbiome and Its Associations with Feed Efficiency in Beef Cattle ». *Microbiome* 7 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0618-5>.
- Li, Siqi, Meiyu Du, Chongyu Zhang, Yun Wang, Yunkyoung Lee, et Guiguo Zhang. 2022. « Diet Type Impacts Production Performance of Fattening Lambs by Manipulating the Ruminal Microbiota and Metabolome ». *Frontiers in Microbiology* 13 (avril): 824001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824001>.
- Liang, Y. S., G. Z. Li, X. Y. Li, J. Y. Lü, F. D. Li, D. F. Tang, F. Li, et al. 2017. « Growth Performance, Rumen Fermentation, Bacteria Composition, and Gene Expressions Involved in Intracellular PH Regulation of Rumen Epithelium in Finishing Hu Lambs Differing in Residual Feed Intake Phenotype1 ». *Journal of Animal Science* 95 (4): 1727-38. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1134>.

- Liquet, Benoit, Kim-Anh Lê Cao, Hakim Hocini, et Rodolphe Thiébaud. 2012. « A Novel Approach for Biomarker Selection and the Integration of Repeated Measures Experiments from Two Assays ». *BMC Bioinformatics* 13 (1): 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-325>.
- Liu, Hongjin, Tianwei Xu, Shixiao Xu, Li Ma, Xueping Han, Xungang Wang, Xiaoling Zhang, et al. 2019. « Effect of Dietary Concentrate to Forage Ratio on Growth Performance, Rumen Fermentation and Bacterial Diversity of Tibetan Sheep under Barn Feeding on the Qinghai-Tibetan Plateau ». *PeerJ* 7 (août): e7462. <https://doi.org/10.7717/peerj.7462>.
- Liu, Hu, Hui Jiang, Lizhuang Hao, Xuliang Cao, Allan Degen, Jianwei Zhou, et Chengfu Zhang. 2021. « Rumen Bacterial Community of Grazing Lactating Yaks (*Capra Grunniens*) Supplemented with Concentrate Feed and/or Rumen-Protected Lysine and Methionine ». *Animals* 11 (8): 2425. <https://doi.org/10.3390/ani11082425>.
- Liu, Junhua, Chunxu Xue, Daming Sun, Weiyun Zhu, et Shengyong Mao. 2019. « Impact of High-grain Diet Feeding on Mucosa-associated Bacterial Community and Gene Expression of Tight Junction Proteins in the Small Intestine of Goats ». *MicrobiologyOpen* 8 (6). <https://doi.org/10.1002/mbo3.745>.
- Liu, Yue, Hao Wu, Wanbao Chen, Chang Liu, Qingxiang Meng, et Zhenming Zhou. 2022. « Rumen Microbiome and Metabolome of High and Low Residual Feed Intake Angus Heifers ». *Frontiers in Veterinary Science* 9 (mars): 812861. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.812861>.
- Ma, Zhi Yuan, Ju Wang Zhou, Si Yu Yi, Min Wang, et Zhi Liang Tan. 2022. « In Vitro Inoculation of Fresh or Frozen Rumen Fluid Distinguishes Contrasting Microbial Communities and Fermentation Induced by Increasing Forage to Concentrate Ratio ». *Frontiers in Nutrition* 8 (janvier): 772645. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.772645>.
- Mahé, Frédéric, Torbjørn Rognes, Christopher Quince, Colomban de Vargas, et Micah Dunthorn. 2014. « Swarm: Robust and Fast Clustering Method for Amplicon-Based Studies ». *PeerJ* 2 (septembre): e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>.
- . 2015. « Swarm v2: Highly-Scalable and High-Resolution Amplicon Clustering ». *PeerJ* 3 (décembre): e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>.
- Marie-Etancelin, Christel, Dominique Francois, Jean-Louis Weisbecker, Didier Marcon, Carole Moreno-Romieux, Frédéric Bouvier, et Flavie Tortereau. 2019. « Detailed Genetic Analysis of Feeding Behaviour in Romane Lambs and Links with Residual Feed Intake ». *Journal of Animal Breeding and Genetics* 136 (3): 174-82. <https://doi.org/10.1111/jbg.12392>.
- Marie-Etancelin, Christel, Flavie Tortereau, Beatrice Gabinaud, Guillermo Martinez Boggio, Quentin Le Graverand, Didier Marcon, Marie-Lea De Almeida, Géraldine Pascal, Jean-Louis Weisbecker, et Annabelle Meynadier. 2021. « Apart From the Diet, the Ruminal Microbiota of Lambs Is Modified in Relation to Their Genetic Potential for Feed Efficiency or Feeding Behavior ». *Frontiers in Microbiology* 12 (octobre): 759432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.759432>.
- Martinez Boggio, Guillermo, Annabelle Meynadier, Pepus Daunis-i-Estadella, et Christel Marie-Etancelin. 2021. « Compositional Analysis of Ruminal Bacteria from Ewes Selected for Somatic Cell Score and Milk Persistency ». Édité par Arda Yildirim. *PLOS ONE* 16 (7): e0254874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254874>.
- McDonnell, R. P., K. J. Hart, T. M. Boland, A. K. Kelly, M. McGee, et D. A. Kenny. 2016. « Effect of Divergence in Phenotypic Residual Feed Intake on Methane Emissions, Ruminal Fermentation, and Apparent Whole-Tract Digestibility of Beef Heifers across Three Contrasting Diets¹ ». *Journal of Animal Science* 94 (3): 1179-93. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0080>.

- McGovern, E., McGee, M., Byrne, C. J., Kenny, D. A., Kelly, A. K., & Waters, S. M. (2020). Investigation into the effect of divergent feed efficiency phenotype on the bovine rumen microbiota across diet and breed. *Scientific Reports*, 10(1), 15317. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71458-0>
- McGovern, Emily, David A. Kenny, Matthew S. McCabe, Claire Fitzsimons, Mark McGee, Alan K. Kelly, et Sinéad M. Waters. 2018. « 16S RRNA Sequencing Reveals Relationship Between Potent Cellulolytic Genera and Feed Efficiency in the Rumen of Bulls ». *Frontiers in Microbiology* 9 (août): 1842. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01842>.
- McLoughlin, Steven, Charles Spillane, Noel Claffey, Paul E. Smith, Tommy O'Rourke, Michael G. Diskin, et Sinéad M. Waters. 2020. « Rumen Microbiome Composition Is Altered in Sheep Divergent in Feed Efficiency ». *Frontiers in Microbiology* 11 (août): 1981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01981>.
- McMurdie, Paul J., et Susan Holmes. 2014. « Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible ». Édité par Alice Carolyn McHardy. *PLoS Computational Biology* 10 (4): e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>.
- Moraïs, Sarah, et Itzhak Mizrahi. 2019. « Islands in the Stream: From Individual to Communal Fiber Degradation in the Rumen Ecosystem ». *FEMS Microbiology Reviews* 43 (4): 362-79. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz007>.
- Mucha, S., F. Tortereau, A. Doeschl-Wilson, R. Rupp, et J. Conington. 2022. « Animal Board Invited Review: Meta-Analysis of Genetic Parameters for Resilience and Efficiency Traits in Goats and Sheep ». *Animal* 16 (3): 100456. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100456>.
- Myer, Phillip R., Timothy P. L. Smith, James E. Wells, Larry A. Kuehn, et Harvey C. Freetly. 2015. « Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency ». Édité par Robert J Forster. *PLOS ONE* 10 (6): e0129174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129174>.
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, 13(1), 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Oliveira, L. F., A. C. Ruggieri, R. H. Branco, O. L. Cota, R. C. Canesin, H. J. U. Costa, et M. E. Z. Mercadante. 2018. « Feed Efficiency and Enteric Methane Production of Nellore Cattle in the Feedlot and on Pasture ». *Animal Production Science* 58 (5): 886. <https://doi.org/10.1071/AN16303>.
- Pang, Kaiyue, Shatuo Chai, Yingkui Yang, Xun Wang, Shujie Liu, et ShuXiang Wang. 2022. « Dietary Forage to Concentrate Ratios Impact on Yak Ruminal Microbiota and Metabolites ». *Frontiers in Microbiology* 13 (août): 964564. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.964564>.
- Penner, G.B., M. Taniguchi, L.L. Guan, K.A. Beauchemin, et M. Oba. 2009. « Effect of Dietary Forage to Concentrate Ratio on Volatile Fatty Acid Absorption and the Expression of Genes Related to Volatile Fatty Acid Absorption and Metabolism in Ruminal Tissue ». *Journal of Dairy Science* 92 (6): 2767-81. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1716>.
- Perea, K., K. Perz, S. K. Olivo, A. Williams, M. Lachman, S. L. Ishaq, J. Thomson, et C. J. Yeoman. 2017. « Feed Efficiency Phenotypes in Lambs Involve Changes in Ruminal, Colonic, and Small-Intestine-Located Microbiota ». *Journal of Animal Science* 95 (6): 2585. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1222>.
- Rius, A.G., S. Kittelmann, K.A. Macdonald, G.C. Waghorn, P.H. Janssen, et E. Sikkema. 2012. « Nitrogen Metabolism and Rumen Microbial Enumeration in Lactating Cows with Divergent Residual Feed Intake Fed High-Digestibility Pasture ». *Journal of Dairy Science* 95 (9): 5024-34. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5392>.

- Rivera-Pinto, J., J. J. Egozcue, V. Pawlowsky-Glahn, R. Paredes, M. Noguera-Julian, et M. L. Calle. 2018. « Balances: A New Perspective for Microbiome Analysis ». Édité par Catherine Lozupone. *MSystems* 3 (4): e00053-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00053-18>.
- Rohart, Florian, Benoît Gautier, Amrit Singh, et Kim-Anh Lê Cao. 2017. « MixOmics: An R Package for 'omics Feature Selection and Multiple Data Integration ». Édité par Dina Schneidman. *PLOS Computational Biology* 13 (11): e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>.
- Shabat, Sheerli Kruger Ben, Goor Sasson, Adi Doron-Faigenboim, Thomer Durman, Shamay Yaacoby, Margret E Berg Miller, Bryan A White, Naama Shterzer, et Itzhak Mizrahi. 2016. « Specific Microbiome-Dependent Mechanisms Underlie the Energy Harvest Efficiency of Ruminants ». *The ISME Journal* 10 (12): 2958-72. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.62>.
- Shi, Weibing, Christina D. Moon, Sinead C. Leahy, Dongwan Kang, Jeff Froula, Sandra Kittelmann, Christina Fan, et al. 2014. « Methane Yield Phenotypes Linked to Differential Gene Expression in the Sheep Rumen Microbiome ». *Genome Research* 24 (9): 1517-25. <https://doi.org/10.1101/gr.168245.113>.
- Sok, M., D.R. Ouellet, J.L. Firkins, D. Pellerin, et H. Lapierre. 2017. « Amino Acid Composition of Rumen Bacteria and Protozoa in Cattle ». *Journal of Dairy Science* 100 (7): 5241-49. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12447>.
- Storm, E., E. R. Ørskov, et R. Smart. 1983. « The Nutritive Value of Rumen Micro-Organisms in Ruminants: 2. The Apparent Digestibility and Net Utilization of Microbial N for Growing Lambs ». *British Journal of Nutrition* 50 (2): 471-78. <https://doi.org/10.1079/BJN19830115>.
- Thomas, Courtney M., Elie Desmond-Le Quéméner, Simonetta Gribaldo, et Guillaume Borrel. 2022. « Factors Shaping the Abundance and Diversity of the Gut Archaeome across the Animal Kingdom ». *Nature Communications* 13 (1): 3358. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31038-4>.
- Tortereau, F., C. Marie-Etancelin, J.-L. Weisbecker, D. Marcon, F. Bouvier, C. Moreno-Romieux, et D. François. 2020. « Genetic Parameters for Feed Efficiency in Romane Rams and Responses to Single-Generation Selection ». *Animal* 14 (4): 681-87. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002544>.
- Touitou, Florian, Flavie Tortereau, Lydie Bret, Nathalie Marty-Gasset, Didier Marcon, et Annabelle Meynadier. 2022. « Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Rumen and Plasma Metabolomic Data ». *Metabolites* 12 (4): 304. <https://doi.org/10.3390/metabo12040304>.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, et B.A. Lewis. 1991. « Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition ». *Journal of Dairy Science* 74 (10): 3583-97. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Wang, Y., & LêCao, K.-A. (2020). Managing batch effects in microbiome data. *Briefings in Bioinformatics*, 21(6), 1954-1970. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz105>
- Wegl, G., Grabner, N., Köstelbauer, A., Klose, V., & Ghanbari, M. (2021). Toward Best Practice in Livestock Microbiota Research : A Comprehensive Comparison of Sample Storage and DNA Extraction Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 12, 627539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.627539>
- Wei, Xiao, Kehui Ouyang, Tanghui Long, Zuogui Liu, Yanjiao Li, et Qinghua Qiu. 2022. « Dynamic Variations in Rumen Fermentation Characteristics and Bacterial Community Composition during In Vitro Fermentation ». *Fermentation* 8 (6): 276. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060276>.
- Westerhuis, Johan A., Huub C. J. Hoefsloot, Suzanne Smit, Daniel J. Vis, Age K. Smilde, Ewoud J. J. van Velzen, John P. M. van Duijnhoven, et Ferdi A. van Dorsten. 2008. « Assessment of PLSDA Cross Validation ». *Metabolomics* 4 (1): 81-89. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0099-6>.

Xie, Yunyi, Huizeng Sun, Mingyuan Xue, et Jianxin Liu. 2022. « Metagenomics Reveals Differences in Microbial Composition and Metabolic Functions in the Rumen of Dairy Cows with Different Residual Feed Intake ». *Animal Microbiome* 4 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00170-3>.

Yin, X., Ji, S., Duan, C., Tian, P., Ju, S., Yan, H., Zhang, Y., & Liu, Y. (2021). Age-Related Changes in the Ruminal Microbiota and Their Relationship With Rumen Fermentation in Lambs. *Frontiers in Microbiology*, 12, 679135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679135>

Yurtseven, Sabri, Mehmet Cetin, Abdullah Can, Mustafa Boga, Tekin Sahin, et Hüseyin Turkoglu. 2009. « Effect of Different Feeding Method on Methane and Carbon Dioxide Emissions Milk Yield and Composition of Lactating Awassi Sheep ». *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 4 (6): 278-87. <https://doi.org/10.3923/ajava.2009.278.287>.

Zened, Asma, Sylvie Combes, Laurent Cauquil, Jérôme Mariette, Christophe Klopp, Olivier Bouchez, Annabelle Troegeler-Meynadier, et Francis Enjalbert. 2013. « Microbial Ecology of the Rumen Evaluated by 454 GS FLX Pyrosequencing Is Affected by Starch and Oil Supplementation of Diets ». *FEMS Microbiology Ecology* 83 (2): 504-14. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12011>.

Zhou, M., Peng, Y.-J., Chen, Y., Klinger, C. M., Oba, M., Liu, J.-X., & Guan, L. L. (2018). Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation : Implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0447-y>

Supplementary Data:

Tableau II.2.S1: Chemical composition of feed ingredients in the different diets/ C1 = fiber-rich concentrate distributed in phase CONC, C2 = concentrate distributed in phase MIX, F=dactylis hay distributed in phase MIX.

	C1_20 18	C1_2019	C1_2020	C2_2018	C2_2019	C2_2020	F_2018	F_2019 Summer	F_2019 Fall	Fall_2020
DM (g/kg)	905	888	883	882	874	894	914	914	916	900
Crude Protein (%DM)	17.3	17.7	17.6	18.2	18.4	17.6	6.5	8.6	6.7	9.4
Crude Fiber (%DM)	14.9	14.7	14.5	10.9	10	10.2	37.3	35.5	35.6	38.0
Crude Fat (%DM)	1.9	3.4	2.5	4	0.35	3.6				

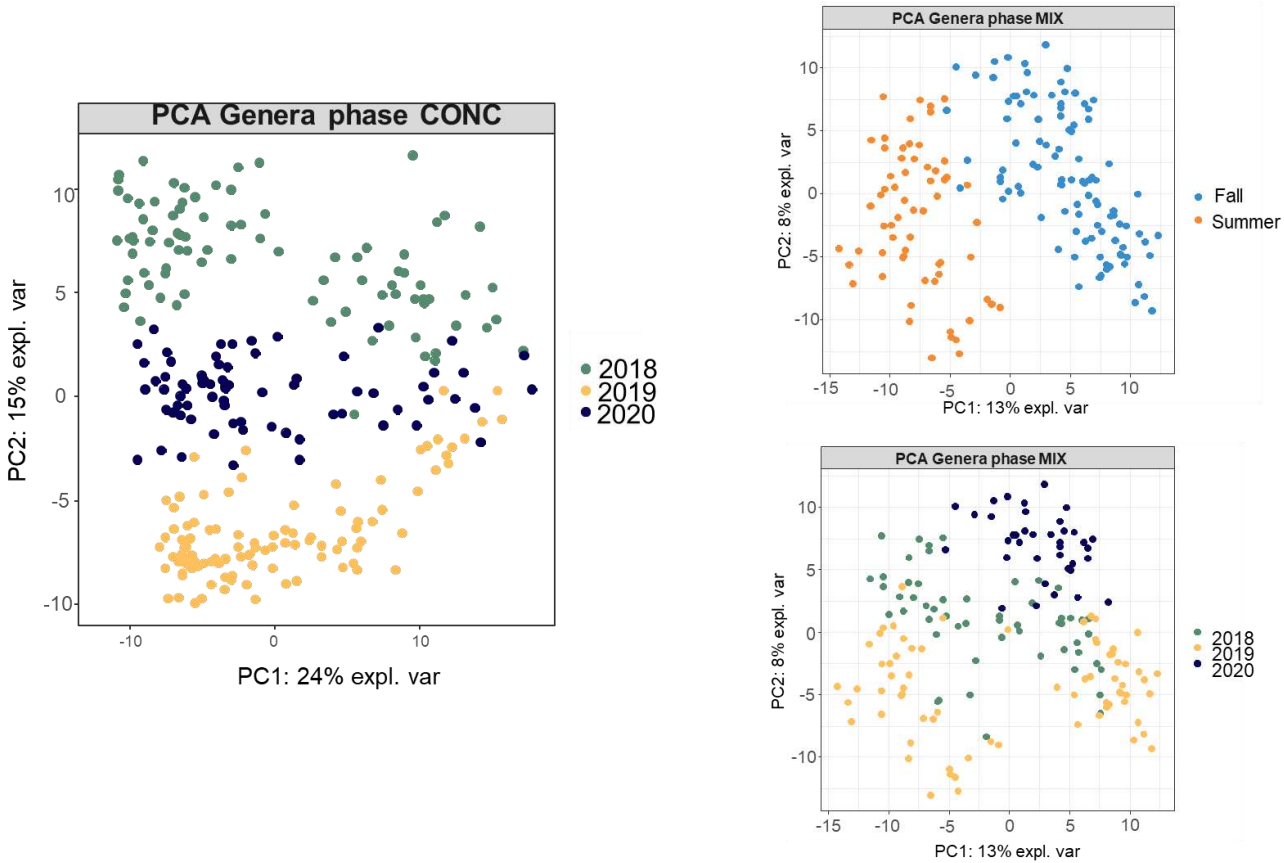


Figure II.2 S1: Graphical output of the two first components of the PCA in both phase CONC (on the left) and phase MIX (on the right) to identify the main experimental factors responsible for a large part of the variance in either the CONC or the MIX microbiota datasets.

Tableau II.2.S2 : Relative abundances of all genera that were or tended to be differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in the CONC phase. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR.

CONC phase	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) \downarrow		p_{line}	%	Relative abundance		p_{phen}	%
	rfi+	rfi-			pRFI+c	pRFI-c		
All samples			n=277				n= 180	
Coprococcus 1	0.15 (0.16)	0.21 (0.17)	0.08	98	0.15 (0.13)	0.19 (0.15)	0.92	98
Ruminococcus gauvreauii group	1.62 (1.22)	2.18 (1.75)	0.08	100	1.63 (1.10)	2.08 (1.85)	0.95	100
2018			N=102				N=63	
Ruminococcus gauvreauii group	1.26 (0.92)	2.04 (1.70)	0.09	100	1.25 (1.07)	1.84 (1.67)	0.29	100
2019			N=101				N=67	
2020			N=73				N=50	
Dialister	0.58 (0.38)	0.28 (0.32)	0.009	92	0.52 (0.44)	0.30 (0.31)	0.031	92
Lachnospira	0.16 (0.12)	0.08 (0.11)	0.009	85	0.14 (0.13)	0.098 (0.13)	0.075	90
Ruminococcaceae UCG 013	0.25 (0.31)	0.55 (0.67)	0.009	100	0.27 (0.45)	0.41 (0.34)	0.029	100
UG 14 ‡	0.23 (0.45)	0.05 (0.12)	0.013	73	0.20 (0.41)	0.048 (0.13)	0.075	70
Succinivibrionaceae UCG 001	0.84 (1.02)	0.33 (0.75)	0.015	96	0.76 (1.07)	0.25 (0.37)	0.075	96
Agathobacter	0.55 (0.43)	0.32 (0.36)	0.016	93	0.56 (0.49)	0.24 (0.30)	0.075	92
Erysipelotrichaceae UCG 002	3.25 (4.70)	1.61 (3.22)	0.016	97	4.47 (5.68)	0.81 (1.18)	0.075	98
Prevotella 9	1.47 (2.35)	0.66 (0.86)	0.016	95	1.52 (2.70)	0.52 (0.70)	0.075	96
Erysipelotrichaceae UCG 004	0.13 (0.25)	0.48 (0.80)	0.021	90	0.12 (0.22)	0.51 (0.88)	0.19	90
[Eubacterium] xylanophilum group	8.65 x 10⁻³ (0.013)	1.73 x10 ⁻³ (4.73 x10 ⁻³)	0.025	30	0.0079 (0.011)	0.0018 (0.0040)	0.095	30
Moryella	0.059 (0.047)	0.13 (0.13)	0.025	97	0.068 (0.089)	0.12 (0.11)	0.072	96
Prevotellaceae UCG 003	0.5 (1.01)	1.53 (2.22)	0.025	95	0.73 (1.63)	1.63 (2.33)	0.17	94
Quinella	0.0040 (0.01)	1.41 (5.58)	0.025	41	0.030 (0.12)	1.90 (6.76)	0.17	40
Coprococcus 1	0.16 (0.12)	0.23 (0.14)	0.030	100	0.15 (0.11)	0.24 (0.16)	0.031	100
Lachnoclostridium 1	0.09 (0.06)	0.18 (0.13)	0.032	100	0.12 (0.12)	0.16 (0.12)	0.17	100
Prevotella 1	26.5 (19.8)	34.2 (13.4)	0.040	100	23.4 (17.7)	37.2 (15.5)	0.11	100
Howardella	0.044 (0.025)	0.060 (0.031)	0.042	100	0.045 (0.028)	0.053 (0.026)	0.096	100
UG 27 ‡	0.012 (0.017)	0.033 (0.048)	0.042	66	0.015 (0.023)	0.024 (0.036)	0.24	62
Blautia	0.079 (0.062)	0.042 (0.042)	0.047	81	0.074 (0.067)	0.040 (0.043)	0.24	78
[Eubacterium] brachy group	0.079 (0.049)	0.10 (0.053)	0.053	100	0.078 (0.052)	0.090 (0.056)	0.17	100
Alloprevotella	0.27 (0.29)	0.17 (0.24)	0.061	97	0.22 (0.21)	0.19 (0.32)	0.19	96
Methanospaera	1.00 (0.47)	1.28 (0.65)	0.061	100	1.03 (0.50)	1.24 (0.63)	0.11	100
UG 7 ‡	0.21 (0.69)	0.18 (0.33)	0.061	75	0.26 (0.80)	0.15 (0.22)	0.43	72
UG 23 ‡	0.23 (0.25)	0.30 (0.21)	0.061	92	0.026 (0.028)	0.029 (0.022)	0.13	90
UG 5 ‡	0.050 (0.18)	1.31 (3.86)	0.063	48	0.77 (3.39)	1.20 (3.63)	0.19	52
Selenomonas 1	0.16 (0.37)	0.79 (1.68)	0.066	85	1.45 (0.44)	0.51 (0.92)	0.21	80
[Eubacterium] eligens group	0.38 (0.34)	0.26 (0.38)	0.080	95	0.31 (0.34)	0.31 (0.44)	0.39	96

CONC phase	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) \downarrow		p _{line}	%	Relative abundance		p _{phen}	%
	r _{fi+}	r _{fi-}			pR _{FI+c}	pR _{FI-c}		
Lachnospiraceae UCG 008	0.13 (0.061)	0.11 (0.092)	0.080	99	0.060 (0.12)	0.090 (0.059)	0.17	98
Treponema 2	0.17 (0.20)	0.37 (0.64)	0.080	100	0.35 (0.77)	0.34 (0.39)	0.094	100
Prevotella 7	21.1 (14.4)	12.1 (9.6)	0.081	100	20.5 (14.8)	11.6 (10.4)	0.27	100
Ruminococcaceae UCG 014	1.65 (0.89)	1.33 (0.95)	0.081	100	1.75 (0.98)	1.29 (0.99)	0.27	100
UG 11 ‡	0.007 (0.024)	0.034 (0.089)	0.081	32	0.0021 (0.010)	0.024 (0.052)	0.13	28
UG 21 ‡	0.071 (0.091)	0.041 (0.051)	0.081	88	0.061 (0.069)	0.040 (0.054)	0.21	86
UG 10 ‡	0.16 (0.23)	0.091 (0.16)	0.10	89	0.15 (0.21)	0.087 (0.17)	0.13	86

\downarrow When a difference occurs ($p < 0.1$), the group in which the relative abundance of a genus is higher is in bold ; * Prevalence ; ‡ UG=Unknown genus.

Tableau II.2.S3 : Relative abundances of all genera that were or tended to be differentially expressed between genetic lines or phenotypic group in the MIX phase. P-values (p_{line} and p_{phen}) are the result of an ANOVA on GBM/CLR-transformed data corrected for fixed experimental effects and have been corrected for FDR.

MIX PHASE	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) \downarrow		p _{Line}	%*	Relative abundance (%) \downarrow		p _{phen}	%*
	r _{fi+}	r _{fi-}			pR _{FI+M}	pR _{FI-M}		
All samples	N=166				N=106			
2018	N=54				N=34			
2019	N=71				N=44			
Ruminoclostridium_9	0.11 (0.13)	0.43 (0.68)	0.029	97	0.10 (0.08)	0.79 (0.95)	0.022	95
UG 157 ‡	0.21 (0.36)	0.15 (0.21)	0.97	52	0.09 (0.29)	0.37 (0.29)	2.36x10 ⁻¹⁰	43
UG 41 ‡	0.26 (0.41)	0.15 (0.16)	0.97	66	0.34 (0.40)	0.035 (0.093)	4.82x10 ⁻⁶	66
Anaerovibrio	0.080 (0.085)	0.11 (0.14)	0.99	89	0.052 (0.070)	0.22 (0.15)	7.97x10 ⁻⁵	91
Pseudoramibacter	0.012 (0.032)	0.008 (0.021)	0.97	30	4.49x10 ⁻⁴ (1.77x10 ⁻⁴)	0.020 (0.023)	7.97x10 ⁻⁵	25
Prevotellaceae_UCG_001	1.48 (1.21)	1.75 (1.44)	0.72	100	2.10 (1.12)	0.64 (0.68)	9.35 x10 ⁻⁵	100
Selenomonas 3	0.078 (0.17)	0.071 (0.14)	0.99	38	0.034 (0.13)	0.21 (0.23)	9.73x10 ⁻⁵	30
UG 158 ‡	0.012 (0.035)	0.012 (0.028)	0.99	27	1.71x10 ⁻³ ₋₃	0.039 (0.060)	2.73x10 ⁻⁴	25
UG 58 ‡	0.11 (0.19)	0.043 (0.067)	0.56	53	0.14 (0.19)	0.021(0.055)	2.76x10 ⁻⁴	64
Treponema 2	0.60 (0.46)	0.63 (0.52)	0.99	100	0.41 (0.36)	0.74 (0.37)	4.65e-04	100
Rikenellaceae RC9 gut group	7.02 (2.48)	7.23 (4.68)	0.99	100	6.31 (2.01)	9.97 (7.83)	1.42e-03	100
UG 54 ‡	0.070 (0.11)	0.11(0.13)	0.49	55	0.11 (0.13)	0.027 (0.068)	1.54e-03	59

MIX PHASE	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%)↓	abundance	pLine	%*	Relative abundance (%)↓	p _{phen}	%*	
	rfi+	rfi-			pRFI+M	pRFI-M		
UG 37 ‡	0.0078 (0.025)	0.0077 (0.021)	0.99	30	0.0026 (0.0049)	0.022 (0.034)	0.0017	34
Flexilinea	0.34 (0.15)	0.34 (0.20)	0.94	100	0.29 (0.15)	0.42 (0.17)	0.0017	100
[Eubacterium]_xylanophilum	0.073(0.085)	0.093(0.11)	0.95	87	0.12 (0.11)	0.027 (0.035)	0.0019	89
UG 35 ‡	0.28(0.20)	0.31(0.23)	0.99	94	0.34 (0.20)	0.15 (0.15)	0.0019	95
Acetitomaculum	1.09(0.73)	1.08(0.76)	0.97	100	1.21 (0.67)	0.57 (0.50)	0.0022	100
Selenomonas_1	0.44(0.41)	0.58(0.68)	0.97	100	0.29 (0.25)	1.21 (0.94)	0.0022	100
UG 7 ‡	0.078(0.12)	0.099(0.16)	0.63	59	0.12 (0.12)	0.034 (0.079)	0.0022	64
UG 39 ‡	0.094(0.19)	0.070(0.11)	0.97	61	0.13 (0.19)	0.013 (0.028)	0.0022	68
UG 83 ‡	0.045(0.054)	0.056(0.070)	0.99	68	0.063 (0.063)	0.012 (0.038)	0.0022	70
UG 59 ‡	0.095(0.11)	0.063(0.096)	0.71	65	0.12 (0.12)	0.034 (0.074)	0.0056	70
UG 172 ‡	0.011(0.014)	0.015(0.023)	0.99	45	0.019 (0.020)	0.0007 (0.002)	0.0026	52
UG 136 ‡	0.016(0.035)	0.038(0.085)	0.80	41	0.012 (0.035)	0.050 (0.074)	0.0027	39
UG 66 ‡	0.030(0.052)	0.037(0.053)	0.72	48	0.040 (0.050)	0.013 (0.031)	0.0032	52
UG 62 ‡	0.094(0.20)	0.081(0.17)	0.99	49	0.11 (0.21)	0.014 (0.033)	0.0057	55
UG 63 ‡	0.068(0.10)	0.077(0.12)	0.97	61	0.11 (0.13)	0.026 (0.041)	0.0062	70
Christensenellaceae_R_7_group	16.1 (4.18)	16.8(4.43)	0.97	100	15.38 (4.18)	16.46 (4.88)	0.0073	100
Prevotellaceae_YAB2003_group	0.0099 (0.017)	0.015 (0.033)	0.99	38	0.007 (0.015)	0.029 (0.039)	0.0074	41
UG 60 ‡	0.045(0.053)	0.041(0.048)	0.99	75	0.056 (0.055)	0.016(0.032)	0.0079	77
UG 57 ‡	0.064(0.085)	0.13(0.25)	0.72	59	0.097 (0.11)	0.010 (0.030)	0.0084	57
Lachnospiraceae_AC2044_group	0.46 (0.28)	0.45 (0.29)	0.97	100	0.58 (0.30)	0.28 (0.22)	0.010	100
Ruminococcaceae_V9D2013	0.026 (0.025)	0.037 (0.040)	0.72	66	0.017 (0.033)	0.037 (0.040)	0.013	57
UG 22 ‡	0.052 (0.077)	0.090 (0.14)	0.64	69	0.086 (0.12)	0.025 (0.051)	0.013	72
Ruminoclostridium_6	0.34 (0.23)	0.38 (0.18)	0.97	100	0.34 (0.14)	0.51 (0.29)	0.017	100
UG 1 ‡	0.13 (0.11)	0.15 (0.15)	0.97	100	0.11 (0.11)	0.22 (0.14)	0.017	100
Family_XIII_AD3011_group	0.54 (0.30)	0.52 (0.25)	0.99	100	0.60 (0.28)	0.33 (0.21)	0.021	100
UG 10 ‡	0.17 (0.39)	0.11 (0.17)	0.90	65	0.18 (0.40)	0.018 (0.028)	0.021	68
UG 12 ‡	0.080 (0.24)	0.020 (0.044)	0.56	52	0.10 (0.24)	0.006 (0.018)	0.021	61
UG 46 ‡	0.17 (0.34)	0.23 (0.52)	0.72	51	0.22 (0.35)	0.065 (0.18)	0.022	55
Ruminococcaceae_UCG_001	0.033 (0.065)	0.032 (0.047)	0.97	62	0.053 (0.073)	0.0067 (0.013)	0.024	66
Lachnospiraceae_NK3A20_group	2.14(1.48)	1.96(1.06)	0.97	100	1.72 (1.32)	2.07 (0.93)	0.025	100
UG 38 ‡	0.10(0.25)	0.14(0.17)	0.41	54	0.17 (0.27)	0.061 (0.15)	0.026	55
Oscillospira	0.042(0.063)	0.044(0.079)	0.99	77	0.023 (0.037)	0.053 (0.070)	0.026	77
Ruminococcus_1	2.09(1.07)	1.41(1.07)	0.56	100	2.70 (1.14)	1.63 (0.87)	0.031	100
UG 40 ‡	0.048(0.056)	0.095(0.20)	0.97	73	0.11 (0.20)	0.031 (0.080)	0.031	70
UG 87 ‡	0.06(0.11)	0.037(0.062)	0.97	44	0.084 (0.12)	0.019 (0.049)	0.033	50
Butyrivibrio_2	1.43(0.49)	1.56(0.73)	0.97	100	1.45 (0.46)	1.78 (0.70)	0.033	100

MIX PHASE	Genetic Lines				Phenotypic groups			
	Relative abundance (%) \downarrow		p _{Line}	%*	Relative abundance (%) \downarrow		p _{phen}	%*
	r _{fi+}	r _{fi-}			pRFI+ _M	pRFI- _M		
Prevotellaceae_Ga6A1_group	0.080(0.11)	0.070(0.10)	0.97	90	0.045 (0.066)	0.16 (0.18)	0.033	86
UG 11 ‡	0.13(0.31)	0.085(0.16)	0.97	62	0.096 (0.31)	0.17 (0.26)	0.033	57
UG 100 ‡	0.20(0.60)	0.15(0.48)	0.97	52	0.058 (0.26)	0.30 (0.64)	0.033	45
UG 9 ‡	0.13(0.13)	0.096(0.087)	0.97	86	0.14 (0.11)	0.058(0.078)	0.033	82
UG 49 ‡	0.46(2.06)	0.023(0.058)	0.72	41	0.011 (0.020)	1.03 (3.43)	0.035	41
UG 150 ‡	0.040(0.035)	0.046(0.035)	0.97	90	0.054 (0.038)	0.023 (0.029)	0.036	89
UG 42 ‡	0.015(0.035)	0.039(0.085)	0.72	48	0.031 (0.047)	0.0039(0.0094)	0.051	52
UG 93 ‡	0.047(0.12)	0.074(0.22)	0.99	52	0.083 (0.13)	0.023(0.053)	0.051	57
UG 81 ‡	0.025(0.044)	0.028(0.036)	0.97	58	0.043 (0.048)	0.012 (0.026)	0.056	66
[Eubacterium]_ventriosum_group	0.14(0.16)	0.15(0.14)	0.99	90	0.18 (0.16)	0.097 (0.13)	0.059	89
Schwartzia	0.062(0.052)	0.062(0.068)	0.72	90	0.050 (0.050)	0.10 (0.074)	0.059	93
UG 133 ‡	0.032(0.042)	0.030(0.052)	0.72	56	0.021 (0.042)	0.026 (0.026)	0.059	52
UG 138 ‡	0.041(0.057)	0.040(0.068)	0.94	68	0.047 (0.062)	0.0097 (0.017)	0.063	61
Lachnospirillum_1	0.0079 (0.014)	0.0061 (0.011)	0.97	37	0.0060 (0.014)	0.011 (0.012)	0.077	36
UG 26 ‡	0.030(0.053)	0.016(0.033)	0.51	54	0.011 (0.018)	0.032 (0.058)	0.081	55
Ruminococcaceae_NKA214_group	5.61(1.27)	5.30(1.28)	0.80	100	5.57 (1.12)	5.43(1.40)	0.083	100
2020	N=38				N=26			

\downarrow When a difference occurs ($p < 0.1$), the group in which the relative abundance of a genus is higher is in bold ; * Prevalence ; ‡ UG=Unknown genus.

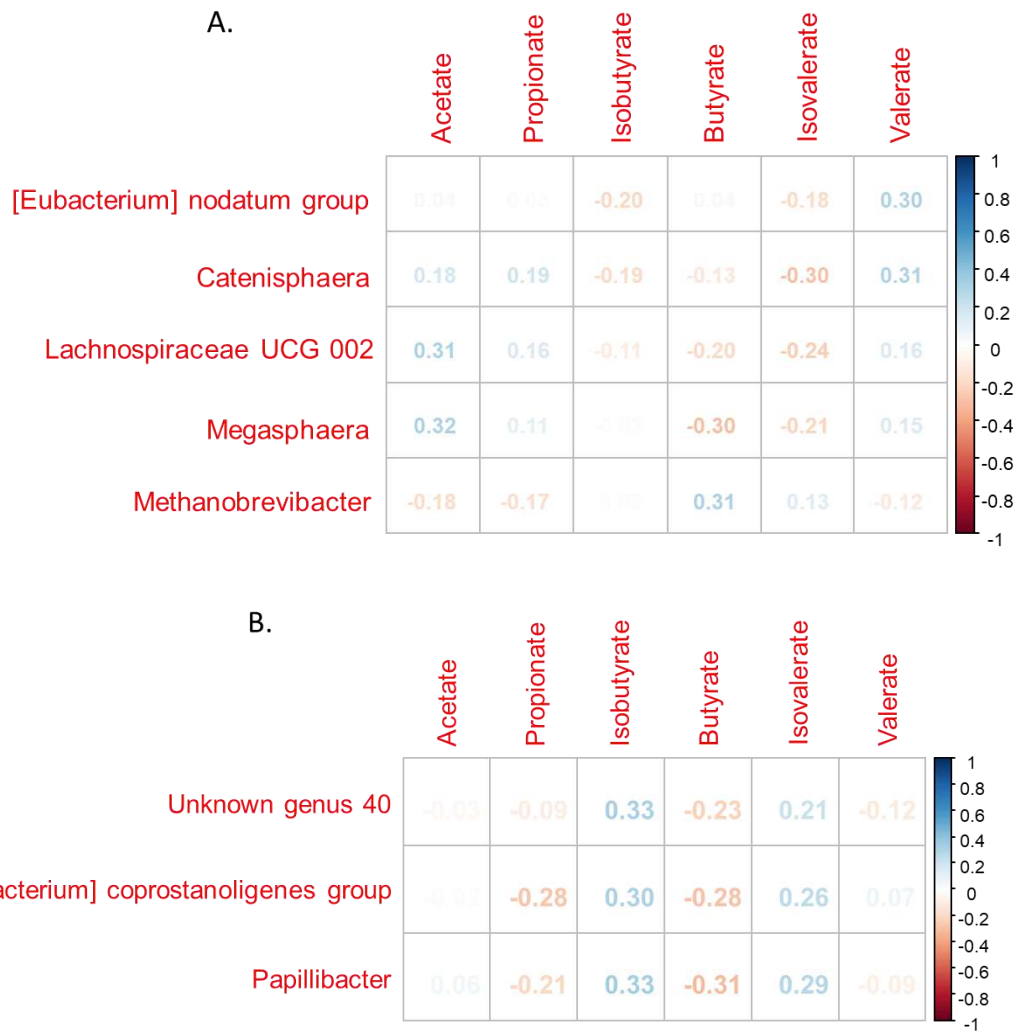


Figure II.2.S2: Correlations between microbial genera and volatile fatty acids in phase CONC (A) and phase MIX (B) with a minimum threshold set to 0.3.

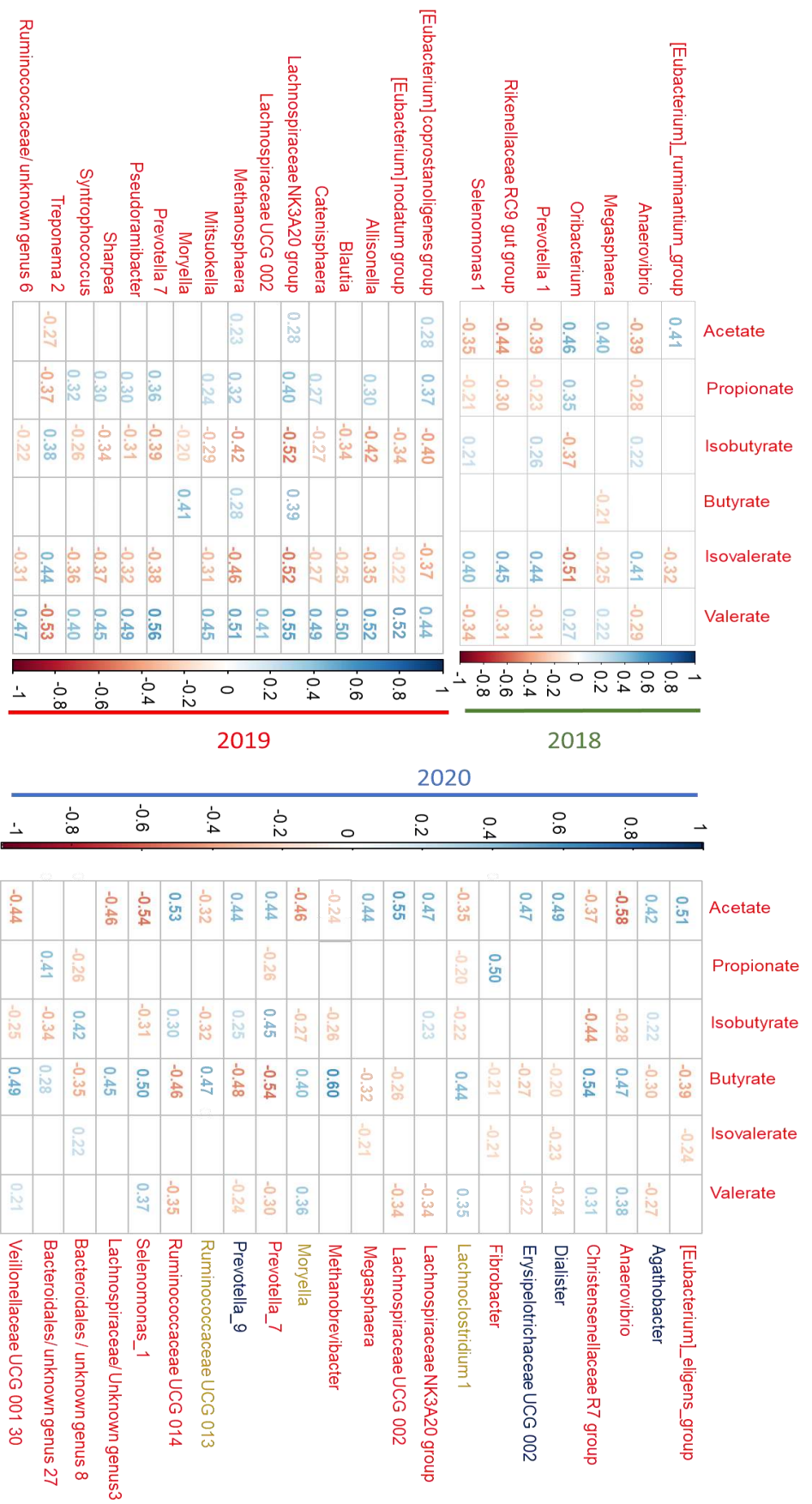


Figure II.2.S3: Main correlations between genera and VFA in CONC phase. Genera that have been identified as associated with efficient animals or inefficient animals in their respective years are represented in gold and blue respectively. Genera were kept if they were significantly correlated with at least one VFA with an absolute correlation higher than 0.4.

	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	
Erysipelotrichaceae UCG 004						0.42	2 0 1 8
[Ruminococcus] gauvreauii group				0.41			
Lachnoclostridium 1				0.42			
F082/ unknown genus 96		0.45	-0.51		-0.55		
Rikenellaceae RC9 gut group				0.46		-0.59	
[Eubacterium] coprostanoligenes group		-0.42	0.46	-0.52			
Papillibacter		-0.49	0.42	-0.43	0.47		
Ruminococcaceae UCG 001		0.42			-0.41		
Saccharofermentans				-0.48		0.52	
Treponema 2						0.44	
Bacteroidales_RF16_group/ unknown genus 12						0.66	2 0 2 0
F082/ unknown genus 40			0.65				
Fretibacterium						0.61	

Figure II.2.S4 : Main correlations between genera and VFA in MIX phase. Genera were kept if they were significantly correlated with at least one VFA with an absolute correlation higher than 0.4. No genus previously identified as associated with phenotypically efficient or inefficient animals was correlated with VFA.

2. Association entre les eucaryotes du rumen et l'efficacité alimentaire

a) Introduction

En plus des procaryotes, bactéries et archées, le rumen est peuplé par des microorganismes eucaryotes. Ces derniers, dont l'abondance est plus réduite puisqu'estimée à 10^3 à 10^5 microorganismes par mL de contenu ruminal, jouent un rôle important dans la digestion de la cellulose et des autres glucides pariétaux (Sylvester et al., 2004; Lwin et al., 2011; Solomon et al., 2016). En particulier, la capacité des champignons anaérobies à dégrader les particules végétales est supérieure à celle des bactéries *in vitro* (Akin & Borneman, 1990; Ma et al., 2020). De plus, une étude de métatranscriptomique quantitative récente a identifié que la majorité des cellulases présentes dans les échantillons provenant du rumen de quatre vaches Holstein, prélevées plusieurs fois à différents temps après un repas d'ensilage de maïs et de trèfle provenaient des champignons anaérobies appartenant à la famille des Neocallimastigaceae, suivis par le genre bactérien *Fibrobacter* puis par les ciliés (Söllinger et al., 2018).

Relativement peu d'études se sont intéressées aux eucaryotes du rumen en lien avec l'efficacité alimentaire et la plupart d'entre elles se sont concentrées sur les effets de la défaunation, c'est-à-dire l'élimination de la population de protozoaires du rumen.

L'objectif de cette étude a été de comparer les populations eucaryotes ruminales d'animaux différant par leur efficacité alimentaire sous deux régimes, un régime riche en concentrés (CONC) et un régime contenant un tiers de concentrés et deux tiers de foin (MIX).

b) Matériel et méthodes spécifiques

Les animaux utilisés dans cette étude sont les mêmes que les animaux utilisés pour l'article précédent. En phase CONC, 277 échantillons de contenu ruminal ont été prélevés mais seulement 275 ont pu être séquencés. En phase MIX, 167 échantillons ont été prélevés et 166 ont été séquencés. Les amorces utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 18S étaient les suivantes : F566 (5'- CAGCAGCCGCGGTAATTCC) et R1200 (5'- CCCGTGTTGAGTCAAATTAAG) précédées des adaptateurs Génotoul (Hadziavdic et al., 2014; Stoeck et al., 2010). L'espacement entre les amorces étant important, certaines séquences peuvent ne pas se chevaucher, auquel cas il est impossible de reconstruire avec certitude

l'amplicon à partir des deux fragments. Dans ce cas, après l'étape de démultiplexage qui permet de récupérer l'information des deux fragments, une série arbitraire de 100 « N », c'est-à-dire de nucléotides non identifiés, est ajoutée entre les deux (Bernard et al., 2021). Au cours de l'affiliation, le pourcentage d'appariement est calculé en conséquence. L'affiliation a été réalisée à l'aide de la base Silva 18S 138.1.

Les échantillons n'ont pas été dilués avant amplification contrairement aux échantillons utilisés pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S du fait des concentrations moins importantes d'eucaryotes que de procaryotes dans le rumen.

c) Résultats

i. *Description générale de la communauté eucaryote du rumen des agneaux*

Les eucaryotes représentés dans le rumen appartiennent majoritairement au phylum Ciliophora du règne des Chromalveolata (en particulier du sous-règne SAR, comprenant les embranchements Stramenopiles, Alveolata et Rhizaria) ainsi qu'au règne des Fungi représenté par les phyla Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota et Neocallimastigomycota. Les autres taxons identifiés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 18S dans nos échantillons ne représentent pas plus de 5 à 10% des séquences à l'exception notable des échantillons de la phase CONC prélevés en 2019, c'est-à-dire d'animaux ayant potentiellement eu accès à la nourriture moins longtemps avant le prélèvement, qui contiennent plus de séquences appartenant aux phyla Cercozoa et Apicomplexa. Ces taxons n'ont pas été retrouvés en forte abondance dans les échantillons prélevés à l'automne 2018 lors de la phase MIX.

Phase CONC :

Chez les animaux prélevés en 2019 la profondeur de séquençage obtenue est en moyenne beaucoup moins importante et beaucoup plus variable que les autres années d'échantillonnage, (Moyenne±écart-type : 8751±9495 séquences en 2019 contre 25623± 3963 en 2018 et 13273±2838 en 2020). Cette différence de profondeur de séquençage ne se retrouve pas sur les données issues du séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S issues des mêmes échantillons et utilisées dans l'article précédent (voir page 96) (Figure II.2.11). En revanche, elle est observable, qualitativement, sur les gels d'électrophorèse obtenus par migration de

l'ADNr 18S amplifié par PCR ce qui laisse supposer une concentration moins importante d'eucaryotes dans ces échantillons.

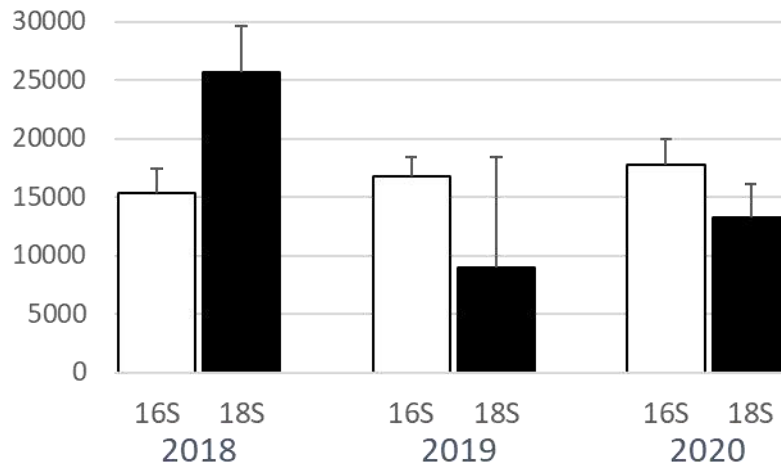


Figure II.2.11 : Profondeur de séquençage obtenue après amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 18S (en noir) ou pour l'ARNr 16S (en blanc) des échantillons de fluide ruminal prélevés en phase CONC en 2018, 2019 et 2020. Le séquençage des échantillons de 2018 et 2019 a été réalisé simultanément tandis que les échantillons de 2020 ont été traités séparément.

En particulier, les échantillons de 2019 se caractérisent par une quantité de séquences affiliées au règne Chromalveolata plus faible (84,7% des séquences eucaryotes en 2019 contre 99,2% en 2018 et 97,6% en 2020) et une proportion plus importante de séquences identifiées comme appartenant aux phyla Apicomplexa (et en particulier à l'ordre des Gregarinasina) et au phylum Cercozoa (uniquement à l'ordre des Glissomonadida) au sein de celles-ci (Figure II.2.12). Aucun de ces taxons n'est classiquement identifié dans le rumen, les premiers étant par exemple des parasites d'invertébrés. Parmi les Ciliophora, qui restent majoritaires, le nombre et la proportion de séquences affiliées au genre *Isotricha* est plus faible en 2019 que pour les autres années.

De la même façon, une plus grande diversité de genres appartenant au règne des Fungi a été identifiée dans les échantillons de la phase CONC de 2019. Par ailleurs, un genre appartenant à la famille Debaryomycetaceae présentait une abondance relative beaucoup plus importante dans les échantillons de 2020 (66,7% des séquences attribuées aux Fungi en 2020 contre 2,2% et 2,1 % respectivement en 2018 et 2019) en lien avec une prévalence respectivement 5,4 et 1,6 fois plus importante qu'en 2018 et 2019.

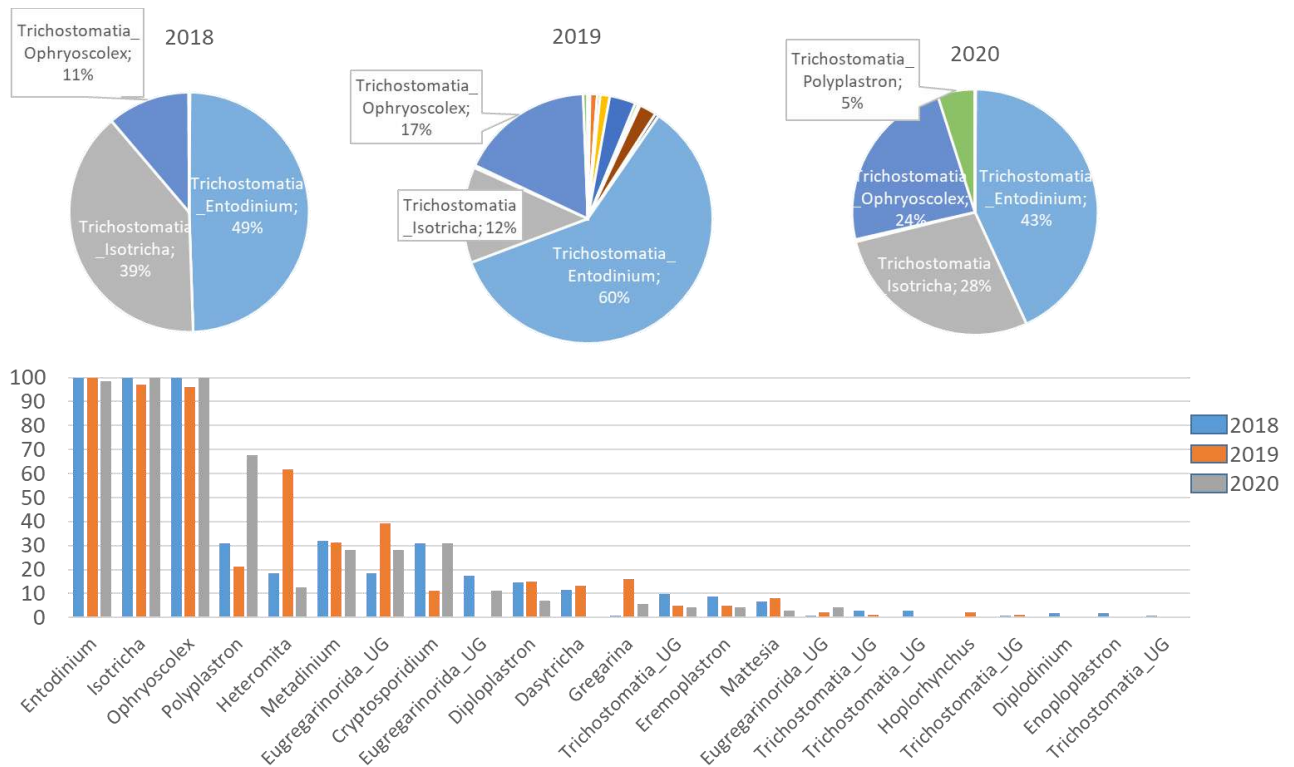


Figure II.2.12:Prévalences et abondances relatives des différents genres appartenant au règne des Chromoalveolata et identifiés par séquençage d'échantillons de fluide ruminal prélevés en 2018, 2019 et 2020 lors de la phase CONC. Le séquençage des échantillons de 2018 et 2019 a été réalisé simultanément tandis que le séquençage des échantillons de 2020 a été réalisé séparément.

Phase MIX :

En phase MIX, les échantillons du prélèvement automnal de 2018 présentent en moyenne deux fois moins de séquences que les échantillons des autres prélèvements (11970±2907 contre 21760±4773 pour les autres prélèvements). La proportion de séquences affiliées au sous-règne SAR variait de 83,1% au prélèvement automnal de 2019 à 92,8% au prélèvement automnal de 2018, le reste des séquences étant affilié au règne Fungi.

Contrairement à la phase CONC où les séquences fongiques appartenait à diverses familles (Debaryomycetaceae, Aspergillaceae, Cladosporiaceae, Sporidiobolaceae, Leptosphaeriaceae, Pleosporaceae et Wallemiaceae pour les majoritaires), en phase MIX, la très vaste majorité des séquences fongiques appartenait à la famille des Neocallimastigaceae (90 à 95% des séquences fongiques) à l'exception du prélèvement automnal de 2018 dans lequel cette famille ne représentait en moyenne que 81% des séquences fongiques.

Quel que soit le prélèvement, le genre *Entodinium* représentait la majorité des séquences affiliées au sous-règne SAR.

ii. Liens entre les genres eucaryotes et l'efficience alimentaire

Phase CONC :

Après filtrage des genres présents dans au moins 20% des échantillons, deux PLS-DA ont été réalisées pour discriminer les lignées génétiques (275 échantillons) ou les groupes phénotypiques (178 échantillons) à partir de 32 genres eucaryotes.

Lignées :

La PLS-DA impliquant les lignées génétiques a mis en évidence une discrimination significative ($p=0.03$) de celles-ci par les genres eucaryotes dont l'AUROC culminait à 0,74 en intégrant 4 composantes au modèle. En particulier, deux genres avaient une valeur VIP supérieure à 1,5 à savoir *Neoscochyta* (VIP=2.36) et *Metadinium* (VIP=2.03). Ces deux genres étaient également les deux genres les plus importants dans la balance globale déterminée par Selbal (AUROC=0.68) avec *Neoscochyta* pesant du côté de la lignée rfi- avec un autre genre appartenant lui aussi à l'ordre des Pleosporales, et *Metadinium* pesant du côté de la lignée rfi+ associé aux genres *Xeromyces* et *Cryptosporidium* (Figure II.2.13).

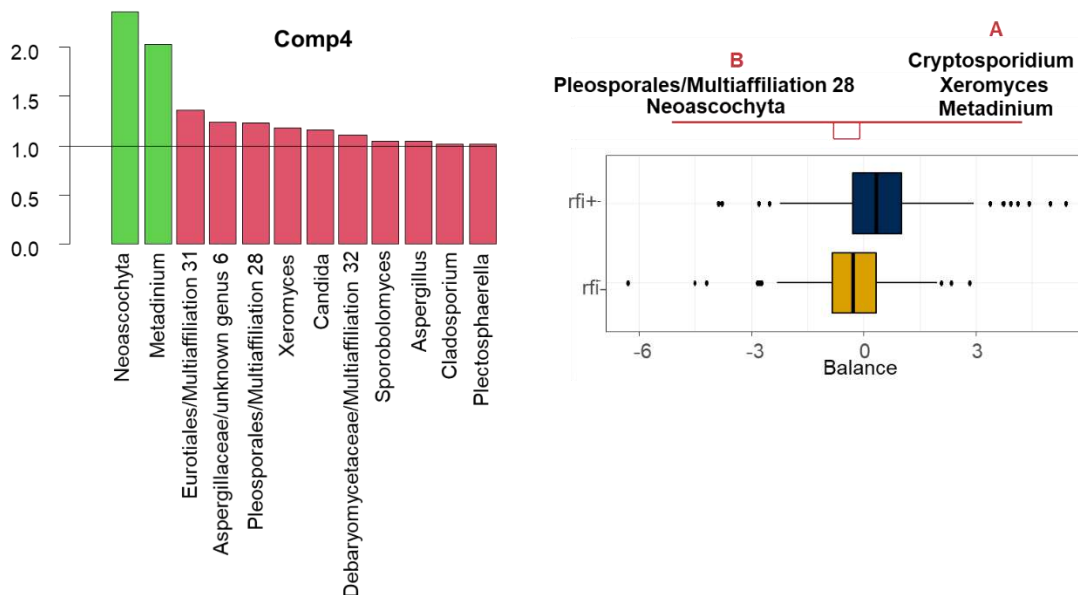


Figure II.2.13: Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des lignées génétiques en phase CONC estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).

Les ANOVA menées sur les transformées CLR des genres eucaryotes ont aussi mis en évidence des différences entre lignées pour les genres *Neoscochyta* (p=0,02) et *Metadinium* (p=0,04). Notons cependant que ces différences peuvent être liées à la présence de ces genres dans un nombre plus ou moins important d'échantillons de l'une ou l'autre lignée. Ainsi, au total, le genre *Neoscochyta* a été identifié dans 60 échantillons sur 277 dont 21 provenant d'animaux rfi+ et 39 d'animaux rfi- et le genre *Metadinium* a été identifié dans 85 échantillons dont 56 provenant d'animaux rfi+ et 29 d'animaux rfi-. Par ailleurs, le genre *Neoscochyta* n'a pas été identifié dans les échantillons de 2020.

De fait, lorsque les mêmes analyses (PLS-DA, selbal et ANOVA) ont été menées séparément entre les années, le genre *Neoscochyta* n'a plus été associé aux individus rfi- quelles que soient l'année ou l'analyse considérées. Un résumé des analyses menées année par année est présenté dans le Tableau II.2.4.

Tableau II.2.4 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les lignées génétiques d'efficacité alimentaire en phase CONC. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans la lignée rfi- ou dans la lignée rfi+, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.

Analyse	Paramètre	2018	2019	2020
PLS-DA	AUROC (ncomp)	0,74 (5)	0,75 (3)	0,88 (4)
	p-valeur \downarrow	0,10	0,10	0,10
	VIP>1,5	<i>Neophaeosphaeria</i>	Ø	<i>Entodinium</i> <i>Polyplastron</i>
Selbal	AUROC	0,71	0,73	0,81
	Global balance	<i>Neophaeosphaeria</i> <i>Wallemia</i> <i>Metadinium</i> <i>Pleosporales/UG 6</i> <i>Trichomonascus</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Candida</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Metadinium</i>	<i>Entodinium</i> <i>Pleosporales/UG 5</i> <i>Metadinium</i>
ANOVA	p-valeur	<i>Neophaeosphaeria</i> **	<i>Candida</i> * <i>Metadinium</i> *	<i>Entodinium</i> **

\downarrow p-valeur obtenue par un test de permutations basé sur la validation croisée (MVA.test) ; *p <0,1 ; **p<0.05 après FDR ; UG=unknown genus

Groupes phénotypiques :

La PLS-DA impliquant les groupes phénotypiques n'a pas indiqué de discrimination significative des groupes pRFI_{-C} et pRFI_{+C} (AUROC avec 7 composantes = 0,77 ; p=0,24) après que le test de permutations basé sur la validation croisée a été appliqué. Cependant les deux genres ayant les plus fortes valeurs VIP, à savoir les genres *Sporobolomyces* et *Metadinium*, ont également été sélectionnés par la balance globale (AUROC=0,74) discriminant les groupes phénotypiques, tous deux étant associés avec le groupe RFI_{+C} (Figure II.2.14).

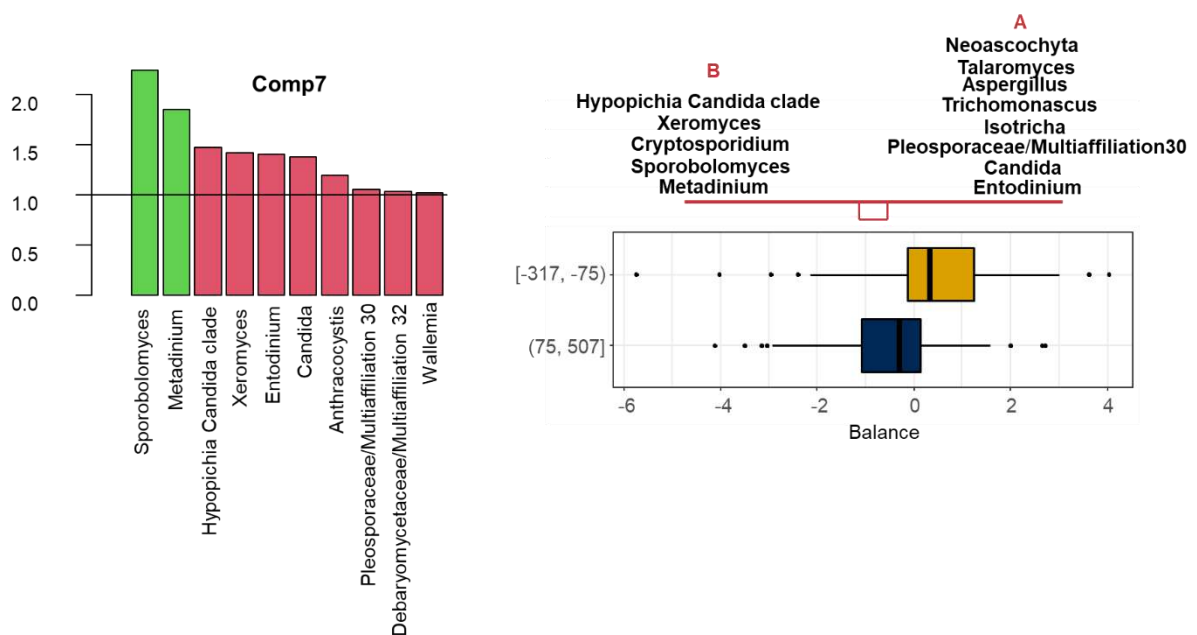


Figure II.2.14 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des groupes phénotypiques en phase CONC estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).

Les ANOVA menées sur les CLR des genres eucaryotes n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les groupes phénotypiques.

Lorsque les analyses ont été menées séparément pour chaque année de prélèvements, on retrouve, en 2020, le genre *Entodinium*, le plus associé au groupe pRFI_{-C} quand les années étaient analysées concomitamment par Selbal et, en 2018, le genre *Metadinium* le plus associé au groupe pRFI_{+C} lors de l'analyse avec les échantillons des trois années par Selbal. Par ailleurs, le genre *Isotricha* a été associé avec le groupe pRFI_{-C} par Selbal à la fois sur les échantillons de 2018 et 2020. En 2019, le genre *Talaromyces* a été associé au groupe pRFI_{+C} à

la fois en considérant les VIP de la PLS-DA dont le test de permutation a montré la significativité, par le Selbal, et par l'analyse univariée ($p=0,04$) (Tableau II.2.5). Lorsque toutes les années étaient soumises ensemble au Selbal, ce genre était associé au groupe pRFI-C (Figure II.2.14).

Tableau II.2.5 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les groupes phénotypiques d'efficacité alimentaire. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans le groupe pRFI-C ou dans le groupe pRFI+C, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.

Analyse	Paramètre	2018	2019	2020
PLS-DA	AUROC (ncomp)	0,79 (2)	0,84 (2)	0,95 (8)
	p-valeur \downarrow	0,15	0,04	0,11
	VIP>1,5	<i>Isotricha</i> <i>Metadinium</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>Entodinium</i> <i>Saccharomyces</i>
Selbal	AUROC	0,71	0,76	0,83
	Global balance	<i>Isotricha</i> <i>Metadinium</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Heteromita</i> <i>Candida</i> <i>Talaromyces</i>	<i>Isotricha</i> <i>Entodinium</i> <i>Saccharomyces</i>
ANOVA	p-valeur	Ø	<i>Talaromyces</i> **	<i>Entodinium</i> **

\downarrow p-valeur obtenue par un test de permutations basé sur la validation croisée (MVA.test) ; * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$ après FDR.

Points communs entre les analyses menées sur les lignées et sur les groupes phénotypiques :

Ainsi que mentionné dans l'article précédent, lors de la phase CONC, les lignées génétiques et les groupes phénotypiques se recoupent assez bien sans pour autant être confondus. Ainsi 39 individus appartenant à la lignée rfi- ou à la lignée rfi+ ont été classés, à l'issue de la mesure de leur RFI phénotypique, dans le groupe d'efficacité alimentaire opposé. Cependant, on retrouve dans la balance globale issue de la discrimination des groupes phénotypiques la plupart des genres qui étaient également utilisés pour la discrimination des lignées, à savoir *Xeromyces*, *Metadinium* et *Cryptosporidium* pour les animaux inefficients (rfi+/pRFI+C) et *Neoscochyta* pour les animaux efficaces (rfi-/pRFI-C).

Phase MIX :

Après filtrage des genres présents dans au moins 20% des échantillons, deux PLS-DA ont été réalisées pour discriminer les lignées génétiques (166 échantillons) ou les groupes phénotypiques (107 échantillons) à partir de 31 genres eucaryotes.

Lignées :

La PLS-DA impliquant les lignées génétiques n'a pas mis en évidence de discrimination significative (AUROC avec 3 composantes = 0,80 ; $p=0,20$) de celles-ci par les genres eucaryotes. Quelques genres, cependant, se détachent par leur valeur VIP dans la discrimination, à savoir le genre *Cyllamyces* (VIP=1,83), le genre *Neophaeosphaeria* (VIP=1,50) et un genre inconnu de la famille des Trichostomatiaceae. Ces trois genres sont également sélectionnés par le Selbal pour discriminer les lignées (AUROC=0,78) et sont tous associés à la lignée rfi- dans la balance (Figure II.2.15).

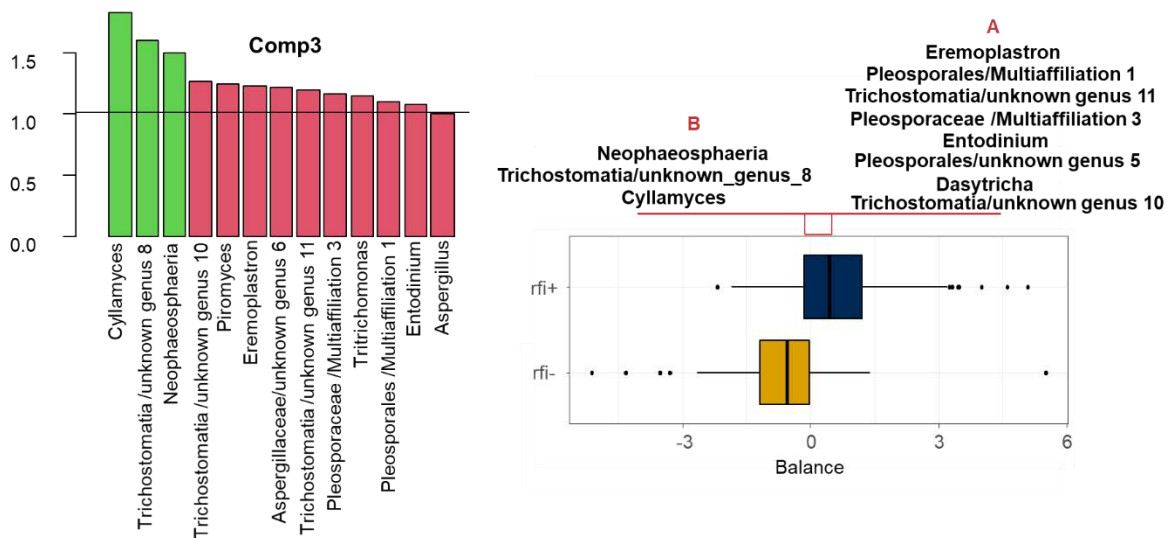


Figure II.2.15 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des lignées génétiques en phase MIX estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (Selbal) (à droite).

Un seul genre, *Cyllamyces*, a présenté des abondances relatives différentes entre les lignées après transformation CLR ($p=0,01$). Ce genre était présent dans tous les échantillons, à l'exception d'un échantillon appartenant à un animal rfi+, ce qui renforce la confiance accordée à l'ANOVA le faisant ressortir.

Lorsque les analyses ont été menées séparément, le genre *Cyllumyces* a pu être identifié comme associé à la lignée rfi- en 2019 par ANOVA et en 2019 et 2020 par Selbal. Par ailleurs, le genre *Dasytricha* tendait à être associé avec la lignée rfi+ par ANOVA (p=0,09) et était le premier genre sélectionné par Selbal en 2018 et 2019 pour discriminer la lignée rfi+ en plus d'avoir une VIP supérieure à 1,5 dans la PLS-DA en 2019 (Tableau II.2.6).

Tableau II.2.6 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les lignées génétiques d'efficacité alimentaire lors de la phase MIX. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans la lignée rfi- ou dans la lignée rfi+, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.

Analyse	Paramètre	2018	2019	2020
PLS-DA	AUROC (ncomp)	0,96 (6)	0,93 (5)	1 (14)
	p-valeur \downarrow	0,17	0,23	0,33
	VIP>1,5	<i>Neocallimastigaceae/U G 13</i> <i>Entodinium</i>	<i>Cyllumyces</i> <i>Dasytricha</i>	Ø
Selbal	AUROC	0,89	0,88	0,83
	Global balance	<i>Heteromita</i> <i>Eremoplastron</i> <i>Trichostomatia/UG 8</i> <i>Neocallimastigaceae/ Orpinomyces</i> <i>Neocallimastix</i> <i>Diplodinium</i> <i>Trichostomatia/UG 10</i> <i>Pleosporales/ Multiaffiliation 1</i> <i>Trichostomatia/UG11</i> <i>Neocallimastigaceae/ Multiaffiliation 7</i> <i>Polyplastron</i> <i>Entodinium</i> <i>Dasytricha</i>	<i>Neophaeosphaeria</i> <i>Cyllumyces</i> <i>Vishniacozyma</i> <i>Pleosporales</i> <i>Multiaffiliation 1</i> <i>Pleosporales/UG5</i> <i>Gregarina</i> <i>Dasytricha</i>	<i>Piromyces</i> <i>Cyllumyces</i> <i>Pleosporaceae/ Multiaffiliation 3</i>
ANOVA	p-valeur	<i>Dasytricha</i> *	<i>Cyllumyces</i> *	Ø

\downarrow p-valeur obtenue par un test de permutations basé sur la validation croisée (MVA.test) ; *p < 0,1 ; **p < 0,05 après FDR ; UG=unknown genus.

Groupes phénotypiques :

La discrimination par PLS-DA des groupes phénotypiques n'a pas été significative d'après le test de permutation (AUROC avec 4 composantes =0,79 ; p=0,64). Cependant les deux approches multivariées (PLS-DA et selbal) mettent en avant les mêmes genres pour la discrimination des groupes pRFI_{-M} et pRFI_{+M}, à savoir le genre *Cladosporium* et un genre appartenant à l'ordre des Pleosporales, tous deux associés avec les animaux inefficients et le genre *Orpinomyces* appartenant à la famille des Neocallimastigaceae associé avec les animaux efficaces (Figure II.2.16).

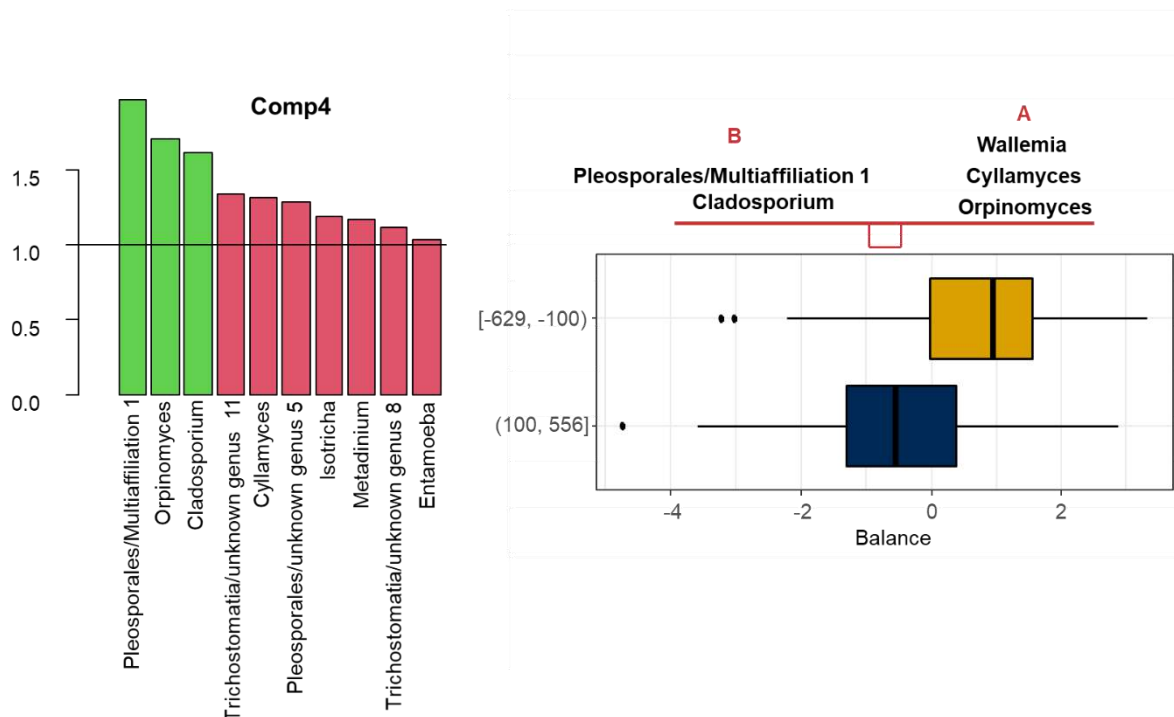


Figure II.2.16 : Importance des genres eucaryotes dans la discrimination des groupes phénotypiques en phase MIX estimée par leur VIP en PLS-DA (à gauche) et leur sélection dans la balance globale (selbal) (à droite).

En accord avec le manque de significativité de la discrimination par approche multivariée, aucun genre n'était différemment abondant entre les deux groupes phénotypiques lorsqu'une ANOVA a été réalisée.

Lorsque les années étaient traitées séparément, le test de permutation basé sur la validation croisée rejetait les discriminations par PLS-DA mais ce rejet était probablement dû à la petite taille des jeux de données avec seulement 39, 41 et 26 animaux conservés en 2018, 2019 et 2020, respectivement, et un déséquilibre entre le nombre d'animaux pRFI_{-M} et pRFI_{+M} en 2018 et 2019 pouvant poser problème lors des validations croisées.

En revanche, les ANOVA ont, elles, mis en évidence des différences entre les groupes phénotypiques (Tableau II.2.7).

Tableau II.2.7 : Résumé des analyses année par année des genres eucaryotes et de leurs liens avec les groupes phénotypiques d'efficacité alimentaire lors de la phase MIX. Lorsque l'abondance relative d'un genre est plus importante dans le groupe pRFI_{-M} ou dans le groupe pRFI_{+M}, ce genre est représenté en doré ou en bleu respectivement.

Analyse	Paramètre	2018	2019	2020
PLS-DA	AUROC (ncomp)	1 (10)	0,99 (11)	1 (3)
	p-valeur _↓	0,61	0,76	0,37
	VIP>1,5	<i>Cladosporium</i>	∅	∅
Selbal	AUROC	0,95	0,83	0,96
	Global balance	<i>Aspergillus</i> <i>UG 6</i> <i>Plectosphaerella</i> <i>Multiaffiliation 6</i> <i>Heteromita</i> <i>Polyplastron</i> <i>Cyllamyces</i> <i>Multiaffiliation 7</i> <i>Entodinium</i> <i>Multiaffiliation 5</i> <i>Wallemia</i> <i>Isotricha</i> <i>Vishniacozyma</i> <i>Cladosporium</i>	<i>UG 10</i> <i>Tritrichomonas</i> <i>Multiaffiliation 1</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Entamoeba</i> <i>Cladosporium</i> <i>Diploplastron</i>	<i>Orpinomyces</i> <i>Tritrichomonas</i> <i>Diploplastron</i> <i>Polyplastron</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Entodinium</i> <i>UG 11</i>
ANOVA	p-valeur	<i>Cladosporium</i> ** <i>Entodinium</i> ** <i>UG 8</i> * <i>Dasytricha</i> * <i>Neocallimastix</i> ** <i>Eremoplastron</i> * <i>UG 9</i> *	<i>Dasytricha</i> ** <i>Diploplastron</i> ** <i>Cyllamyces</i> ** <i>Multiaffiliation 6</i> ** <i>Ophryoscolex</i> ** <i>Multiaffiliation 7</i> ** <i>Entodinium</i> ** <i>Eremoplastron</i> * <i>Piromyces</i> *	<i>UG 11</i> *

↓ p-valeur obtenue par un test de permutations basé sur la validation croisée (MVA.test) ; *p <0,1 ; **p<0.05 après FDR.

d) Discussion

Sur la base d'une analyse par observation microscopique et détermination morphologique des populations de ciliés, Francisco et al. ont estimé l'abondance de ciliés dans le rumen d'agneaux à $1,35 \times 10^6/\text{mL}$, 86% de ceux-ci étant identifiés comme appartenant au genre *Entodinium* et le reste étant majoritairement constitué d'*Epidinium*, d'*Isotricha*, de *Diplodinium*, d'*Ophryoscolex* et de *Polyplastron* (Francisco et al., 2019). Ces résultats sont cohérents avec les proportions obtenues par comptage ou séquençage chez d'autres espèces de ruminants (Berber & Gürelli, 2019; Kišidayová et al., 2021; Shin et al., 2004). Les protozoaires identifiés dans notre étude par séquençage de l'ARNr 18S appartenaient aux mêmes genres à l'exception près que, dans la base SILVA 138.1, les protozoaires appartenant au « genre *Epidinium* » sont identifiés comme appartenant au genre *Ophryoscolex*. Par ailleurs, les populations de champignons anaérobies dans le rumen d'ovins ont été estimées à un ordre de grandeur de 10^4 - $10^5/\text{mL}$ ce qui correspond aux proportions de champignons anaérobies et de procaryotes obtenues à l'issue de nos séquençages (France et al., 1990; Lwin et al., 2011).

En phase CONC, un genre de protozoaire en particulier est ressorti en lien avec les lignées génétiques et les groupes phénotypiques par le biais des différentes analyses. En effet, le genre *Metadinium* a été sélectionné dans les balances globales à la fois pour discriminer la lignée rfi+ et le groupe pRFI+C et présentait dans chacune des PLS-DA une valeur VIP>1,5 témoignant de son importance dans la discrimination. Lorsque les analyses étaient menées année par année, le genre *Metadinium* était associé à la lignée rfi+ par selbal quelle que soit l'année et avec le groupe phénotypique pRFI+C en 2018. Ce genre est un genre très minoritaire dont la prévalence est, dans la plupart des études, similaire à celle retrouvée dans nos échantillons, à savoir 30-40% et dont l'abondance relative est inférieure à 1% des séquences eucaryotes dans notre étude et à 1% des ciliés dans la littérature (Berber & Gürelli, 2019; Kišidayová et al., 2021). Au contraire, *Entodinium* et *Isotricha*, les protozoaires majoritaires dans le rumen des agneaux étaient plutôt associés au groupe pRFI-C dans la balance globale et en particulier en 2018 et 2020. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus sur 48 taurillons de 3 races différentes nourries avec un régime riche en concentrés (Zhang et al., 2020a). Cependant, bien que le genre *Entodinium* ait été associé aux animaux efficients dans leur étude, ce genre ne représentait qu'une proportion assez faible des séquences affiliées aux protozoaires et le régime avait la particularité de contenir du monensin dont on sait qu'il affecte la communauté bactérienne et potentiellement, indirectement, la communauté de protozoaires. De la même façon, une abondance relative plus importante bien que non significative a été retrouvée chez les taurillons

efficacités (RFI < -0,5 SD) par rapport aux inefficacités (RFI > 0,5 SD) nourris avec un régime concentré contenant lui aussi du monensin (67% contre 81% des séquences de protozoaires, $p=0,19$) (Clemmons et al., 2021). L'absence de significativité pourrait être liée au manque de puissance puisque l'étude compare 14 animaux inefficacités à 10 animaux efficaces. Newbold et al. ont suggéré à partir d'une expérience de défaunation-refaunation sur des ovins nourris avec un régime mixte riche en amidon que les animaux non-défaunés présentaient une diminution plus rapide du lactate ruminal infusé et une augmentation de la production d'AGV et de la proportion de propionate (Newbold et al., 1986). Une autre hypothèse pouvant expliquer l'intérêt des protozoaires, lorsqu'un régime riche en concentrés est distribué aux animaux, est la capacité de ceux-ci à capturer des particules riches en amidon et en glucides solubles et à prévenir une chute brutale du pH ruminal (Newbold et al., 2015).

Le genre fongique *Sporobolomyces* associé par selbal au groupe phénotypique pRFI_C et au groupe phénotypique pRFI_M en 2019 et 2020 est un genre très minoritaire (représentant moins de 1% des séquences fongiques identifiées dans le rumen) et plutôt associé aux moisissures qui poussent dans un environnement aérobie sur les végétaux. Il est possible que son abondance relative plus importante, mais tout de même faible, chez les animaux phénotypiquement inefficacités soit proportionnelle à la quantité d'aliments, en particulier de foin, ingérés.

En phase MIX, les multiples analyses discriminantes ont révélé l'importance du genre *Cladosporium*, du genre *Orpinomyces*, particulièrement abondant et prévalent dans les prélèvements automnaux et d'un genre non affilié de l'ordre des Pleosporales. Par ailleurs, le selbal associe également le genre *Cyllumyces* appartenant à la famille des Neocallimastigaceae ainsi que le genre *Wallemia*, une moisissure retrouvée en abondance plus importante dans le rumen des animaux de la période automnale de 2018 aux animaux efficaces. Lorsque les analyses ont été menées séparément, le genre *Wallemia* a été associé au groupe pRFI_M en 2018. Les champignons identifiés dans le rumen peuvent avoir plusieurs origines : ils peuvent s'être multipliés dans le rumen dans des conditions anaérobies propres à leur survie, comme pour les Neocallimastigaceae, ou provenir de l'aliment qui aurait été mal conservé et aurait moisie. De très rares études sont parvenues à identifier des différences de composition fongique entre animaux efficaces et inefficacités. En particulier l'étude de Lopes et al. a montré qu'une OTU appartenant au genre *Orpinomyces* était spécifique des zébus efficaces quand les autres OTUs du genre *Orpinomyces* étaient partagées et ne différaient pas en abondance relative tandis que les animaux inefficacités étaient seuls à présenter des OTUs appartenant au genre *Neocallimastix* (Lopes et al., 2019). Ces résultats, cohérents avec ceux obtenus lors des

prélèvements de la phase MIX de notre étude ont été obtenus sous un régime mixte à dominante de concentrés. Aucune étude n'a reporté d'association particulière entre le genre *Cyllumyces* et l'efficacité alimentaire. Les champignons anaérobies produisent des enzymes qui leur permettent de dégrader les glucides pariétaux ainsi et sont capables de coloniser les particules végétales grâce à leurs rhizoïdes (Akin & Borneman, 1990). Une amélioration de la dégradabilité de la matière organique d'une ration riche en glucides pariétaux est obtenue par addition de Neocallimastigaceae *in vitro* et quelques études pointent une amélioration de la digestibilité de la matière organique et de l'efficacité alimentaire chez des animaux nourris avec un régime riche en fourrages et supplémentés par des champignons anaérobies comme *Orpinomyces* sp ou *Piromyces* sp *in vivo* (Paul et al., 2004; Puniya et al., 2015; Tripathi et al., 2007). De ce fait, une part de la variabilité de l'efficacité alimentaire sous un régime mixte pourrait provenir des différences de communautés fongiques dans le rumen.

e) Conclusion

En conclusion il semble que les liens entre communauté eucaryote et efficacité alimentaire varient en fonction du régime avec un impact plus important des populations de protozoaires au régime CONC et des champignons au régime MIX. En particulier, le genre *Metadinium* a été rapporté comme plus prévalent chez les animaux inefficients en phase CONC et son abondance relative était, de fait, plus faible en moyenne dans ce groupe d'animaux tandis qu'en phase MIX, des champignons anaérobies appartenant à la famille des Neocallimastigaceae étaient conservés dans la balance discriminant les animaux efficaces des inefficients.

Chapitre 3. Le profil en Acides Gras Longs du rumen est-il lié aux phénotypes d'ingestion, de croissance et d'efficacité alimentaire chez les ovins Romane mâles ?

Objectifs :

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer les liens, peu étudiés dans la littérature, entre le profil en acides gras longs du rumen et les paramètres d'ingestion, de croissance et d'efficacité alimentaire chez les ovins mâles de race Romane sélectionnés pour leur efficacité ou inefficacité alimentaire.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un poster présenté au congrès de l'Association Européenne de Productions Animales (EAAP) en 2022 à Porto (Chapitre 3.2) ainsi que de la rédaction d'un article présenté dans les pages suivantes.

Conclusions :

Contrairement aux conclusions avancées par les rares travaux ayant étudié les liens entre AG longs ruminiaux et efficacité alimentaire, aucune différence de profil d'AG, que cela soit pour les intermédiaires de biohydrogénation ou les AG issus de synthèse microbienne n'a été mise en évidence entre animaux efficaces et inefficaces. Les animaux efficaces avaient, tout de même, une abondance relative de 16 :1cis9 plus faible que les inefficaces en phase CONC. En revanche, de fortes corrélations entre AG et genres microbiens ont été révélées, en particulier en phase CONC.

1. Associations entre les profils des acides gras longs ruminiaux et l'efficience alimentaire.

Long-chain fatty acid profiles do not differ in Romane lambs selected for high and low residual feed intake.

1.Introduction

In the current ecological and sociological context, livestock production has to improve its sustainability. One way of doing so is by increasing feed efficiency and therefore reducing farm costs and negative impacts on the environment (Herrero et al., 2013). Overall, mechanisms underlying feed efficiency are still unknown even though it is quite widely accepted that no single phenomenon can be responsible for the variation in feed efficiency. Several hypotheses have been put forward, both involving animals' digestion, metabolism and activity (Herd et al., 2004). Due to the particularity of ruminants' digestion, the rumen and its microbiota have been the focus of many studies. Most of them linked bacterial beta-diversity in the rumen or relative abundances of specific microorganisms and feed efficiency (Perea et al., 2017). Some of them also explored the links between microbial fermentative products, such as Volatile Fatty Acids (VFA), and feed efficiency (Arce-Recinos et al., 2022a; Ellison et al., 2017).

Very few studies linked rumen long-chain fatty acids (FA) or biohydrogenation patterns and feed efficiency either in dairy sheep (Toral et al., 2021) or steers (Artegoitia et al., 2017). Biohydrogenation (BH) is the process by which microorganisms hydrogenate unsaturated fatty acids that could be harmful for them (Enjalbert et al., 2017; Lourenço et al., 2010). This process results in the more or less complete saturation of unsaturated fatty acid yielding multiple intermediates, in particular *trans*-containing intermediates such as conjugated fatty acids (Lee & Jenkins, 2011). Rumenic acid (C18:2 c9,t11) which is the major conjugated fatty acid in ruminants meat has been associated with anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties (Lee et al., 2005). Moreover, an increase in C18:1t10, also called *trans*-10 shift has been associated with an increase in adipose tissue deposition and a decrease in c9t11-CLA (Bessa et al., 2015). Thus, in addition to potential effects on feed efficiency, biohydrogenation is linked with animals' body composition and nutritional properties of ruminants' meat. To our knowledge, no study has been led, linking rumen FA and feed efficiency in meat sheep. In the rumen, FA can either be issued from lipolysis of esterified plant lipids and subsequent transformations such as BH or microbial synthesis from VFA resulting in microbial lipids or secondary products such as odd and branched-chain fatty acids or fatty aldehydes.

The purpose of this study was to identify the differences in long-chain FA profiles in animals considered efficient or inefficient either according to divergent selection for feed efficiency or considering their actual feed efficiency phenotypes.

2. Material and methods

2.1 Animals

Since 2015, a divergent genetic selection on RFI has been led at the INRAE experimental unit P3R in Bourges (<https://doi.org/10.15454/1.5483259352597417E12>). The divergent selection has been described elsewhere (Tortereau et al., 2020) but, in short, every year, male lambs were phenotyped during a 6-week feeding intake trial during which their feed intake of a 100% concentrate diet was registered every day and averaged to calculate their residual feed intake. PEST software was used to estimate their breeding value for RFI. Extreme animals (based on the breeding value) were kept as sires to initiate the divergent lines subsequently renewed by selecting the most efficient sires in the rfi- line (efficient animals) and the least efficient in the rfi+ line (inefficient animals). A total of 277 lambs belonging to the 2nd (n=103) and 3rd (n=174) generations of divergent selection were bred in respectively 6, 5 and 4 pens in 2018 (the 103 lambs of the 2nd generation), 2019 (101 of the 3rd generation) and 2020 (73 lambs of the 3rd generation), respectively, and phenotyped under the same *ad libitum* diet used for selection (CONC phase). Groups were constituted based on the lambs' body weights at the beginning of the adaptation period (i.e when lambs were 107±12 days of age).

Animals with the most extreme breeding values were kept for a second phase during which they were fed a mixed ration containing two thirds of orchard hay and one third of concentrate (MIX phase). In 2018, this ration was distributed as a TMR through two automatic forage feeders while in 2019 and 2020 forage and concentrate were distributed separately allowing a better estimation of each constituent's consumption. The diet was calculated to enable a growth of 125g/day according to INRA standards (INRA, 2018) and in 2019 and 2020 the concentrate consumption was limited to 700g/day to match animals' requirements and the consumption animals from 2018 had. This second phase was carried out in two separate phases (summer and fall) due to the availability of forage feeders. In the summer (29 animals in 2018, 36 in 2019), animals were 204±7 days old and in the fall (29 animals in 2018, 35 in 2019, 38 in 2020), they were 263±18 days old.

During the MIX phase, animals were housed in two pens per period with a density of fifteen animals per pen per period in 2018 and twenty in 2019 and 2020. Animals were housed on litter chips to avoid straw consumption that would falsify the measured feed intake.

2.2 RFI calculation and group attribution

C and M subscripts will be used throughout this study to describe phenotypes and features associated with the CONC and the MIX phases respectively. During the CONC phase, RFI_C was calculated using a multiple linear regression of Average Daily Feed Intake (ADFI_C) on End-Phase Metabolic Weight (E-MW_C), Average Daily Gain (ADG_C) and body composition parameters (Back Fat Thickness (BFT_C) and longissimus dorsi Muscle Depth (MD_C)) measured by ultrasound at the end of the trial (1). ADFI was determined as the mean of daily cumulative feed intake during the six-week period. To compensate for the difference in growth status and climate between the summer and the fall periods of the MIX phase, a period effect was added to the RFI calculation model during this phase (2).

$$(1) \text{ADFI}_{C,i} = \mu + \beta_1(\text{E-W}_{C,i})0.75 + \beta_2\text{ADG}_{C,i} + \beta_3\text{MD}_{C,i} + \beta_4\text{BFT}_{C,i} + \text{RFI}_{C,i}$$

$$(2) \text{ADFI}_{M,i} = \mu + \beta_1(\text{E-W}_{M,i})0.75 + \beta_2\text{ADG}_{M,i} + \beta_3\text{MD}_{M,i} + \beta_4\text{BFT}_{M,i} + \text{Period}_M + \text{RFI}_{M,i}$$

Phenotypic RFI (pRFI) groups were constituted in phase CONC and phase MIX by keeping animals having a RFI (RFI_C or RFI_M) higher than 0.5 SD or lower than -0.5 SD. Phenotypic groups will be written down as pRFI+ and pRFI- for extreme inefficient and efficient animals respectively, using the same subscripts as for other phenotypes to differentiate phase CONC and phase MIX.

2.3 Diet

During CONC phase, the diet consisted in a 100% concentrate custom-made by SOREAL Nutrition Animale (Vonnas, France) that contained beet pulp, wheat bran, barley grain, corn, rapeseed meal, sunflower meal and pelleted lucerne (905 gDM/kg, 17.3% crude protein, 14.9% crude fiber and 1.9% crude fat in 2018, 888 gDM/kg, 17.7% crude protein, 14.7% crude fiber and 3.4% crude fat in 2019 and 883 gDM/kg, 17.6% crude protein, 14.5% crude fiber and 2.5% crude fat in 2020, on a DM basis). During the MIX phase, the diet consisted in a mixed ration with approximately two thirds of orchard hay and one third of a second concentrate from SOREAL Nutrition Animale (Vonnas, France) made up of wheat, barley, wheat bran and rapeseed meal (883gDM/kg, 20% crude protein, 11% crude fiber, 4% crude fat on DM basis). Chemical composition of orchard hay used in each phase was summed in Tableau II.3.1.

Tableau II.3.1 : Chemical composition of orchard hay used in the different periods of the MIX phase.

	MIX 2018	MIX 19 Summer	MIX 2019 Fall	MIX 2020
DM (g/kg)	914	914	916	900
Crude Proteins (%DM)*	6.5	8.6	6.7	9.4
Crude Fiber (%DM)*	37.3	35.5	35.6	38.9
Crude Fat (%DM) *	1.7	1.8	1.8	1.7

*Chemical composition of feed was determined according to the Association of Official Analytical procedures (Association of Official Analytical Chemists, 1998).

2.4 Sampling

277 and 167 animals were sampled respectively during the CONC phase and the MIX phase. Feeders were stopped the night prior to the sampling resulting in at least ten to eleven hours of fasting and the drinking devices were stopped two hours before the sampling started to avoid an excessive dilution of ruminal content. However, during the CONC phase of 2019 and the Fall period of the MIX phase of 2018, the automatic feeders were not successfully stopped and animals had access to the feed until the beginning of the sampling.

Rumen fluid was sampled using a medical gastric probe and a vacuum pump. It was then transferred to several tubes for further analyses. For microbiota analyses, rumen fluid was transferred into 2mL microtubes, immediately frozen into liquid nitrogen before being relocated into a -80°C freezer for conservation. For FA analyses it was transferred to 60mL propylene straight tubes before being transferred to a -20°C freezer. Samples were freeze-dried before subsequent analysis.

2.5 Long-chain fatty acid

2.5.1 Gas chromatography

Method for measuring the concentration of FA in the rumen content was adapted from Alves et al. 2013 (Alves et al., 2013). Briefly, 250mg of freeze-dried rumen content was weighed and introduced into incubation tubes capped tightly with teflon caps. Then, 1mL of dry toluen and 1ml of 1mg/ml nonadecanoic acid (C19:0) in hexane used as an internal standard were added to the tubes that were left for 10min to sonicate in an ultrasound bath. Afterwards, 2mL of 0.5M sodium methoxide in methanol was added and the tubes were vortexed for 10s before being put into a 50°C water bath for 15min. They were then left to cool down to room temperature and 3ml of 1,25M HCl in methanol was added to the tubes before they were vortexed for 10s and incubated for 20min in a 80°C water bath with 40rpm translational agitation. After cooling down to room temperature, 2ml of aqueous 6% K₂CO₃ was added slowly to the tubes. Then 2ml of n-hexane with 25mg/L of Butylated hydroxyl-toluen (BHT), were added and

the tubes were vortexed for 10s and centrifuged for 5min. Supernatant was collected from the tubes and placed into a new incubation tube containing around 0.5mg anhydrous sodium sulfate, then 2ml of n-hexane with BHT was added once again to the first tube before it was vortexed and centrifuged the same way as previously described. Supernatant was taken from the tube and added to the same new incubation tube that was then centrifuged for 5min. Liquid from this tube was transferred to a new incubation tube and the hexane content was evaporated in a stream of nitrogen (N₂) at 37°C. After evaporation of the hexane, the content of the tube was dissolved into 1ml of hexane and transferred to a chromatography vial.

Fatty acids methyl esters (FAME) were then analysed using a Shimadzu GC 2010 Plus gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a flame-ionization detector. Injection temperature was 250°C and helium was used a carrier gas at a flow rate of 1ml/min. The initial oven temperature of 50°C was held for 1min, increased at 50°C/min to 150°C and held for 20 min, increased at 1°C/min to 190°C, then increased at 2°C/ min to 220°C and held for 40 min. The split ratio that was used ranged from 50:1 to 100:1 depending on the initial concentration of the samples.

Identification of the FAME was performed by comparing sample peak retention times to those of FAME standard mixtures (Sigma, St.Louis, MO, United States of America). Peaks that could not be identified with the mixtures were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

Each concentrate and forage distributed from 2018 to 2020 was analysed in the same way as rumen samples in order to determine their lipid profile.

2.5.2 Bacterial and archaeal profiles

Bacteria and archaea profiles were obtained by sequencing of the 16SrRNA gene after DNA extraction and resulting Operational Taxonomy Unit (OTU) were affiliated using SILVA 132 database. The whole procedure and bioinformatics treatment is described in Touitou (Chapitre 2.1).

2.5.3 Data transformation

FAME that were identified were subsequently expressed as a composition *i.e.* as percentages, the sum of which equal to 1. This allows to compare samples which may differ in terms of total FA solely based on their profile. When peaks were too small to be quantified it resulted in below detection limit zeros which were transformed using Geometric Bayesian Multiplicative (GBM) replacement in order to allow the use of Centered-Log-Ratio (CLR) transformation. Microbial profiles were also expressed as compositions, and after filtering on prevalence as described in Touitou et al. (Chapitre 2.1), the same procedure was applied to them.

2.6 Statistics

2.6.1 Exploratory multivariate analyses

Firstly, Principal Component Analysis (PCA) was used to initiate dimensionality reduction of both CONC and MIX fatty acid datasets constituted of 70 variables and 275 and 167 samples respectively. There is no clear consensus on how to select the optimal number of components to take into account in PCA but several approaches can be found in the literature. Ideally, we want the explained variance to be the highest it can be while keeping the number of components as low as possible. We decided to keep the lowest number of components that allowed to keep 95% of the cumulative variance or did not improve the amount of variation explained by more than 5%, if the number of components would happen to be larger than a tenth of the number of variables. Then, a t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) was performed with a number of iterations set to 1000 to minimize calculation time while still reaching convergence and with a perplexity empirically set to square root of the sample size, which is consistent with the initial article from van der Maaten (van der Maaten & Hinton, 2008) and with the empirical approach developed by Oskolkov (Oskolkov, 2019). This allowed for the identification of strong grouping effects that will be taken into account in subsequent analyses such as the diet or the year and period effects.

2.6.2 Multivariate discriminant analyses

Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) were applied separately to the CONC and the MIX datasets. To account for other experimental factors such as the pen, the fact that the feeder was stopped prior to sampling or not (hereafter called feeder effect) and the period for MIX phase, PLS-DA was applied on the residuals of the following models:

- (1) (CONC): $\text{CLR}(\text{FA}_i) \sim \mu + \text{year} + \text{pen}\% \text{in}\% \text{year} + \text{feeder_effe} + \text{resid}(\text{CLR}(\text{FA}_i))$
- (2) (MIX): $\text{CLR}(\text{FA}_i) \sim \mu + \text{year} + \text{pen}\% \text{in}\% \text{period} + \text{feeder_effe} + \text{period}\% \text{in}\% \text{year} + \text{resid}(\text{CLR}(\text{FA}_i))$

Both genetic lines (rfi+ and rfi-) and phenotypic efficiency groups (pRFI+ and pRFI-) were used as dichotomous dependent variables for PLS-DA.

Similar PLS-DAs were also applied to each of the periods inside each year to try and identify potential differences in ruminal fatty acid profiles either between genetic lines or between phenotypic efficiency groups. In these analyses, the year and feeder effect were removed from the correction models.

In each PLS-DA analysis, the optimal number of components was determined by maximizing the Area Under the Receiver Operating Curve (AUROC) and a subsequent permutation significance test based on cross-validation using RVAideMemoire package in R was performed to assess the quality of the discrimination. Selection of most discriminatory components was performed using selbal package in R (Rivera-Pinto et al., 2018). Selbal relies on compositional balances and starts by finding the two-component balance that is the most closely associated with a dichotomous response and adds new components until no additional variable improves the optimization parameter.

2.6.3 Univariate analyses

Analysis of Variance (ANOVA) was performed separately between diets based on the two following models:

(CONC): $CLR (FA_i) \sim \mu + year + pen\%in\%year + feeder_effect + GOI + \epsilon_i$

(MIX): $CLR (FA_i) \sim \mu + year + pen\%in\%period + feeder_effect + GOI + period\%in\%year + \epsilon_i$

Fatty acids were used as dependent variables and year, pen and period in the MIX phase were used as fixed effects. Lines and Phenotypic groups were the two explanatory groups of interest (GOI) and p-values for these groups were adjusted for False Discovery Rate (FDR) before interpretation.

2.7 Associations between fatty acids and microbial genera

Sequencing and FA datasets were corrected for undesirable environmental effects applying equations (1) and (2) to the CONC and MIX datasets respectively. Then a sparse-PLS was applied to select the optimal number of components and genera to keep in order to highlight the strongest links between microbial genera and FA.

Due to the lack of consistency in microbial genera identified in the different periods, evidenced by Touitou et al. (Chapitre 2.1) on the same data, Pearson correlations between microbial genera and FA were performed separately for each period inside each year and phase. For each period, microbial genera were filtered with a 20%

prevalence threshold and GBM replacement of zeros and CLR-transformation were applied. Both FA data and microbial data were corrected for pen effect.

3. Results

3.1 Overall description of Fatty Acid Profiles data

The main fatty acids identified in the feed were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and oleic acid (C18:1cis9), the latter being relatively more abundant in concentrates than in forages. Similarly, concentrates had higher proportions of Linoleic Acid (LA, C18:2 n-6) while forages had higher proportions of alpha-linolenic acid (ALA, C18:3 n-3) and of two long-chain aldehydes (Aldehyde-C26:0 and Aldehyde C28:0) (Tableau II.3.2).

Tableau II.3.2 : Fatty acid composition of concentrates and forages from CONC and MIX phases obtained through gas chromatography analysis.

Fatty acid/aldehyde	CONC 18	MIX 18 concentrate	CONC 19	MIX 19 concentrate	CONC 20	MIX 20 concentrate	MIX 18 forage	MIX 19 forage	MIX 20 forage
C14:0	0.42	0.34	0.26	0.11	0.14	0.21	0.56	0.61	0.43
C16:0	32.3	21.73	25.91	21.42	18.94	19.17	26.17	18.23	19.93
C16:1t3	0	0	0	0	0	0	2.78	0.88	1.09
C16:1c9	0.68	0.93	0.4	1.55	1	0.21	0	0	0
C18:0	8.02	4.94	5.14	4.02	2.19	1.85	5.83	5.13	5.48
C18:1c9	32.76	34.83	29.48	25.06	22.53	19.9	5.28	5.73	6.09
C18:1c11	2.08	2.79	1.99	2.33	2.48	1.21	0.41	0.68	0.59
C18:2n-6	19.34	29/37	31.91	39.51	47.68	51.77	14.1	11.55	14.34
C20:0	0.61	0.52	0.45	0.37	0.19	0.27	0.96	1.85	2.11
C18:3n-3	1.59	2.67	2.8	3.25	3.33	4.1	30.82	17.44	20.69
C20:1	0.64	0.62	0.56	0.32	0.61	0.59	0	0	0
C22:0	0.59	0.53	0.47	0.63	0.29	0.26	1.27	1.14	1.26
C24:0	0.62	0.49	0.44	0.89	0.42	0.25	3.91	1.78	2.14
Aldehyde -26:0	0	0	0	0	0	0	3.1	21.42	14.92
C26:0	0.35	0.24	0.2	0.52	0.22	0.21	1.63	4.98	4,14
Aldehyde -28:0	0	0	0	0	0	0	1.65	5.41	4.08
C28:0	0	0	0	0	0	0	1.51	3.16	2.70

PCA was applied to data after GBM/CLR transformation and clearly separated samples from the CONC phase and samples from the MIX phase, the latter having a higher relative abundance of forage-derived aldehyde C26 and C26:0 and the former having a higher trans,C18:1 intermediates relative abundances, particularly that of trans10, C18:1 (Figure II 3.S1). Samples from MIX phase also had significantly lower concentrations of FA ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) than samples from CONC phase (34.3 mg/gDM and 51.3 mg/gDM, respectively). The first two components of the PCA explained 46% of the CLR-transformed dataset variance and less than 5% of the variance was added when a sixth component was added, so five components were kept as initial dimensionality reduction parameter. T-SNE (perplexity=20, initial dimensions=10, final dimensions =2) highlighted three different groups corresponding to each year in phase CONC and tended to separate MIX samples into five clusters corresponding to each of the periods of experiment (Season×Year) in phase MIX (Figure II.3.1).

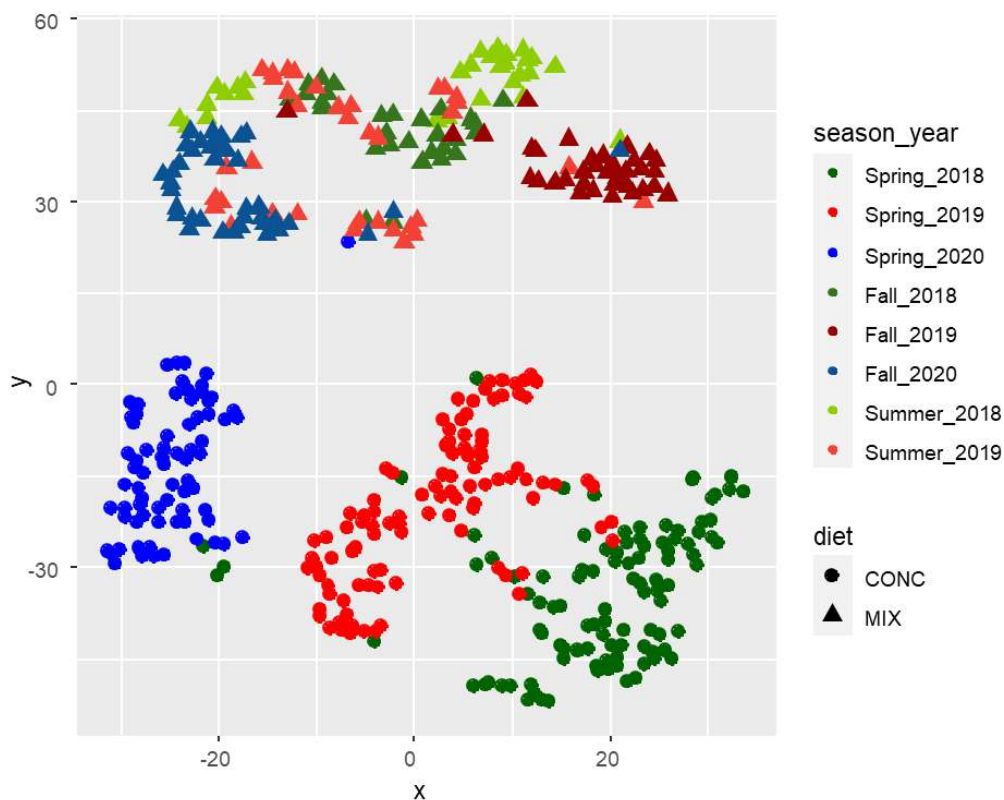


Figure II.3.1 : T-Stochastic Neighbor Embedding illustrating diet and year effects on fatty acid profiles.

3.2 Fatty Acid Profiles and Feed Efficiency

3.2.1 CONC phase

During CONC phase, a majority of the FA retrieved from rumen samples were saturated fatty acids (SFA). In particular, 34.8% of the identified FA were C18:0 and 16.5% were C16:0 (Figure II.3.2). A large proportion of the other FA were trans-C18:1, the most abundant of them being C18:1 trans10 that represented 12.7% of the total FA and half of the trans-C18:1. Notable differences with the FA profile of the feed were a decrease in oleic acid, LA and ALA relative abundances and an increase in the share of C18:0 as well as the apparition of odd- and branched-chain fatty acids (OBCFA) and dimethylacetals which are products of microbial metabolism.

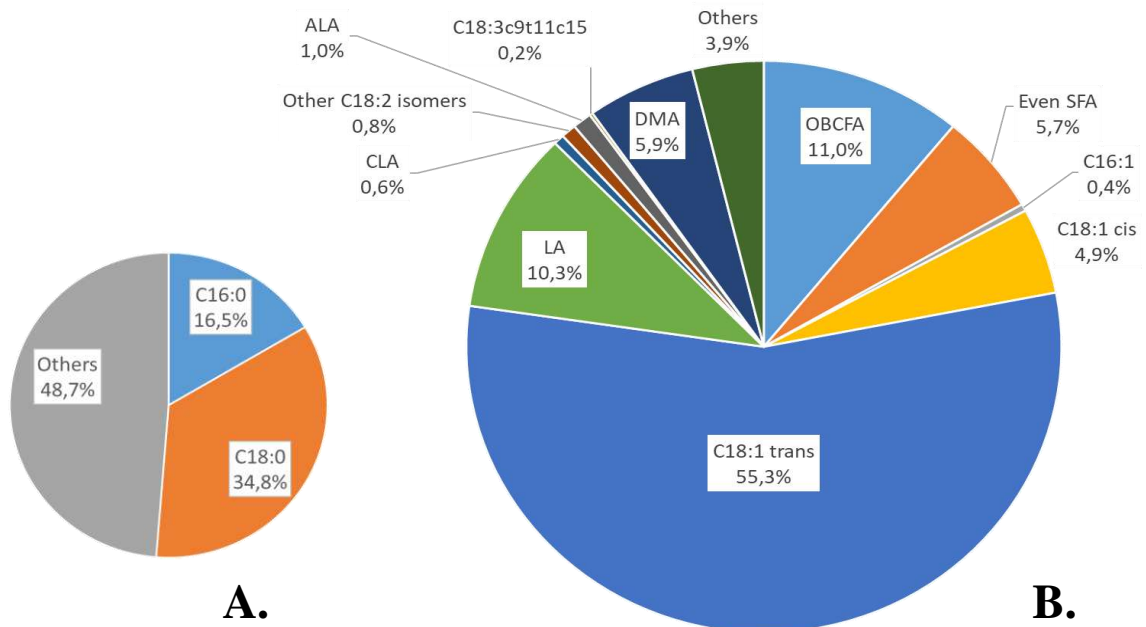


Figure II.3.2 : Fatty acid (FA) profile in phase CONC : A. Proportions of the main saturated FA ; B. Other FA identified by gas chromatography grouped by categories: OBCFA = Odd and Branched-Chain Fatty Acids, Even SFA = Even Saturated Fatty Acids other than C16:0 and C18:0, LA = Linoleic Acid, CLA = Conjugated Linoleic Acids, ALA = Alpha Linolenic Acid, DMA = Dimethylacetals issued from methylation of aldehydes, Others = Phytanoic acid, C20:1, C24:1, oxo-C18:0, cyclo-C17:0.

When PLS-DA was applied to CONC data to discriminate genetic lines the best model according to AUROC kept 9 components (AUROC=0.79) and showed poor and non-significant discrimination (according to MVA permutation test: $p=0.40$). Nine fatty acids were highlighted by selbal to best discriminate lines ((AUROC=0.65), one of them being one of the only two fatty acids with VIP values higher than 1.5 on PLS-DA, namely C16:1c9 associated with line rfi+. The other fatty acid associated with line rfi+ was ALA while unconjugated C18:2 were associated with line rfi- in the balances as well as C18:1c11, iC18:0 and C14:0 (Figure II.3.3A&B). No fatty acid was differentially abundant between genetic lines when univariate analyses were conducted.

When PLS-DA was applied to discriminate phenotypic groups, discrimination was even worse (AUROC with 14 components = 0.81, $p=0.90$). Selection of balances (AUROC=0.66) resulted in C16:1c9 being the only fatty acid associated with pRFI+c group and C13:0, C18:1c11 and C25:0 being associated with pRFI-c group. VIP values higher than 1.5 on the fourteenth component highlighted the importance of the co-eluted C18:2t10c15/C18:2t11c15 associated with pRFI+ according to the loadings of the PLS-DA while C16:1c9 was the main fatty acid associated with pRFI+c on the first component but had a VIP value equal to 1.24 when the 14 components were considered (Figure II.3.3C&D).

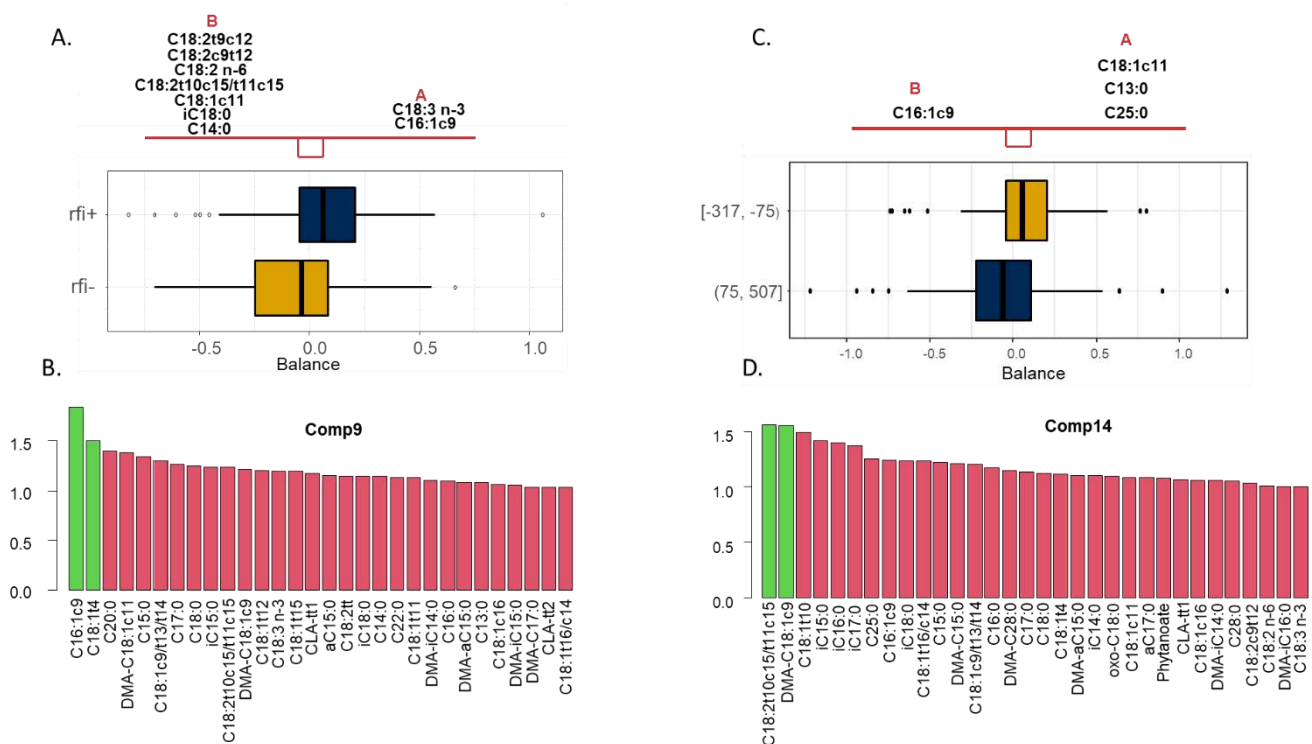


Figure II.3.3 : Best FA to discriminate lines using either selbal (A) or Variable Importance in Projection (VIP) of the best PLS-DA (B) and best FA to discriminate phenotypic efficiency groups using either selbal (C) or VIP (D) in phase CONC.

When analyses were conducted year by year, C16:1c9 was consistently associated with inefficient animals in the global balance throughout the years since it was associated with line rfi+ in 2018 CONC samples and pRFI+c in 2019 and 2020 samples. Lauric acid (C12:0) was associated with pRFI-c in the balances resulting from 2018 and 2019 samples while C18:0 was associated with line rfi+ in 2019 and pRFI+c group in 2020, but showed poor VIP values in the PLS-DA. Besides being associated with pRFI-c group in 2019 and 2020, C24:0 also had high VIP values in the PLS-DA discriminating phenotypic groups these years (1.22 and 1.40, respectively). Overall, out of the 32 fatty acids that were associated with either one line or one phenotypic group, very few were consistently associated twice or more with efficient or inefficient animals and selbal and PLS-DA VIP values did not agree on many associations (Tableau II.3.3).

Tableau II.3.3 : Summary of multivariate analyses discriminating genetic lines (L) or phenotypic efficiency groups (P) in both CONC and MIX phase. When associated with either line rfi- or pRFI- groups by selbal the FA is highlighted in gold; when associated with either line rfi+ or pRFI+ group by selbal the FA is highlighted in blue. Values in highlighted boxes are the VIP values for each FA in the best PLS-DA model.

	CONC phase						MIX phase					
	2018		2019		2020		2018		2019		2020	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
N° of samples	102	63	101	67	73	50	58	39	71	42	38	26
N° of PLS-DA components ↓	14	9	15	8	7	7	6	3	6	6	3	2
AUROC of PLS-DA	0.96	1	0.99	1	1	1	1	1	0.99	1	1	1
p-value ‡	0.81	0.88	0.25	0.79	0.28	0.48	0.30	0.49	0.42	0.72	0.26	0.09
C12:0		1.26		0.96					0.96			
DMA-iC14:0			1.00						1.02			
C13:0				0.93		1.04			1.45			
DMA-C14:0							0.83		1.22		0.60	
DMA-iC15:0								1.78				
DMA-aC15:0							0.92		1.44			
C14:0	1.29				1.08							
DMA-C15:0	0.91											
iC15:0			1.02						0.92			
aC15:0										1.10		
DMA-iC16:0								1.34				
C15:0			1.00		1.01		1.35					
DMA-C16:0						1.31	1.65					
iC16:0									1.08			
C16:0									1.21			
DMA-C17:0										0.62		
C16:1t3/c7											1.26	

c16:1c9	1.05			0.90		1.13			1.25			
Phytanoate									1.43			
C17:0	1.31					0.88			0.97			
DMA-C18:0		0.97										
iC18:0		1.23										
DMA-C18:1c9		2.22										
DMA-C18:1c11		1.27		0.84		1.40						
C18:0			0.96			0.91						
DMA-C17:1											1.34	
C18:1t4						0.91						
C18:1t12			1.19									
C18:1c9/t13/t14				1.02								
C18:1c11									0.93			
C18:1c13			1.11							0.79		
C18:1c15												1.22
C18:2c9t12										1.74		
C18:1c16			1.06									
C18:2t9c12										1.63		1.90
C18:2t10c15/t11c15		0.87										
C18:2 n-6	0.91											
C20:0			1.01									
C18:3 n-3	0.98							1.13				
CLA-c9t11											1.93	
CLA-ct											0.94	
C18:3c9t11c15		0.84		1.12								
C22:0		1.08	1.18			1.03			1.41			
C23:0						0.91			1.06			
C24:0				1.22		1.40						
C24:1				1.02					1.32			
C25:0			0.65			0.89		1.07				
DMA-C26:0						0.96						
C26:0				1.15								
oxo-C18:0											1.61	
DMA-C28:0								0.92				
AUROC of selbal	0.75	0.86	0.78	0.80	0.77	0.91	0.81	0.92	0.89	0.91	0.95	0.93

‡Determined by maximizing AUROC, †p-value resulting from a permutation test on cross-validation.

When applied to evaluate the associations between microbial genera and FA, sPLS using mixOmics package in R resulted in keeping 2 components and 75 and 10 genera on the first and second component respectively. Loadings on the two components of the sPLS are presented in Figure II.3.4 with a 0.2 threshold on absolute loading values. Among biohydrogenation intermediates of C18 feed FA, C18:2t10c15/C18:2t11c15, C18:1t10 and C18:1c15 were associated with *Prevotella 7*, *Acidaminococcus*, *Dialister* and *Megasphaera* on comp 1 and with *Lachnospiraceae ND3007* group, *Anaeroplasma*, *Pseudobutyrvibrio* and *Lachnospiraceae NK3A20* group on comp2 while microbial FA such as ac17:0 or DMA-aC15:0, saturated FA and C18:1t11 were associated with *Ruminococcaceae NK4A214* group, *Selenomonas 1*, *Prevotella 1*, *Christensenellaceae R7* group and *Anaerovibrio* (Figure II.3.4).

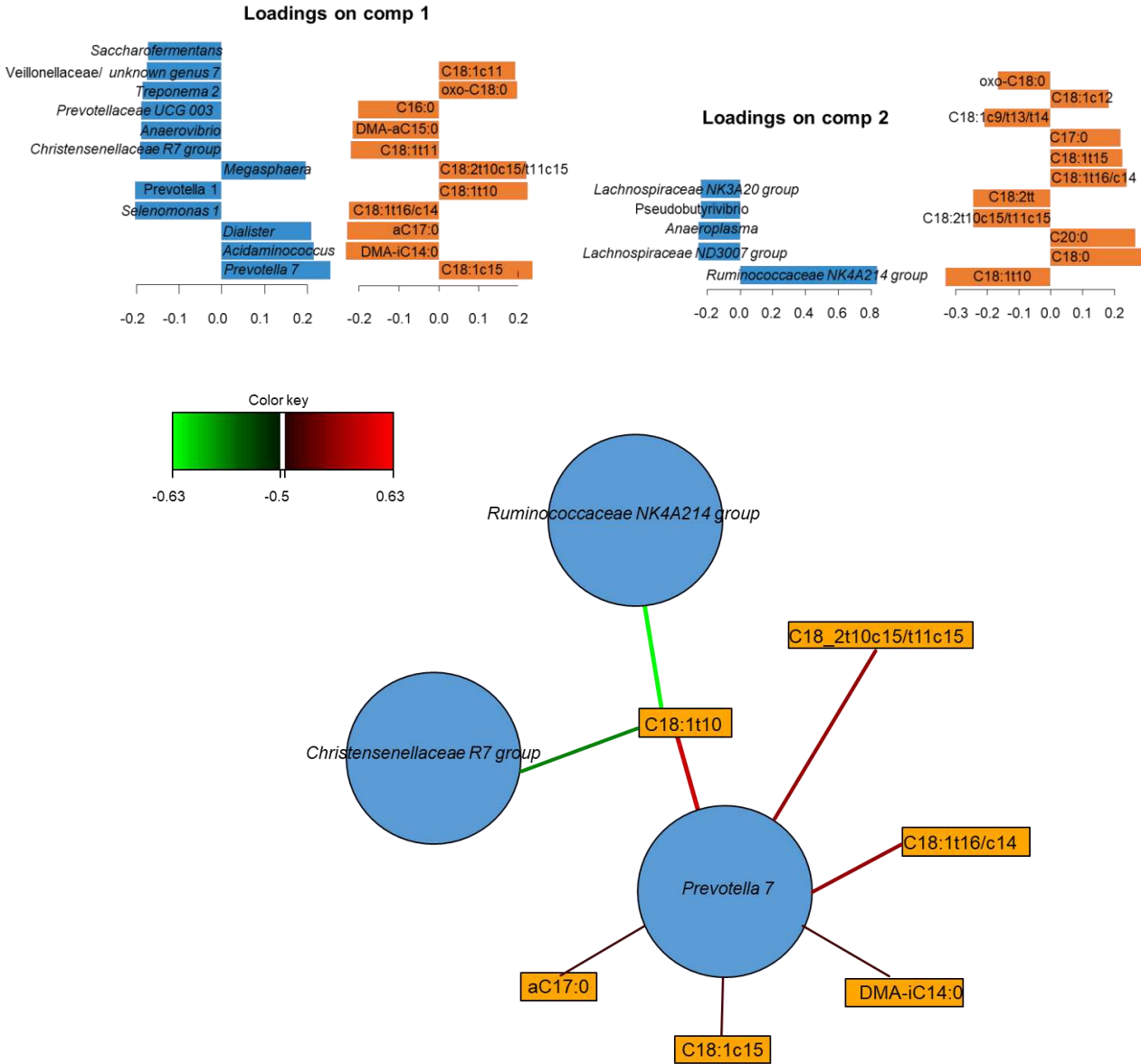


Figure II.3.4 : Main relationships between rumen microbial genera and rumen fatty acids in phase CONC evidenced by a sparse PLS approach.

Correlations between microbial genera and fatty acids were then calculated separately for each year. Genera which correlated the most with fatty acids year by year were often genera that had been identified in all or nearly all samples in each and every year and hence are consistent with sPLS results. For instance, *Prevotella 7* was negatively correlated with C16:0 ($r = -0.70$, $p = 2.0 \times 10^{-14}$; $r = -0.72$, $p = 2.0 \times 10^{-15}$; $r = -0.78$, $p = 3.2 \times 10^{-14}$, in 2018, 2019 and 2020 respectively) and positively correlated with C18:1t10 ($r = 0.55$, $p = 6.3 \times 10^{-8}$; $r = 0.69$, $p = 1.9 \times 10^{-13}$ and $r = 0.71$, $p = 1.6 \times 10^{-12}$ in 2018, 2019 and 2020 respectively). On the other hand, genus *Ruminococcaceae NK4A214 group* was consistently positively correlated with C18:0 and negatively correlated with trans 10 intermediates of ALA biohydrogenation (Figure II.3.5). *Rikenellaceae RC9 group* was positively correlated with C16:0 in 2018 ($r = 0.67$, $p = 1.3 \times 10^{-12}$) and 2019 ($r = 0.71$, $p = 7.7 \times 10^{-6}$) while *Prevotella 9*, identified as one of the genera associated with line rfi+ and pRFI+c in the CONC phase of 2020 (Chapitre 2.1) was positively correlated with C16:1c9 ($r = 0.69$, $p = 9.3 \times 10^{-12}$), C18:1c11 ($r = 0.71$, $p = 1.3 \times 10^{-12}$) and C18:1t10 ($r = 0.47$, $p = 3.2 \times 10^{-5}$) and negatively with C16:0 ($r = -0.70$, $p = 8.5 \times 10^{-12}$). *Prevotella 9* behave the same way as *Prevotella 7*, both evolving in the opposite direction as *Prevotella 1* did (Figure II.3.5). Interestingly, in 2020, *Dialister* was strongly correlated with oxo-C18:0 ($r = 0.70$, $p = 7.3 \times 10^{-10}$). Associations with C18:1t10, C18:1c11 or C16:1c9 were often opposite to associations with DMA and OBCFA (Figure II.3.S1).

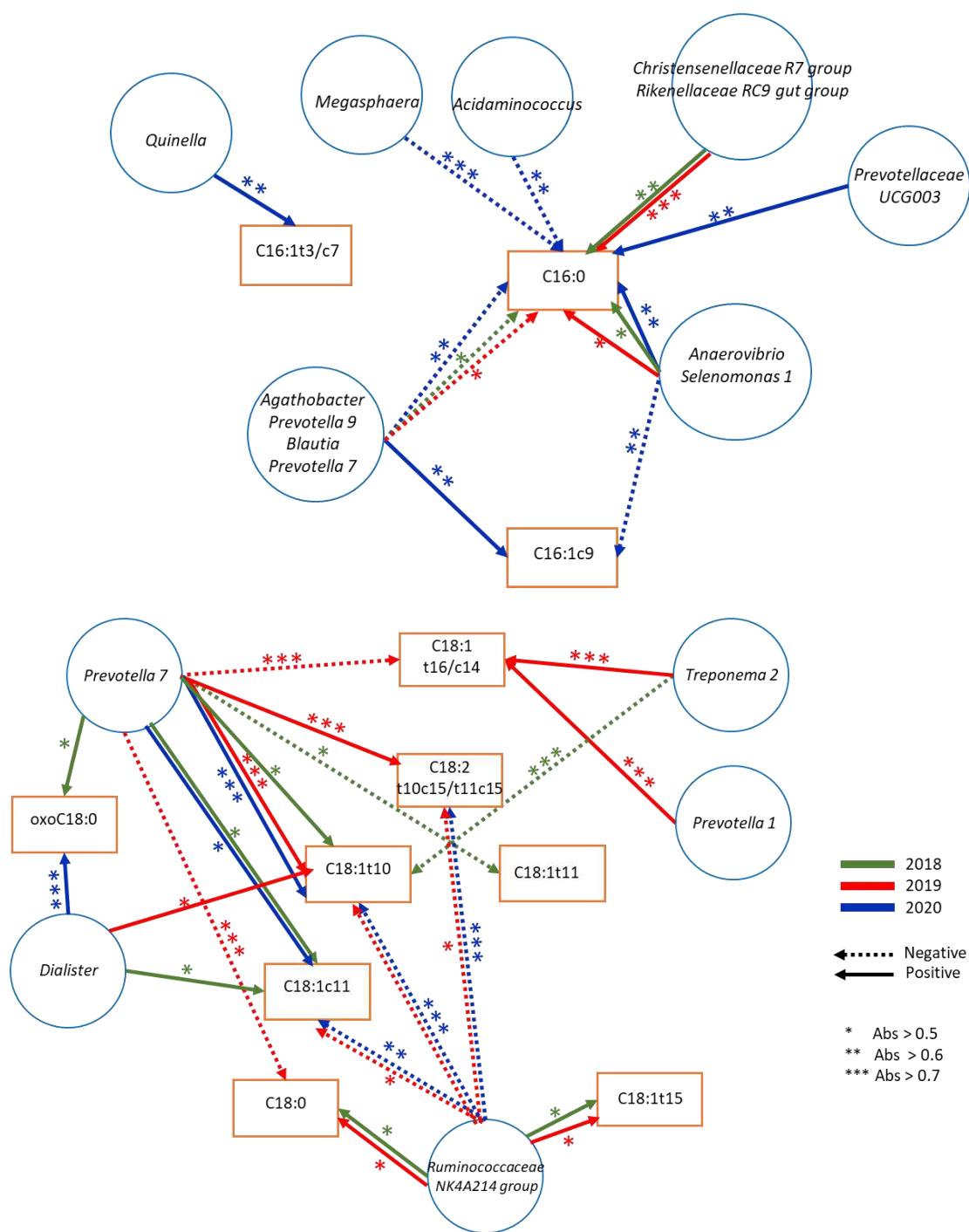


Figure II.3.5 : Summary of the main correlations between rumen prokaryotic genera and rumen C16 and C18 biohydrogenation intermediates.

The main associations between rumen prokaryotic genera and microbial lipids involved *Anaerovibrio*, *Selenomonas 1*, *Saccharofermentans* and *Treponema 2* mainly correlated with DMA iC14:0 and DMA aC15:0 and *Anaerovibrio*, *Christensenellaceae R7 group* and *Rikenellaceae RC9 group* correlated with aC17:0 (Figure II.3.6). Only positive correlations higher than 0.6 are represented on Figure II.3.6 since negative correlations cannot be properly interpreted when dealing with FA that are synthesized in the rumen.

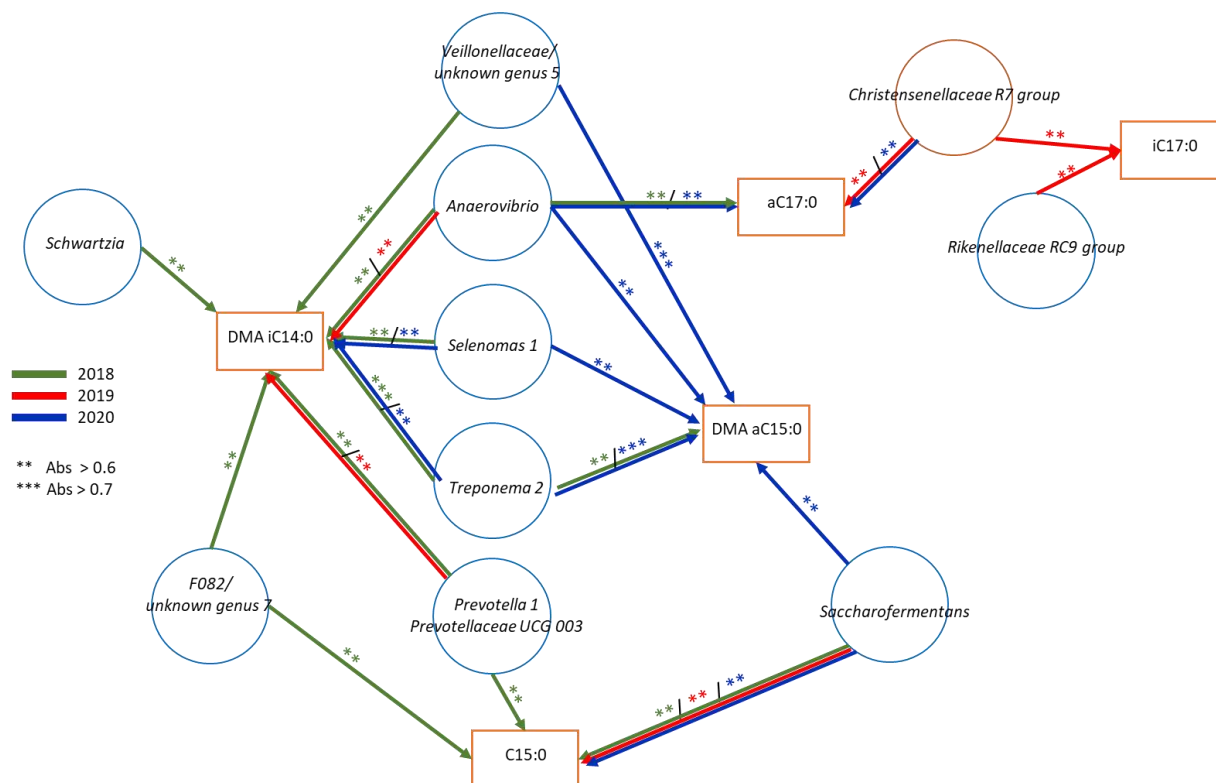


Figure II.3.6 : Summary of the main correlations between rumen prokaryotic genera and microbial lipids (DMA and OBCFA) during the CONC phase.

3.2.2 MIX phase

During MIX phase, 39.7% of the identified lipids were C18:0 and 19.4% were C16:0 and relative concentrations of ALA and C18:3c9t11c15 were low (0.5% and 0.08%, respectively) despite the forage being rich in ALA (17.5-30.8% of identified fatty acids and aldehydes depending on the year) (Figure II.3.7).

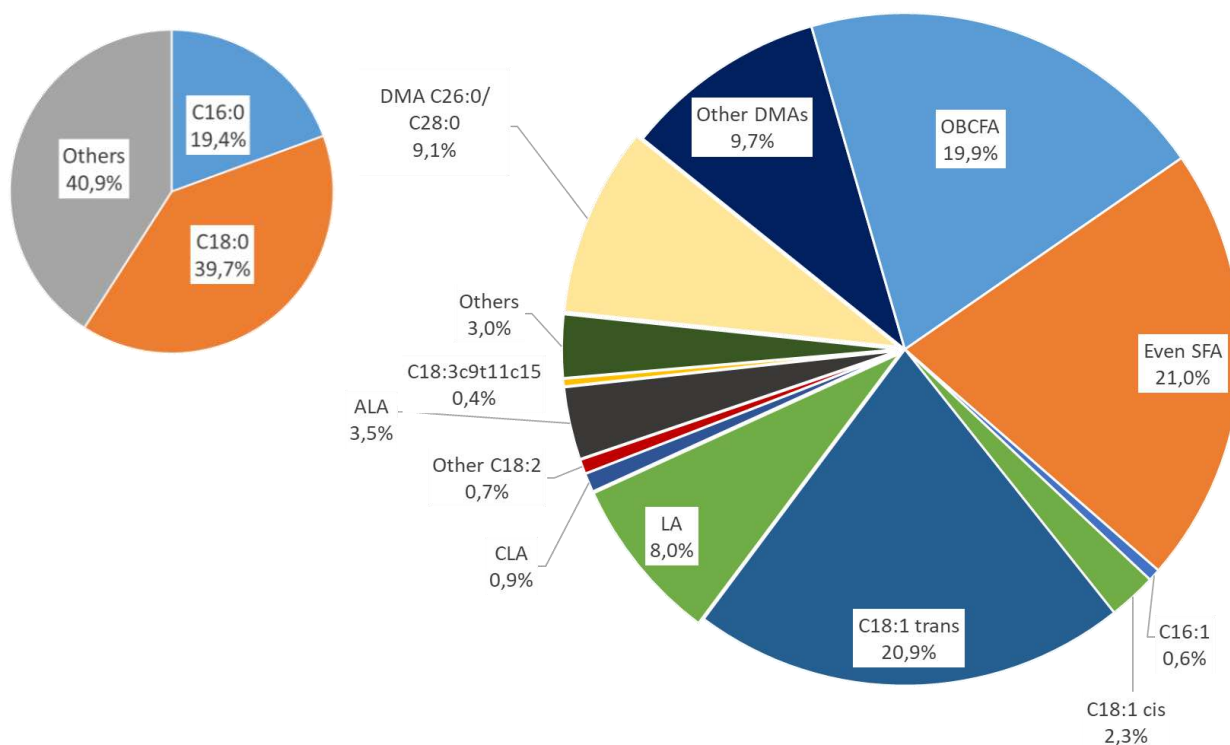


Figure II.3.7 : Fatty acid (FA) profile in phase MIX : A. Proportions of the main saturated FA ; B. Other FA identified by gas chromatography grouped by categories: OBCFA = Odd and Branched-Chain Fatty Acids, Even SFA = Even Saturated Fatty Acids other than C16:0 and C18:0, LA = Linoleic Acid, CLA = Conjugated Linoleic Acids, ALA = Alpha Linolenic Acid, DMA = Dimethylacetals issued from methylation of aldehydes, DMA C26:0 and 28:0 deriving from *Dactylis* aldehydes, Others = Phytanoic acid, C20:1, C24:1, oxo-C18:0, cyclo-C17:0.

When PLS-DA was applied to MIX FA dataset to discriminate genetic lines the best model according to AUROC kept 8 components (AUROC=0.87) and showed poor and non-significant discrimination (according to MVA permutation test: $p=0.61$). The best balance identified by selbal (AUROC = 0.74) was between 11 FA associated with line rfi- and 9 associated with line rfi+ but it showed low consistency with VIP values from PLS-DA (Figures II.3.8A and 8B).

None of the selected FA was differentially abundant between lines when univariate analyses were conducted.

However, when PLS-DA was applied to discriminate phenotypic groups, discrimination was better (AUROC with 8 components = 0.99, $p=0.06$). Three FA had VIP values higher than 1.5 when the 8 components were considered, with DMA-C16:0 and DMA-C26:0 being associated with pRFI+_M and C18:1c16 with pRFI-_M group, and they were the three most important FA in the selection of balances (AUROC = 0.83)

that resulted in 7 FA and aldehydes being associated with pRFI+ group and 6 with pRFI- group.

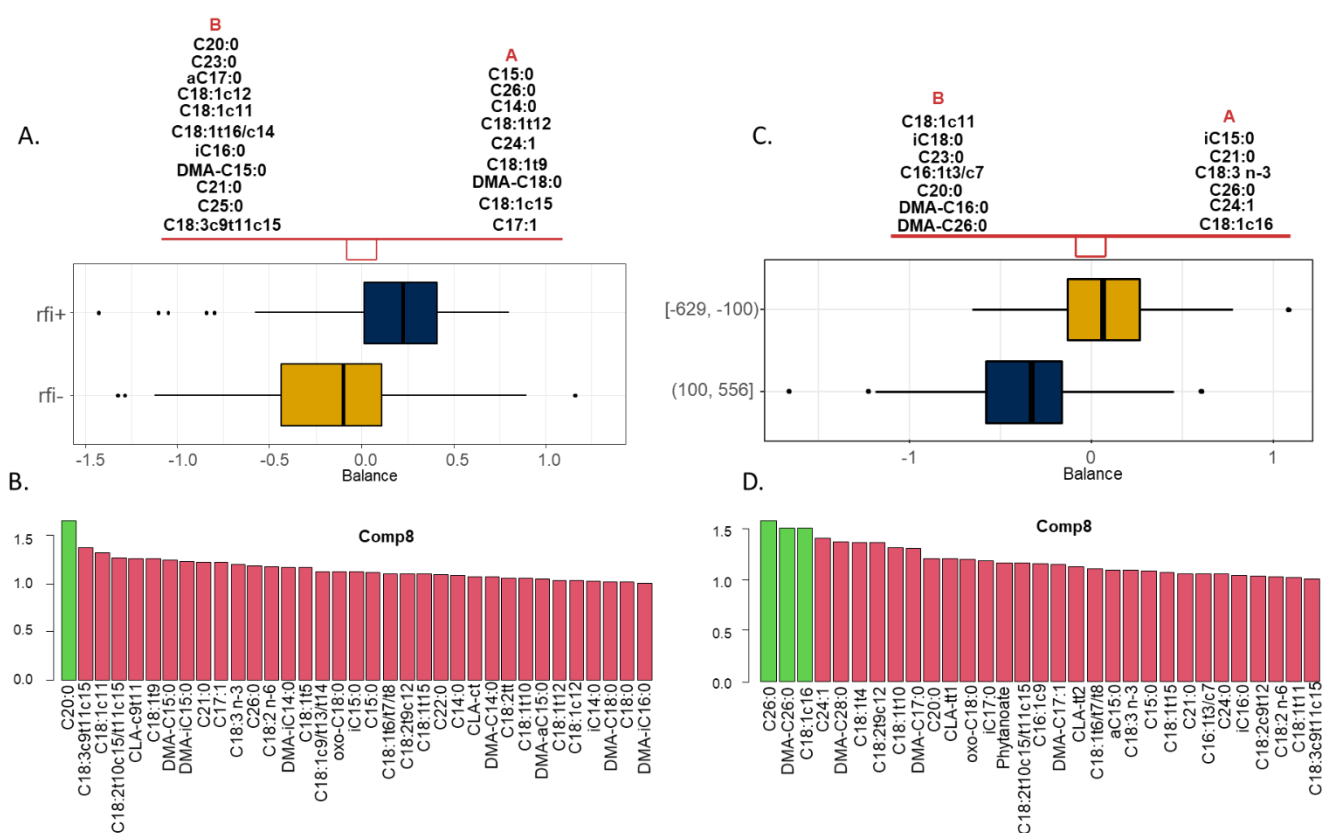


Figure II.3.8 : Best FA to discriminate lines using either selbal (A) or Variable Importance in Projection (VIP) of the best PLS-DA (B) and best FA to discriminate phenotypic efficiency groups using either selbal (C) or VIP (D) in phase MIX.

When sPLS was applied to CLR-transformed and corrected FA and CLR-transformed and corrected microbial genera in phase MIX, 2 components and 180 and 10 genera on the first and second component respectively were kept. It worth noting that both Q^2 .total and individual FA Q^2 were too low for any component to be kept. The resulting sPLS did not highlight any strong correlation between microbial genera and fatty acids, the strongest negative correlations between *Treponema* 2 and C15:0 and iC16:0 (Figure II.3.9).

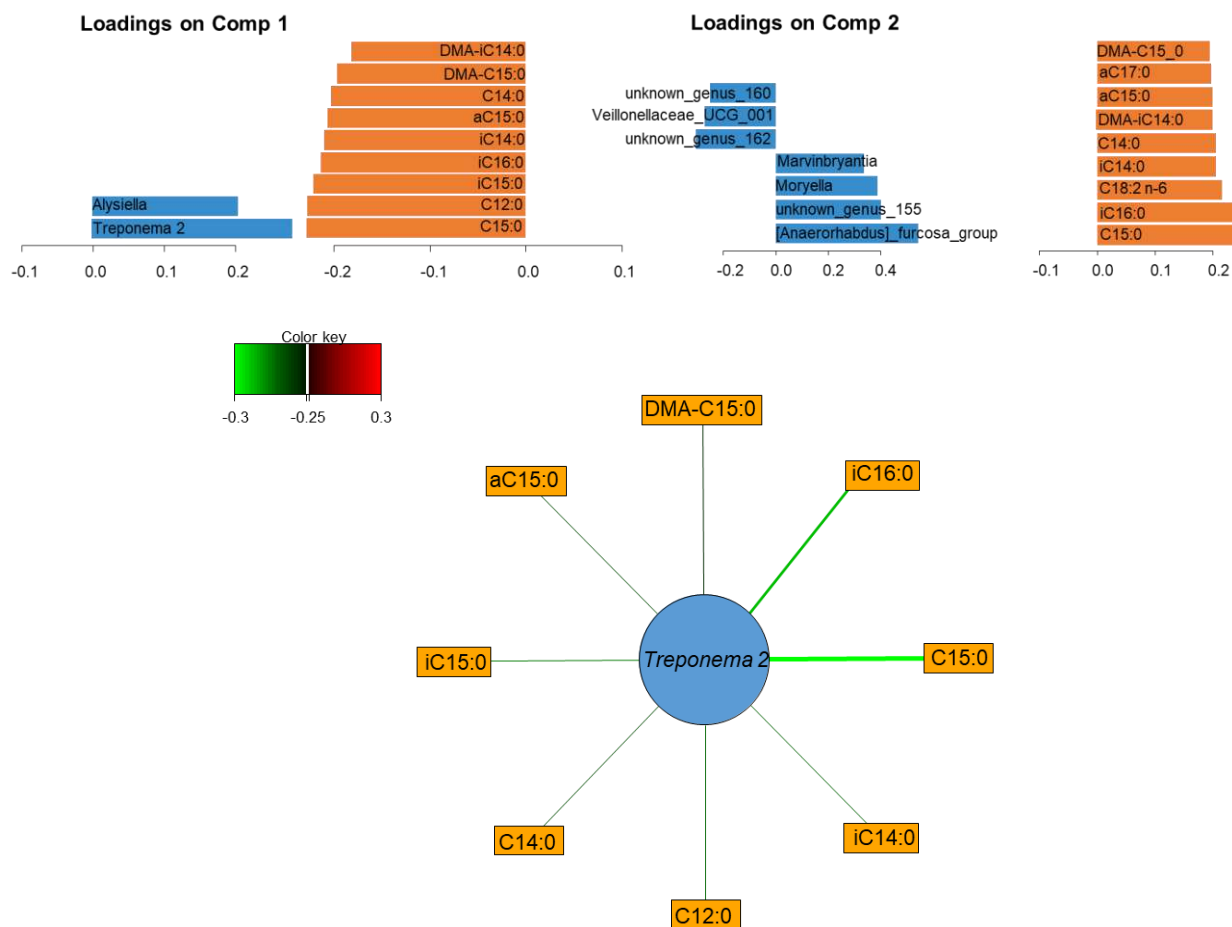


Figure II.3.9 : PLS loadings and network evaluating the structure of associations between phenotypes and fatty acids variables. The cutoff threshold was set to 0.25 to extract relevant associations.

When samples from different years were treated separately, CLR-transformed FA, that were corrected for pen and period effects before analyses, showed low consistency in discriminating lines or phenotypes. Only C18:2t9c12 was associated with pRFI_M both in 2019 and 2020 and even though it was not differentially abundant between phenotypes in either of these years it was slightly correlated to phenotypic RFI_M ($r=0.20$, $p=0.0080$) and had high VIP values in the PLS-DA models, especially in 2020 (VIP=1.90) which showed the best discrimination between phenotypes. This could be explained by the fact that rumen samples were all taken up in the same season.

Overall, fatty acid profiles did not differ between either the genetic efficiency line or the phenotypic groups in phase MIX.

Correlations between prokaryotic microbiota and FA profiles in each and every Year x Season did not highlight any consistent association between genera and specific FA. All correlations higher than 0.65 in absolute values are presented in Tableau II.3.4. This threshold was chosen because of the small size of the datasets that tends to inflate correlations.

Tableau II.3.4 : Main correlations between microbial genera and fatty acids in every sampling period of phase MIX (absolute value > 0.65, $p < 0.05$ after FDR-adjustment).

Period	Association	Correlation coefficient (p-value)	Prevalence of the
2018 Summer	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes group</i> / iC15:0	0.65 (2.5×10^{-4})	27/27
	<i>[Ruminococcus] gnavoreauii group</i> / iC15:0	-0.71 (3.2×10^{-5})	26/27
	<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG 002 / C18:2tt	-0.68 (1.1×10^{-4})	14/27
2018 Fall	<i>Lachnospiraceae</i> NK3A20 group / C18:0	0.65 (2.4×10^{-4})	27/27
	<i>Lachnospiraceae</i> NK3A20 group / C18:1t16/c14	0.66 (2.1×10^{-4})	27/27
	<i>Rikenellaceae</i> RC9 group / C18:1t15	-0.66 (2.1×10^{-4})	27/27
	<i>Christensenellaceae</i> R7 group / DMA C28:0	0.65 (2.1×10^{-4})	27/27
2019 Summer			
2019 Fall			
2020 Fall	<i>Quinella</i> / C16:1t3/c7	0.69 (1.8×10^{-6})	38/38

4. Discussion

4.1 Diet effect and Fatty Acid Profiles

Diet has consistently been proven to be the major driver of rumen ecosystem, determining the orientation of rumen metabolism affecting both physical and chemical properties of the rumen and microbial populations (Belanche et al., 2019). As such, it affects ruminal lipid metabolism including biohydrogenation patterns (Jarvis & Moore, 2010). Even though bacterial synthesis of fatty acids and aldehydes is unneglectable, the main source of rumen fatty acid is the diet. Therefore, diets richer in FA usually result in higher retrieved FA from rumen samples (Alves et al., 2013). Since the FA composition of the diets used in phase CONC and phase MIX differ, the comparison of single rumen FA relative abundances between diets is not really meaningful. Nevertheless, despite the MIX diet having more unsaturated fatty acids than the CONC diet, the level of saturation in MIX rumen sample was higher than in CONC samples with, for example, significantly less trans,C18:1 and cis,C18:1 and more C18:0 which is consistent with the literature showing a decrease in BH in concentrate-rich diets (Alves et al., 2013; Ventto et al., 2017). During the CONC phase, the rumen samples had higher relative abundances of C18:1t10 then during the MIX phase. C18:1t10 was on average four times more abundant than C18:1t11. The latter had

similar relative abundances in both phases. The accumulation of C18:1t10, also qualified as trans-10 shift, has been consistently reported in animals whose diet is largely constituted of concentrates and is often associated with a decrease in rumen pH (Alves et al., 2021; Enjalbert & Troegeler-Meynadier, 2009) and with the Milk-Fat Depression syndrome in dairy animals. The accumulation of C18:1t10 also seems to be associated with a decreased biohydrogenation and the accumulation of the co-eluted fatty acid combination identified as C18:2t10c15/C18:2t11c15 which is more likely C18:2t10c15, as it has been found to be increased in starch-rich diets in Merino lambs (Alves et Bessa 2014).

4.2 Fatty acid profiles and feed efficiency

Very few studies linked fatty acid profiles to feed efficiency and to our knowledge none considered this aspect in meat lambs nor did they use genetic lines. Moreover, these studies were led on much smaller groups of animals. Toral et al. found an accumulation of C18:0 in high feed efficiency (i.e low phenotypic RFI) dairy sheep (LRFI) as well as a decrease in some C18:1 and C18:2 isomers issued from the partial biohydrogenation of ALA and LA in comparison with low feed efficiency (i.e high phenotypic RFI) animals (HRFI) when they were fed a 50:50 TMR (Toral et al., 2021). In particular, C18:2t9c12, a geometric LA isomer, was more abundant in HRFI sheep similarly to our 2019 and 2020 MIX phase samples in which C18:2t9c12 was selected by selbal and had VIP values higher than 1.5. C16:1c9 was also more abundant in HRFI dairy sheep consistently with results from the CONC phase of our study in which C16:1c9 was the only fatty acid to be linked with inefficient animals either through the genetic line (in 2018) or phenotypic group (in 2019 and 2020). Similarly, in Artegoitia et al. both ALA and LA were more abundant in steers with low ADG compared with steers with high ADG that did not differ in ADFI, pointing out that inefficient animals tend to biohydrogenate less than efficient ones (Artegoitia et al., 2017). Finally, Liu et al. showed an upregulation of Gamma-Linolenic Acid in efficient Angus heifers and hypothesized that its anti-inflammatory effect, in accordance with lower levels of proinflammatory lipid metabolites trans12,(9,10)-Dihydroxyoctadecenoate and 9-oxoC18:0, could partly explain feed efficiency (Liu et al., 2022). The same study also underlined a 8% lower C16:0 concentration in the rumen of efficient animals compared to inefficient ones but this could be due to the fact that inefficient animals consumed more of the C16:0-containing diet since FA were not treated as a composition in this study (Liu et al., 2022). Finally, they showed negative correlations between *Rikenellaceae* RC9 gut group, *Christensenellaceae* R7 group and *Ruminococcaceae* NK4A214 group and phenotypic RFI. In our study, the first two were strongly positively correlated with C16:0 in phase CONC and the last was the FA most strongly correlated with C18:0 in phase CONC. *Rikenellaceae* RC9 gut group has also been reported as associated with steers with high growth rates (Daghio et al., 2021) as well as with

efficient animals in several studies (Andrade et al., 2022; Liu et al., 2022) including in our animals in phase MIX 2019 (Chapitre 2.1).

In phase MIX, the main FA discriminating phenotypic groups were C26:0 which is a minor component of both concentrates and forages and DMA-C26:0 which is mainly derived from orchard hay C26 aldehyde. The association of DMA-C26:0 to inefficient animals could be due to their higher consumption of forage compared to efficient animals since the amount of concentrate distributed was limited in phase MIX. Though, DMA-C28:0 is also derived from dactylis hay C28 aldehyde and was correlated with *Christensenellaceae R7 group* in the Fall period of 2018 MIX phase while this same genus was associated with phenotypically efficient animals in our previous study (Chapitre 2).

Except for C16:1c9 in phase CONC, no fatty acid could be linked to feed efficiency no matter the diet. Moreover, this FA being a minor FA of the concentrate feed, its higher relative abundance in inefficient animals could be due to an increase in feed intake.

4.3 Microbial genera and fatty acid profiles

Overall, links between FA in the rumen and microbial community profiles have not been studied extensively. Recently, Conte et al. explored the relationships between bacterial genera and lipid metabolism in the rumen of beef steers from two different breeds : Maremmana and Aubrac, both breeds being divided into two groups fed either a mixed diet (grass hay + 1kg concentrate/100kgBW) or pasture and grass hay (Conte et al., 2022). Surprisingly, they did not find any discriminant effect of the diet on FA profile but rather a breed effect justifying that correlations between bacterial genera and fatty acids were analyzed separately for each breed. Among correlations that were common to both breeds, *Rikenellaceae RC9 gut group* was positively correlated with DMA and especially with DMA-iC14:0 which was also the case in phase CONC 2018 in our study. In the 20 Aubrac steers they also found a positive correlation between *Treponema 2* and DMA iso-FA, which is consistent with our findings from phase CONC but not so much in phase MIX, in which *Treponema 2* showed moderate negative correlations with several OBCFA. In phase CONC, *Anaerovibrio* and *Selenomonas 1*, both from family Selenomonadales were also strongly positively correlated with DMA-iC14:0 and DMA-aC15:0 as well as with C16:0 in all years for phase CONC and with 18:1t11 in years 2018 and 2020 of phase CONC, suggesting a higher biohydrogenation of palmitoleic acid (C16:1c9) and a lower trans-10 shift when these bacteria are present. *Anaerovibrio* is the genus of the most known bacterium responsible for lipolysis *i.e* *Anaerovibrio lypolytica* whose lipolytic activity is decreased by acidification of the rumen (Fuentes et al., 2009; Prins et al., 1975). *Selenomonas ruminantium*, the main bacterial species from *Selenomonas 1* genus was proposed as a potential producer of oxo-C18:0 (Hudson et al., 1995) but in our study this FA was correlated with *Prevotella 7* and *Dialister* which showed opposite correlations with FA

compared with the *Anaerovibrio/Selenomonas 1/Treponema* group and were correlated with C18:1t10 that seems to be produced in the same conditions if not by the same bacteria. Another genus associated with C18:1t10 in phase CONC was *Megasphaera*, certain strains of which have been previously demonstrated as producing C18:1t10c12 from LA (Kim et al., 2002). *Megasphaera elsdeni* was also associated with Milk Fat Depression in some studies (Palmonari et al., 2010). *Butyrivibrio*, one of the genera mostly involved in BH in the literature was nearly undetected in the rumen of lambs during phase CONC and was far more abundant during phase MIX (Lourenço et al., 2010).

The main finding of our study concerning the links between fatty acids and microbial genera is the consistent negative association between *Prevotella 7* and saturated fatty acids, both C18:0 and C16:0, and its positive correlations with C18:1t10 and C18:1t10c15/C18:1t11c15 in phase CONC. This coincidence of the trans-10 shift, the limitation of BH and the increase of genus *Prevotella 7* could be due to the physical and chemical conditions at the time of sampling (Troegeler-Meynadier et al., 2014). Indeed, concentrate-rich diets tend to increase the proportions of several genera belonging to the Prevotellaceae family in addition to being known to inhibit BH and enhance trans-10 shift. (Seddik et al., 2019). Nonetheless, precise genus *Prevotella 7* issued from SILVA 132 affiliation was not differentially abundant between sheep fed a concentrate diet and grazing sheep. Fasting can also influence both microbial composition and BH since the latter is a dynamic phenomenon and is likely to be more complete the further the last meal is (Kim et al., 2019). As such, in a comparison between cattle that were fasted or non-fasted, the former tended to have higher *Treponema* relative abundances and the latter higher Prevotellaceae relative abundances (Welch et al., 2021b). Another hypothesis could be the direct involvement of the genus *Prevotella 7* in the trans-10 shift and limitation of BH in the rumen of animals fed a concentrate-rich diet. A study led on lambs fed either a concentrate diet or cardoon meal showed a similar decrease of C18:t10 and of genus *Prevotella* without any modification of rumen pH or VFA profile (Salami et al., 2021) and *in vitro* studies suggest that *Prevotella* could play a role in biohydrogenation of PUFA (Huws et al., 2011). Family Prevotellaceae, which is one of the main families in the rumen microbiota and considered part of the core microbiome (Global Rumen Census Collaborators et al., 2015), has also been linked with C18:1t10 in goats (Cremonesi et al., 2018). Nevertheless, analyses at the family level should be made cautiously since genus *Prevotella 1*, as abundant as *Prevotella 7*, was positively correlated with DMA and saturated fatty acids as did *Prevotellaceae UCG 003*, a minor representative of the Prevotellaceae family. Identification of *Prevotella* individual species involved in BH could help untangle the associations presented in this paper, especially since the latest version of SILVA database merged *Prevotella* sub-genera into one *Prevotella* genus.

Bibliography :

- Alves, Susana P., et Rui J. B. Bessa. 2014. « The Trans -10, Cis -15 18:2: A Missing Intermediate of Trans -10 Shifted Rumen Biohydrogenation Pathway? » *Lipids* 49 (6): 527-41. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3897-4>.
- Alves, Susana P., Alexandra Francisco, Mónica Costa, José Santos-Silva, et Rui J.B. Bessa. 2017. « Biohydrogenation Patterns in Digestive Contents and Plasma of Lambs Fed Increasing Levels of a Tanniferous Bush (*Cistus Ladanifer* L.) and Vegetable Oils ». *Animal Feed Science and Technology* 225 (mars): 157-72. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2017.01.018>.
- Alves, Susana P., José Santos-Silva, Ana R. J. Cabrita, António J. M. Fonseca, et Rui J. B. Bessa. 2013. « Detailed Dimethylacetal and Fatty Acid Composition of Rumen Content from Lambs Fed Lucerne or Concentrate Supplemented with Soybean Oil ». Édité par Wolf-Hagen Schunck. *PLoS ONE* 8 (3): e58386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058386>.
- Alves, Susana P., Payam Vahmani, Cletos Mapiye, Tim A. McAllister, Rui J. B. Bessa, et Michael E. R. Dugan. 2021. « Trans-10 18:1 in Ruminant Meats: A Review ». *Lipids* 56 (6): 539-62. <https://doi.org/10.1002/lipd.12324>.
- Andrade, Bruno G. N., Flavia A. Bressani, Rafael R. C. Cuadrat, Tainã F. Cardoso, Jessica M. Malheiros, Priscila S. N. de Oliveira, Juliana Petrini, et al. 2022. « Stool and Ruminant Microbiome Components Associated With Methane Emission and Feed Efficiency in Nelore Beef Cattle ». *Frontiers in Genetics* 13 (mai): 812828. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.812828>.
- Arce-Recinos, Carlos, Nadia Florencia Ojeda-Robertos, Ricardo Alfonso Garcia-Herrera, Jesús Alberto Ramos-Juarez, Ángel Trinidad Piñeiro-Vázquez, Jorge Rodolfo Canul-Solís, Luis Enrique Castillo-Sanchez, Fernando Casanova-Lugo, Einar Vargas-Bello-Pérez, et Alfonso Juventino Chay-Canul. 2022. « Residual Feed Intake and Rumen Metabolism in Growing Pelibuey Sheep ». *Animals* 12 (5): 572. <https://doi.org/10.3390/ani12050572>.
- Artegoitia, Virginia M., Andrew P. Foote, Ronald M. Lewis, et Harvey C. Freetly. 2017. « Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on Crossbred Steers ». *Scientific Reports* 7 (1): 2864. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02856-0>.
- Association of Official Analytical Chemists. 1998. « *Animal Feed Official Methods Analysis*, 16th edn. AOAC, Gaithersburg, MA. »
- Belanche, Alejandro, Alison H. Kingston-Smith, Gareth W. Griffith, et Charles J. Newbold. 2019. « A Multi-Kingdom Study Reveals the Plasticity of the Rumen Microbiota in Response to a Shift From Non-Grazing to Grazing Diets in Sheep ». *Frontiers in Microbiology* 10 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00122>.
- Bessa, Rui J. B., Susana P. Alves, et José Santos-Silva. 2015. « Constraints and Potentials for the Nutritional Modulation of the Fatty Acid Composition of Ruminant Meat: Modulation of Ruminant Meat Fatty Acid Composition ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 117 (9): 1325-44. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400468>.
- Conte, G., C. Dimauro, M. Daghighio, A. Serra, F. Mannelli, B.M. McAmmond, J.D. Van Hamme, et al. 2022. « Exploring the Relationship between Bacterial Genera and Lipid Metabolism in Bovine Rumen ». *Animal* 16 (5): 100520. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100520>.
- Cremonesi, P., G. Conte, M. Severgnini, F. Turri, A. Monni, E. Capra, L. Rapetti, et al. 2018. « Evaluation of the Effects of Different Diets on Microbiome Diversity and Fatty Acid Composition of Rumen Liquor in Dairy Goat ». *Animal* 12 (9): 1856-66. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003433>.
- Daghighio, Matteo, Francesca Ciucci, Arianna Buccioni, Alice Cappucci, Laura Casarosa, Andrea Serra, Giuseppe Conte, et al. 2021. « Correlation of Breed, Growth Performance, and Rumen Microbiota in Two Rustic Cattle Breeds Reared Under Different Conditions ». *Frontiers in Microbiology* 12 (avril): 652031. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652031>.

- Ellison, M. J., Conant, G. C., Lamberson, W. R., Cockrum, R. R., Austin, K. J., Rule, D. C., & Cammack, K. M. (2017). Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, 156, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.009>
- Enjalbert, F., S. Combes, A. Zened, et A. Meynadier. 2017. « Rumen Microbiota and Dietary Fat: A Mutual Shaping ». *Journal of Applied Microbiology* 123 (4): 782-97. <https://doi.org/10.1111/jam.13501>.
- Enjalbert, F, et A Troegeler-Meynadier. 2009. « Biosynthesis of <i>trans</i>fatty acids in ruminants ». In *Trans fatty acids in human nutrition*, The Oily Press. Vol. 23. The Oily Press lipid library.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., & Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4456-4466. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1722>
- Global Rumen Census Collaborators, Gemma Henderson, Faith Cox, Siva Ganesh, Arjan Jonker, Wayne Young, et Peter H. Janssen. 2015. « Rumen Microbial Community Composition Varies with Diet and Host, but a Core Microbiome Is Found across a Wide Geographical Range ». *Scientific Reports* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/srep14567>.
- Herd, R. M., V. H. Oddy, et E. C. Richardson. 2004. « Biological Basis for Variation in Residual Feed Intake in Beef Cattle. 1. Review of Potential Mechanisms ». *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44 (5): 423. <https://doi.org/10.1071/EA02220>.
- Herrero, M., Havlík, P., Valin, H., Notenbaert, A., Rufino, M. C., Thornton, P. K., Blümmel, M., Weiss, F., Grace, D., & Obersteiner, M. (2013). Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 20888-20893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308149110>.
- Hudson, J A, C A M MacKenzie, et K N Joblin. 1995. « Conversion of Oleic Acid to 10-Hydroxystearic Acid by Two Species of Ruminal Bacteria » *Appl Microbiol Biotechnol* (44): 6.
- Huws, Sharon A., Eun J. Kim, Michael R. F. Lee, Mark B. Scott, John K. S. Tweed, Eric Pinloche, R. John Wallace, et Nigel D. Scollan. 2011. « As yet Uncultured Bacteria Phylogenetically Classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* Incertae Sedis and Unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* May Play a Predominant Role in Ruminal Biohydrogenation: Bacterial Involvement in Biohydrogenation ». *Environmental Microbiology* 13 (6): 1500-1512. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02452.x>.
- INRA. 2018 *Alimentation des Ruminants*. Éditions Quæ. Versailles, France.
- Jarvis, G. N., et E. R. B. Moore. 2010. « Lipid Metabolism and the Rumen Microbial Ecosystem ». In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, édité par Kenneth N. Timmis, 2245-57. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_163.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Rychlik, J. L., & Russell, J. B. (2002). The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 976-982. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01610.x>
- Kim, J. N., Song, J., Kim, E. J., Chang, J., Kim, C.-H., Seo, S., Chang, M. B., & Bae, G.-S. (2019). Effects of short-term fasting on in vivo rumen microbiota and in vitro rumen fermentation characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(6), 776-782. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0489>
- Lee, Ki Won, Hyong Joo Lee, Hong Yon Cho, et Young Jun Kim. 2005. « Role of the Conjugated Linoleic Acid in the Prevention of Cancer ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (2): 135-44. <https://doi.org/10.1080/10408690490911800>.
- Lee, Yong-Jae, et Thomas C. Jenkins. 2011. « Biohydrogenation of Linolenic Acid to Stearic Acid by the Rumen Microbial Population Yields Multiple Intermediate Conjugated Diene Isomers ». *The Journal of Nutrition* 141 (8): 1445-50. <https://doi.org/10.3945/jn.111.138396>.
- Liu, Yue, Hao Wu, Wanbao Chen, Chang Liu, Qingxiang Meng, et Zhenming Zhou. 2022. « Rumen Microbiome and Metabolome of High and Low Residual Feed Intake Angus Heifers ». *Frontiers in Veterinary Science* 9 (mars): 812861. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.812861>.

- Lourenço, M., E. Ramos-Morales, et R.J. Wallace. 2010. « The Role of Microbes in Rumen Lipolysis and Biohydrogenation and Their Manipulation ». *Animal* 4 (7): 1008-23. <https://doi.org/10.1017/S175173111000042X>.
- Maaten, Laurens van der, et Geoffrey Hinton. 2008. « Visualizing Data using t-SNE ». *Journal of Machine Learning Research* 9 (août): 2579-2605.
- Oskolkov, Nicolay. 2019. « How to tune hyperparameters of tSNE ». *Towards Data Science (blog)*. 19 juillet 2019.
- Perea, K., Perz, K., Olivo, S. K., Williams, A., Lachman, M., Ishaq, S. L., Thomson, J., & Yeoman, C. J. (2017). Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *Journal of Animal Science*, 95(6), 2585. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1222>
- Prins, R. A., Lankhorst, A., van der Meer, P., & Van Nevel, C. J. (1975). Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen lipolytic organism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 41(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/BF02565031>
- Rivera-Pinto, J., J. J. Egozcue, V. Pawlowsky-Glahn, R. Paredes, M. Noguera-Julian, et M. L. Calle. 2018. « Balances: A New Perspective for Microbiome Analysis ». Édité par Catherine Lozupone. *MSystems* 3 (4): e00053-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00053-18>.
- Salami, Saheed A., Bernardo Valenti, Giuseppe Luciano, Massimiliano Lanza, Ngozi M. Umezurike-Amahah, Joseph P. Kerry, Michael N. O'Grady, Charles J. Newbold, et Alessandro Priolo. 2021. « Dietary Cardoon Meal Modulates Rumen Biohydrogenation and Bacterial Community in Lambs ». *Scientific Reports* 11 (1): 16180. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95691-3>.
- Seddik, H., Xu, L., Wang, Y., & Mao, S. Y. (2019). A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. *Animal*, 13(8), 1614-1622. <https://doi.org/10.1017/S1751731118003269>
- Toral, P.G., G. Hervás, C. Fernández-Díez, A. Belenguer, et P. Frutos. 2021. « Rumen biohydrogenation and milk fatty acid profile in dairy ewes divergent for feed efficiency ». *Journal of Dairy Science* 104 (5): 5569-82. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19061>.
- Tortereau, F., C. Marie-Etancelin, J.-L. Weisbecker, D. Marcon, F. Bouvier, C. Moreno-Romieux, et D. François. 2020. « Genetic Parameters for Feed Efficiency in Romane Rams and Responses to Single-Generation Selection ». *Animal* 14 (4): 681-87. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002544>.
- Troegeler-Meynadier, A., Palagiano, C., & Enjalbert, F. (2014). Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term in vitro incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(4), 704-713. <https://doi.org/10.1111/jpn.12128>
- Ventto, Laura, Heidi Leskinen, Piia Kairenius, Tomasz Stefański, Ali R. Bayat, Johanna Vilkki, et Kevin J. Shingfield. 2017. « Diet-Induced Milk Fat Depression Is Associated with Alterations in Ruminal Biohydrogenation Pathways and Formation of Novel Fatty Acid Intermediates in Lactating Cows ». *British Journal of Nutrition* 117 (3): 364-76. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000010>.
- Welch, C. B., Lourenco, J. M., Seidel, D. S., Krause, T. R., Rothrock, M. J., Pringle, T. D., & Callaway, T. R. (2021b). The Impact of Pre-Slaughter Fasting on the Ruminal Microbial Population of Commercial Angus Steers. *Microorganisms*, 9(12), 2625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122625>

Supplementary Data:

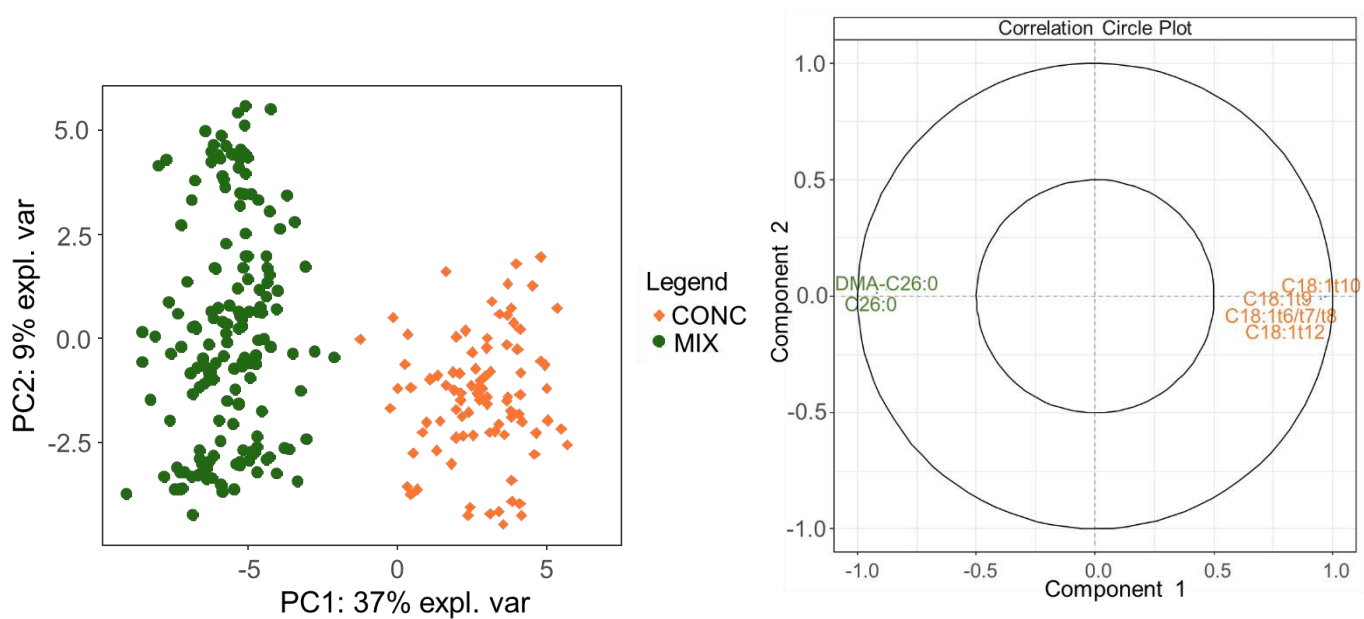


Figure II 3.S1 : Principal component analysis of fatty acid profiles in phase CONC (orange) and MIX (green) and main fatty acids involved in the separation of phases evidence by the correlation circle plot on the first component (cutoff = 0.85)

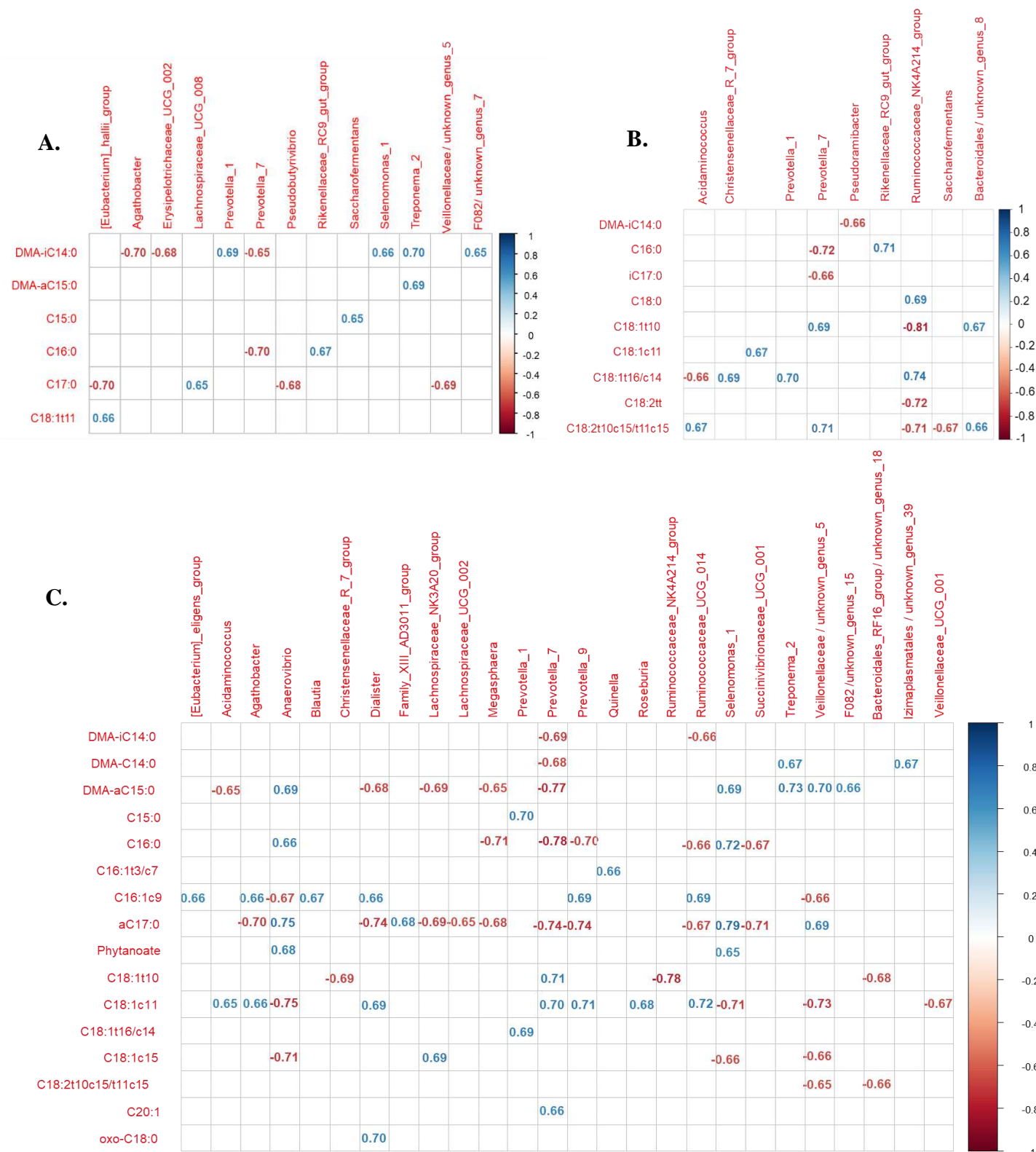


Figure II.3.S1 : Correlations between rumen prokaryotic genera and rumen fatty acids during the CONC phase in 2018 (A), 2019 (B) and 2020 (C). Only correlations with absolute values higher than 0.65 are shown.

2. Corrélations entre les phénotypes impliqués dans le calcul de la consommation résiduelle et les profils d'acides gras ruminiaux.

a) Introduction

Les régimes riches en concentrés, classiquement distribués aux agneaux en croissance, ont tendance à provoquer une déviation de la biohydrogénation vers la production d'intermédiaires trans-10 que cela soit le CLA-trans10cis12, le C18 :2-trans10,cis15, ou l'acide C18 :1-trans10 dans le rumen (Alves & Bessa, 2014). Les acides gras, transformés dans le rumen, vont être absorbés au niveau intestinal et incorporer aux triglycérides dans les tissus animaux dont les proportions d'intermédiaires de biohydrogénation sont liées aux proportions ruminales (Alves et al., 2021). Par ailleurs, certains acides gras, en particulier les deux CLA majoritaires que sont le CLAcis9, trans11 et le CLAtrans10, cis12, ont été rapportés comme ayant un rôle à jouer dans le métabolisme, notamment en limitant l'adipogénèse et la lipogénèse dans de nombreuses espèces, y compris de ruminants (Dirandeh et al., 2021; Martins et al., 2015; Park & Pariza, 2007; Shi et al., 2017; Trinchese et al., 2020). Les liens qui existent entre les acides gras ruminiaux et ceux présents dans les tissus et l'effet de certains acides gras sur la composition corporelle nous ont amenés à nous demander s'il pouvait exister un lien entre les profils en acides gras ruminiaux et les principaux phénotypes impliqués dans la détermination de la consommation résiduelle, à savoir le poids métabolique, le GMQ, l'épaisseur de gras dorsal et l'épaisseur de muscle *longissimus dorsi*.

b) Matériel et méthodes spécifiques

Puisqu'en plus du changement de régime, les animaux en phase MIX étaient plus âgés, plus lourds et avaient une croissance plus lente que les animaux en phase CONC, les deux phases ont été traitées séparément. Les profils d'AG ont été transformés par approche CLR après imputation des zéros par GBM puis ont été corrigés pour les effets année, lot, et de mise à jeun pour la phase CONC et année, période, lot et mise à jeun pour la phase MIX. Les phénotypes ont également été corrigés pour les mêmes effets à l'exception de la mise à jeun puisque la mesure des phénotypes ne dépendait pas de cet effet. Une régression PLS a permis de dégager les principales relations entre phénotypes et AG et des corrélations de Pearson ont été calculées et corrigées par l'approche de Benjamini-Hochberg.

c) Résultats

Les résultats sont présentés sur le poster en Figure II.3.10.

La régression PLS a permis d'identifier que le phénotype le plus fortement associé au profil en acides gras au cours de la phase CONC était le GMQ, les plus fortes corrélations de Pearson étant observées avec le C18 :1t10 ($r=0,29$; $p= 1,6 \times 10^{-6}$), le C18:2t10c15/t11c15 ($r=0,25$; $p= 1,9 \times 10^{-5}$), et le C18:1c11 ($r=0,20$; $p= 7,0 \times 10^{-4}$). En phase MIX, le phénotype le plus fortement corrélé avec les acides gras était l'ingestion quotidienne moyenne, les plus fortes corrélations de Pearson étant observées avec le C18 :0 ($r=0,25$; $p= 0,02$), le C18 :1t16/c14 ($r= 0,24$; $p= 0,04$) et le C16 :0 ($r= 0,21$; $p= 0,03$). Aucune corrélation significative avec les épaisseurs de muscle et de gras dorsal n'a été observée quel que soit le régime.

d) Discussion

Quelques études, sur la base de supplémentations, ont tenté de mettre en évidence des effets des acides gras insaturés, en particulier les CLA, sur la composition corporelle et le métabolisme des ruminants. Schiavon et al. ont mis en évidence une réduction dose-dépendante du score d'engraissement (note de 1 à 5) et une amélioration du FCE chez les taurillons et génisses supplémentés avec un mélange rumino-protégé de CLA-c9t11 et CLA-t10c12 (Schiavon et al., 2019) mais une étude menée plus tôt sur des ovins en croissance n'avait pas obtenu de différence de composition corporelle ou d'efficacité après supplémentation bien que la concentration des tissus en CLA ait augmenté (Wynn et al., 2006). D'autres études ont comparé des animaux nourris avec des aliments différant par leur profil en AG sans mettre en évidence de modification de composition corporelle ou de croissance. (Meale et al., 2015) L'association entre la voie alternative de la biohydrogénation comprenant le C18:2t10c15 et le C18:1t10 a déjà été rapportée en comparant des régimes plus ou moins riches en concentrés, les régimes riches en concentrés étant à la fois associés à une croissance plus importante et à un trans10-shift mais aucune étude à notre connaissance n'a lié l'abondance relative de C18 :1t10 ou de C18:2t10c15 et le GMQ intra-régime (Alves et al., 2021; Bessa et al., 2005). Les corrélations, plus faibles et à la limite la significativité entre ingestion quotidienne moyenne et C18 :0 et C16 :0 résultent vraisemblablement de la proportion de ces AG dans le foin, ingérée en quantité plus importante par les animaux inefficients.

Rumen fatty acids linked to phenotypes in Romane lambs selected for feed efficiency



F. Touitou¹, S. Alves^{2,3}, F. Tortereau¹, R. Bessa^{2,3}, A. Meynadier¹

¹GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326 Castanet Tolosan, France

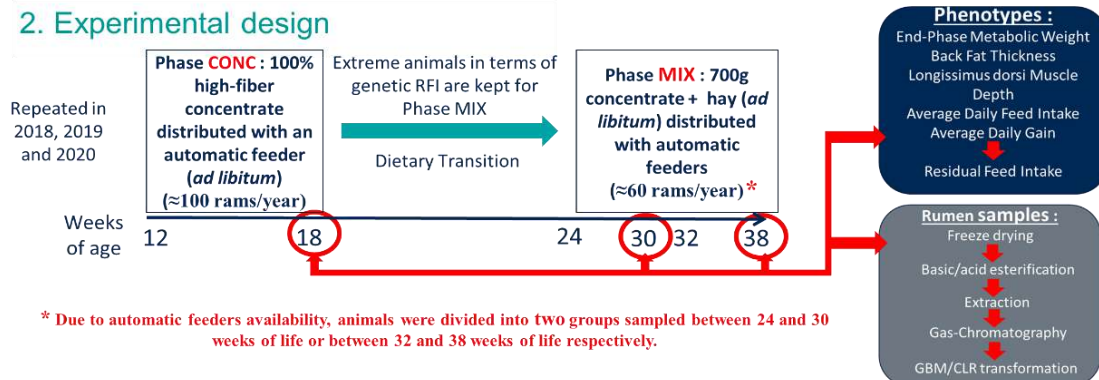
²CISA, FMV, University of Lisbon, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

³Associate Laboratory for Animal and Veterinary Sciences (AL4Animals), UTAD, 5000-801 Vila Real, Portugal

1. Introduction

- Mechanisms underlying Feed Efficiency (FE) are not fully understood.
- Microbial metabolism of the dietary lipids is responsible for the formation of bioactive intermediates that could be involved in FE variability.
- Divergent selection on residual feed intake (RFI) is a good tool to investigate biological processes underlying feed efficiency: after 3 generations of selection under a 100% concentrate diet an important difference between **efficient (rfi-)** and **inefficient animals (rfi+)** was reached (~1.9 genetic standard deviation).

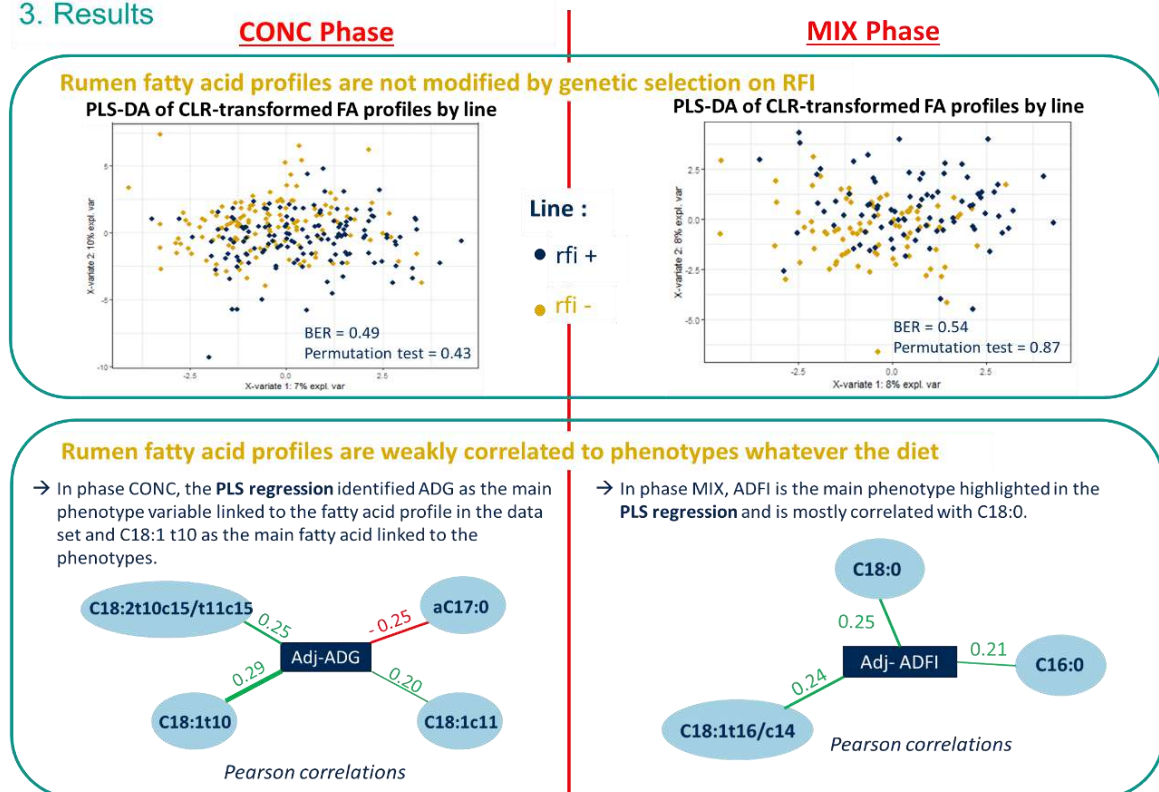
2. Experimental design



* Due to automatic feeders availability, animals were divided into two groups sampled between 24 and 30 weeks of life or between 32 and 38 weeks of life respectively.

→ Fatty Acid profiles and phenotypes were corrected for year and pen effects in phase CONC, and year, period and pen effects in phase MIX

3. Results



Thanks to the colleagues of the experimental unit P3R in Bourges for handling the animals and their help during the sampling sessions.
Thanks to the colleagues from the Faculty of Veterinary Medicine in Lisbon for their support and help with the chromatographs.
Thanks to the meta-program INRA MEM for the fundings.



Figure II.3.10 : Poster présentée à l'EAAP 2022

Chapitre 4. Liens entre l'efficacité alimentaire et le métabolome des ovins : étude par résonance magnétique des métabolites ruminiaux et plasmatiques.

Objectifs :

L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence les liens entre les phénotypes des animaux des lignées rfi+ et rfi- sélectionnées et le métabolome ruminal et plasmatique de ces animaux. Deux hypothèses sous-jacentes sont avancées dans ce travail. D'une part, comme développé au chapitre 2 de la partie II, des modifications d'efficacité digestive peuvent être responsable de variations d'efficacité alimentaire. D'autre part, des différences métaboliques, potentiellement liées à certains métabolites d'origine ruminale, peuvent également expliquer les variations interindividuelles d'efficacité alimentaire observées.

Ces travaux ont fait l'objet d'une présentation au Congrès européen des productions animales (EAAP) en 2021 à Davos sous la forme d'une courte présentation orale intitulée : « Plasmatic and ruminal metabolomes of lambs divergently selected on residual feed intake » et mettant en avant les premiers résultats obtenus par RMN et d'un article de revue publié dans *Metabolites* en mars 2022 : « Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Rumen and Plasma Metabolomic Data ».

Conclusions :

Les données de métabolome plasmatique ont permis une meilleure discrimination des lignées et des groupes phénotypique d'efficacité alimentaire que les données de métabolome ruminal. En particulier, les concentrations plasmatiques en citrate se sont révélées plus importantes chez les animaux de la lignée rfi- à la fois en phase CONC et en phase MIX ce qui suggère un effet de la sélection sur le métabolisme du citrate. Les animaux de la lignée rfi+ présentaient des concentrations plasmatiques en L-thréonine plus élevées aux deux phases et le groupe pRFI+C était caractérisé par de plus fortes concentrations en bêta-hydroxyisovalérate que le groupe pRFI-C. Par ailleurs, les animaux inefficients avaient des concentrations plasmatiques en acides amines plus élevées que les inefficients en phase CONC. Les phénotypes n'ont pas été correctement discriminés par les métabolites plasmatiques en phase MIX ce qui suggère que les mécanismes associés à l'efficacité alimentaire aux deux phases différent.

Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Rumen and Plasma Metabolomic Data

Florian Toutilou^{1*}, Flavie Tortereau¹, Lydie Bret², Nathalie Marty-Gasset¹, Didier Marcon and Annabelle Meynadier¹

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326 Castanet-Tolosan, France; flavie.tortereau@inrae.fr (F.T.); nathalie.marty-gasset@inrae.fr (N.M.-G.); annabelle.meynadier@envt.fr (A.M.)

² Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, F-31300 Toulouse, France; lydie.bret@envt.fr

³ INRAE, Experimental Unit P3R, F-18390 Osmoy, France; didier.marcon@inrae.fr

* Correspondence: florian.toutilou@envt.fr

Abstract: Feed efficiency is one of the keystones that could help make animal production less costly and more environmentally friendly. Residual feed intake (RFI) is a widely used criterion to measure feed efficiency by regressing intake on the main energy sinks. We investigated rumen and plasma metabolomic data on Romane male lambs that had been genetically selected for either feed efficiency (line rfi-) or inefficiency (line rfi+). These investigations were conducted both during the growth phase under a 100% concentrate diet and later on under a mixed diet to identify differential metabolite expression and to link it to biological phenomena that could explain differences in feed efficiency. Nuclear magnetic resonance (NMR) data were analyzed using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and correlations between metabolites' relative concentrations were estimated to identify relationships between them. High levels of plasma citrate and malate were associated with genetically efficient animals, while high levels of amino acids such as L-threonine, L-serine, and L-leucine as well as beta-hydroxyisovalerate were associated with genetically inefficient animals under both diets. The two divergent lines could not be discriminated using rumen metabolites. Based on phenotypic residual feed intake (RFI), efficient and inefficient animals were discriminated using plasma metabolites determined under a 100% concentrate diet, but no discrimination was observed with plasma metabolites under a mixed diet or with rumen metabolites regardless of diet. Plasma amino acids, citrate, and malate were the most discriminant metabolites, suggesting that protein turnover and the mitochondrial production of energy could be the main phenomena that differ between efficient and inefficient Romane lambs.

Keywords: residual feed intake; NMR; plasma; rumen; multivariate analysis

Citation: Toutilou, F.; Tortereau, F.; Bret, L.; Marty-Gasset, N.;

Marcon, D.; Meynadier, A. Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Rumen and Plasma Metabolomic Data. *Metabolites* **2022**, *12*, 304. <https://doi.org/10.3390/metabo12040304>

Academic Editor: Cholsoon Jang

Received: 4 February 2022

Accepted: 24 March 2022

Published: 29 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Meeting society's expectations in terms of environmental preservation, animal health and welfare, and meat quality while staying economically viable is a challenge breeders must overcome. Feeding costs are one of the most important production costs, especially in sheep meat production [1]. Increasing animal feed efficiency is a good way to reconcile economy and ecology, reducing both food inputs and environmental impacts [2–4]. The concept of feed efficiency consists of focusing on the relations between what animals eat and what they produce instead of focusing on production only.

Feed efficiency is mainly studied through the feed conversion ratio (FCR) and residual feed intake (RFI). RFI has long been proven heritable in cattle [5] and, more recently, in sheep with estimates ranging from 0.11 to 0.46 [6–8]. In the Romane breed, heritability of RFI is estimated to be 0.45 ± 0.08 [9,10]. RFI presents the advantages of being independent (at both the phenotypic and genetic levels) of average daily gain (ADG) [7] compared to FCR and being more suited to genetic selection [11].

The biological determinants of feed efficiency are widely studied in cattle [12], and some studies are emerging in lambs [13,14]. In sheep, feed efficiency has been recently linked to feeding behavior [9,15] and methane emissions [3]. In beef cattle, some studies tried to link RFI with infrared thermometry used as a proxy for radiated heat loss, with conflicting results [16,17]. Methane emissions and radiated heat loss are responsible for a diminution in energy efficiency. To this day, the main hypotheses explaining divergences in feed efficiency rely on differences in digestion and/or metabolism, including processes of protein renewal in skeletal muscle [18]. Indeed, protein synthesis and degradation have an energy cost and have been identified as important factors influencing feed efficiency in beef [19]. Several studies linked rumen metabolites or plasma metabolites with either greenhouse gases emissions [20] or production phenotypes, including RFI [21,22].

Metabolomics studies give an unbiased insight into metabolic phenomena that occur both in the rumen and in the organs and could explain differences in feed efficiency. For example, in the rumen, an orientation of carbohydrate metabolism towards acetate and butyrate production is associated with an increase in methane production by archaea, and hence an increase in methane release and energy loss [20]. Concerning host metabolism, the plasmatic concentrations of amino acids have been associated with differences in protein turnover both in sheep and beef cattle, highlighting the interest of studying those concentrations in divergent animals in terms of feed efficiency [21–23].

The above-mentioned studies only focused on the phenotypic RFI, which is the result of the genetic value and environmental factors that are not always well considered because of the limited sizes of experiments. In this paper, our objective was to identify ruminal and/or plasmatic metabolites associated with differences in RFI both at the

genetic and phenotypic levels in the progeny of Romane rams divergently selected for RFI under a 100% concentrate diet and belonging to lines called rfi- (efficient animals) and rfi+ (inefficient animals). These differences were identified while lambs were receiving two different diets: a diet rich in concentrates and then a diet rich in forage.

2. Results

2.1 Zootechnical Parameters

A total of 277 animals (135 from the divergent line rfi- and 142 from the divergent line rfi+) were phenotyped from 121 to 163 d of age (SD=12 d) under a 100% concentrate diet. Their phenotypes are presented in Tableau II.4.1 : Descriptive statistics of phenotypes during CONC (A) and MIX (B) phases, and estimation of the divergent line effect.. Average Daily Feed Intake (ADFI_c) was recorded every day, body weight was measured at the beginning and end of the 6-week trial, and ADG_c was calculated. Back fat thickness (BFT_c) and muscle depth (MD_c) of the longissimus dorsi were measured by ultrasound at the end of the trial. Out of the 277 animals, and after calculations of their genetic breeding values, 167 animals with extreme breeding values were kept for the MIX phase, and the same phenotypes were recorded (Tableau II.4.1B).

Tableau II.4.1 : Descriptive statistics of phenotypes during CONC (A) and MIX (B) phases, and estimation of the divergent line effect.

A	Phase CONC (N = 277)				
	Traits *	Mean (SD)	rfi-	rfi+	p-Value
	ADFI _c ¹ (g/day)	2098 (273)	1991	2173	5 × 10 ⁻¹²
	E-MW _c ² (kg)	20.6 (1.9)	20.3	20.7	0.0014
	ADG _c ³ (g/day)	327.6 (62.4)	326.5	326.5	0.93
	BFT _c ⁴ (mm)	5.73 (0.87)	5.81	5.74	0.41
	MD _c ⁵ (mm)	28.1 (2.4)	27.8	28.3	0.02
	RFI _c ⁶ (g/day)	0 (151.4)	-71.4	66.6	<2.2 × 10 ⁻¹⁶

B	Phase MIX (N = 167)							
	Traits *	Mean (SD)	rfi-		rfi+		p-Value	
			Summer	Fall	Summer	Fall	rfi-	rfi+
ADFI _M ¹ (g/day)	1857 (280)	1804	1856	1817	1869	1830	1843	0.80
E-MW _M ² (kg)	22.8 (1.5)	22.7	22.6	22.9	22.8	22.7	22.8	0.38
ADG _M ³ (g/day)	124.4 (64.3)	147	113	137	104	130	121	0.40
BFT _M ⁴ (mm)	4.54 (0.78)	4.79	4.55	4.54	4.30	4.67	4.42	0.02
MD _M ⁵ (mm)	27.1 (2.4)	26.8	18.5	27.1	18.9	22.6	23.0	0.20
RFI _M ⁶ (g/day)	0 (183.1)	-3.2	-3.8	4.1	3.5	-3.5	3.8	0.81
		Phase MIX (N = 109 #)						
ADForI _M ⁷ (g/day)	1279 (224)	1276	1290	1268	1282	1283	1275	0.75
RForI _M ⁸ (g/day)	0 (175.7)	-3.7	-3.0	3.3	4.0	-3.3	3.6	0.83

* X_C and X_M are phenotypes from the CONC and the MIX phase, respectively: ¹ ADFI, average daily feed intake; ² E-MW, end-phase metabolic weight; ³ ADG, average daily gain; ⁴ BFT, back fat thickness; ⁵ MD, back muscle depth; ⁶ RFI, residual feed intake; ⁷ ADForI, average daily forage intake; ⁸ RForI, residual forage intake. # Only animals from 2019 and 2020 had a precisely registered forage consumption; in 2018, forage and concentrate were distributed as a total mixed ration.

2.1.1 Growth Phase under a 100% Concentrate Diet

Descriptions of traits recorded under a 100% concentrate diet (CONC phase) are presented in Tableau II.4.1A. Animals from rfi+ and rfi- divergent lines ate 2173 and 1991 g/day of concentrate, respectively, these two quantities being significantly different ($p < 0.001$). While marginal, though significant, differences were observed in end-phase metabolic weight (E-MW_C) and MD_C between the two lines, no difference was observed either in ADG_C or in BFT_C. RFI_C was obtained from a linear model regressing ADFI_C on E-MW_C, ADG_C, MD_C, and BFT_C ($R^2 = 0.69$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). E-MW_C and ADG_C were the most explanatory covariates and neither of the body composition parameters were significant. Mean RFI was found to be negative in line rfi- (71.4

g/day) and positive in line rfi+ (66.6 g/day), the difference being significant ($p < 0.001$). Genetic and phenotypic RFI_C were highly correlated ($r = 0.72$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), both being well correlated with ADFI_C ($r = 0.50$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$ and $r = 0.55$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$, respectively). In the CONC phase, 203 animals out of the 277 (100 from line rfi- and 103 from line rfi+) had phenotypic RFI_C matching their genetic line, while 35 lambs from line rfi- had a positive phenotypic RFI_C and 39 lambs from line rfi+ had a negative phenotypic RFI_C (Tableau II.4.2).

Tableau II.4.2 : Number of lambs in each phenotypic class in the CONC phase according to their genetic line.

		Phenotypic RFI _C (g/Day) ¹			
		≤-75] -75,0]]0,75]	>75
Genetic Line	rfi-	62	38	17	18
	rfi+	20	19	40	63

¹ The -75 and 75 thresholds were chosen because they were -0.5 SD and 0.5 SD of phenotypic RFI_C, respectively.

E-MW_C and ADG_C were both significantly correlated with ADFI_C ($r = 0.81$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$ and $r = 0.49$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$, respectively). By construction, RFI_C was not correlated to any zootechnical parameters except ADFI_C.

2.1.2 Finishing Phase under a Mixed Diet

Descriptions of traits recorded under a mixed diet (MIX phase) are presented in Tableau II.4.1B. Animals from lines rfi+ and rfi- tested in the summer period ate 1817 and 1804 g/day, respectively. Animals from line rfi+ and rfi- tested later in life (i.e., during the fall period) ate 1869 and 1856 g/day, respectively. In 2018, concentrate and forage were distributed as a total mixed ration; therefore, it was not possible to precisely measure consumption of one or the other. In 2019 and 2020, concentrate consumption was limited to 700 g/day, and except for one animal from 2019, all animals ate the whole 700 g daily. ADFI_M and average daily forage intake (ADForI_M) were not significantly different between the divergent lines (Tableau II.4.1B). No difference was observed between the two lines in terms of E-MW_M, ADG_M, and MD_M, and animals from line rfi- had a slightly higher BFT_M than animals from line rfi+. In comparison with the model used to estimate RFI_M under a concentrate diet, an additional effect of the period of control nested in the year was added as a fixed effect, and together with zootechnical parameters, it explained 46% of the variation in ADFI_M ($p = 3 \times 10^{-16}$) in the MIX phase. There were no differences between the two lines when RFI_M was calculated with total ADFI_M. For the 2019 and 2020 animals, no difference

was observed between the lines when RFI was calculated considering forage intake only (RFor_M). Out of the 83 animals from line rfi⁻ kept in the MIX phase, only 45 turned out to have a negative phenotypic RFI_M, and out of the 84 animals from line rfi⁺, 41 had positive phenotypic RFI_M values (Tableau II.4.3). ADFI_M was significantly correlated with E-MW_M ($r = 0.40$, $p = 6.6 \times 10^{-7}$) and ADGM ($r = 0.20$, $p = 0.03$).

Tableau II.4.3 : Number of lambs in each phenotypic class in phase MIX according to their genetic line.

		Phenotypic RFI _M ¹ (g/Day)			
		≤-90]90,0]]0,90]	>90
Genetic Line	rfi ⁻	28	17	17	21
	rfi ⁺	25	18	13	28

¹ The -90 and 90 thresholds were chosen because they were -0.5 SD and 0.5 SD of RFI_M, respectively.

Since concentrate intake was limited to 700 g/day in 2019 and 2020, animals that ate less forage had a total ration that was denser in energy and crude protein. However, in the Wilcoxon signed-rank tests applied to the RFI_M calculated from ADFI_M, total energy intake or total crude protein intake led to the incapacity of rejecting the null hypothesis, meaning the distributions of the three traits were the same.

2.2 Plasma Metabolites

2.2.1 Growth Phase under a 100% Concentrate Diet

Thirty-four metabolites were identified in the plasma of the animals in the CONC phase, the most abundant being D-glucose (Tableau II.4.S1). All metabolites were included in the PLS-DA model used to discriminate genetic lines rfi⁺ and rfi⁻. Based on the area under the receiving operator characteristic curve (AUROC), we retained eight components (AUROC = 0.81) for the PLS-DA of plasma metabolites in the CONC phase (Figure II.4.1A). According to the permutation test, the genetic lines were significantly discriminated by the PLS-DA ($p = 9.9 \times 10^{-5}$). Only citrate and malate had a variable importance in projection (VIP) value higher than 1.5 in the eight-dimension PLS-DA model and were therefore the two most discriminant metabolites, followed by L-leucine, beta-hydroxyisovalerate, and L-threonine with VIP values around 1.3 (Figure II.4.1B). The loadings of the first component highlighted an association between line rfi⁻ and higher levels of plasma citrate and malate and between line rfi⁺ and higher levels of L-leucine, L-threonine, and beta-hydroxyisovalerate (Figure II.4.1C).

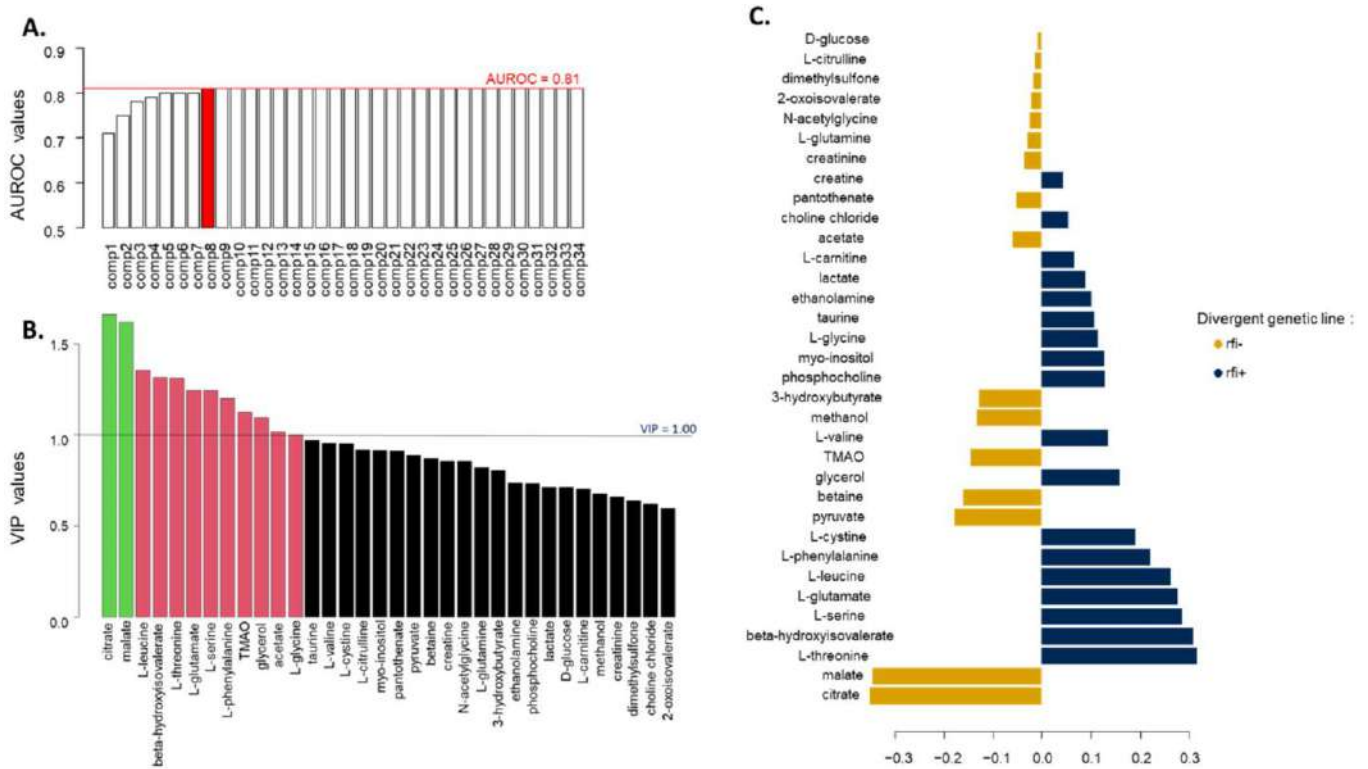


Figure II.4.1 : Results from the PLS-DA of the plasma metabolites measured during the CONC phase according to the rfi divergent genetic line of lambs ($n = 133$ rfi⁻ and $n = 142$ rfi⁺). (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; red line marks the maximum AUROC value obtained with 8 components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values of each metabolite on the first component of the PLS-DA model; in gold and blue, metabolites associated with line rfi⁻ and line rfi⁺, respectively.

When PLS-DA was applied to the two extreme phenotypic RFI groups comprising animals with a phenotypic RFI_c higher than 0.5 standard deviations (SD) or lower than -0.5 SD independently from their genetic line, the results were similar. Eleven components were retained based on the AUROC (AUROC = 0.84), and they significantly discriminated the two phenotypic RFI_c groups ($p = 1.0 \times 10^{-3}$). When the eleven components were taken into account in the PLS-DA model, only beta-hydroxyisovalerate had a VIP value higher than 1.5, followed by L-glutamate, L-serine, and citrate (VIP = 1.40, 1.29, and 1.25, respectively) (Figure II.4.S1).

Pearson correlations were calculated between phenotypes recorded during the CONC phase and the relative concentrations of all metabolites. Only weak correlations were found between metabolites and phenotypes. The highest correlation with ADFI_c was with beta-hydroxyisovalerate ($r = 0.40$, $p = 8.4 \times 10^{-11}$), which was also significantly correlated with phenotypic RFI_c ($r = 0.30$, 1.7×10^{-7}). Amino acids were all positively correlated with each other, with the highest correlation being observed between L-leucine and L-valine ($r = 0.91$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). Citrate was highly correlated with malate ($r = 0.94$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) (Figure II.4.2).

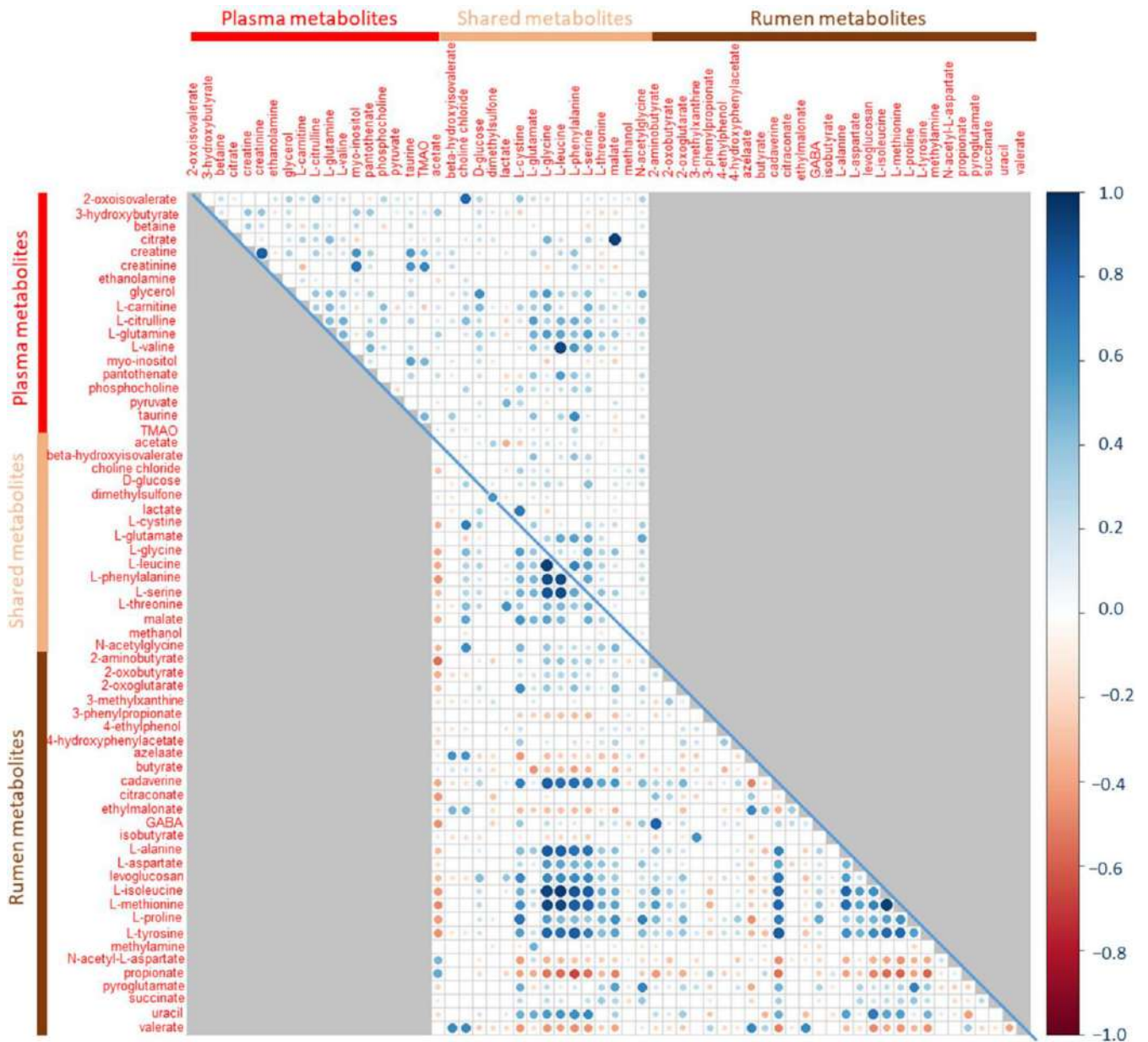


Figure II.4.2 : Correlation matrix of metabolites measured during the CONC phase in plasma (above the diagonal) and rumen (below the diagonal). Correlations of a metabolite between the two biological fluids are given on the diagonal. Gray squares correspond to non-existing correlations. White squares are non-significant correlations after Benjamini–Hochberg adjustment of p-values.

2.2.2 Finishing Phase under a Mixed Diet

Twenty-three metabolites were identified in plasma samples from the MIX phase, 21 of them being present in all samples and D-glucose being, once again, the most abundant (Tableau II.4.S1). Based on the AUROC, nine components were retained for the PLS-DA (AUROC = 0.87) (Figure II.4.3A), which significantly discriminated the two divergent genetic lines ($p = 3.0 \times 10^{-4}$) according to the permutation test. When the nine components were taken into account in the PLS-DA model, only citrate, associated with line rfi-, had a VIP value above 1.5, while L-threonine and L-leucine, associated with line rfi+, had VIP values higher than 1.4 (Figure II.4.3B). The loadings of the first component highlighted the association between line rfi- and citrate and between line rfi+ and L-threonine and L-leucine (Figure II.4.3C).

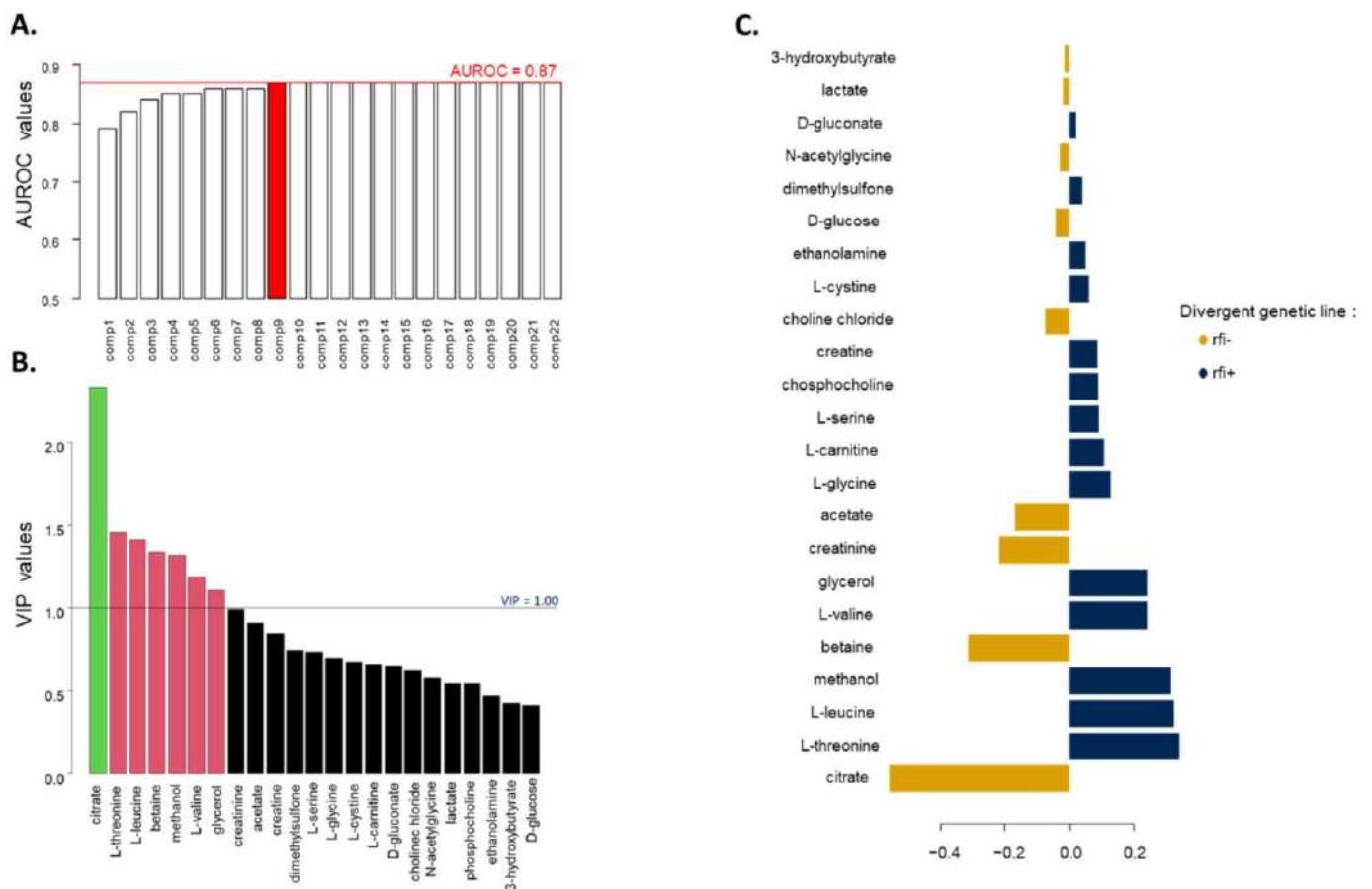


Figure II.4.3 : Results of the PLS-DA of the plasma metabolites measured during the MIX phase according to the rfi divergent genetic line of lambs ($n = 133$ rfi- and $n = 142$ rfi+). (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; the red line marks the maximum AUROC value obtained with nine components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values assigned to each metabolite on the first component of the PLS-DA model; in gold and blue, metabolites associated with line rfi- and line rfi+, respectively.

When PLS-DA was applied to phenotypic RFI groups, the best model in terms of diagnosis had nine components (AUROC = 0.74) but did not significantly discriminate the two phenotypic groups according to the permutation test ($p = 0.50$).

No correlation between either ADFI_M or genetic or phenotypic RFI_M and plasma metabolites was higher than 0.5 in absolute values. The strongest correlations between phenotypes and metabolites were observed for ADFI_M with either L-glycine or L-leucine ($r = -0.23$, $p = 0.004$ and $r = 0.23$, $p = 0.008$, respectively). L-leucine was strongly correlated with L-valine ($r = 0.85$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) (Figure II.4.4).

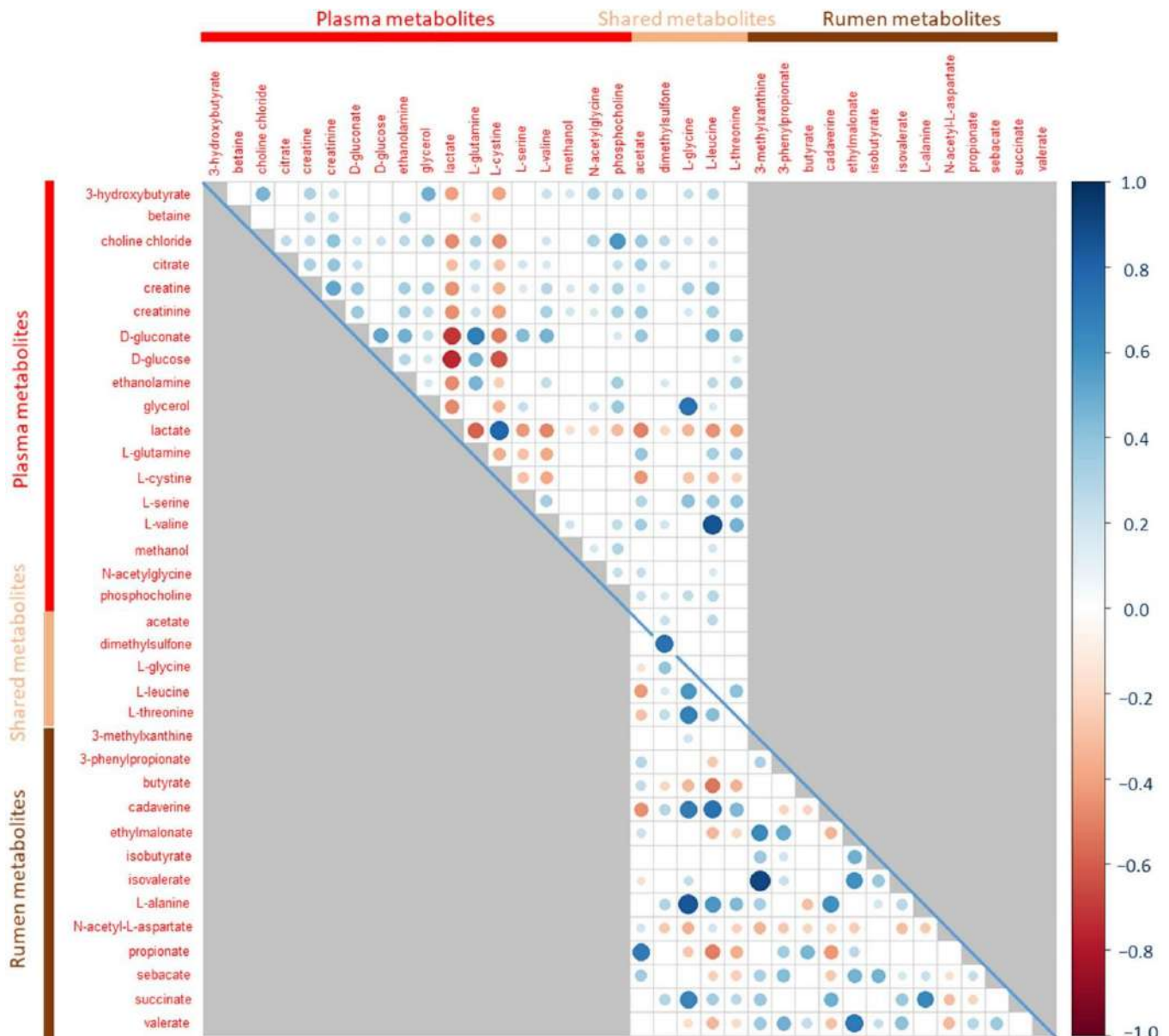


Figure II.4.4 : Correlation matrix of metabolites measured during the MIX phase in plasma (above the diagonal) and rumen (below the diagonal). Correlations of a metabolite between the two biological fluids are given on the diagonal. Gray squares correspond to non-existing correlations. White squares are non-significant correlations after Benjamini–Hochberg adjustment of p -values.

A summary of plasma metabolite correlations observed under both diets is presented in Figure II.4.5. All correlations higher than 0.5 in absolute values and significant after Benjamini–Hochberg correction are shown.

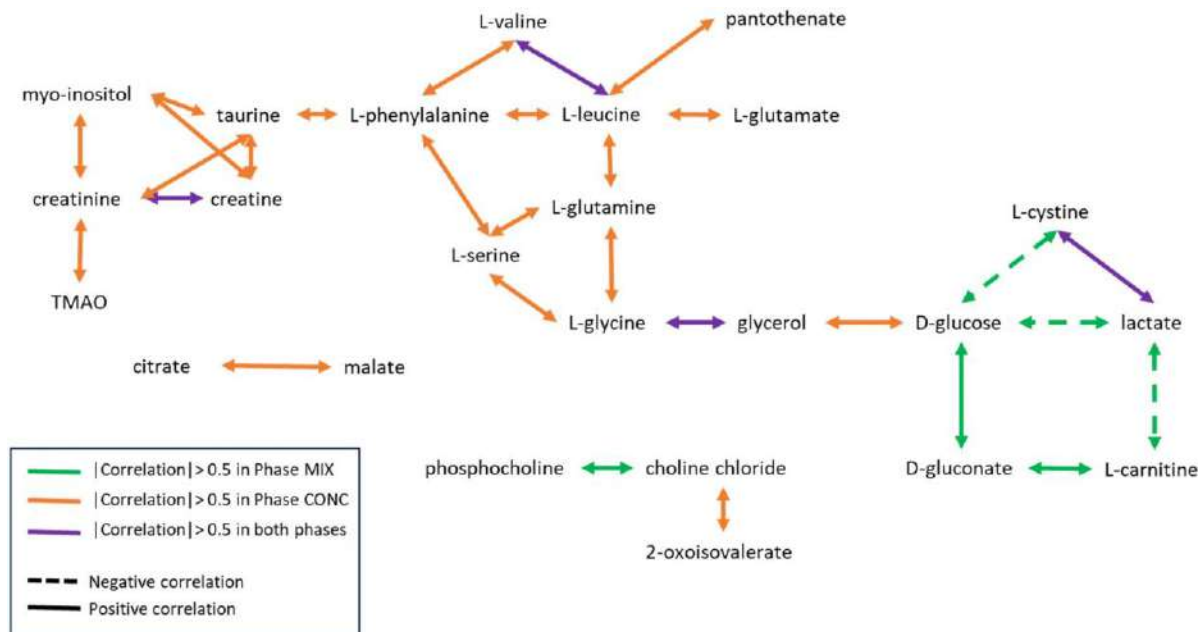


Figure II.4.5 : Summary of plasma metabolite correlations. Significant correlations higher than 0.5 in absolute values specifically in the CONC phase, the MIX phase, or under both diets are represented in orange, green, and purple, respectively. Negative correlations are marked by dashed lines and positive correlations are marked by solid lines.

2.3. Rumen Metabolites

2.3.1. Growth Phase with a 100% Concentrate Diet

Forty-four metabolites were identified in rumen samples from the CONC phase. Thirty of them were quantified in every sample and fourteen were missing from one or several samples (Tableau II.4.S1).

Based on the AUROC, ten components were retained for the PLS-DA (AUROC = 0.70) that best discriminated the two divergent genetic lines, but this model did not significantly discriminate them according to the permutation test ($p = 0.79$).

The best PLS-DA model that aimed to discriminate extreme phenotypic groups retained 10 components but failed to significantly discriminate efficient from inefficient animals according to the permutation test ($p = 0.22$).

No statistically significant correlation was found between any of the metabolites and ADFI_c and RFI_c. Correlations between rumen metabolites higher than 0.5 in absolute values were, on the other hand, quite numerous. Generally, correlations among amino

acids and among volatile fatty acids (VFA) were positive, whereas correlations between amino acids and VFA were negative. As an example, L-alanine was strongly correlated with L-glycine ($r = 0.83$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), L-serine ($r = 0.73$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), L-leucine ($r = 0.81$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), L-isoleucine ($r = 0.78$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), L-methionine ($r = 0.77$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) and L-phenylalanine ($r = 0.73$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) and was negatively correlated with acetate ($r = 0.33$, $p = 5.2 \times 10^{-7}$), propionate ($r = 0.42$, $p = 2.8 \times 10^{-11}$) and butyrate ($r = 0.30$, $p = 2 \times 10^{-6}$). Cadaverine was also highly positively correlated with the amino acids (Figure II.4.2).

2.3.2. Finishing Phase with a Mixed Diet

Nineteen metabolites were identified in rumen samples from the MIX phase. Eighteen of them were quantified in every sample. The last one, citraconate, was not detected in more than half the samples (88 samples out of 164) and was therefore removed from the metabolites considered for the PLS-DA (Tableau II.4.S1). Neither the PLS-DA on genetic divergent lines (nine components, AUROC = 0.71) nor the PLS-DA on phenotypic groups (five components, AUROC = 0.71) were found to significantly discriminate the groups ($p = 0.21$ and $p = 0.77$, respectively).

No significant correlation was observed between phenotypes and metabolites. All correlations higher than 0.5 in absolute values between metabolites were positive correlations. Acetate and propionate were positively correlated ($r = 0.7$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), isovalerate was correlated with ethylmalonate ($r = 0.61$, $p = 1.2 \times 10^{-16}$) and 3-methylxanthine ($r = 0.90$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), those two being also correlated ($r = 0.63$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). Amino acids were correlated with each other and with cadaverine and negatively correlated with VFA (Figure II.4.4).

2.4. Correlations between Rumen and Plasma Metabolites

No correlation higher than 0.5 in absolute values was observed between rumen and plasma metabolites, except between rumen dimethylsulfone and plasma dimethylsulfone in both phases: $r = 0.58$ ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) and $r = 0.70$ ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) in the CONC (Figure II.4.2) and MIX (Figure II.4.4) phases, respectively.

3. Discussion

3.1. Phenotypes

Genetic selection of the divergent lines on RFI was initiated in 2015 from 12 extreme sires phenotyped in 2013 and 2014 [10]. These lines rely on RFI phenotyped in young lambs fed a rich diet. In the first generation of selection [10], animals from the two lines essentially differed in ADFI and phenotypic RFI and showed no statistically significant differences in ADG, E-MW, BFT, or MD. Animals tested in this work were from the second (103 lambs from 2018) and third generations (101 lambs from 2019 and 73 from 2020) of selection. They exhibited a similar pattern, differing in ADFI_c and RFI_c, only marginally in E-MW_c and MD_c, and not at all in ADG_c or BFT_c under the same concentrate-based diet that was used for selection. One purpose of this study was to evaluate phenotypes in both divergent lines under a mixed diet, implying less competition with human food. The number of animals kept in the MIX phase was lower, but these animals were extreme males in terms of genetic RFI_c. Despite this, under the MIX diet, no difference between lines was significant with any of the phenotypes considered, even though mean phenotypic RFI_M in lines rfi and rfi+ were still negative and still positive, respectively. This absence of significant differences during the MIX phase could be due to two parameters evolving concomitantly in our study: the diet and the animals' age and growth status. Redden et al. found that Targhee ewes that were efficient in terms of RFI under a high-energy diet while growing were not the same as the efficient ones when they were fed a forage-rich maintenance diet as yearlings [24]. Oliveira et al. reported similar results in Nellore cattle: animals from the low-RFI group, when fed a high-energy diet in the feedlot, had a 9.4% and 19.7% lower DMI than animals from the medium-RFI and high-RFI groups, respectively, but when animals were brought to the pasture, no significant difference was observed between the groups [25]. In their study, animals were older when switched to grass. The main difference between these studies and ours is that their RFI groups were made up based on single phenotypic assessments while our divergent lines stem from a multiple-generation genetic selection, making classification more reliable. Our selection seems to be appropriate for rapidly growing lamb breeding often based on high-concentrate diets and slaughtering between 3.5 and 6 months of age. Some of our lambs had null or negative mean ADGM during the second phase of measurements, indicating that they were not growing anymore and that potential mechanisms associated with growth, such as preferential muscle deposition over fat [26], could not be applicable anymore on lambs older than 6 months. If this was the sole explanation, we would expect plasma metabolites to differ between efficient and inefficient animals in the CONC phase but not necessarily in the MIX phase, and no difference in rumen metabolites in either phase. The difference between our phases could also be linked with a better use of the concentrate diet in rfi lambs than in the rfi+ lambs and no better use of the mixed diet. In this scenario, we would expect both rumen and plasma metabolites to vary between lines during the CONC phase as being

linked to one or the other line as a result of a different digestion and absorption of this diet in divergent animals [27].

3.2. Plasma Metabolites

Few studies have been performed on sheep plasma metabolites, and even fewer have linked NMR-measured metabolites and feed efficiency. In a recent study, Goldansaz et al. used multiple platform analysis to identify potential biomarkers of RFI in sheep [21]. A few months later, Foroutan et al. tried to extensively describe the metabolome of beef cattle with either high-RFI or low-RFI phenotypes using NMR, GC/MS, and LC/MS techniques [28] and compared their results with pre-existing studies on cattle and with scarce studies that exist on sheep [23,29,30].

3.2.1. Amino Acids

Repeatedly throughout the studies, amino acids were more abundant in the plasma or serum of less efficient animals than in the plasma or serum of the more efficient ones. In particular, L-threonine, identified as the most discriminant metabolite for the line rfi+ in our study, was also more represented in high-RFI animals compared to low-RFI ones in other studies [23,28]. This result can be nuanced by the comparison between the two PLS-DAs performed on the genetic lines or the extreme phenotypic RFI groups since, in the latter, plasma L-threonine was not identified as one of the most discriminant metabolites in either of the phases. L-glycine is more controversial since it has been found to be higher in efficient animals in some studies [12,28] and in less efficient animals in others [12,22], and was associated with line rfi+ in the PLS-DA discriminating our divergent lines and associated with efficient animals when phenotypes were considered. L-glutamate, L-serine, and even more beta-hydroxyisovalerate (which is a product of L-leucine metabolism) were the most discriminant metabolites associated with inefficient animals in terms of phenotypic RFI_c in the CONC phase. L-glutamate had also been associated with inefficiency in Foroutan et al., 2020 [28]. Beta-hydroxyisovalerate has not been reported yet in the literature either way.

The overall increase in amino acids plasma concentrations could be linked to an increase in crude protein consumption, proportional to the increase in ADFI. However, no correlation was found between any individual amino acid concentration and ADFI, regardless of diet. This may be due to the fact that plasma amino acid concentrations are a reflection of both ingestion and metabolism and that ADFI is a reflection of feed intake during the whole period, not only during the few days or hours prior to sampling. Mechanisms other than simply ingestion must be at stake. Jorge-Smeding et al. suggested that efficient animals could have a slowed-down urea cycle, resulting in the accumulation of carbamoyl phosphate and fumarate and a decrease in plasma

concentrations of L-ornithine, L-aspartate, L-valine, and L-lysine [29]. In our case, neither L-ornithine nor L-lysine were quantified in the plasma, but L-citrulline, which is part of the urea cycle, was not differentially expressed in the different genetic lines. However, L-valine had a VIP value higher than 1 in the MIX phase and was associated with line rfi+. Urea is not one of the 191 metabolites in the ASICS library [31] and therefore was not identified in our study; thus, we cannot properly conclude on the acceleration or slow-down of the urea cycle.

Another explanation for feed efficiency, particularly discussed in Cantalapiedra-Hijar et al., is a modification of protein turnover [18]. Protein turnover is the continuous process of the synthesis and degradation of proteins in the organism allowing animals to adapt to their physiological status [32]. Its increase, resulting in a higher energy expense to deposit the same amount of muscle protein, could explain why some animals are poorly efficient. In our study, we found no difference in longissimus dorsi depth measured with ultrasounds between efficient and inefficient animals in either phase, suggesting that while eating less, efficient animals deposited the same amount of muscle. In some non-ruminant species, protein turnover, which is known to be variable between individuals, has been proven to be heritable and could therefore be one of the mechanisms involved in feed efficiency [33,34]. Protein turnover is an energy-consuming process that increases with protein concentration of the diet, and both synthesis and degradation are enhanced when supplementation of an amino acid-lacking diet is realized [35]. Our animals were fed in order to cover or overpass their protein needs in accordance with INRAE recommendations and thus cannot be considered as lacking amino acids [36].

3.2.2. Organic Acids

Citrate was the most discriminant metabolite between the two genetic lines in both our phases. It has been identified in most of the studies previously quoted, but its association with efficiency was not commonly reported. Even in our study, when discrimination was made on the bases of phenotypic groups, citrate importance in the discrimination was far lower. Karisa et al. even linked citrate and less efficient animals [23].

Plasma citrate concentrations are mainly regulated by digestive absorption of feed citrate, bone metabolism, and renal filtration and resorption [37,38]. Thus, an increase in citrate plasma concentration in genetically efficient animals could stem from their better reabsorption of urine citrate, resulting in less waste of potentially valuable carbon or higher export from the cell when energy is in excess, resulting in a more efficient use of citrate [37]. Other hypotheses would have been a higher digestive citrate absorption, but this is not consistent with the fact that efficient animals eat less and that the ruminal metabolites profile does not suggest a higher citrate production in the rumen.

Finally, the increase in citrate plasma concentration could be caused by an increased citrate production in the cell or an increased export of citrate from the cell to the plasma. The concomitant augmentation of citrate and malate, also highly discriminant in the CONC phase of our experiment, suggests that when fed 100% concentrate, catabolic phenomena and energy metabolism could be involved in the difference in feed efficiency between lambs (Figure II.4.6). This was previously considered by Herd and Richardson in cattle [19]. Citrate is a key metabolite of both anabolism and catabolism, being the initial step of the citric cycle in the mitochondria and thus a very important element of ATP production in the cell. Citrate is also involved in fatty acid synthesis in the cytoplasm through acetyl-CoA production [39,40] and in modulating glycolysis, lipogenesis, and neoglucogenesis.

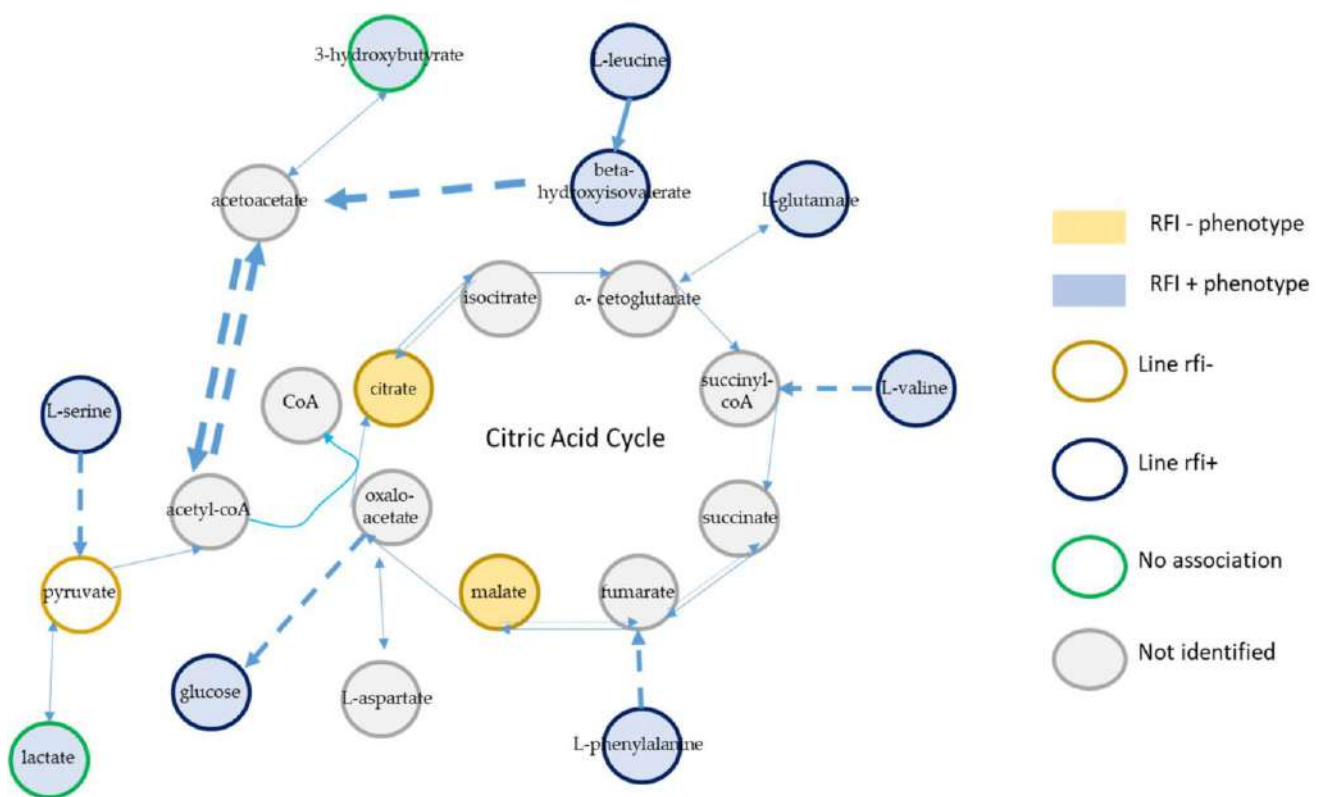


Figure II.4.6 : Summary of metabolites found to be associated with genetic lines or phenotypic RFI groups. Gold circles and blue circles indicate that metabolites were associated with line rfi⁻ and line rfi⁺, respectively. Gray circles indicate that the metabolites were not identified in our study. Green circles indicate that the metabolites were identified but not significantly associated with either of the lines. Gold and blue backgrounds represent the association between a metabolite and rfi⁻ or rfi⁺ phenotypic groups, respectively. Dashed lines represent several reactions in a pathway. Dotted lines represent potentially reversible reactions.

Kelly et al. reported an increase in 3-hydroxybutyrate in inefficient heifers [41]. In ruminants, 3-hydroxybutyrate has two potential origins. On one hand, absorbed butyrate can be converted to 3-hydroxybutyrate in the rumen epithelium, and thus, an increase in feed intake or an orientation towards butyrate production can be responsible for a plasma 3-hydroxybutyrate increase [42]. On the other hand, it could result from an impaired energy valorization. When intermediates of the citric cycle are lacking, especially when oxaloacetate is oriented towards neoglucogenesis, citrate synthase is inhibited, resulting in a condensation of acetylCoA into ketone bodies in the liver (Figure II.4.6).

3.2.3. Integration

Another hypothesis could explain both the increased citric cycle intermediates in efficient animals and increased amino acids in inefficient animals (Figure 6). Efficient animals could have a higher capacity to orient excess amino acids towards anaplerotic reactions, resulting in the augmentation of the citric cycle metabolites, including citrate and malate.

Increased citrate and malate mitochondrial concentrations that could stem from an increased deamination of excess amino acids may be better exported from the mitochondria in efficient animals, which would avoid impairing citric cycle reactions, as suggested in MacDonald et al. [43]. Even though plasma exports from the cell to the plasma are not well described for now, contrarily to exchanges between the mitochondria and the cytoplasm [44], Mycielska and coworkers postulated the existence of a transporter allowing citrate and potentially other citric cycle intermediates to leave the cell [45].

The link between mitochondrial metabolism and feed efficiency has been proposed in the literature. Sharifabadi and coworkers isolated mitochondria from lambs differing in ADFI and RFI and found that the activity of all five mitochondrial respiratory chain complexes were enhanced in feed-efficient animals [46]. Moreover, studies on isolated pig mitochondria have shown that pigs selected for efficiency tend to have a lower electron leakage from several complexes of the respiratory chain and a lower production of reactive oxygen species (ROS), correlated with their phenotypic RFI [47]. Similarly, Bottje et al. reviewed links between electron leaks and feed efficiency, concluding that poorly efficient animals had a less efficient electron transfer along the electron transfer chain, leading to an increase in ROS in broilers [48]. In Kolath et al., feed efficiency was associated with greater efficiency in respiratory control ratio, implying a higher degree of coupling between respiration and oxidative phosphorylation but no increase in production of ROS when expressed as a function of respiration rate [49].

A description of the main metabolic pathways highlighted in this study is proposed in Figure II.4.6

3.3. Rumen Metabolites

No significant correlation higher than 0.4 in absolute values was observed between rumen and plasma metabolites, with the notable exception of the correlation between rumen dimethylsulfone and plasma dimethylsulfone in both phases. Plasma dimethylsulfone results from the absorption of rumen dimethylsulfone, presumably produced from the degradation of organic sulfur compounds such as L-methionine or from S-methyl cysteine sulfoxide that would come from the rapeseed meal incorporated in the concentrates. An increase in plasma dimethylsulfone was previously described to be linked to reduced methane emissions in dairy cows, but this was not associated with a production increase [50]. In our study, dimethylsulfone was not linked with any of the phenotypes, nor with genetic RFI.

Rumen metabolites could potentially be linked to feed efficiency in two ways. On one hand, metabolites produced by the rumen microbiota are subsequently released in the rumen and absorbed, and differences in metabolites in the rumen could indicate impaired or enhanced digestion associated with better use of feed. On the other hand, metabolites absorbed in the rumen or in the intestine could influence host phenotype by orienting metabolism towards tissue deposition or by increasing protein turnover, for example. Metabolites that we identified in the rumen are very close to those obtained in earlier studies led with NMR techniques [20]. In our study, rumen metabolites did not discriminate genetic lines nor phenotypic groups, regardless of the diet. Indeed, discrimination by PLS-DA was poor (as highlighted by the AUROC values being 0.7 at most, and p-values of the permutation tests being greater than 0.05).

Succinate, which is a microbial intermediate towards propionate production in the rumen [51], was found to be linked to animals growing faster for the same feed intake in a study from Clemmons et al. [52].

Artegoitia and coworkers compared rumen metabolomics of steers with high ADG and steers with low ADG for the same amount of feed ingested [53]. They reported an increase in phenylpyruvate, pyroglutamate, cortisol, DHEA sulfate, lactate, imidazole, and malonyl-carnitine and a decrease in lactate, taurine, and both alpha-linolenic acid and linoleic acid in rapidly growing animals ($p < 0.1$), suggesting that ruminal metabolism may differ between efficient and inefficient animals [53]. Among these metabolites, only pyroglutamate and lactate in the CONC phase and sebacate in the MIX phase were quantified in our study, and neither was associated with either lines or phenotypic RFI.

Two recent studies compared VFA relative concentrations and total VFA concentrations without finding any difference between efficient and inefficient animals [54,55]. Consistently with these studies, no difference was found in the relative concentrations of VFA in our study.

Ruminal digestion and lipid biohydrogenation in the rumen are mainly driven by the microbiota, and investigating ruminal microbiota could highlight differences that are

difficult to determine using metabolomics. As an example, Artegoitia et al. also found higher bacterial and lower archaeal populations in efficient animals, and other studies have investigated links between ruminal microbiota and feed efficiency [56–58]. The analysis of microbial populations and long-chain fatty acids in our samples might unravel new explanations.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

A total of 277 Romane male lambs belonging to the 2nd and 3rd generations of divergent selection on RFI were bred at the INRAE experimental unit P3R in Bourges (<https://doi.org/10.15454/1.5483259352597417E12>, 1 February 2022) during the years 2018 (2nd generation), 2019, and 2020 (3rd generation). The genetic selection of the lines has been presented in Tortereau et al. [10]. Briefly, every year since 2015, males were phenotyped for 6 weeks under a 100% concentrate diet, and their RFI values were calculated. Breeding values for RFI were then estimated, and males with the most extreme breeding values for RFI were selected as the sires of the next generation [10]. Lambs inherited their line (rfi⁻ or rfi⁺ for the efficient or less efficient lines, respectively) from their sire.

In 2018, 2019, and 2020, animals following this phenotyping protocol were bred in 6, 5, and 4 different pens, respectively, each pen being equipped with one automatic concentrate feeder (CONC phase). Lambs were grouped based on their body weights recorded at the beginning of the adaptation period (i.e., when lambs were about 10 weeks of age). After the estimation of the RFI breeding values, the most extreme animals in terms of genetic RFI values were fed a mixed ration distributed by automatic forage and concentrate feeders (MIX phase). This second phase was led between 204 and 246 d of age (SD=7 d) in the summer (29 animals in 2018, 36 in 2019) or between 263 and 305 d of age (SD= 18 d) in the fall (29 animals in 2018, 35 in 2019, 38 in 2020) due to the limited number of automatic forage feeders available (Figure II.4.7). In total, up to 30 animals were kept per period in 2018, resulting in keeping 57% of the animals, and up to 40 animals were kept per period in 2019 and 2020, resulting in 69% and 52% of the animals being kept, respectively.

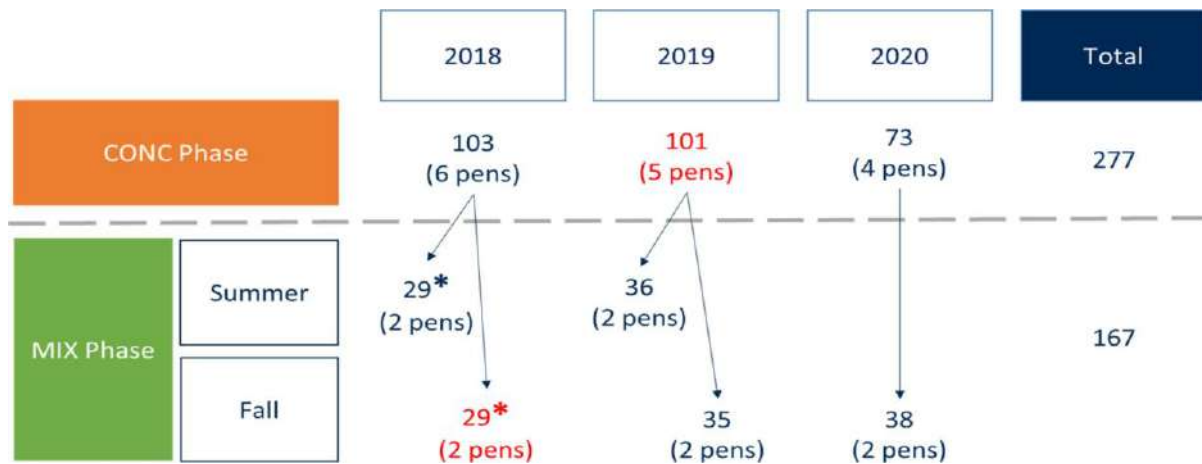


Figure II.4.7 : Experimental design. Periods marked in red indicate that the feeders were not stopped prior to sampling. * Concentrate and forage distributed as a TMR through forage feeders only.

During the MIX phase, animals were divided into two pens per period. In 2018, each pen was equipped with two forage feeders, each delivering the total mixed diet comprising one-third concentrates and two-thirds hay. The total mixed ration was calculated to enable a growth of 125 g/day according to INRA standards [36]. In 2019 and 2020, each pen was equipped with two forage feeders delivering only forage ad libitum, and one concentrate feeder delivering at most 700 g of concentrate per day per animal. This amount was chosen to match the consumption of concentrates in the MIX phase in 2018 and represents approximately one-third of the ration. As a result, the mean proportions of concentrate in the MIX rations in 2019 and 2020 were 34% and 37%, respectively. Animals were housed on litter chips to avoid straw consumption that would distort the measured feed intake.

4.2. Diets

In the CONC phase, the diet consisted of a 100% concentrate meal made up of beet pulp, wheat bran, barley, corn, rapeseed meal, sunflower meal, and pelleted lucerne (880 gDM/kg, 18.2% crude protein, 10.5% crude fiber, and 2.7% crude fat in 2018 and 0.3% crude fat in 2019, on a DM basis) fed through automatic feeders. During the MIX phase, the diet consisted of a mixed ration of approximately two-thirds orchard hay (915 gDM/kg, 6.6% crude protein for 2018 and fall 2019 and 8.6% crude protein for 2019; 37% crude fiber in 2018 and 34% crude fiber in 2019) and one-third of a concentrate made of wheat, barley, wheat bran, and rapeseed meal (883 gDM/kg, 20% crude protein, 11% crude fiber, 4% crude fat on a DM basis). Chemical composition of feed was determined according to the procedures of the Association of Official Analytical Chemists (Association of Official Analytical Chemists, 1998) [59]; neutral detergent fiber was determined according to the procedure of Van Soest et al. (1991) [60].

4.3. Traits

Animals were weighed at the beginning (B-W) and the end (E-W) of each period of testing. End metabolic weight (E-MW) was calculated as $E-W \times 0.75$. The difference between B-W and E-W was used to calculate the ADG of each animal during the period of testing. MD of longissimus dorsi and BFT were both measured by ultrasound at the end of each period of testing. ADFI was determined as the mean of daily cumulative feed intake during the six-week period. Phenotypes from the CONC phase are presented with a C subscript and phenotypes from the MIX phase with an M subscript. Residual feed intake was estimated for each diet separately using the following multiple linear regression for phase CONC:

$$ADFI_{C,i} = \mu + \beta_1(E-W_{C,i}) \times 0.75 + \beta_2ADG_{C,i} + \beta_3MD_{C,i} + \beta_4BFT_{C,i} + RFI_{C,i}$$

The period of control effect nested in each year was added as a fixed effect in the MIX phase. In this model, metabolic weight is a proxy for maintenance requirements while the other parameters are linked to meat production. To deal with the issue of the energy density of the ration when animals were restricted to 700 g/day of concentrate and allowed ad libitum consumption of a less-energetically dense forage, Wilcoxon signed-rank tests were performed, comparing the residuals of the above-presented model when the predicted variable was ADFI, energy total intake, or crude protein total intake.

4.4. Sampling

The 277 animals were sampled during the CONC phase (103 in 2018, 101 in 2019, and 73 in 2020), and 167 were then sampled during the MIX phase (58 in 2018, 70 in 2019, and 37 in 2020). In practice, feeders were stopped the night before the sampling, resulting in a minimum of ten to eleven hours of fasting, and water was stopped 2 h prior to the sampling to avoid an excessive dilution of ruminal content. However, in the CONC phase of 2019 and the fall period of the MIX phase of 2018, the automatic feeders were not stopped (Figure II.4.7). Rumen fluid was sampled using an esophageal probe and a pump, transferred to 2 mL microtubes and immediately frozen into liquid nitrogen. Five microtubes containing rumen samples were broken during the freezing process and one did not have enough rumen fluid for the protocol. Therefore, three samples from the CONC phase and three from the MIX phase were not available for further analysis.

Blood was sampled at the jugular vein using vacutainer needles and tubes containing lithium heparin and centrifuged at 2400 g for 10 min at 4°C. Plasma was transferred to 2 mL microtubes and immediately frozen in liquid nitrogen. All samples were transferred from liquid nitrogen to -80°C freezers where they were stored. Two samples, one from the CONC phase and one from the MIX phase, were broken during the process and therefore not available for subsequent analysis.

4.5. NMR Analysis

4.5.1. Chemical Analysis

Plasma samples both from 2018 and 2019 were prepared at the same time; similarly, rumen fluid samples of these two years were prepared at once. Plasma and rumen samples from 2020 were prepared at the same time. Plasma samples were centrifuged at 3000 g for 5 min at 4°C. Then, 200 µL of the supernatant was transferred to a microtube containing 500 µL of phosphate buffer (pH = 7.0) with 17.2 mg/mL of trimethylsilylpropanoic acid (TSP) used as a reference for chemical shift. This mix was then centrifuged for 15 min at 4190 g and 4°C. Finally, 600 µL of the supernatant was transferred to NMR tubes. Rumen fluid samples followed the same protocol until the last centrifugation at 4190 g. In this step, the supernatant was transferred to another microtube and centrifuged again in the same conditions, and finally, 600 µL of the supernatant was transferred to NMR tubes. All NMR experiments were performed using the MetaToul-AXIOM platform, a partner of the National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics: MetaboHUB (MetaboHUB-ANR- 11-INBS-0010, 2011). Samples were kept at 300 K while spectra were acquired using the cpmgpr1D Bruker pulse program on a Bruker AVANCE III HD 600 MHz NMR spectrometer (Bruker Biospin; Rheinstetten, Germany) operating at 600.13 MHz for ¹H resonance frequency using an inverse detection 5 mm 1H-13C-15N-31P cryoprobe attached to a CryoPlatform (the preamplifier cooling unit) with the following parameters: 512 transient and 16 “dummy” scans using a relaxation time of 2.0 s and an acquisition time of 1.36 s, resulting in the acquisition of 32,000 data points. Plasma and rumen samples were analyzed in two separate batches. Pre-processing of the spectra (zero order phase correction, baseline correction, and shift referencing) was performed using the TopSpin® software (version 4.0.9) from Bruker (Billerica, MA, United States of America). Shift referencing was calibrated on TSP in rumen spectra and on D-glucose doublet at 5.24 ppm for plasma samples because complexation between proteins and TSP made it unavailable for referencing.

4.5.2. Bioinformatic Analysis

Pre-processed spectra were finally analyzed with the ASICS (version 2.5.3) R package, which removed the solvent (water) signals (between 4.5 and 5.1 ppm), normalized areas under the spectra to constant sum, and then identified and quantified metabolites [61]. Each diet biological fluid (plasma or rumen) combination was treated in a separate analysis. The parameters were the following: noise.thres was set to 0.015 in accordance with noise baseline observed in the spectra, max.shift was set to 0.01 in all spectra, and clean.thres was set to 50 to keep only the metabolites that were present in at least 50% of the samples in each diet × biological fluid combination.

4.5.3. Statistical Analyses

Production traits and metabolite quantifications were corrected using the following linear models:

$$\text{CONC phase: } Y \sim \mu + \text{Year} + \text{Pen\%in\%Year} + \text{Fasting} + \varepsilon \quad (1)$$

$$\text{MIX phase: } Y \sim \mu + \text{Year} + \text{Period\%in\%Year} + \text{Pen\%in\%Period\%in\%Year} + \text{Fasting} + \varepsilon \quad (2)$$

The fasting fixed effect (2 levels) was introduced to take into account that in one of the three years of the CONC phase and one of the five periods of the MIX phase, feeders were not stopped prior to sampling (Figure II.4.7).

Principal component analysis was performed on each metabolomic dataset to identify potential outliers, resulting in the exclusion of an animal from the CONC phase that had atypical plasma and rumen profiles and had barely eaten the two days prior to the sampling. As a result, 274 and 273 samples were available for subsequent analyses on plasma and rumen metabolites, respectively, during the CONC phase, and 166 and 164 samples were available for plasma and rumen analysis, respectively, during the MIX phase (Tableau II.4.S1).

Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) from the mixOmics R package was applied on residuals obtained from the linear models (1) and (2) to examine the links between genetic lines and metabolites in rumen or in plasma under each diet [62]. Area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) was used to select the number of components to consider in the discriminant analyses. This method relies on the probability of correctly classifying a sample in a binary classification system compared to the probability of wrongly classifying the sample. A perfect classifier would always correctly classify and therefore have an AUROC of 1. An AUROC of 0.5 characterizes a random classifier. Validation of the discrimination performance was assessed by the MVA.test function from the RVAideMemoire R package, with 10,000 permutations [63]. Then, loadings on the first component, being the most discriminant, and variable importance in projection (VIP) with the optimal number of components according to AUROC taken into account were used to determine which variables were the most explanatory.

Additional PLS-DAs were plotted using phenotypic RFI as groups. The groups were formed by excluding individuals whose phenotypic RFI was between mean -0.5 SD and mean $+0.5$ SD. Animals with phenotypic RFI higher than 0.5 SD were considered efficient at the phenotypic level and animals with phenotypic RFI lower than 0.5 SD were considered inefficient at the phenotypic level. These PLS-DAs allowed us to compare genetic RFI and phenotypic RFI in both phases in order to determine if the differences potentially identified between the divergent lines were consistent with the phenotypic evaluation.

Pearson correlation coefficients between metabolites and phenotypes were calculated within each diet biological fluid combination, and the Benjamini–Hochberg correction was applied to the correlations [64]. Pearson correlations between plasma and rumen metabolites within each diet were also calculated and submitted to Benjamini–Hochberg correction.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12040304/s1>, Table S1. Metabolites identified and quantified in the four biological fluid × diet combinations. For each metabolite, the number of samples in which it has been identified is expressed followed by the prevalence percentage between parentheses. Figure S1. Discriminant analysis of the plasma metabolites measured during the CONC phase according to phenotypic RFI groups. Efficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between −328 and −75 g/day, and inefficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between 75 and 546 g/day. (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; red line marks the maximum AUROC value obtained with 11 components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values assigned to each metabolite on the first component of the PLS-DA model; gold and blue represent metabolites associated with efficient and inefficient animals, respectively.

Author Contributions: F.T. (Flavie Tortereau) and A.M. conceived and managed the study. Animals were handled by the trained staff of the experimental unit P3R in Bourges under the supervision of D.M. (<https://doi.org/10.15454/1.5483259352597417E12>, 1 February 2022). F.T. (Florian Touitou), F.T. (Flavie Tortereau), A.M. and D.M. performed the sampling. F.T. (Florian Touitou) and N.M.-G. prepared samples and performed NMR analyses. F.T. (Florian Touitou) performed data processing and statistical analyses under the supervision of F.T. (Flavie Tortereau) and A.M. F.T. (Florian Touitou), F.T. (Flavie Tortereau), A.M. and L.B. participated in the interpretation of the results. F.T. (Florian Touitou) wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research was funded by INRAE internal fundings (MILAGE and Phenefficace). This project received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement no. 772787 (SMARTER) and from the French National Research Agency (ANR)—ERAGAS project no. 39413 (GrassToGas).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and in agreement with the French National Regulations for human care and use of animals for research purposes. Animals were bred and handled at the experimental unit P3R, which has the experimental approval C18-174-01.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets analyzed in the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank all the colleagues of the experimental unit P3R in Bourges for handling the animals and their help during the sampling sessions. The authors would also like to thank the staff of the Meta-Toul AXIOM platform, and particularly Roselyne Gautier and Cécile Canlet for their help in the acquisition of NMR spectra.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Raineri, C.; Stivari, T.S.S.; Gameiro, A.H. Lamb Production Costs: Analyses of Composition and Elasticities Analysis of Lamb Production Costs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2015, 28, 1209–1215. [[CrossRef](#)]
2. Dumont, B.; Groot, J.C.J.; Tichit, M. Review: Make Ruminants Green Again—How Can Sustainable Intensification and Agroecology Converge for a Better Future? *Animal* 2018, 12, s210–s219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Paganoni, B.; Rose, G.; Macleay, C.; Jones, C.; Brown, D.J.; Kearney, G.; Ferguson, M.; Thompson, A.N. More Feed Efficient Sheep Produce Less Methane and Carbon Dioxide When Eating High-Quality Pellets. *J. Anim. Sci.* 2017, 95, 3839–3850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Løvendahl, P.; Difford, G.F.; Li, B.; Chagunda, M.G.G.; Huhtanen, P.; Lidauer, M.H.; Lassen, J.; Lund, P. Review: Selecting for Improved Feed Efficiency and Reduced Methane Emissions in Dairy Cattle. *Animal* 2018, 12, s336–s349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Arthur, P.F.; Archer, J.A.; Johnston, D.J.; Herd, R.M.; Richardson, E.C.; Parnell, P.F. Genetic and Phenotypic Variance and Covariance Components for Feed Intake, Feed Efficiency, and Other Postweaning Traits in Angus Cattle. *J. Anim. Sci.* 2001, 79, 2805. [[CrossRef](#)]
6. Berry, D.P.; Crowley, J.J. Residual Intake and Body Weight Gain: A New Measure of Efficiency in Growing Cattle. *J. Anim. Sci.* 2012, 90, 109–115. [[CrossRef](#)]
7. Cammack, K.M.; Leymaster, K.A.; Jenkins, T.G.; Nielsen, M.K. Estimates of Genetic Parameters for Feed Intake, Feeding Behavior, and Daily Gain in Composite Ram Lambs. *J. Anim. Sci.* 2005, 83, 777–785. [[CrossRef](#)]
8. Johnson, P.; Miller, S.; Knowler, K. Preliminary Investigations into the Trait of Residual Energy Intake in Sheep. *Proc. N. Zldn. Soc. Anim. Prod.* 2016, 76, 5.
9. Marie-Etancelin, C.; Francois, D.; Weisbecker, J.; Marcon, D.; Moreno-Romieux, C.; Bouvier, F.; Tortereau, F. Detailed Genetic Analysis of Feeding Behaviour in Romane Lambs and Links with Residual Feed Intake. *J. Anim. Breed. Genet.* 2019, 136, 174–182. [[CrossRef](#)]
10. Tortereau, F.; Marie-Etancelin, C.; Weisbecker, J.-L.; Marcon, D.; Bouvier, F.; Moreno-Romieux, C.; François, D. Genetic Parameters for Feed Efficiency in Romane Rams and Responses to Single-Generation Selection. *Animal* 2020, 14, 681–687. [[CrossRef](#)]
11. Gunsett, F.C. Linear Index Selection to Improve Traits Defined as Ratios. *J. Anim. Sci.* 1984, 59, 1185–1193. [[CrossRef](#)]
12. Meale, S.J.; Morgavi, D.P.; Cassar-Malek, I.; Andueza, D.; Ortigues-Marty, I.; Robins, R.J.; Schiphorst, A.-M.; Laverroux, S.; Graulet, B.; Boudra, H.; et al. Exploration of Biological Markers of Feed Efficiency in Young Bulls. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 9817–9827. [[CrossRef](#)]
13. De Paula, E.F.E.; de Souza, D.F.; Monteiro, A.L.G.; de Santana, M.H.A.; Gilaverte, S.; Rossi Junior, P.; Locatelli Dittrich, R. Residual Feed Intake and Hematological and Metabolic Blood Profiles of Lle de France Lambs. *R. Bras. Zootec.* 2013, 42, 806–812. [[CrossRef](#)]
14. Perea, K.; Perz, K.; Olivo, S.K.; Williams, A.; Lachman, M.; Ishaq, S.L.; Thomson, J.; Yeoman, C.J. Feed Efficiency Phenotypes in Lambs Involve Changes in Ruminal, Colonic, and Small-Intestine-Located Microbiota. *J. Anim. Sci.* 2017, 95, 2585. [[CrossRef](#)]
15. Muir, S.K.; Linden, N.; Knight, M.; Behrendt, R.; Kearney, G. Sheep Residual Feed Intake and Feeding Behaviour: Are ‘Nibblers’ or ‘Binge Eaters’ More Efficient? *Anim. Prod. Sci.* 2018, 58, 1459. [[CrossRef](#)]
16. Thompson, S.; Schaefer, A.L.; Crow, G.H.; Basarab, J.; Colyn, J.; Ominski, K. Relationship between Residual Feed Intake and Radiated Heat Loss Using Infrared Thermography in Young Beef Bulls. *J. Therm. Biol.* 2018, 78, 304–311. [[CrossRef](#)]
17. Montanholi, Y.R.; Swanson, K.C.; Palme, R.; Schenkel, F.S.; McBride, B.W.; Lu, D.; Miller, S.P. Assessing Feed Efficiency in Beef Steers through Feeding Behavior, Infrared Thermography and Glucocorticoids. *Animal* 2010, 4, 692–701. [[CrossRef](#)]

18. Cantalapiedra-Hijar, G.; Abo-Ismael, M.; Carstens, G.E.; Guan, L.L.; Hegarty, R.; Kenny, D.A.; McGee, M.; Plastow, G.; Relling, A.; Ortigues-Marty, I. Review: Biological Determinants of between-Animal Variation in Feed Efficiency of Growing Beef Cattle. *Animal* 2018, 12, s321–s335. [[CrossRef](#)]
19. Herd, R.M.; Oddy, V.H.; Richardson, E.C. Biological Basis for Variation in Residual Feed Intake in Beef Cattle. 1. Review of Potential Mechanisms. *Aust. J. Exp. Agric.* 2004, 44, 423. [[CrossRef](#)]
20. Bica, R.; Palarea-Albaladejo, J.; Kew, W.; Uhrin, D.; Pacheco, D.; Macrae, A.; Dewhurst, R.J. Nuclear Magnetic Resonance to Detect Rumen Metabolites Associated with Enteric Methane Emissions from Beef Cattle. *Sci. Rep.* 2020, 10, 5578. [[CrossRef](#)]
21. Goldansaz, S.A.; Markus, S.; Berjanskii, M.; Rout, M.; Guo, A.C.; Wang, Z.; Plastow, G.; Wishart, D.S. Candidate Serum Metabolite Biomarkers of Residual Feed Intake and Carcass Merit in Sheep. *J. Anim. Sci.* 2020, 98, skaa298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, J.; Greenwood, P.L.; Cockett, N.E.; Hadfield, T.S.; Vuocolo, T.; Byrne, K.; White, J.D.; Tellam, R.L.; Schirra, H.J. Impacts of the Callipyge Mutation on Ovine Plasma Metabolites and Muscle Fibre Type. *PLoS ONE* 2014, 9, e99726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Karisa, B.K.; Thomson, J.; Wang, Z.; Li, C.; Montanholi, Y.R.; Miller, S.P.; Moore, S.S.; Plastow, G.S. Plasma Metabolites Associated with Residual Feed Intake and Other Productivity Performance Traits in Beef Cattle. *Livest. Sci.* 2014, 165, 200–211. [[CrossRef](#)]
24. Redden, R.R.; Surber, L.M.M.; Roeder, B.L.; Nichols, B.M.; Paterson, J.A.; Kott, R.W. Residual Feed Efficiency Established in a Post-Weaning Growth Test May Not Result in More Efficient Ewes on the Range. *Small Rumin. Res.* 2011, 96, 155–159. [[CrossRef](#)]
25. Oliveira, L.F.; Ruggieri, A.C.; Branco, R.H.; Cota, O.L.; Canesin, R.C.; Costa, H.J.U.; Mercadante, M.E.Z. Feed Efficiency and Enteric Methane Production of Nellore Cattle in the Feedlot and on Pasture. *Anim. Prod. Sci.* 2018, 58, 886. [[CrossRef](#)]
26. Owens, F.N.; Dubeski, P.; Hanson, C.F. Factors That Alter the Growth and Development of Ruminants. *J. Anim. Sci.* 1993, 71, 3138–3150. [[CrossRef](#)]
27. Beauclercq, S.; Nadal-Desbarats, L.; Hennequet-Antier, C.; Gabriel, I.; Tesseraud, S.; Calenge, F.; Le Bihan-Duval, E.; Mignon-Grasteau, S. Relationships between Digestive Efficiency and Metabolomic Profiles of Serum and Intestinal Contents in Chickens. *Sci. Rep.* 2018, 8, 6678. [[CrossRef](#)]
28. Foroutan, A.; Fitzsimmons, C.; Mandal, R.; Berjanskii, M.V.; Wishart, D.S. Serum Metabolite Biomarkers for Predicting Residual Feed Intake (RFI) of Young Angus Bulls. *Metabolites* 2020, 10, 491. [[CrossRef](#)]
29. Jorge-Smeding, E.; Renand, G.; Centeno, D.; Pétéra, M.; Durand, S.; Polakof, S.; Cantalapiedra-Hijar, G. Metabolomics Reveals Changes in Urea Cycle Associated to Residual Feed Intake in Growing Heifers. In Proceedings of the Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Belo Horizonte, Brazil, 9–12 September 2019; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2019; pp. 231–232.
30. Clemmons, B.A.; Martino, C.; Powers, J.B.; Campagna, S.R.; Voy, B.H.; Donohoe, D.R.; Gaffney, J.; Embree, M.M.; Myer, P.R. Rumen Bacteria and Serum Metabolites Predictive of Feed Efficiency Phenotypes in Beef Cattle. *Sci. Rep.* 2019, 9, 19265. [[CrossRef](#)]
31. Tardivel, P.J.C.; Canlet, C.; Lefort, G.; Tremblay-Franco, M.; Debrauwer, L.; Concordet, D.; Servien, R. ASICS: An Automatic Method for Identification and Quantification of Metabolites in Complex 1D 1H NMR Spectra. *Metabolomics* 2017, 13, 109. [[CrossRef](#)]
32. Lobley, G.E. Protein Turnover—What Does It Mean for Animal Production? *Can. J. Anim. Sci.* 2003, 83, 327–340. [[CrossRef](#)]
33. Maeda, Y.; Yamanouchi, N.; Okamoto, S.; Hashiguchi, T. Genetic Parameters of Muscle Protein Turnover Rate in the Japanese Quail, *Coturnix Coturnix Japonica*. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 1989, 60, 484–490. [[CrossRef](#)]
34. McCarthy, I.D.; Houlihan, D.F.; Carter, C.G. Individual Variation in Protein Turnover and Growth Efficiency in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum). *Proc. R. Soc. Lond. B* 1994, 257, 141–147. [[CrossRef](#)]
35. Wessels, R.H.; Titgemeyer, E.C.; St Jean, G. Effect of Amino Acid Supplementation on Whole-Body Protein Turnover in Holstein Steers. *J. Anim. Sci.* 1997, 75, 3066. [[CrossRef](#)]
36. INRA. Alimentation Des Ruminants; Éditions Quæ: Versailles, France, 2018.

37. Hamm, L.L. Renal Handling of Citrate. *Kidney Int.* 1990, 38, 728–735. [[CrossRef](#)]
38. Krebs, H.A.; Johnson, W.A. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. *FEBS Lett.* 1980, 117, 9. [[CrossRef](#)]
39. Watson, J.A.; Lowenstein, J.M. Citrate and the Conversion of Carbohydrate into Fat. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5993–6002. [[CrossRef](#)]
40. MacDonald, M.J.; Smith, A.D.; Hasan, N.M.; Sabat, G.; Fahien, L.A. Feasibility of Pathways for Transfer of Acyl Groups from Mitochondria to the Cytosol to Form Short Chain Acyl-CoAs in the Pancreatic Beta Cell. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 30596–30606. [[CrossRef](#)]
41. Kelly, A.K.; McGee, M.; Crews, D.H.; Sweeney, T.; Boland, T.M.; Kenny, D.A. Repeatability of Feed Efficiency, Carcass Ultrasound, Feeding Behavior, and Blood Metabolic Variables in Finishing Heifers Divergently Selected for Residual Feed Intake¹. *J. Anim. Sci.* 2010, 88, 3214–3225. [[CrossRef](#)]
42. Leighton, B.; Nicholas, A.R.; Pogson, C.I. The Pathway of Ketogenesis in Rumen Epithelium of the Sheep. *Biochem. J.* 1983, 216, 769–772. [[CrossRef](#)]
43. MacDonald, M.J.; Fahien, L.A.; Brown, L.J.; Hasan, N.M.; Buss, J.D.; Kendrick, M.A. Perspective: Emerging Evidence for Signaling Roles of Mitochondrial Anaplerotic Products in Insulin Secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005, 288, E1–E15. [[CrossRef](#)]
44. Mosaoa, R.; Kasprzyk-Pawelec, A.; Fernandez, H.R.; Avantagegiati, M.L. The Mitochondrial Citrate Carrier SLC25A1/CIC and the Fundamental Role of Citrate in Cancer, Inflammation and Beyond. *Biomolecules* 2021, 11, 141. [[CrossRef](#)]
45. Mycielska, M.E.; Djamgoz, M.B.A. Citrate Transport in the Human Prostate Epithelial PNT2-C2 Cell Line: Electrophysiological Analyses: Electrophysiology of Prostatic Citrate. *J. Physiol.* 2004, 559, 821–833. [[CrossRef](#)]
46. Sharifabadi, H.R.; Zamiri, M.J.; Rowghani, E.; Bottje, W.G. Relationship between the Activity of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes and Feed Efficiency in Fat-Tailed Ghezel Lambs. *J. Anim. Sci.* 2012, 90, 1807–1815. [[CrossRef](#)]
47. Grubbs, J.K.; Fritchen, A.N.; Huff-Lonergan, E.; Dekkers, J.C.M.; Gabler, N.K.; Lonergan, S.M. Divergent Genetic Selection for Residual Feed Intake Impacts Mitochondria Reactive Oxygen Species Production in Pigs. *J. Anim. Sci.* 2013, 91, 2133–2140. [[CrossRef](#)]
48. Bottje, W.G.; Carstens, G.E. Association of Mitochondrial Function and Feed Efficiency in Poultry and Livestock Species. *J. Anim. Sci.* 2009, 87, E48–E63. [[CrossRef](#)]
49. Kolath, W.H.; Kerley, M.S.; Golden, J.W.; Keisler, D.H. The Relationship between Mitochondrial Function and Residual Feed Intake in Angus Steers. *J. Anim. Sci.* 2006, 84, 861–865. [[CrossRef](#)]
50. Yanibada, B.; Hohenester, U.; Pétéra, M.; Canlet, C.; Durand, S.; Jourdan, F.; Bocard, J.; Martin, C.; Eugène, M.; Morgavi, D.P.; et al. Inhibition of Enteric Methanogenesis in Dairy Cows Induces Changes in Plasma Metabolome Highlighting Metabolic Shifts and Potential Markers of Emission. *Sci. Rep.* 2020, 10, 15591. [[CrossRef](#)]
51. Ungerfeld, E.M. Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation: Principles and Possibilities of Interventions. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 589. [[CrossRef](#)]
52. Clemmons, B.A.; Powers, J.B.; Campagna, S.R.; Seay, T.B.; Embree, M.M.; Myer, P.R. Rumen Fluid Metabolomics of Beef Steers Differing in Feed Efficiency. *Metabolomics* 2020, 16, 23. [[CrossRef](#)]
53. Artegoitia, V.M.; Foote, A.P.; Lewis, R.M.; Freetly, H.C. Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on Crossbred Steers. *Sci. Rep.* 2017, 7, 2864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lam, S.; Munro, J.C.; Zhou, M.; Guan, L.L.; Schenkel, F.S.; Steele, M.A.; Miller, S.P.; Montanholi, Y.R. Associations of Rumen Parameters with Feed Efficiency and Sampling Routine in Beef Cattle. *Animal* 2018, 12, 1442–1450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Giráldez, F.J.; Santos, N.; Santos, A.; Valdés, C.; López, S.; Andrés, S. Fattening Lambs with Divergent Residual Feed Intakes and Weight Gains: Unravelling Mechanisms Driving Feed Efficiency. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 2021, 273, 114821. [[CrossRef](#)]
56. Myer, P.R.; Freetly, H.C.; Wells, J.E.; Smith, T.P.L.; Kuehn, L.A. Analysis of the Gut Bacterial Communities in Beef Cattle and Their Association with Feed Intake, Growth, and Efficiency. *J. Anim. Sci.* 2017, 95, 3215. [[CrossRef](#)]

57. Spillane, C.; Waters, S.M. Rumen Microbiome Composition Is Altered in Sheep Divergent in Feed Efficiency. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 16.
58. Lopes, D.R.G.; de Souza Duarte, M.; La Reau, A.J.; Chaves, I.Z.; de Oliveira Mendes, T.A.; Detmann, E.; Bento, C.B.P.; Mercadante, M.E.Z.; Bonilha, S.F.M.; Suen, G.; et al. Assessing the Relationship between the Rumen Microbiota and Feed Efficiency in Nellore Steers. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2021, 12, 79. [[CrossRef](#)]
59. Association of Official Analytical Chemists. *Animal Feed Official Methods Analysis*, 16th ed.; AOAC: Gaithersburg, MA, USA, 1998.
60. Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991, 74, 3583–3597. [[CrossRef](#)]
61. Lefort, G.; Liaubet, L.; Canlet, C.; Tardivel, P.; Père, M.-C.; Quesnel, H.; Paris, A.; Iannuccelli, N.; Vialaneix, N.; Servien, R. ASICS: An R Package for a Whole Analysis Workflow of 1D 1H NMR Spectra. *Bioinformatics* 2019, 35, 4356–4363. [[CrossRef](#)]
62. Rohart, F.; Gautier, B.; Singh, A.; Lê Cao, K.-A. MixOmics: An R Package for ‘omics Feature Selection and Multiple Data Integration. *PLoS Comput. Biol.* 2017, 13, e1005752. [[CrossRef](#)]
63. Hervé, M.R.; Nicolè, F.; Lê Cao, K.-A. Multivariate Analysis of Multiple Datasets: A Practical Guide for Chemical Ecology. *J. Chem. Ecol.* 2018, 44, 215–234. [[CrossRef](#)]
64. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodol.)* 1995, 57, 289–300. [[CrossRef](#)]

Supplementary Material:

Tableau II.4.S1 : Metabolites identified and quantified in the four biological fluid × diet combinations. For each metabolite, the number of samples in which it has been identified is expressed followed by the prevalence percentage between parentheses.

	Plasma		Rumen	
	CONC	MIX	CONC	MIX
Number of samples in which the metabolite was identified (prevalence %)				
Organic acids				
Acetate	274 (100)	166 (100)	273 (100)	164 (100)
Azelaate			273 (100)	
Butyrate			273 (100)	164 (100)
Citrate	274 (100)	166 (100)		
Citraconate			232 (85.0)	76 (46.3)
Ethylmalonate			273 (100)	164 (100)
Gluconate		166 (100)		
Beta-hydroxyisovalerate	274 (100)		273 (100)	
3-hydroxybutyrate	274 (100)	166 (100)		
4-hydroxyphenylacetate			272 (100)	
Isobutyrate			273 (100) ²	164 (100)
Isovalerate				164 (100)
Lactate	274 (100)	166 (100)	253 (92.7)	
Malate	274 (100)		271 (99.3)	
2-oxobutyrate			253 (92.6)	
2-oxoglutarate			272 (99.6)	
2-oxoisovalerate	274 (100)			
Pantothenate	274 (100)			
3-phenylpropionate			273 (100)	164 (100)
Propionate			273 (100)	164 (100)
Pyroglutamate			269 (98.5)	
Pyruvate	264 (96.3)			
Sebacate				164 (100)
Succinate			248 (90.8)	164 (100)
Valerate			273 (100)	164 (100)
Amino acids				
N-acetylaspartate			273 (100)	164 (100)
Alanine			273 (100)	164 (100)
2-aminobutyrate			273 (100)	
Aspartate			273 (100)	
N-Acetylglucine	274 (100)	166 (100)	267 (97.8)	
Betaine	273 (99.6)	166 (100)		
Citrulline	274 (100)			
Creatine	274 (100)	166 (100)		
Cystine	274 (100)	166 (100)	273 (100)	
GABA			273 (100)	
Glutamate	274 (100)		273 (100)	
Glutamine	274 (100)			

Glycine	274 (100)	166 (100)	273 (100)	164 (100)
Isoleucine			273 (100)	
Leucine	274 (100)	166 (100)	268 (98.1)	164 (100)
Methionine			272 (99.6)	
3-methylxanthine			273 (100)	164 (100)
Phenylalanine	274 (100)		273 (100)	
Proline			273 (100)	
Serine	274 (100)	166 (100)		
Taurine	274 (100)			
Threonine	274 (100)	165 (99.4)	273 (100)	164 (100)
Tyrosine			273 (100)	
Valine	274 (100)	166 (100)		
Alcohols				
Choline chloride	265 (96.7)	161 (97.0)	273 (100)	
Ethanolamine	265 (96.7)	166 (100)		
4-Ethylphenol			273 (100)	
Glycerol	274 (100)	166 (100)		
Methanol	274 (100)	166 (100)	187 (68.5)	
Myo-inositol	274 (100)			
Phosphocholine	271 (98.9)	166 (100)		
Other metabolites				
Cadaverine			269 (98.5)	164 (100)
Carnitine	274 (100)	166 (100)		
Creatinine	274 (100)	166 (100)		
Dimethylsulfone	274 (100)	166 (100)	273 (100)	164 (100)
Glucose	274 (100)	166 (100)	272 (99.6)	
Levoglucosan			273 (100)	
TMAO	259 (94.5)			
Uracil	274 (100)		273 (100)	

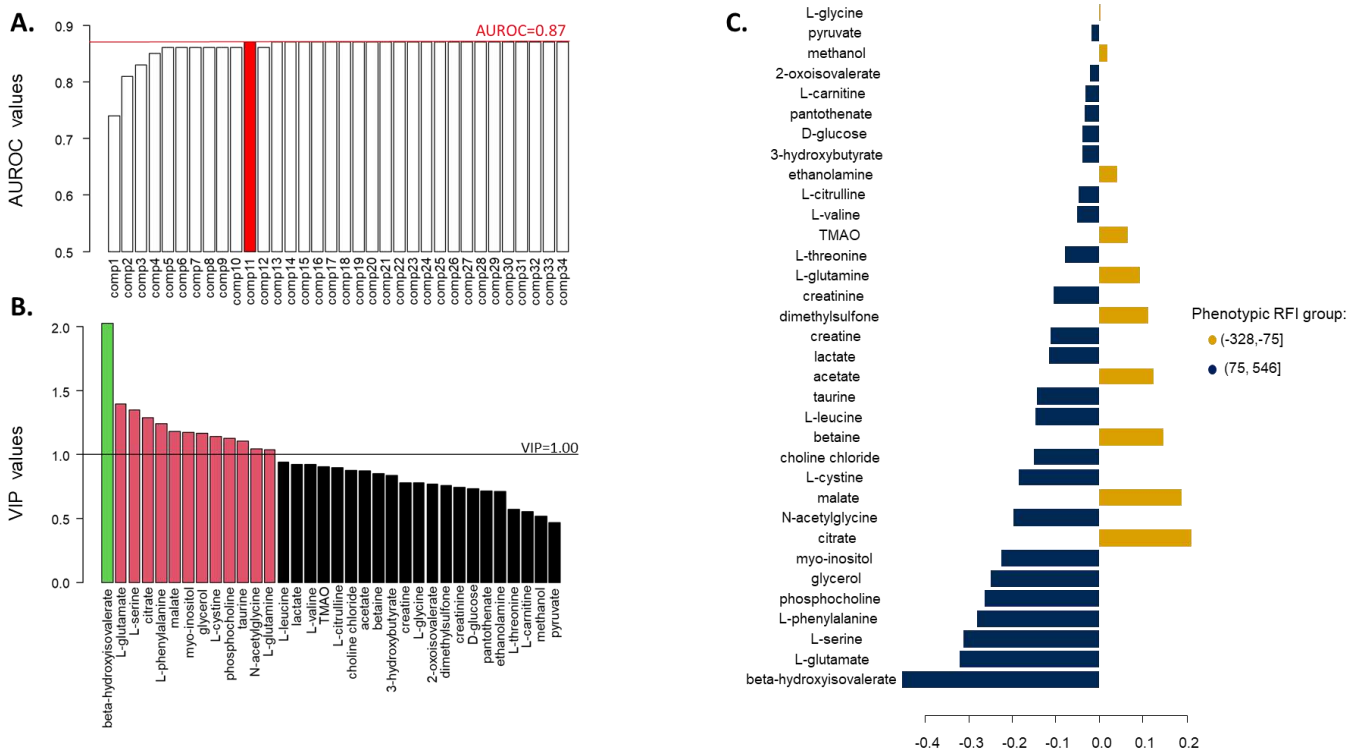


Figure II.4.S1 : Discriminant analysis of the plasma metabolites measured during the CONC phase according to phenotypic RFI groups. Efficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between -328 and -75 g/day and inefficient animals are the ones that had a phenotypic RFI between 75 and 546 g/day. (A) Accuracy of the PLS-DA models assessed using AUROC; red line marks the maximum AUROC value obtained with 11 components. (B) Selection of the variables contributing the most to the discriminant analysis using a VIP approach. (C) Loading values assigned to each metabolite on the first component of the PLS-DA model; gold and blue represent metabolites associated with efficient and inefficient animals, respectively.

Discussion Générale :

Au cours de ce travail, nous avons recherché de potentiels déterminants de l'efficience alimentaire sur une population d'agneaux mâles Romane issus d'une sélection divergente sur la consommation résiduelle. Cette sélection a pu être réalisée du fait de la variabilité et de l'héritabilité de ce caractère ($h^2=0,45$) dans notre population (Tortereau et al., 2020) et a abouti à la création de deux lignées, l'une d'animaux efficients, l'autre d'animaux inefficients, respectivement les lignées rfi- et rfi+.

Parmi les animaux de la deuxième et de la troisième génération de sélection, 277 animaux ont été phénotypés et prélevés au cours de la phase CONC (période d'engraissement avec un concentré sur litière paillée pour maximiser le GMQ) et 167, parmi les plus extrêmes de ces animaux, ont été phénotypés et prélevés au cours de la phase MIX (période de finition avec une ration à base de foin, équilibrée par un concentré, sur litière de copeaux de bois). Cette taille de population est un avantage considérable en comparaison des études disponibles à ce jour sur des bovins ou des ovins, dans lesquelles un nombre plus réduit d'animaux (souvent quelques dizaines) est phénotypé, et un nombre plus réduit encore d'animaux est prélevé. Cet effort d'échantillonnage présente de nombreux intérêts, notamment pour les analyses discriminantes qui constituent le cœur de nos analyses de données. Lorsque le nombre d'échantillons est réduit, la discrimination visuelle des échantillons peut sembler claire sans pour autant que la discrimination soit réellement pertinente lorsqu'elle est vérifiée par validation croisée ou extrapolée à un plus grand nombre d'échantillons (Ruiz-Perez et al., 2020). Ce phénomène se vérifie d'autant plus que le nombre de variables considérées est important ce qui est, en particulier, le cas pour les études de composition microbienne par exemple.

La constitution d'un échantillon aussi important d'ovins, soumis à deux régimes, a impliqué que les expériences soient menées sur différentes années du fait de l'augmentation considérable de la charge de travail et de la place et du matériel nécessaires à l'élevage des animaux, notamment les distributeurs automatiques d'aliments. De ce fait, nous avons introduit dans le protocole une variabilité expérimentale liée à l'année de prélèvement qui s'est avérée significative. Cette variabilité s'est accrue encore davantage pour la phase MIX au cours de laquelle, par manque de distributeurs de fourrages disponibles, les phénotypages et les prélèvements ont dû être réalisés en deux périodes par année. Malgré nos efforts pour conserver les conditions identiques (les animaux ont été prélevés approximativement aux mêmes âges entre les différentes années dans les mêmes conditions de logement et avec la même ration), il

a subsisté quelques différences de conditions expérimentales (le foin de dactyle, récolté annuellement, était différent d'une année sur l'autre, les concentrés fabriqués annuellement et répondant à un cahier des charges quant à l'énergie et aux protéines apportées avaient cependant des compositions chimiques variables, les conditions météorologiques étaient susceptibles de changer). Par ailleurs, pour toutes les analyses réalisées, les prélèvements de 2018 et 2019 ont été traités simultanément tandis que les échantillons de 2020 ont été traités séparément.

Des corrections statistiques ont été appliquées lors de l'analyse des données pour prendre en compte la variabilité annuelle des conditions expérimentales.

Nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés au cours du protocole. D'une part, deux sessions de prélèvement, CONC 2019 et MIX 2018 Automne, ont été réalisées sans que les animaux aient été mis à jeun la veille au soir. La possible consommation de concentrés en phase CONC 2019 et de concentrés et de fourrages en phase MIX 2018 a occasionné d'importantes variations, en particulier au niveau ruminal.

Les principaux effets visibles de cette absence de mise à jeun ont été une concentration en AGV plus importante (Figure Discussion 1) et une diminution de la quantité d'ADN eucaryote, en particulier affilié aux ciliés (Partie II, Chapitre 2, 2)) chez les animaux ayant eu accès à la nourriture avant prélèvement. Cet effet a également été retrouvé dans l'étude par PCR quantitative de Salfer et al. dans laquelle l'abondance de la communauté eucaryote était plus importante avant le repas et diminuait après ingestion d'aliment (Salfer et al., 2021).

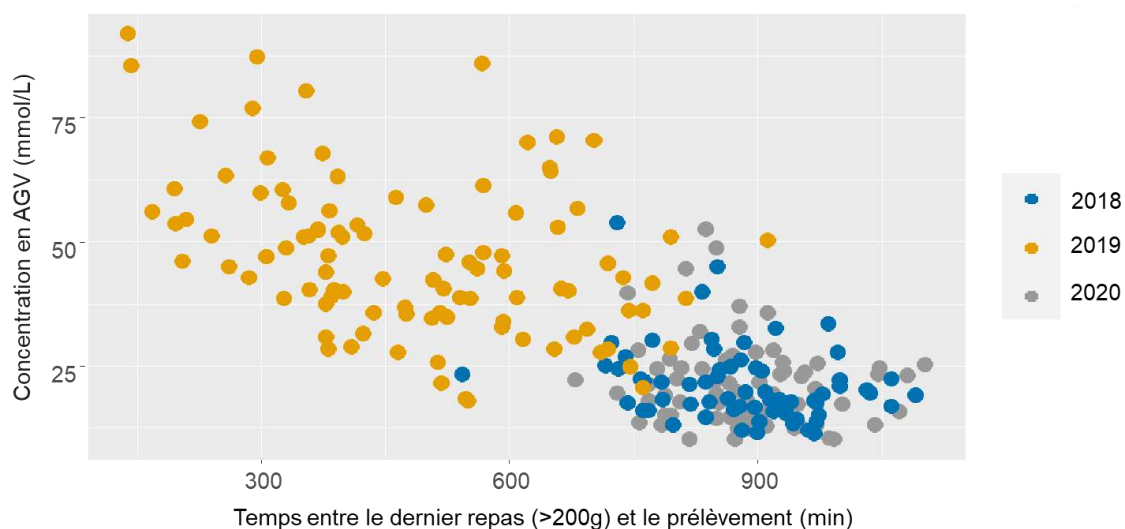


Figure Discussion 1 : Lien entre la concentration en AGV totaux et le temps écoulé entre le dernier repas de plus de 200g et le prélèvement lors de la phase CONC.

Les effets de l'absence de mise à jeun sont moins marqués pour la phase MIX ce qui est cohérent avec la libération plus progressive d'acides gras volatils à partir de fourrages que de concentrés occasionnant des variations de pH ruminal moins brutales (Palmonari et al., 2010; Yang & Beauchemin, 2007). L'effet de l'absence de mise à jeun sur le nombre de séquences eucaryotes obtenues n'a pas été observé en phase MIX. En revanche, une ACP a mis en évidence une séparation de ce prélèvement sur la seconde composante indiquant un changement de composition de ces séquences. Les échantillons de l'automne 2018 contenaient plus de séquences de l'infra-règne SAR, et en particulier, les variables ayant le plus de poids sur le second axe de l'ACP étaient des genres appartenant à la famille Trichostomatia.

Pour compenser ces aléas techniques un facteur binaire (mise à jeun/absence de mise à jeun) a été ajouté aux modèles de correction et d'analyse statistiques des données issues des prélèvements biologiques.

Une fois ces corrections appliquées, nous avons cherché à répondre aux trois hypothèses concernant la part digestive et la part liée au métabolisme de l'hôte de l'efficacité alimentaire ainsi qu'aux variations d'efficacité individuelle liées à l'alimentation.

L'efficacité alimentaire individuelle est-elle dépendante de l'alimentation distribuée aux animaux. ?

Lorsque les animaux issus de la deuxième et de la troisième génération de cette sélection ont été phénotypés sous un régime 100% concentrés, les RFI phénotypiques, obtenues à partir des données d'ingestion, de poids métabolique, de GMQ et de composition corporelle, ont confirmé l'efficacité des animaux rfi- et l'inefficacité des animaux rfi+. En effet les agneaux appartenant à la lignée rfi- avaient une consommation quotidienne plus faible sans modification marquée des autres caractères phénotypiques par rapport aux animaux rfi+.

En revanche, lorsque les mêmes animaux, plus âgés, ont été phénotypés sous un régime mixte (1/3 de concentrés, 2/3 de foin), les valeurs de RFI phénotypiques étaient bouleversées et aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la RFI avec le régime concentrés (RFI_C) et la RFI avec le régime mixte (RFI_M) ($r=0,03$; $p=0,67$). Ainsi, en phase MIX, la répartition des animaux appartenant à l'une ou l'autre des lignées dans les groupes de RFI positive ou négative était équilibrée. Les animaux de la lignée rfi+ et ceux de la lignée rfi- ne différaient plus en termes d'ingestion quotidienne moyenne, et ne différaient toujours pas en termes de poids

métabolique, de GMQ ou d'épaisseur de muscle dorsale mais les agneaux de la lignée rfi-tendaient à avoir une épaisseur de gras dorsal plus élevée.

Dans notre étude il y a une confusion possible entre le changement de régime et l'âge des animaux, ceux-ci étant de 12 à 24 semaines plus âgés lors de la phase MIX selon la saison de prélèvement. Cependant, les quelques études de la littérature ayant comparé les efficacités d'animaux recevant divers régimes ou le même régime à diverses périodes montrent une stabilité plus importante de cet indicateur à différents âges qu'à différentes rations (Asher et al., 2018). Un moyen de différencier l'effet âge de l'effet régime serait par exemple de réaliser une expérience en carré latin sur un nombre plus réduit d'animaux appartenant aux deux lignées et de voir si les agneaux de la lignée rfi- sont aussi efficaces avec un régime 100% concentrés en étant plus âgés et s'ils sont efficaces à l'âge auquel la sélection a été faite lorsqu'ils reçoivent un régime enrichi en fourrages.

Ces variations d'efficacité entre phases CONC et MIX soulèvent de nouvelles questions quant à l'intégration de l'efficacité alimentaire dans les schémas de sélection en fonction de la rentabilité du système. D'après les résultats du présent travail, les agneaux en croissance sélectionnés pour leur efficacité ont besoin d'une moins grande quantité de concentrés pour leur croissance que leurs pairs inefficaces et cette meilleure valorisation se perd quand les animaux grandissent et/ou passent à un régime mixte sans pour autant que la situation s'inverse. La sélection n'est, de fait, pas délétère : elle améliore simplement l'efficacité alimentaire des animaux sur une partie du cycle de production sans modifier l'efficacité du reste du cycle.

À l'issue de l'étude bibliographique nous avons émis plusieurs hypothèses concernant les déterminants biologiques de l'efficacité alimentaire. Une part de l'efficacité alimentaire pourrait être liée à l'efficacité de la digestion et l'autre à la capacité de valorisation de l'énergie et des nutriments par l'animal. L'importance de l'un ou l'autre de ces mécanismes est, au regard de l'état de l'art réalisé, probablement fortement dépendante de la ration distribuée. De ce fait, nous avons traité les deux rations séparément et nous avons, pour chaque jeu de données, analysé à la fois les différences entre lignées et entre groupes phénotypiques d'efficacité alimentaire pour évaluer, d'une part, les effets de la sélection génétique et, d'autre part, les déterminants biologiques de l'efficacité alimentaire.

L'efficience alimentaire est-elle liée aux variables digestives ruminales ?

Comparativement aux autres mammifères, les ruminants se distinguent par la façon dont les aliments composant leur ration sont digérés. L'essentiel de la digestion est réalisé par des microorganismes en amont de l'estomac glandulaire dans la large poche fermentaire qu'est le rumen. Les produits issus des transformations microbiennes des aliments représentent la part majeure de l'énergie absorbée par le ruminant et une grande part des protéines qui seront digérées dans l'intestin grêle. Le microbiote ruminal produit également des vitamines et remanie les acides gras d'origine alimentaire. Ces particularités nous ont amenés à nous concentrer sur la composition du microbiote ruminal et sur les produits ruminiaux issus des activités microbiennes en lien avec l'efficience alimentaire. Par ailleurs, le contenu ruminal est assez facilement accessible par l'intermédiaire d'un prélèvement considéré peu invasif.

Deux types d'analyses ont été réalisés à partir du contenu ruminal : des analyses de communauté microbienne par métabarcoding et des analyses métabolomiques par CPG (AGV et acides gras longs) et par RMN (petites molécules en concentration importante). La CPG et la RMN sont complémentaires et ont permis dans certaines études récentes d'obtenir un bon aperçu du métabolome ruminal (Foroutan et al., 2020).

Les analyses de communautés microbiennes ont été réalisées au niveau taxonomique du genre ce qui permet à la fois une meilleure identification des taxons et une plus grande facilité à comparer nos résultats avec d'autres études tout en restant capable d'interpréter les résultats sur le plan fonctionnel (Bach et al., 2019). En menant les analyses à l'échelle de l'OTU, les OTU les plus discriminantes sur la base de l'abondance relative étaient souvent des OTUs minoritaires dont l'écart de prévalence entre groupes faussait la comparaison. De plus, les OTUs sont encore plus sensibles que les genres à l'année de prélèvement. En effet, par simple analyse en composantes principales on peut constater que les trois clusters responsables du plus grand nombre de séquences, à savoir les clusters 1, 2 et 3, appartenant au genre *Prevotella 7* pour le premier et *Prevotella 1* pour les deux suivants sont fortement caractéristiques des années 2019, 2020 et 2018 respectivement (Figure Discussion 2).

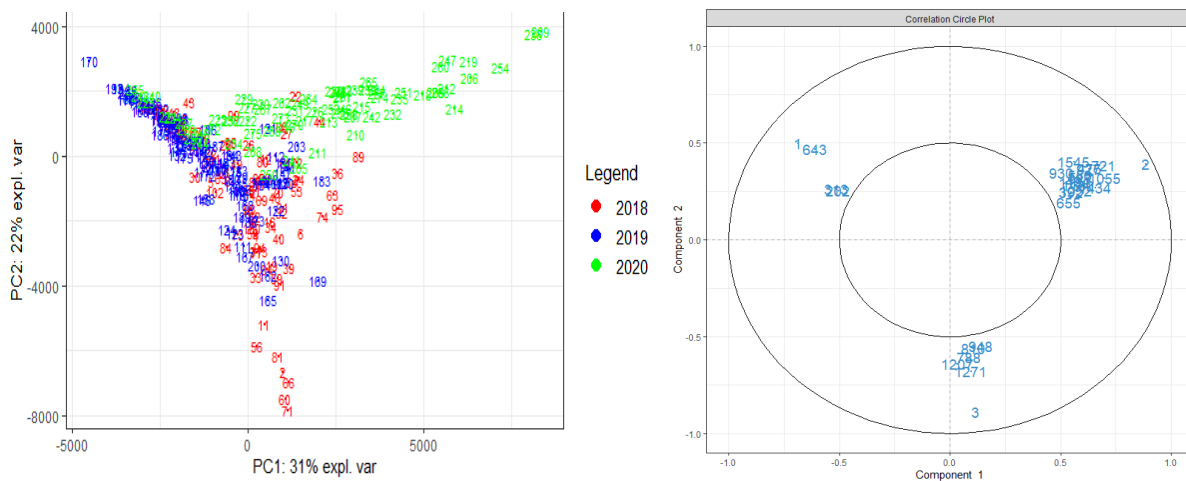


Figure Discussion 2 : Analyse en composantes principales des OTUs obtenues par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S en phase CONC en 2018 (rouge), 2019 (bleu) et 2020 (vert).

Aucune différence majeure n'a été observée entre animaux efficaces et inefficaces par l'analyse des communautés procaryote ou eucaryote. Bien que quelques genres aient présenté des abondances relatives différentes en phase CONC (*Ruminococcus gauvreauii* group et *Coprococcus 1* associés avec les animaux efficaces et *Metadinium* avec les animaux inefficaces) ou en phase MIX (*Orpinomyces* et *Cyllumyces* associés avec les animaux efficaces), globalement les résultats des analyses statistiques étaient dépendants de l'année voire même présentaient des contradictions comme l'association du genre *Entodinium* en phase MIX avec les animaux phénotypiquement efficaces en 2019 et inefficaces en 2018. Le microbiote ruminal est connu pour présenter une certaine redondance fonctionnelle et il est possible que différentes communautés microbiennes figurent dans l'un et l'autre des groupes d'efficacité et que l'effet de l'environnement ruminal sur l'efficacité soit davantage associé aux réactions opérées par les micro-organismes et se concrétisent par des produits de dégradation différents.

Pour autant, l'étude des petits métabolites et des acides gras ruminiaux n'a révélé aucune différence significative entre les animaux efficaces et inefficaces, que ce soit globalement ou à l'échelle de l'année quel que soit le régime.

Une hypothèse permettant d'expliquer cette absence de différence significative pourrait être la forte dépendance de l'abondance des micro-organismes et des produits de leur activité avec le temps de mise à jeun et la quantité ingérée au dernier repas qui pourrait masquer les potentielles différences liées à l'efficacité. En effet, la croissance microbienne, de même que la production et l'absorption ou la vidange des produits microbiens, sont des phénomènes dynamiques. La concentration d'un métabolite mesurée au cours d'un prélèvement résulte de sa production et

de sa disparition du rumen qui sont deux phénomènes dépendants du temps. C'est pour limiter ces effets temporels que tous les animaux devaient avoir été mis à jeun la veille au soir du prélèvement.

La variabilité des résultats entre années ou périodes, indépendamment de la mise à jeun des animaux, soulève la question de la pertinence de prélèvements ponctuels de contenu ruminal pour expliquer un phénotype calculé à partir de phénotypes élémentaires qui ne sont pas enregistrés de façon concomitante avec les prélèvements. En effet, l'efficacité alimentaire est mesurée, dans notre étude, à partir des données d'ingestion quotidienne moyenne sur six semaines, du poids métabolique des animaux en fin de période de prélèvement et de leur croissance estimée par le GMQ sur six semaines. Or, un seul prélèvement de contenu ruminal est réalisé. Ce prélèvement a été réalisé en fin de période de contrôle, c'est-à-dire 8 semaines après le changement d'alimentation, suivant l'hypothèse que pour qu'un effet soit observable il serait approprié que le microbiote ait pu se stabiliser sous ce nouveau régime (Clemmons et al., 2019; Snelling et al., 2019). Cependant, il est possible que l'absence de différence marquée entre animaux efficaces et inefficaces témoigne du fait que tous les animaux se sont correctement adaptés à la ration qui leur est distribuée, auquel cas les différences d'efficacité alimentaire pourraient être plus visibles pendant la phase de transition. Pour évaluer cela, des prélèvements répétés au cours de la période de phénotypage et l'utilisation d'approches de bêta-diversité telles que les distances d'Aitchison permettraient de suivre l'évolution du microbiote des animaux efficaces ou inefficaces et de voir si l'un ou l'autre se stabilise plus rapidement, permettant ainsi une adaptation plus précoce à la ration et potentiellement une meilleure efficacité digestive. Cependant, la répétition des prélèvements impliquerait un stress plus important pour les animaux, une charge de travail plus importante par la multiplication des chantiers de prélèvements, des contraintes logistiques du fait de l'éloignement de la station expérimentale par rapport au lieu de stockage et de préparation des échantillons et serait très coûteuse si on souhaitait travailler sur le même nombre d'agneaux. Par ailleurs, l'évaluation de la stabilisation du microbiote pourrait être complexe du fait des variations individuelles de communauté microbienne d'une semaine sur l'autre chez des animaux prélevés dans les mêmes conditions et sous le même régime. En effet, une étude récente a montré une faible conservation des OTUs bactériennes et d'importantes variations d'abondances relatives des différentes familles bactériennes chez des brebis Lacaune prélevées deux fois à une semaine d'intervalle (Fresco et al., 2022). Cela pourrait également expliquer les résultats extrêmement hétérogènes de la littérature et entre nos années, quant aux liens entre l'efficacité alimentaire et les profils

bactériens du rumen puisque la plupart des conclusions des études découlent d'un prélèvement unique pour chaque individu, celui-ci ne représentant qu'en partie la communauté microbienne et à un instant. Enfin, si les différences d'efficacité alimentaire observées sur six semaines découlaient d'une adaptation plus ou moins rapide à la ration, ces différences ne seraient pas extrapolables à une période plus longue, ou du moins seraient diluées au cours de cette période.

Ainsi, dans les conditions expérimentales de ce travail, l'influence de la communauté microbienne et des produits de transformation des aliments par le microbiote sur l'efficacité alimentaire ne s'est pas révélée très importante. Cependant, l'analyse simultanée du microbiote et du métabolome ruminal a permis de mettre en relation certains genres microbiens et certains métabolites d'intérêt pour le métabolisme de l'hôte tels que les AGV ou les AG.

L'efficacité alimentaire est-elle liée au métabolisme de l'hôte ?

En première approche, nous avons choisi de réaliser un prélèvement sanguin à la veine jugulaire pour étudier, sans *a priori*, le plasma des agneaux par la méthode RMN qui permet l'étude des petites molécules impliquées dans le métabolisme de l'hôte (glucose, acides aminés ou intermédiaires du métabolisme énergétique par exemple (Tardivel et al., 2017)).

L'analyse RMN des échantillons plasmatiques a permis de mettre en évidence une concentration plus importante en citrate et en malate chez les animaux de la lignée rfi- et de certains acides aminés, en particulier la thréonine, ou intermédiaires de leur dégradation comme le bêta-hydroxyisovalérate chez les animaux rfi+ pendant la phase CONC. Durant cette même phase, les groupes phénotypiques ont été discriminés par les mêmes métabolites à l'exception de la thréonine. Alors que le citrate était le plus discriminant pour les lignées, la différence majeure entre les groupes phénotypiques a été observée pour le bêta-hydroxyisovalérate.

La proximité des résultats des discriminations des lignées génétiques et des groupes phénotypiques en phase CONC était attendue puisque les animaux appartenant à la lignée efficace sont, globalement, efficaces sous le régime utilisé pour la sélection. Cependant, la superposition de ces deux phénomènes (sélection génétique et efficacité phénotypique) ne permet pas de conclure quant au mécanisme impliqué dans chacun. Néanmoins, une augmentation des concentrations plasmatiques en acides aminés a été associée à une moindre efficacité de l'utilisation de ceux-ci, ainsi qu'à une augmentation de la RFI (Letelier et al., 2022; Li et al., 2021; Meale et al., 2017). Les principales hypothèses concernant cette

augmentation sont une moins bonne utilisation des acides aminés pour la néoglucogénèse ou un déséquilibre entre synthèse protéique et dégradation protéique. La leucine, qui n'est pas glucoformatrice, a été dosée en plus forte concentration dans le plasma d'animaux inefficients ce qui, en lien avec la concentration relativement plus élevée de bêta-hydroxyisovalérate chez les agneaux inefficients dans notre étude, oriente plutôt vers une augmentation de la dégradation des acides aminés chez ces animaux (Letelier et al., 2022; Li et al., 2021).

Durant la phase MIX, la différence entre lignées repose surtout sur le citrate associé à la lignée rfi- et la thréonine et la leucine associées à la lignée rfi+. Ces résultats, cohérents entre la phase CONC et la phase MIX laissent entendre que la sélection génétique peut avoir un impact sur le métabolisme du citrate et des acides aminés. L'absence de discrimination des groupes phénotypiques confirme que ces marqueurs métaboliques sont davantage associés à la sélection qu'à un mécanisme permettant l'efficacité quel que soit le régime. Le citrate est un intermédiaire central du métabolisme énergétique. En effet, il est le résultat de la condensation de l'oxalo-acétate et de l'acétyl-coA lorsque la cellule ne manque pas de glucose, et son oxydation permet la production de co-enzymes réduits. Il est également impliqué dans la synthèse des acides gras en permettant la sortie de l'acétyl-coA de la matrice mitochondriale et en étant activateur allostérique de l'acétyl-coA carboxylase impliquée dans la synthèse des acides gras.

En parallèle de l'augmentation du citrate plasmatique, les animaux appartenant à la lignée rfi- présentaient, en phase MIX, une épaisseur de gras dorsal significativement plus élevée (+6%, $p=0,02$) que les animaux inefficients. L'épaisseur de gras dorsal est considérée comme un bon indicateur de la masse grasse corporelle (Baker et al., 2006; Fan et al., 2022). Il serait donc intéressant de considérer l'impact de la sélection sur la composition de la carcasse des animaux, d'autant que ce genre d'associations entre efficacité alimentaire et composition de carcasse a surtout été rapporté chez les bovins. Un moyen d'estimer la composition corporelle et la répartition de la masse grasse des animaux est la tomodynamétrie, qui a déjà permis d'observer les effets de la sélection pour l'adiposité de béliers sur la composition corporelle de leur progéniture par exemple (Anderson et al., 2016). Certains de nos animaux ont été scannés à l'issue de la deuxième phase de phénotypage, l'analyse de ces résultats de tomodynamétrie pourrait, en plus de la composition corporelle, renseigner sur de potentiels effets du volume ruminal ou d'autres organes dont la dépense énergétique, contributrice au métabolisme basal, pourrait impacter l'efficacité alimentaire.

Cette thèse a apporté quelques pistes sur les potentiels déterminants de l'efficacité alimentaire et l'impact de la sélection sur celle-ci. En particulier, la concentration plasmatique plus importante en citrate et malate et moins importante en acides aminés chez les animaux rfi- et chez les animaux phénotypiquement efficaces en phase CONC suggère que des phénomènes métaboliques liés au métabolisme énergétique pourraient être impliqués dans l'efficacité alimentaire. Plusieurs pistes pourraient alors être explorées notamment concernant la fonction mitochondriale ou le turnover protéique. Dans ce deuxième cas, un dosage de l'urée sanguine, inaccessible par RMN car résonnant dans la zone de l'eau, pourrait donner un premier renseignement sur la dégradation des protéines tissulaires à condition de parvenir à exclure une origine ruminale. En effet, une augmentation de la dégradation des protéines au sein du rumen peut également, si l'ammoniac formé n'est pas utilisé par les micro-organismes, provoquer une augmentation de l'ammoniac au niveau de la veine porte qui, une fois détoxifié par le foie engendrera une augmentation de l'urémie. Une autre approche, surtout valable pour une mesure ponctuelle du turnover protéique serait l'utilisation d'un traceur isotopique, par exemple un acide aminé marqué comme de la leucine contenant un carbone 13 (^{13}C -Leucine). L'ingestion d'eau lourde (D_2O) peut également permettre d'obtenir un reflet du taux de renouvellement des protéines sur une période plus longue. L'eau lourde est rapidement équilibrée avec le pool corporel et des mesures successives d'enrichissement en deutérium des tissus, ou de protéines en particulier, permettent d'estimer la synthèse de protéines.

Enfin, des études récentes présentent la fractionation isotopique comme un moyen d'estimer le turnover protéique sur le long-terme ce qui serait cohérent avec la mesure de l'efficacité alimentaire sur une période donnée. Généralement, une corrélation négative entre l'abondance relative d'isotope ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) et le FCE est obtenue, ainsi qu'une corrélation positive entre $\delta^{15}\text{N}$ et poids, sans association entre $\delta^{15}\text{N}$ et RFI (Wheadon et al., 2014). Ces analyses ont été appliquées sur les données des 71 animaux de 2019 phénotypés sous deux régimes par l'équipe de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores et ont montré une corrélation faiblement négative entre le $\delta^{15}\text{N}$ et le FCE en phase CONC ($r=-0,23$, $p=0,045$) et une corrélation plus marquée en phase MIX ($r=-0,66$, $p=1,9 \times 10^{-10}$). Ces résultats sont fortement liés aux corrélations existant entre le FCE et le GMQ, lui-même corrélé négativement avec le $\delta^{15}\text{N}$ aux deux régimes. En revanche aucun lien entre le $\delta^{15}\text{N}$ et la RFI n'a été observé quel que soit le régime.

L'analyse des métabolites plasmatiques qui, par leur lien plus direct avec le métabolisme de l'hôte et leur caractère moins fluctuants que les métabolites ruminiaux, avaient le meilleur potentiel de discrimination, n'a pas révélé de différences en phase MIX. Pour autant la

variabilité de consommation, et de consommation résiduelle, n'étaient pas moins fortes qu'en phase CONC. Il est possible que l'efficacité alimentaire, sous un régime riche en fourrages, soit davantage déterminée par l'efficacité digestive, ainsi que le suggèrent les abondances relatives plus importantes des genres *Orpinomyces*, *Cyllamyces* ou *Christensenellaceae R7 group* chez les agneaux efficaces lors des prélèvements en phase MIX, mais cela serait à confirmer par des mesures de digestibilité.

Bibliographie Générale :

- Abdul-Razzaq, H. A., & Bickerstaffe, R. (1989). The influence of rumen volatile fatty acids on protein metabolism in growing lambs. *British Journal of Nutrition*, 62(2), 297-310. <https://doi.org/10.1079/BJN19890031>
- Acinas, S. G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L., & Polz, M. F. (2004). Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature*, 430(6999), 551-554. <https://doi.org/10.1038/nature02649>
- Ahmad, A. A., Yang, C., Zhang, J., Kalwar, Q., Liang, Z., Li, C., Du, M., Yan, P., Long, R., Han, J., & Ding, X. (2020). Effects of Dietary Energy Levels on Rumen Fermentation, Microbial Diversity, and Feed Efficiency of Yaks (*Bos grunniens*). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00625>
- Aitchison, J. (2005). *A Concise Guide to Compositional Data Analysis*. 134.
- Aitchison, J. (2020). *The Statistical Analysis of Compositional Data*. 40.
- Akarachantachote, N., Chadcham, S., & Saithanu, K. (2014). Cutoff Threshold of Variable Importance in Projection for Variable Selection. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, 94(3). <https://doi.org/10.12732/ijpam.v94i3.2>
- Akbar, M. K., Gavora, J. S., & Fairfull, R. W. (1985). Relationship Between Activity at a Young Age and Feed Efficiency in Chickens. *Poultry Science*, 64(7), 1402-1404. <https://doi.org/10.3382/ps.0641402>
- Akin, D. E., & Borneman, W. S. (1990). Role of Rumen Fungi in Fiber Degradation. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3023-3032. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78989-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78989-8)
- Alba, H. D. R., Freitas Júnior, J. E. de, Leite, L. C., Azevêdo, J. A. G., Santos, S. A., Pina, D. S., Cirne, L. G. A., Rodrigues, C. S., Silva, W. P., Lima, V. G. O., Tosto, M. S. L., & Carvalho, G. G. P. de. (2021). Protected or Unprotected Fat Addition for Feedlot Lambs : Feeding Behavior, Carcass Traits, and Meat Quality. *Animals*, 11(2), 328. <https://doi.org/10.3390/ani11020328>
- Albornoz, R. I., Aschenbach, J. R., Barreda, D. R., & Penner, G. B. (2013). Feed restriction reduces short-chain fatty acid absorption across the reticulorumen of beef cattle independent of diet. *American Society of Animal Science*, 91, 4730-4738.
- Alexandratos, N. (2012). *World Agriculture towards 2030/2050 : The 2012 revision*. 154.
- Allen, M. S. (2014). Drives and limits to feed intake in ruminants. *Animal Production Science*, 54(10), 1513. <https://doi.org/10.1071/AN14478>
- Almeida, A. K., Resende, K. T., St-Pierre, N., Silva, S. P., Soares, D. C., Fernandes, M. H. M. R., Souza, A. P., Silva, N. C. D., Lima, A. R. C., & Teixeira, I. A. M. A. (2015). Energy requirements for growth in male and female Saanen goats1. *Journal of Animal Science*, 93(8), 3932-3940. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8632>
- Alqaisi, O., Ali, H., Al-Abri, M., Johnson, E. H., & Al-Marzooqi, W. (2021). Effect of dietary concentrate content on feed intake, feed efficiency, and meat quality of Holstein steers fattened in a hot environment. *Animal Science Journal*, 92(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13547>

- Alves, S. P., & Bessa, R. J. B. (2014). The *trans* -10, *cis* -15 18:2 : A Missing Intermediate of *trans* -10 Shifted Rumen Biohydrogenation Pathway? *Lipids*, 49(6), 527-541. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3897-4>
- Alves, S. P., Santos-Silva, J., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Bessa, R. J. B. (2013). Detailed Dimethylacetal and Fatty Acid Composition of Rumen Content from Lambs Fed Lucerne or Concentrate Supplemented with Soybean Oil. *PLoS ONE*, 8(3), e58386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058386>
- Alves, S. P., Vahmani, P., Mapiye, C., McAllister, T. A., Bessa, R. J. B., & Dugan, M. E. R. (2021). Trans-10 18:1 in ruminant meats : A review. *Lipids*, 56(6), 539-562. <https://doi.org/10.1002/lipd.12324>
- Anderson, F., Williams, A., Pannier, L., Pethick, D. W., & Gardner, G. E. (2016). Sire carcass breeding values affect body composition in lambs—2. Effects on fat and bone weight and their distribution within the carcass as measured by computed tomography. *Meat Science*, 116, 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.013>
- Andrade, B. G. N., Bressani, F. A., Cuadrat, R. R. C., Cardoso, T. F., Malheiros, J. M., de Oliveira, P. S. N., Petrini, J., Mourão, G. B., Coutinho, L. L., Reecy, J. M., Koltés, J. E., Neto, A. Z., R. de Medeiros, S., Berndt, A., Palhares, J. C. P., Afli, H., & Regitano, L. C. A. (2022). Stool and Ruminal Microbiome Components Associated With Methane Emission and Feed Efficiency in Nelore Beef Cattle. *Frontiers in Genetics*, 13, 812828. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.812828>
- Andreini, E. M., Augenstein, S. M., Fales, C. S., Sainz, R. D., & Oltjen, J. W. (2020). Effects of feeding level on efficiency of high- and low-residual feed intake beef steers. *Journal of Animal Science*, 98(10), skaa286. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa286>
- Andriarimalala, J. H., Dubeux, J. C. B., DiLorenzo, N., Jaramillo, D. M., Rakotozandriny, J. de N., & Salgado, P. (2020). Use of n-alkanes to estimate feed intake in ruminants : A meta-analysis. *Journal of Animal Science*, 98(10), skaa304. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa304>
- Arce-Recinos, C., Ojeda-Robertos, N. F., Garcia-Herrera, R. A., Ramos-Juarez, J. A., Piñeiro-Vázquez, Á. T., Canul-Solís, J. R., Castillo-Sanchez, L. E., Casanova-Lugo, F., Vargas-Bello-Pérez, E., & Chay-Canul, A. J. (2022a). Residual Feed Intake and Rumen Metabolism in Growing Pelibuey Sheep. *Animals*, 12(5), 572. <https://doi.org/10.3390/ani12050572>
- Arce-Recinos, C., Ramos-Juárez, J. A., Hernández-Cázares, A. S., Crosby-Galván, M. M., Alarcón-Zúñiga, B., Miranda-Romero, L. A., Zaldívar-Cruz, J. M., Vargas-Villamil, L., Aranda-Ibáñez, E. M., Vargas-Bello-Pérez, E., & Chay-Canul, A. J. (2022b). Interplay between feed efficiency indices, performance, rumen fermentation parameters, carcass characteristics and meat quality in Pelibuey lambs. *Meat Science*, 183, 108670. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108670>
- Archer, J. A., Richardson, E. C., Herd, R. M., & Arthur, P. F. (1999). Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle : A review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(2), 147. <https://doi.org/10.1071/A98075>
- Armentano, L. E., & Young, J. W. (1983). Production and Metabolism of Volatile Fatty Acids, Glucose and CO₂ in Steers and the Effects of Monensin on Volatile Fatty Acid Kinetics. *The Journal of Nutrition*, 113(6), 1265-1277. <https://doi.org/10.1093/jn/113.6.1265>

- Armstrong, D. G., & Blaxter, K. L. (1956). Heat increments of feeding in ruminants. *Nature*, 177(4521), 1183-1183. <https://doi.org/10.1038/1771183a0>
- Artegoitia, V. M., Foote, A. P., Lewis, R. M., & Freetly, H. C. (2017). Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on Crossbred Steers. *Scientific Reports*, 7(1), 2864. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02856-0>
- Arthur, P. F., Archer, J. A., Johnston, D. J., Herd, R. M., Richardson, E. C., & Parnell, P. F. (2001). Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 79(11), 2805. <https://doi.org/10.2527/2001.79112805x>
- Aschenbach, J. R., Bilk, S., Tadesse, G., Stumpff, F., & Gäbel, G. (2009). Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(5), G1098-G1107. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90442.2008>
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., & Gäbel, G. (2011). RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM : Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH12. *Journal of Animal Science*, 89(4), 1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>
- Asher, A., Shabtay, A., Cohen-Zinder, M., Aharoni, Y., Miron, J., Agmon, R., Halachmi, I., Orlov, A., Haim, A., Tedeschi, L. O., Carstens, G. E., Johnson, K. A., & Brosh, A. (2018). Consistency of Feed Efficiency Ranking and Mechanisms Associated with Inter-Animal Variation among Growing Calves. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.1093/jas/skx045>
- Association of Official Analytical Chemists. (1998). *Animal Feed Official Methods Analysis, 16th edn.* AOAC, Gaithersburg, MA.
- Auffret, M. D., Stewart, R. D., Dewhurst, R. J., Duthie, C.-A., Rooke, J. A., Wallace, R. J., Freeman, T. C., Snelling, T. J., Watson, M., & Roehe, R. (2018). Identification, Comparison, and Validation of Robust Rumen Microbial Biomarkers for Methane Emissions Using Diverse Bos Taurus Breeds and Basal Diets. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02642>
- Auffret, M. D., Stewart, R. D., Dewhurst, R. J., Duthie, C.-A., Watson, M., & Roehe, R. (2020). Identification of Microbial Genetic Capacities and Potential Mechanisms Within the Rumen Microbiome Explaining Differences in Beef Cattle Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01229>
- Bach, A., & Ahedo, J. (2008). Record Keeping and Economics of Dairy Heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 117-138. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.001>
- Bach, A., López-García, A., González-Recio, O., Elcoso, G., Fàbregas, F., Chaucheyras-Durand, F., & Castex, M. (2019). Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6180-6198. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16105>
- Baker, F. (1942). Normal Rumen Microflora and Microfauna of Cattle. *Nature*, 149(3773), 220-220. <https://doi.org/10.1038/149220a0>

- Baker, M. J., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Henning, W. R., & Ketchen, D. J. (2006). Using ultrasound measurements to predict body composition of yearling bulls1. *Journal of Animal Science*, *84*(10), 2666-2672. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-006>
- Balch, D. A., & Rowland, S. J. (1957). Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of dairy cows receiving a variety of diets. *British Journal of Nutrition*, *11*(3), 288-298. <https://doi.org/10.1079/BJN19570046>
- Baldwin, R. L., & Connor, E. E. (2017). Rumen Function and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *33*(3), 427-439. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.001>
- Barcroft, J., McAnally, R. A., & Phillipson, A. T. (1943). *Absorption of Volatile Acids from the alimentary tract of the Sheep and other animals*. 10.
- Barendse, W., Reverter, A., Bunch, R. J., Harrison, B. E., Barris, W., & Thomas, M. B. (2007). A Validated Whole-Genome Association Study of Efficient Food Conversion in Cattle. *Genetics*, *176*(3), 1893-1905. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.072637>
- Barling, K. S., Lunt, D. K., Snowden, K. F., & Thompson, J. A. (2001). Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *219*(9), 1259-1262. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.1259>
- Basarab, J. A., Price, M. A., Aalhus, J. L., Okine, E. K., Snelling, W. M., & Lyle, K. L. (2003). Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, *83*(2), 189-204. <https://doi.org/10.4141/A02-065>
- Batista, E. D., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Titgemeyer, E. C., & Valadares, R. F. D. (2017). The effect of CP concentration in the diet on urea kinetics and microbial usage of recycled urea in cattle: A meta-analysis. *Animal*, *11*(8), 1303-1311. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002822>
- Bauman, D. E., Davis, C. L., & Bucholtz, H. F. (1971). Propionate Production in the Rumen of Cows Fed Either a Control or High-Grain, Low-Fiber Diet. *Journal of Dairy Science*, *54*(9), 1282-1287. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)86021-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)86021-6)
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., & McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *48*(2), 21. <https://doi.org/10.1071/EA07199>
- Beecher, M., Buckley, F., Waters, S. M., Boland, T. M., Enriquez-Hidalgo, D., Deighton, M. H., O'Donovan, M., & Lewis, E. (2014). Gastrointestinal tract size, total-tract digestibility, and rumen microflora in different dairy cow genotypes. *Journal of Dairy Science*, *97*(6), 3906-3917. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7708>
- Belanche, A., Kingston-Smith, A. H., Griffith, G. W., & Newbold, C. J. (2019). A Multi-Kingdom Study Reveals the Plasticity of the Rumen Microbiota in Response to a Shift From Non-grazing to Grazing Diets in Sheep. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00122>
- Bell, S. L., Thomas, R. J., & Ferber, M. T. (1988). Feed intake of grazing calves exposed to trichostrongyle infection and treated with the morantel sustained release bolus. *Veterinary Parasitology*, *28*(1-2), 125-135. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90024-6)

- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Berber, B., & Gürelli, G. (2019). Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep in Kastamonu, Turkey, and Infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *Metadinium affine*, and *M. tauricum* (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae). *Zootaxa*, 4695(6), 550-558. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.6.5>
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70(2), 567-590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
- Bergman, E., Reid, R., Murray, M., Brockway, J., & Whitelaw, F. (1965). Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochemical Journal*, 97(1), 53-58. <https://doi.org/10.1042/bj0970053>
- Bergstrom, R. C., Maki, L. R., & Kerchera, C. J. (1975). Average Daily Gain and Feed Efficiency of Lambs with low-level trichostrongylid burdens. *Journal of Animal Science*, 41(2), 513-516.
- Bernard, M., Rué, O., Mariadassou, M., & Pascal, G. (2021). FROGS : A powerful tool to analyse the diversity of fungi with special management of internal transcribed spacers. *Briefings in Bioinformatics*, 22(6), bbab318. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab318>
- Berry, D. P., & Crowley, J. J. (2012). Residual intake and body weight gain : A new measure of efficiency in growing cattle. *Journal of Animal Science*, 90(1), 109-115. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4245>
- Berry, D. P., & Crowley, J. J. (2013). CELL BIOLOGY SYMPOSIUM : Genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle1. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1594-1613. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5862>
- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat : Modulation of ruminant meat fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1325-1344. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400468>
- Bessa, R. J. B., Portugal, P. V., Mendes, I. A., & Santos-Silva, J. (2005). Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate. *Livestock Production Science*, 96(2-3), 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.017>
- Bird, S. H., & Leng, R. A. (1978). The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. *British Journal of Nutrition*, 40(1), 163-167. <https://doi.org/10.1079/BJN19780108>
- Bishop-Hurley, G. J., Paull, D., Valencia, P., Overs, L., Kalantar-zadeh, K., Wright, A.-D. G., & McSweeney, C. (2016). Intra-ruminal gas-sensing in real time : A proof-of-concept. *Animal Production Science*, 56(3), 204. <https://doi.org/10.1071/AN15581>
- Blackburn, H. D., Rocha, J. L., Figueiredo, E. P., Berne, M. E., Vieira, L. S., Cavalcante, A. R., & Rosa, J. S. (1991). Interaction of parasitism and nutrition and their effects on

- production and clinical parameters in goats. *Veterinary Parasitology*, 40(1-2), 99-112. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90086-B](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90086-B)
- Blaxter, K. L., Wainman, F. W., & Wilson, R. S. (1961). The regulation of food intake by sheep. *Animal Science*, 3(1), 51-61. <https://doi.org/10.1017/S0003356100033766>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bottje, W., Iqbal, M., Tang, Z. X., Cawthon, D., Okimoto, R., Wing, T., & Cooper, M. (2002). Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science*, 81(4), 546-555. <https://doi.org/10.1093/ps/81.4.546>
- Bowen, J. M., Cormican, P., Lister, S. J., McCabe, M. S., Duthie, C.-A., Roehe, R., & Dewhurst, R. J. (2020). Links between the rumen microbiota, methane emissions and feed efficiency of finishing steers offered dietary lipid and nitrate supplementation. *PLOS ONE*, 15(4), e0231759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231759>
- Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- Brereton, R. G., & Lloyd, G. R. (2014). Partial least squares discriminant analysis : Taking the magic away: PLS-DA: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, 28(4), 213-225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
- Brooke, C. G., Najafi, N., Dykier, K. C., & Hess, M. (2019). *Prevotella copri* , a potential indicator for high feed efficiency in western steers. *Animal Science Journal*, 90(5), 696-701. <https://doi.org/10.1111/asj.13197>
- Brown, E. G. (2005). *Sources of biological variation in residual feed intake in growing and finishing steers*. Texas A&M University.
- Bruinsma, J. (2009). *The Resource Outlook To 2050 : By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050 ?* 33.
- Buddle, B. M., Denis, M., Attwood, G. T., Altermann, E., Janssen, P. H., Ronimus, R. S., Pinares-Patiño, C. S., Muetzel, S., & Neil Wedlock, D. (2011). Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*, 188(1), 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.019>
- Buss, C. E., Afonso, J., de Oliveira, P. S. N., Petrini, J., Tizioto, P. C., Cesar, A. S. M., Gustani-Buss, E. C., Cardoso, T. F., Rovadoski, G. A., da Silva Diniz, W. J., de Lima, A. O., Rocha, M. I. P., Andrade, B. G. N., Wolf, J. B., Coutinho, L. L., Mourão, G. B., & de Almeida Regitano, L. C. (2022). Bivariate GWAS reveals pleiotropic regions among feed efficiency and beef quality-related traits in Nelore cattle. *Mammalian Genome*. <https://doi.org/10.1007/s00335-022-09969-6>
- Cabral da Silva, D., Ribeiro Pereira, L. G., Mello Lima, J. A., Machado, F. S., Ferreira, A. L., Tomich, T. R., Coelho, S. G., Maurício, R. M., & Campos, M. M. (2020). Grouping crossbred Holstein x Gyr heifers according to different feed efficiency indexes and its effects on energy and nitrogen partitioning, blood metabolic variables and gas exchanges. *PLOS ONE*, 15(9), e0238419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238419>

- Cai, W., Casey, D. S., & Dekkers, J. C. M. (2008). Selection response and genetic parameters for residual feed intake in Yorkshire swine1. *Journal of Animal Science*, 86(2), 287-298. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0396>
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., & Griffith, G. W. (2015). *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: A new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys*, 9, 11-28. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.9.9032>
- Canal, L. B., Fontes, P. L. P., Sanford, C. D., Mercadante, V. R. G., DiLorenzo, N., Lamb, G. C., & Oosthuizen, N. (2020). Relationships between feed efficiency and puberty in *Bos taurus* and *Bos indicus*-influenced replacement beef heifers. *Journal of Animal Science*, 98(10), skaa319. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa319>
- Cantalapiedra-Hijar, G., Abo-Ismael, M., Carstens, G. E., Guan, L. L., Hegarty, R., Kenny, D. A., McGee, M., Plastow, G., Relling, A., & Ortigues-Marty, I. (2018). Review : Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal*, 12(s2), s321-s335. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001489>
- Cantalapiedra-Hijar, G., Fouillet, H., Chantelauze, C., Khodorova, N., Bahloul, L., & Ortigues-Marty, I. (2019). The isotopic nitrogen turnover rate as a proxy to evaluate in the long-term the protein turnover in growing ruminants. *The Journal of Agricultural Science*, 157(9-10), 701-710. <https://doi.org/10.1017/S0021859620000118>
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Schiphorst, A.-M., Robins, R. J., Tea, I., & Prache, S. (2016). Natural 15N Abundance in Key Amino Acids from Lamb Muscle : Exploring a New Horizon in Diet Authentication and Assessment of Feed Efficiency in Ruminants. *J. Agric. Food Chem.*, 10.
- Cao, Q., Sun, X., Rajesh, K., Chalasani, N., Gelow, K., Katz, B., Shah, V. H., Sanyal, A. J., & Smirnova, E. (2021). Effects of Rare Microbiome Taxa Filtering on Statistical Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 607325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607325>
- Cao, Y., & Wang, L. (2017). Automatic Selection of t-SNE Perplexity. *ArXiv:1708.03229 [Cs, Stat]*. <http://arxiv.org/abs/1708.03229>
- Carberry, C. A., Kenny, D. A., Han, S., McCabe, M. S., & Waters, S. M. (2012). Effect of Phenotypic Residual Feed Intake and Dietary Forage Content on the Rumen Microbial Community of Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4949-4958. <https://doi.org/10.1128/AEM.07759-11>
- Carberry, C. A., Kenny, D. A., Kelly, A. K., & Waters, S. M. (2014). Quantitative analysis of ruminal methanogenic microbial populations in beef cattle divergent in phenotypic residual feed intake (RFI) offered contrasting diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 41. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-41>
- Carstens, G. E., & Tedeschi, L. O. (2006). Defining Feed Efficiency in Beef Cattle. *Proceedings of the Beef Improvement Federation*, 12-21.
- Casal, A., Garcia-Roche, M., Navajas, E. A., Cassina, A., & Carriquiry, M. (2018). Hepatic mitochondrial function in Hereford steers with divergent residual feed intake phenotypes1. *Journal of Animal Science*, 96(10), 4431-4443. <https://doi.org/10.1093/jas/sky285>

- Casal, A., Garcia-Roche, M., Navajas, E. A., Cassina, A., & Carriquiry, M. (2020). Differential hepatic oxidative status in steers with divergent residual feed intake phenotype. *Animal*, *14*(1), 78-85. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001332>
- Cassady, C. J., Felix, T. L., Beever, J. E., Shike, D. W., & National Program for Genetic Improvement of Feed Efficiency in Beef Cattle. (2016). Effects of timing and duration of test period and diet type on intake and feed efficiency of Charolais-sired cattle1. *Journal of Animal Science*, *94*(11), 4748-4758. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0633>
- Castillo-González, A., Burrola-Barraza, M., Domínguez-Viveros, J., & Chávez-Martínez, A. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *46*(3), 349-361. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300003>
- Castillo-Lopez, E., & Dominguez, M. G. (2019). Factors that affect the ruminal microbial composition and methods to determine microbial protein yield. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *10*(1). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4547>
- Castro Bulle, F. C. P., Paulino, P. V., Sanches, A. C., & Sainz, R. D. (2007). Growth, carcass quality, and protein and energy metabolism in beef cattle with different growth potentials and residual feed intakes^{1,2}. *Journal of Animal Science*, *85*(4), 928-936. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-373>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *69*(2), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chaucheyras-Durand, F., & Ossa, F. (2014). REVIEW : The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist*, *30*(1), 1-12. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30076-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30076-0)
- Chaves, A. S., Nascimento, M. L., Tullio, R. R., Rosa, A. N., Alencar, M. M., & Lanna, D. P. (2015). Relationship of efficiency indices with performance, heart rate, oxygen consumption, blood parameters, and estimated heat production in Nelore steers. *Journal of Animal Science*, *93*(10), 5036-5046. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9066>
- Chiu, C.-H., Wang, Y.-T., Walther, B. A., & Chao, A. (2014). An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good-turing frequency formula : An Improved Nonparametric Lower Bound of Species Richness. *Biometrics*, *70*(3), 671-682. <https://doi.org/10.1111/biom.12200>
- Cho, H. W., Kim, S. B., Jeong, M. K., Park, Y., Miller, N. G., Ziegler, T. R., & Jones, D. P. (2008). Discovery of metabolite features for the modelling and analysis of high-resolution NMR spectra. *International Journal of Data Mining and Bioinformatics*, *2*(2), 176. <https://doi.org/10.1504/IJDMB.2008.019097>
- Clemmons, B. A., Martino, C., Schneider, L. G., Lefler, J., Embree, M. M., & Myer, P. R. (2019). Temporal Stability of the Ruminal Bacterial Communities in Beef Steers. *Scientific Reports*, *9*(1), 9522. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45995-2>
- Clemmons, B. A., Shin, S. B., Smith, T. P. L., Embree, M. M., Voy, B. H., Schneider, L. G., Donohoe, D. R., McLean, K. J., & Myer, P. R. (2021). Ruminal Protozoal Populations of Angus Steers Differing in Feed Efficiency. *Animals*, *11*(6), 1561. <https://doi.org/10.3390/ani11061561>

- Cockrum, R. R., Pickering, N. K., Anderson, R. M., Hyndman, D. L., Bixley, M. J., Dodds, K. G., Stobart, R. H., McEwan, J. C., & Cammack, K. M. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms associated with feed efficiency in rams. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science*, 63.
- Coelho-Junior, H. J., Calvani, R., Azzolino, D., Picca, A., Tosato, M., Landi, F., Cesari, M., & Marzetti, E. (2022). Protein Intake and Sarcopenia in Older Adults : A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), 8718. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148718>
- Cole, N. A., & Todd, R. W. (2008). Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in concentrate-fed ruminants^{1,2,3}. *Journal of Animal Science*, 86(suppl_14), E318-E333. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0444>
- Coleman, G. S. (1980). Rumen Ciliate Protozoa. In *Advances in Parasitology* (Vol. 18, p. 121-173). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60399-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60399-1)
- Colucci, P. E., Chase, L. E., & Van Soest, P. J. (1982). Feed Intake, Apparent Diet Digestibility, and Rate of Particulate Passage in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 65(8), 1445-1456. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82367-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82367-9)
- Conte, G., Dimauro, C., Daghigho, M., Serra, A., Mannelli, F., McAmmond, B. M., Van Hamme, J. D., Buccioni, A., Viti, C., Mantino, A., & Mele, M. (2022). Exploring the relationship between bacterial genera and lipid metabolism in bovine rumen. *Animal*, 16(5), 100520. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100520>
- Cotta, M. A. (1988). Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 5.
- Couger, M. B., Youssef, N. H., Struchtemeyer, C. G., Liggenstoffer, A. S., & Elshahed, M. S. (2015). Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. Strain C1A. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0390-0>
- Cremonesi, P., Conte, G., Severgnini, M., Turri, F., Monni, A., Capra, E., Rapetti, L., Colombini, S., Chessa, S., Battelli, G., Alves, S. P., Mele, M., & Castiglioni, B. (2018). Evaluation of the effects of different diets on microbiome diversity and fatty acid composition of rumen liquor in dairy goat. *Animal*, 12(9), 1856-1866. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003433>
- Crowley, J. J., McGee, M., Kenny, D. A., Crews, D. H., Evans, R. D., & Berry, D. P. (2010). Phenotypic and genetic parameters for different measures of feed efficiency in different breeds of Irish performance-tested beef bulls. *Journal of Animal Science*, 88(3), 885-894. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1852>
- Curley, K. O., Neuendorff, D. A., Lewis, A. W., Cleere, J. J., Welsh, T. H., & Randel, R. D. (2008). Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperament. *Hormones and Behavior*, 53(1), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.005>
- Daghigho, M., Ciucci, F., Buccioni, A., Cappucci, A., Casarosa, L., Serra, A., Conte, G., Viti, C., McAmmond, B. M., Van Hamme, J. D., & Mele, M. (2021). Correlation of Breed, Growth Performance, and Rumen Microbiota in Two Rustic Cattle Breeds Reared Under Different Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 652031. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652031>

- Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A., & Bertilsson, J. (2017). Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>
- Danielsson, R., Schnürer, A., Arthurson, V., & Bertilsson, J. (2012). Methanogenic Population and CH₄ Production in Swedish Dairy Cows Fed Different Levels of Forage. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6172-6179. <https://doi.org/10.1128/AEM.00675-12>
- Daunis-i-Estadella, J., & Martin-Fernandez, J. A. (2008). *Bayesian tools for count zeros in compositional data sets*.
- Davis, M. E. (1987). Divergent Selection for Postweaning Feed Conversion in Beef Cattle : Predicted Response Based on an Index of Feed Intake and Gain vs Feed:Gain Ratio³. *Journal of Animal Science*, 65(4), 886-895. <https://doi.org/10.2527/jas1987.654886x>
- De La Torre, A., Andueza, D., Renand, G., Baumont, R., Cantalapiedra-Hijar, G., & Nozière, P. (2019). Digestibility contributes to between-animal variation in feed efficiency in beef cows. *Animal*, 13(12), 2821-2829. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001137>
- de Assis Lage, C. F., Gesteira Coelho, S., Diniz Neto, H. do C., Rocha Malacco, V. M., Pacheco Rodrigues, J. P., Sacramento, J. P., Samarini Machado, F., Ribeiro Pereira, L. G., Ribeiro Tomich, T., & Magalhães Campos, M. (2019). Relationship between feed efficiency indexes and performance, body measurements, digestibility, energy partitioning, and nitrogen partitioning in pre-weaning dairy heifers. *PLOS ONE*, 14(10), e0223368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223368>
- de Oliveira, P. S., Cesar, A. S., do Nascimento, M. L., Chaves, A. S., Tizioto, P. C., Tullio, R. R., Lanna, D. P., Rosa, A. N., Sonstegard, T. S., Mourao, G. B., Reecy, J. M., Garrick, D. J., Mudadu, M. A., Coutinho, L. L., & Regitano, L. C. (2014). Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. *BMC Genetics*, 15(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0100-0>
- Déru, V., Bouquet, A., Labussière, E., Ganier, P., Blanchet, B., Carillier-Jacquin, C., & Gilbert, H. (2021). Genetics of digestive efficiency in growing pigs fed a conventional or a high-fibre diet. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 138(2), 246-258. <https://doi.org/10.1111/jbg.12506>
- de Vargas Junior, F. M., Martins, C. F., dos Santos Pinto, G., Ferreira, M. B., de Almeida Ricardo, H., Leão, A. G., Fernandes, A. R. M., & Teixeira, A. (2014). The effect of sex and genotype on growth performance, feed efficiency, and carcass traits of local sheep group Pantaneiro and Texel or Santa Inês crossbred finished on feedlot. *Tropical Animal Health and Production*, 46(5), 869-875. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0579-4>
- DiCostanzo, A., Meiske, J. C., & Plegge, S. D. (1991). Characterization of energetically efficient and inefficient beef cows. *Journal of Animal Science*, 69(4), 1337. <https://doi.org/10.2527/1991.6941337x>
- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., & Tamminga, S. (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition*, 69(2), 385-396. <https://doi.org/10.1079/BJN19930041>

- Dirandeh, E., Ghorbanalinia, M., Roodbari, A. R., & Colazo, M. G. (2021). Effects of dietary conjugated linoleic acid on metabolic status, BW and expression of genes related to lipid metabolism in adipose tissue of dairy cows during peripartum. *Animal*, *15*(2), 100105. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100105>
- Doreau, M., Fievez, V., Troegeler-Meynadier, A., & Glasser, F. (2012). Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant : Le point des connaissances récentes. *INRAE Productions Animales*, *25*(4), 361-374. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2012.25.4.3224>
- Douglas, J.-L., Worgan, H. J., Easton, G. L., Poret, L., Wolf, B. T., Edwards, A., Davies, E., Ross, D., & McEwan, N. R. (2016). Microbial diversity in the digestive tract of two different breeds of sheep. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(5), 1382-1389. <https://doi.org/10.1111/jam.13060>
- Douhard, F., Rupp, R., & Gilbert, H. (2022, juillet). *Feed efficiency and resource allocation trade-offs : Theory, evidence and prospects*. 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Rotterdam, Netherlands.
- Du, T., Lin, Z., Xie, Y., Ye, X., Tu, C., Jin, K., Xie, J., & Shen, Y. (2018). Metabolic profiling of femoral muscle from rats at different periods of time after death. *PLOS ONE*, *13*(9), e0203920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203920>
- Duarte, D. A. S., Newbold, C. J., Detmann, E., Silva, F. F., Freitas, P. H. F., Veroneze, R., & Duarte, M. S. (2019). Genome-wide association studies pathway-based meta-analysis for residual feed intake in beef cattle. *Animal Genetics*, *50*(2), 150-153. <https://doi.org/10.1111/age.12761>
- Duarte, E. R., Abrão, F. O., Oliveira Ribeiro, I. C., Vieira, E. A., Nigri, A. C., Silva, K. L., Virgínio Júnior, G. F., Prates Barreto, S. M., & Geraseev, L. C. (2018). Rumen protozoa of different ages of beef cattle raised in tropical pastures during the dry season. *Journal of Applied Animal Research*, *46*(1), 1457-1461. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1530676>
- Dufreneix, F., Faverdin, P., & Peyraud, J.-L. (2019). Influence of particle size and density on mean retention time in the rumen of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *102*(4), 3010-3022. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15926>
- Durunna, O. N., Colazo, M. G., Ambrose, D. J., McCartney, D., Baron, V. S., & Basarab, J. A. (2012). Evidence of residual feed intake reranking in crossbred replacement heifers. *Journal of Animal Science*, *90*(3), 734-741. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4264>
- Durunna, O. N., Mujibi, F. D. N., Goonewardene, L., Okine, E. K., Basarab, J. A., Wang, Z., & Moore, S. S. (2011). Feed efficiency differences and reranking in beef steers fed grower and finisher diets1. *Journal of Animal Science*, *89*(1), 158-167. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2514>
- Duthie, C.-A., Haskell, M., Hyslop, J. J., Waterhouse, A., Wallace, R. J., Roehe, R., & Rooke, J. A. (2017). The impact of divergent breed types and diets on methane emissions, rumen characteristics and performance of finishing beef cattle. *Animal*, *11*(10), 1762-1771. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000301>
- Dykier, K. C., Oltjen, J. W., Robinson, P. H., & Sainz, R. D. (2020). Effects of finishing diet sorting and digestibility on performance and feed efficiency in beef steers. *Animal*, *14*(1), 59-65. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001988>

- Dýrmundsson, Ó. R. (1981). Natural factors affecting puberty and reproductive performance in ewe lambs: A review. *Livestock Production Science*, 8(1), 55-65. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(81\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0301-6226(81)90030-0)
- Ehrhardt, R. A., Greenwood, P. L., Bell, A. W., & Boisclair, Y. R. (2003). Plasma Leptin Is Regulated Predominantly by Nutrition in Preruminant Lambs. *The Journal of Nutrition*, 133(12), 4196-4201. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4196>
- Ellison, M. J., Conant, G. C., Lamberson, W. R., Austin, K. J., van Kirk, E., Cunningham, H. C., Rule, D. C., & Cammack, K. M. (2019). Predicting residual feed intake status using rumen microbial profiles in ewe lambs. *Journal of Animal Science*, 97(7), 2878-2888. <https://doi.org/10.1093/jas/skz170>
- Ellison, M. J., Conant, G. C., Lamberson, W. R., Cockrum, R. R., Austin, K. J., Rule, D. C., & Cammack, K. M. (2017). Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, 156, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.009>
- Elolimy, A. A., Abdel-Hamied, E., Hu, L., McCann, J. C., Shike, D. W., & Loor, J. J. (2019). RAPID COMMUNICATION: Residual feed intake in beef cattle is associated with differences in protein turnover and nutrient transporters in ruminal epithelium. *Journal of Animal Science*, 97(5), 2181-2187. <https://doi.org/10.1093/jas/skz080>
- Elolimy, A. A., Abdelmegeid, M. K., McCann, J. C., Shike, D. W., & Loor, J. J. (2018). Residual feed intake in beef cattle and its association with carcass traits, ruminal solid-fraction bacteria, and epithelium gene expression. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0283-8>
- Elzo, M. A., Riley, D. G., Hansen, G. R., Johnson, D. D., Myer, R. O., Coleman, S. W., Chase, C. C., Wasdin, J. G., & Driver, J. D. (2009). Effect of breed composition on phenotypic residual feed intake and growth in Angus, Brahman, and Angus × Brahman crossbred cattle. *Journal of Animal Science*, 87(12), 3877-3886. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1553>
- Enjalbert, F., Combes, S., Zened, A., & Meynadier, A. (2017). Rumen microbiota and dietary fat: A mutual shaping. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 782-797. <https://doi.org/10.1111/jam.13501>
- Enjalbert, F., & Troegeler-Meynadier, A. (2009). Biosynthesis of <i>trans</i>fatty acids in ruminants. In *Trans fatty acids in human nutrition* (The Oily Press, Vol. 23).
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>
- Fan, N., Liu, G., Zhang, C., Zhang, J., Yu, J., & Sun, Y. (2022). Predictability of carcass traits in live Tan sheep by real-time ultrasound technology with least-squares support vector machines. *Animal Science Journal*, 93(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13733>

- Faverdin, P., Fischer, A., Lebreton, A., Xavier, C., & Le Cozier, Y. (2021, août). *Indirect approaches of digestive processes to determine feed efficiency in dairy cows*. 2. Annual meeting of the european federation of animal science (EAAP), Davos, Switzerland.
- Fernandez, E. E., Oltjen, J. W., & Sainz, R. D. (2020). Mitochondrial abundance and function in muscle from beef steers with divergent residual feed intakes. *Animal*, *14*(3), 560-565. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002209>
- Ferrell, C. L., & Jenkins, T. G. (1998). Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high-concentrate diet during the finishing period : I. Angus, Belgian Blue, Hereford, and Piedmontese sires. *Journal of Animal Science*, *76*(2), 637. <https://doi.org/10.2527/1998.762637x>
- Fidelis, H. A., Bonilha, S. F. M., Tedeschi, L. O., Branco, R. H., Cyrillo, J. N. S. G., & Mercadante, M. E. Z. (2017). Residual feed intake, carcass traits and meat quality in Nellore cattle. *Meat Science*, *128*, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.004>
- Fischer, A. (2017). *Etude de la variabilité interindividuelle de l'efficacité alimentaire de la vache laitière*. Université européenne de Bretagne.
- Fischer, A., Dai, X., & Kalscheur, K. F. (2022). Feed efficiency of lactating Holstein cows is repeatable within diet but less reproducible when changing dietary starch and forage concentrations. *Animal*, *16*(8), 100599. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100599>
- Fischer, A., Delagarde, R., & Faverdin, P. (2018). Identification of biological traits associated with differences in residual energy intake among lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 4193-4211. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12636>
- Fitzsimons, C., Kenny, D. A., Deighton, M. H., Fahey, A. G., & McGee, M. (2013). Methane emissions, body composition, and rumen fermentation traits of beef heifers differing in residual feed intake1. *Journal of Animal Science*, *91*(12), 5789-5800. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6956>
- Fitzsimons, C., Kenny, D. A., Fahey, A. G., & McGee, M. (2014). Feeding behavior, ruminal fermentation, and performance of pregnant beef cows differing in phenotypic residual feed intake offered grass silage1. *Journal of Animal Science*, *92*(5), 2170-2181. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7438>
- Fliegerova, K. O., Podmirseg, S. M., Vinzelj, J., Grilli, D. J., Kvasnová, S., Schierová, D., Sechovcová, H., Mrázek, J., Siddi, G., Arenas, G. N., & Moniello, G. (2021). The Effect of a High-Grain Diet on the Rumen Microbiome of Goats with a Special Focus on Anaerobic Fungi. *Microorganisms*, *9*(1), 157. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010157>
- Foote, A. P., Hales, K. E., Kuehn, L. A., Keisler, D. H., King, D. A., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Freetly, H. C. (2015). Relationship of leptin concentrations with feed intake, growth, and efficiency in finishing beef steers. *Journal of Animal Science*, *93*(9), 4401-4407. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9339>
- Foote, A. P., Hales, K. E., Tait, R. G., Berry, E. D., Lents, C. A., Wells, J. E., Lindholm-Perry, A. K., & Freetly, H. C. (2016). Relationship of glucocorticoids and hematological measures with feed intake, growth, and efficiency of finishing beef cattle1. *Journal of Animal Science*, *94*(1), 275-283. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9407>

- Foroutan, A., Fitzsimmons, C., Mandal, R., Piri-Moghadam, H., Zheng, J., Guo, A., Li, C., Guan, L. L., & Wishart, D. S. (2020). The Bovine Metabolome. *Metabolites*, 10(6), 233. <https://doi.org/10.3390/metabo10060233>
- Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J., & Nelson, K. E. (2012). Next Generation Sequencing to Define Prokaryotic and Fungal Diversity in the Bovine Rumen. *PLoS ONE*, 7(11), e48289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048289>
- Fox, N. J., Smith, L. A., Houdijk, J. G. M., Athanasiadou, S., & Hutchings, M. R. (2018). Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. *International Journal for Parasitology*, 48(13), 1017-1021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.06.001>
- France, J., Theodorou, M. K., & Davies, D. (1990). Use of zoospore concentrations and life cycle parameters in determining the population of anaerobic fungi in the rumen ecosystem. *Journal of Theoretical Biology*, 147(3), 413-422. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80496-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80496-5)
- Francisco, A. E., Santos-Silva, J. M., V. Portugal, A. P., Alves, S. P., & B. Bessa, R. J. (2019). Relationship between rumen ciliate protozoa and biohydrogenation fatty acid profile in rumen and meat of lambs. *PLOS ONE*, 14(9), e0221996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221996>
- Frederiksen, K. R., Price, D. A., & Blackwell, R. L. (1967). Environmental Factors Affecting Rate and Efficiency of Gain and other Traits in Rambouillet Lambs. *Journal of Animal Science*, 26(4), 667-673. <https://doi.org/10.2527/jas1967.264667x>
- Freetly, H. C., Dickey, A., Lindholm-Perry, A. K., Thallman, R. M., Keele, J. W., Foote, A. P., & Wells, J. E. (2020a). Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency. *Journal of Animal Science*, 98(2), skaa008. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa008>
- Freetly, H. C., Kuehn, L. A., Thallman, R. M., & Snelling, W. M. (2020b). Heritability and genetic correlations of feed intake, body weight gain, residual gain, and residual feed intake of beef cattle as heifers and cows. *Journal of Animal Science*, 98(1), skz394. <https://doi.org/10.1093/jas/skz394>
- Freetly, H. C., Lindholm-Perry, A. K., Hales, K. E., Brown-Brandl, T. M., Kim, M., Myer, P. R., & Wells, J. E. (2015). Methane production and methanogen levels in steers that differ in residual gain. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2375-2381. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8721>
- Freitas, A. C. B., Costa, R. L. D., Quirino, C. R., Junior, A. B., Vega, W. H. O., Beltrame, R. T., & Campos, F. P. (2020). The effects of genetic group and sex on residual feed intake, performance, morphometric, testicular, and carcass traits' in lambs. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 92 (Suppl_1), 11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190340>
- Fresco, S., Marie-Etancelin, C., Meynadier, A., & Martinez Boggio, G. (2022). Variation in Rumen Bacteria of Lacaune Dairy Ewes From One Week to the Next. *Frontiers in Microbiology*, 13, 848518. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.848518>
- Fricke, W. F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2006). The Genome Sequence of *Methanospaera stadmanae*

- Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 642-658. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.642-658.2006>
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., & Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4456-4466. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1722>
- Fukuda, S., Suzuki, Y., Komori, T., Kawamura, K., Asanuma, N., & Hino, T. (2007). Purification and gene sequencing of conjugated linoleic acid reductase from a gastrointestinal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 365-371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03247.x>
- Galindo-Prieto, B. (2017). *Novel variable influence on projection (VIP) methods in OPLS, O2PLS, and OnPLS models for single- and multi-block variable selection: VIPOPLS, VIPO2PLS, and MB-VIOP methods*. Umeå University.
- Gibert, P. (1980). *Le contrôle de gestion dans les organisations publiques*. (Les Editions d'organisation).
- Gilbert, H., Bidanel, J.-P., Gruand, J., Caritez, J.-C., Billon, Y., Guillouet, P., Lagant, H., Noblet, J., & Sellier, P. (2007). Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 85(12), 3182-3188. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-590>
- Gill, M., France, J., Summers, M., McBRIDE, B. W., & Milligan, L. P. (1989). Simulation of the energy costs associated with protein turnover and Na⁺, K⁺-transport in growing lambs. *The Journal of Nutrition*, 119(9), 1287-1299.
- Gilmour, A. R., Gogel, R. B. J., Cullis, B. R., & Thompson, R. (2009). ASReml User Guide_Release 3.0. *VSN International Ltd*.
- Gleason, C. B., Beckett, L. M., & White, R. R. (2022). Rumen fermentation and epithelial gene expression responses to diet ingredients designed to differ in ruminally degradable protein and fiber supplies. *Scientific Reports*, 12(1), 2933. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06890-5>
- Global Rumen Census Collaborators, Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Gnaiger, E. (2020). *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. 5th ed.* <https://doi.org/10.26124/BEC:2020-0002>
- Goldfine, H. (2010). The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Progress in Lipid Research*, 49(4), 493-498. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.003>
- Gomes, R. da C., Sainz, R. D., & Leme, P. R. (2013). Protein metabolism, feed energy partitioning, behavior patterns and plasma cortisol in Nellore steers with high and low residual feed intake. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(1), 44-50. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013000100007>
- Good, I. J. (1953). The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika*, 40(3), 237-264.

- Goopy, J. P., Donaldson, A., Hegarty, R., Vercoe, P. E., Haynes, F., Barnett, M., & Oddy, V. H. (2014). Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *British Journal of Nutrition*, *111*(4), 578-585. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002936>
- Gray, F. V. (1948). The absorption of Volatile Fatty Acids from the rumen. *Journal of Experimental Biology*, *25*, 135-144.
- Greenacre, M., Martínez-Álvaro, M., & Blasco, A. (2021). Compositional Data Analysis of Microbiome and Any-Omics Datasets: A Validation of the Additive Logratio Transformation. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 727398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.727398>
- Grubbs, J. K., Fritchen, A. N., Huff-Lonergan, E., Dekkers, J. C. M., Gabler, N. K., & Lonergan, S. M. (2013a). Divergent genetic selection for residual feed intake impacts mitochondria reactive oxygen species production in pigs1. *Journal of Animal Science*, *91*(5), 2133-2140. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5894>
- Grubbs, J. K., Fritchen, A. N., Huff-Lonergan, E., Gabler, N. K., & Lonergan, S. M. (2013b). Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. *Journal of Proteomics*, *80*, 334-345. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.017>
- Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. A., & Moore, S. S. (2008). Linkage of microbial ecology to phenotype: Correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters*, *288*(1), 85-91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01343.x>
- Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., Salis, L., Chantelauze, C., Bes, A., Nozière, P., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2022). Protein metabolism, body composition and oxygen consumption in young bulls divergent in residual feed intake offered two contrasting forage-based diets. *Animal*, *16*(7), 100558. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100558>
- Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., Taussat, S., Fossaert, C., Renand, G., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2021). Plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ vs plasma urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle: Phenotypic and genetic evaluation. *Animal*, *15*(8), 100318. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100318>
- Guillet, C., Debout, M., Batisse, M., Walrand, S., & Boirie, Y. (2008). Isotopes stables et métabolisme: Principe et applications. *Médecine des Maladies Métaboliques*, *2*(4), 395-399. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(08\)74041-0](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(08)74041-0)
- Guinguina, A., Yan, T., Lund, P., Bayat, A. R., Hellwing, A. L. F., & Huhtanen, P. (2020). Between-cow variation in the components of feed efficiency. *Journal of Dairy Science*, *103*(9), 7968-7982. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18257>
- Gürelli, G. (2017). Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep (*Ovis aries*) in İzmir, Turkey and Scanning Electron Microscopic Observations. *Zootaxa*, *4286*(4), 545. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4286.4.7>
- Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D. P., Doreau, M., & Martin, C. (2014). Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal*, *8*(11), 1816-1825. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001852>
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote

- Specific Primers. *PLoS ONE*, 9(2), e87624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- Hafla, A. N., Carstens, G. E., Forbes, T. D. A., Tedeschi, L. O., Bailey, J. C., Walter, J. T., & Johnson, J. R. (2013). Relationships between postweaning residual feed intake in heifers and forage use, body composition, feeding behavior, physical activity, and heart rate of pregnant beef females. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5353-5365. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6423>
- Hall, M. B. (2015). Total volatile fatty acid concentrations are unreliable estimators of treatment effects on ruminal fermentation in vivo. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3988-3999.
- Hamlin, L. J., & Hungate, R. E. (1956). Culture and physiology of a Starch-degrading bacterium (*Bacteroides amylophilus* N. SP.) from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 72(4), 548-554. <https://doi.org/10.1128/jb.72.4.548-554.1956>
- Harper, M.-E., Antoniou, A., Bevilacqua, L., Bezaire, V., & Monemdjou, S. (2002). Cellular energy expenditure and the importance of uncoupling. *Journal of Animal Science*, 80(E-suppl_2), E90-E97. https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_2E90x
- Heaton, G. M., Wagenvoord, R. J., Kemp, A., & Nicholls, D. G. (1978). Brown-Adipose-Tissue Mitochondria : Photoaffinity Labelling of the Regulatory Site of Energy Dissipation. *European Journal of Biochemistry*, 82(2), 515-521. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12045.x>
- Hecker, J. F., Budtz-Olsen, O. E., & Ostwald, M. (1964). The Rumen as a Water Store in Sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 15, 961-968.
- Hegarty, R. S., Goopy, J. P., Herd, R. M., & McCorkell, B. (2007). Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1479-1486. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-236>
- Herd, R. M., & Arthur, P. F. (2009). Physiological basis for residual feed intake1. *Journal of Animal Science*, 87(suppl_14), E64-E71. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1345>
- Herd, R. M., Oddy, V. H., & Richardson, E. C. (2004). Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(5), 423-430. <https://doi.org/10.1071/EA02220>
- Herd, R. M., Velazco, J. I., Smith, H., Arthur, P. F., Hine, B., Oddy, H., Dobos, R. C., & Hegarty, R. S. (2019). Genetic variation in residual feed intake is associated with body composition, behavior, rumen, heat production, hematology, and immune competence traits in Angus cattle1. *Journal of Animal Science*, 97(5), 2202-2219. <https://doi.org/10.1093/jas/skz077>
- Hernandez-Sanabria, E., Goonewardene, L. A., Wang, Z., Durunna, O. N., Moore, S. S., & Guan, L. L. (2012). Impact of Feed Efficiency and Diet on Adaptive Variations in the Bacterial Community in the Rumen Fluid of Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1203-1214. <https://doi.org/10.1128/AEM.05114-11>
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L., Goonewardene, L. A., Li, M., Mujibi, D. F., Stothard, P., Moore, S. S., & Leon-Quintero, M. C. (2010). Correlation of Particular Bacterial PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Patterns with Bovine Ruminant Fermentation Parameters and Feed Efficiency Traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6338-6350. <https://doi.org/10.1128/AEM.01052-10>

- Herrero, M., Havlík, P., Valin, H., Notenbaert, A., Rufino, M. C., Thornton, P. K., Blümmel, M., Weiss, F., Grace, D., & Obersteiner, M. (2013). Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(52), 20888-20893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308149110>
- Higgins, M. G., Fitzsimons, C., McClure, M. C., McKenna, C., Conroy, S., Kenny, D. A., McGee, M., Waters, S. M., & Morris, D. W. (2018). GWAS and eQTL analysis identifies a SNP associated with both residual feed intake and GFRA2 expression in beef cattle. *Scientific Reports*, *8*(1), 14301. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32374-6>
- Hill, D. L., & Wall, E. (2017). Weather influences feed intake and feed efficiency in a temperate climate. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 2240-2257. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11047>
- Hill, R. A. (2012). *Feed efficiency in the beef industry* (1st ed). Wiley-Blackwell.
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (Éds.). (1997). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7>
- Hook, S. E., Wright, A.-D. G., & McBride, B. W. (2010). Methanogens : Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea*, *2010*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2010/945785>
- Houdijk, J. G. M., Tolcamp, B. J., Rooke, J. A., & Hutchings, M. R. (2017). Animal health and greenhouse gas intensity : The paradox of periparturient parasitism. *International Journal for Parasitology*, *47*(10-11), 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.006>
- Huang, C., Ge, F., Yao, X., Guo, X., Bao, P., Ma, X., Wu, X., Chu, M., Yan, P., & Liang, C. (2021). Microbiome and Metabolomics Reveal the Effects of Different Feeding Systems on the Growth and Ruminal Development of Yaks. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 682989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682989>
- Hudson, J. A., MacKenzie, C. A. M., & Joblin, K. N. (1995). Conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by two species of ruminal bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *44*, 1-6.
- Huhtanen, P., Bayat, A., Lund, P., & Guinguina, A. (2021). Residual carbon dioxide as an index of feed efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *104*(5), 5332-5344. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19370>
- Hungate, R. E. (1947). Studies on cellulose fermentation III The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. *Journal of Bacteriology*, *53*, 15.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Kingston-Smith, A. H., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Cookson, A. R., Newbold, C. J., Wallace, R. J., & Scollan, N. D. (2009). Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts : Fatty acid content of rumen microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, *69*(3), 461-471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00717.x>
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., & Scollan, N. D. (2011). As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella* , *Lachnospiraceae* incertae sedis and unclassified *Bacteroidales* ,

- Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation: Bacterial involvement in biohydrogenation. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1500-1512. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02452.x>
- INRA. (2018). *ALIMENTATION DES RUMINANTS* (Éditions Quae).
- Iqbal, M., Pumford, N. R., Tang, Z. X., Lassiter, K., Wing, T., Cooper, M., & Bottje, W. (2004). Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. *Poultry Science*, 83(3), 474-484. <https://doi.org/10.1093/ps/83.3.474>
- Ishaku, P., & Abdullahi, A. (2010). Volatile fatty acids production in ruminants and the role of monocarboxylate transporters: A review. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6229-6232.
- Jami, E., & Mizrahi, I. (2012). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE*, 7(3), e33306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033306>
- Jami, E., White, B. A., & Mizrahi, I. (2014). Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. *PLoS ONE*, 9(1), e85423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085423>
- Jarrige, R. (1978). *Principes de la nutrition et de l'alimentation des ruminants: Besoins alimentaires des animaux, valeur nutritive des aliments*. INRA.
- Jarvis, G. N., & Moore, E. R. B. (2010). Lipid Metabolism and the Rumen Microbial Ecosystem. In K. N. Timmis (Éd.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (p. 2245-2257). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_163
- Jewell, K. A., McCormick, C. A., Odt, C. L., Weimer, P. J., & Suen, G. (2015). Ruminal Bacterial Community Composition in Dairy Cows Is Dynamic over the Course of Two Lactations and Correlates with Feed Efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4697-4710. <https://doi.org/10.1128/AEM.00720-15>
- Jiao, D., Ji, K., Wang, W., Liu, H., Zhou, J., Degen, A. A., Zhang, Y., Zhou, P., & Yang, G. (2021). Transcriptome Profiles of the Liver in Two Cold-Exposed Sheep Breeds Revealed Different Mechanisms and Candidate Genes for Thermogenesis. *Genetics Research*, 2021, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/5510297>
- Johnson, J. R., Carstens, G. E., Krueger, W. K., Lancaster, P. A., Brown, E. G., Tedeschi, L. O., Anderson, R. C., Johnson, K. A., & Brosh, A. (2019). Associations between residual feed intake and apparent nutrient digestibility, in vitro methane-producing activity, and volatile fatty acid concentrations in growing beef cattle. *Journal of Animal Science*, 97(8), 3550-3561. <https://doi.org/10.1093/jas/skz195>
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483-2492. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- Jørgensen, H., Sørensen, P., & Eggum, B. O. (1990). Protein and energy metabolism in broiler chickens selected for either body weight gain or feed efficiency. *British Poultry Science*, 31(3), 517-524. <https://doi.org/10.1080/00071669008417283>
- Jorge-Smeding, E., Bonnet, M., Renand, G., Taussat, S., Graulet, B., Ortigues-Marty, I., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2021). Common and diet-specific metabolic pathways

- underlying residual feed intake in fattening Charolais yearling bulls. *Scientific Reports*, *11*(1), 24346. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03678-x>
- Jorge-Smeding, E., Polakof, S., Bonnet, M., Durand, S., Centeno, D., Pétéra, M., Taussat, S., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2022). Untargeted metabolomics confirms the association between plasma branched chain amino acids and residual feed intake in beef heifers. *PLOS ONE*, *17*(11), e0277458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277458>
- Jouany, J.-P. (2008). Enteric methane production by ruminants and its control. In *Gut Efficiency; The Key Ingredient in Ruminant Production* (p. pp35-39). Wageningen Academic Publishers.
- Karimi, Abdolhamid., Abarghuei, M. J., & Boostani, A. (2022). Growth performance and carcass traits of purebred and crossbred fattening lambs from Ghezel ram with Grey Shirazi ewe. *Tropical Animal Health and Production*, *54*(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-03017-2>
- Kelly, A. K., Lawrence, P., Earley, B., Kenny, D. A., & McGee, M. (2017). Stress and immunological response of heifers divergently ranked for residual feed intake following an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *8*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0197-x>
- Kelly, A. K., McGee, M., Crews, D. H., Fahey, A. G., Wylie, A. R., & Kenny, D. A. (2010a). Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers¹. *Journal of Animal Science*, *88*(1), 109-123. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2196>
- Kelly, A. K., McGee, M., Crews, D. H., Sweeney, T., Boland, T. M., & Kenny, D. A. (2010b). Repeatability of feed efficiency, carcass ultrasound, feeding behavior, and blood metabolic variables in finishing heifers divergently selected for residual feed intake¹. *Journal of Animal Science*, *88*(10), 3214-3225. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2700>
- Kelly, A. K., Waters, S. M., McGee, M., Browne, J. A., Magee, D. A., & Kenny, D. A. (2013). Expression of key genes of the somatotrophic axis in longissimus dorsi muscle of beef heifers phenotypically divergent for residual feed intake. *Journal of Animal Science*, *91*(1), 159-167. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5557>
- Kelly, D. N., Murphy, C., Sleator, R. D., Judge, M. M., Conroy, S. B., & Berry, D. P. (2019). Feed efficiency and carcass metrics in growing cattle¹. *Journal of Animal Science*, *97*(11), 4405-4417. <https://doi.org/10.1093/jas/skz316>
- Kelly, W. J., Mackie, R. I., Attwood, G. T., Janssen, P. H., McAllister, T. A., & Leahy, S. C. (2022). Hydrogen and formate production and utilisation in the rumen and the human colon. *Animal Microbiome*, *4*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00174-z>
- Kennedy, K. M., Becker, F., Hammon, H. M., & Kuhla, B. (2021). Differences in net fat oxidation, heat production, and liver mitochondrial DNA copy numbers between high and low feed-efficient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *104*(8), 9287-9303. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20031>
- Kennedy, P. M., Christopherson, R. J., & Milligan, L. P. (1976). The effect of cold exposure of sheep on digestion, rumen turnover time and efficiency of microbial synthesis. *British Journal of Nutrition*, *36*, 231-242.

- Kenny, D. A., Fitzsimons, C., Waters, S. M., & McGee, M. (2018). Invited review : Improving feed efficiency of beef cattle – the current state of the art and future challenges. *Animal*, *12*(9), 1815-1826. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000976>
- Kern, R. J., Lindholm-Perry, A. K., Freetly, H. C., Kuehn, L. A., Rule, D. C., & Ludden, P. A. (2016). Rumen papillae morphology of beef steers relative to gain and feed intake and the association of volatile fatty acids with kallikrein gene expression. *Livestock Science*, *187*, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.02.007>
- Kessel, J. A. S., & Russell, J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, *20*(4), 205-210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00319.x>
- Khansefid, M., Millen, C. A., Chen, Y., Pryce, J. E., Chamberlain, A. J., Vander Jagt, C. J., Gondro, C., & Goddard, M. E. (2017). Gene expression analysis of blood, liver, and muscle in cattle divergently selected for high and low residual feed intake1. *Journal of Animal Science*, *95*(11), 4764-4775. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1320>
- Kim, J. N., Song, J., Kim, E. J., Chang, J., Kim, C.-H., Seo, S., Chang, M. B., & Bae, G.-S. (2019). Effects of short-term fasting on in vivo rumen microbiota and in vitro rumen fermentation characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *32*(6), 776-782. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0489>
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes : Status of microbial census in rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, *76*(1), 49-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x>
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Rychlik, J. L., & Russell, J. B. (2002). The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(5), 976-982. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01610.x>
- King, E. E., Smith, R. P., St-Pierre, B., & Wright, A.-D. G. (2011). Differences in the Rumen Methanogen Populations of Lactating Jersey and Holstein Dairy Cows under the Same Diet Regimen. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(16), 5682-5687. <https://doi.org/10.1128/AEM.05130-11>
- Kišidayová, S., Durkaj, D., Mihaliková, K., Váradyová, Z., Puchalska, J., Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., & Gizejewski, Z. (2021). Rumen Ciliated Protozoa of the Free-Living European Bison (*Bison bonasus*, Linnaeus). *Frontiers in Microbiology*, *12*, 658448. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658448>
- Kittelmann, S., Deventer, S. R., Kirk, M. R., Seedorf, H., Dehority, B. A., & Janssen, P. H. (2015). Phylogeny of Intestinal Ciliates, Including *Charonina ventriculi*, and Comparison of Microscopy and 18S rRNA Gene Pyrosequencing for Rumen Ciliate Community Structure Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(7), 2433-2444. <https://doi.org/10.1128/AEM.03697-14>
- Kittelmann, S., & Janssen, P. H. (2011). Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries : Rumen ciliate community composition of domestic ruminants. *FEMS Microbiology Ecology*, *75*(3), 468-481. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01022.x>

- Kittelmann, S., Pinares-Patiño, C. S., Seedorf, H., Kirk, M. R., Ganesh, S., McEwan, J. C., & Janssen, P. H. (2014). Two Different Bacterial Community Types Are Linked with the Low-Methane Emission Trait in Sheep. *PLoS ONE*, 9(7), e103171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103171>
- Kittelmann, S., Seedorf, H., Walters, W. A., Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., & Janssen, P. H. (2013). Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. *PLoS ONE*, 8(2), e47879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047879>
- Kleiber, M. K. (1961). *Metabolic Rate and Food Utilization as a Function of Body Size*. Brody Memorial Lecture I, University of Missouri.
- Knott, S. A., Cummins, L. J., Dunshea, F. R., & Leury, B. J. (2008). Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(3), 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2007.07.002>
- Knott, S. A., Cummins, L. J., Dunshea, F. R., & Leury, B. J. (2010). Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotropin hormone and insulin-induced hypoglycemia in rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(2), 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.03.003>
- Koch, R., M., Swiger, L. A., Chambers, D., & Gregory, K. E. (1963). Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, 22(2), 486-494.
- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., & Kobayashi, Y. (2010). Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1887-1894. <https://doi.org/10.1128/AEM.02606-09>
- Kolath, W. H., Kerley, M. S., Golden, J. W., & Keisler, D. H. (2006). The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers¹. *Journal of Animal Science*, 84(4), 861-865. <https://doi.org/10.2527/2006.844861x>
- Krause, D. O., Nagaraja, T. G., Wright, A. D. G., & Callaway, T. R. (2013). Board-invited review : Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology^{1,2}. *Journal of Animal Science*, 91(1), 331-341. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5567>
- Krueger, W. K. (2009). *Understanding beef cattle efficiency : I) Understanding physiological and digestive factors affecting residual feed intake and II) tannin supplementation : Effects on animal performance, fermentation and carcass traits*. Texas A&M University.
- Kumar, S., Indugu, N., Vecchiarelli, B., & Pitta, D. W. (2015). Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00781>
- Kuzdzal-Savoie, S., & Kuzdzal, W. (1967). Le dosage des acides gras volatils du beurre par chromatographie en phase gazeuse. *Le Lait*, 47(468), 487-494. <https://doi.org/10.1051/lait:196746818>
- Ladeira, G. C., Pilonetto, F., Fernandes, A. C., Bóscollo, P. P., Dauria, B. D., Titto, C. G., Coutinho, L. L., e Silva, F. F., Pinto, L. F. B., & Mourão, G. B. (2022). CNV detection and their association with growth, efficiency and carcass traits in Santa Inês sheep.

- Journal of Animal Breeding and Genetics*, 139(4), 476-487.
<https://doi.org/10.1111/jbg.12671>
- Lahart, B., Prendiville, R., Buckley, F., Kennedy, E., Conroy, S. B., Boland, T. M., & McGee, M. (2020). The repeatability of feed intake and feed efficiency in beef cattle offered high-concentrate, grass silage and pasture-based diets. *Animal*, 14(11), 2288-2297.
<https://doi.org/10.1017/S1751731120000853>
- Lam, S., Miglior, F., Fonseca, P. A. S., Gómez-Redondo, I., Zeidan, J., Suárez-Vega, A., Schenkel, F., Guan, L. L., Waters, S., Stothard, P., & Cánovas, A. (2021). Identification of functional candidate variants and genes for feed efficiency in Holstein and Jersey cattle breeds using RNA-sequencing. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1928-1950.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18241>
- Lam, S., Munro, J. C., Zhou, M., Guan, L. L., Schenkel, F. S., Steele, M. A., Miller, S. P., & Montanholi, Y. R. (2018). Associations of rumen parameters with feed efficiency and sampling routine in beef cattle. *Animal*, 12(7), 1442-1450.
<https://doi.org/10.1017/S1751731117002750>
- Lancaster, P. A., Carstens, G. E., Michal, J. J., Brennan, K. M., Johnson, K. A., & Davis, M. E. (2014). Relationships between residual feed intake and hepatic mitochondrial function in growing beef cattle1. *Journal of Animal Science*, 92(7), 3134-3141.
<https://doi.org/10.2527/jas.2013-7409>
- Lande, R. (1996). Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos*, 76(1), 5. <https://doi.org/10.2307/3545743>
- Lange, V., Böhme, I., Hofmann, J., Lang, K., Sauter, J., Schöne, B., Paul, P., Albrecht, V., Andreas, J. M., Baier, D. M., Nething, J., Ehninger, U., Schwarzelt, C., Pingel, J., Ehninger, G., & Schmidt, A. H. (2014). Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-63>
- Lawrence, P., Kenny, D. A., Earley, B., Crews, D. H., & McGee, M. (2011). Grass silage intake, rumen and blood variables, ultrasonic and body measurements, feeding behavior, and activity in pregnant beef heifers differing in phenotypic residual feed intake1. *Journal of Animal Science*, 89(10), 3248-3261. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3774>
- Leão, J. M., Coelho, S. G., Machado, F. S., Azevedo, R. A., Lima, J. A. M., Carneiro, J. C., Lage, C. F. A., Ferreira, A. L., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., & Campos, M. M. (2018). Phenotypically divergent classification of preweaned heifer calves for feed efficiency indexes and their correlations with heat production and thermography. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5060-5068. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14109>
- Lee, K. W., Lee, H. J., Cho, H. Y., & Kim, Y. J. (2005). Role of the Conjugated Linoleic Acid in the Prevention of Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 135-144. <https://doi.org/10.1080/10408690490911800>
- Lee, L. C., Liong, C.-Y., & Jemain, A. A. (2018). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data : A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *The Analyst*, 143(15), 3526-3539.
<https://doi.org/10.1039/C8AN00599K>

- Lee, Y.-J., & Jenkins, T. C. (2011). Biohydrogenation of Linolenic Acid to Stearic Acid by the Rumen Microbial Population Yields Multiple Intermediate Conjugated Diene Isomers. *The Journal of Nutrition*, *141*(8), 1445-1450. <https://doi.org/10.3945/jn.111.138396>
- Lefort, G. (2021). *Quantification automatique de métabolites dans un spectre RMN et application à la description de la maturité périnatale chez le porc*. Université Toulouse Capitole.
- Lefort, G., Liaubet, L., Marty-Gasset, N., Canlet, C., Vialaneix, N., & Servien, R. (2021). Joint Automatic Metabolite Identification and Quantification of a Set of ¹H NMR Spectra. *Analytical Chemistry*, *93*(5), 2861-2870. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04232>
- Lemal, D., Renaville, R., Claes, V., Ruelle, L., Fabry, J., Bumy, A., & Underwood, L. E. (1989). Effect of pituitary somatotropin injections on plasma insulin-like growth factor I and somatotropin profiles in growing heifers. *Journal of Animal Science*, *67*(10), 2715-2723.
- Letelier, P., Zanton, G. I., Dórea, J. R. R., & Wattiaux, M. A. (2022). Plasma essential amino acid concentration and profile are associated with performance of lactating dairy cows as revealed through meta-analysis and hierarchical clustering. *Journal of Dairy Science*, *105*(6), 5044-5061. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21028>
- Leverve, X., Carpentier, F., & Bamoud, D. (1992). Intérêt et limites de la 3-méthylhistidine pour la mesure du catabolisme musculaire. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *6*, 219-225.
- Lewis, R. M., & Emmans, G. C. (2010). Feed intake of sheep as affected by body weight, breed, sex, and feed composition1. *Journal of Animal Science*, *88*(2), 467-480. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1735>
- Li, F., & Guan, L. L. (2017). Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(9), e00061-17, [/aem/83/9/e00061-17.atom](https://doi.org/10.1128/AEM.00061-17). <https://doi.org/10.1128/AEM.00061-17>
- Li, F., Hitch, T. C. A., Chen, Y., Creevey, C. J., & Guan, L. L. (2019). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, *7*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0618-5>
- Li, F., Wang, Z., Dong, C., Li, F., Wang, W., Yuan, Z., Mo, F., & Weng, X. (2017). Rumen Bacteria Communities and Performances of Fattening Lambs with a Lower or Greater Subacute Ruminal Acidosis Risk. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02506>
- Li, J., Mukiibi, R., Wang, Y., Plastow, G. S., & Li, C. (2021). Identification of candidate genes and enriched biological functions for feed efficiency traits by integrating plasma metabolites and imputed whole genome sequence variants in beef cattle. *BMC Genomics*, *22*(1), 823. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08064-5>
- Li, S., Du, M., Zhang, C., Wang, Y., Lee, Y., & Zhang, G. (2022). Diet Type Impacts Production Performance of Fattening Lambs by Manipulating the Ruminal Microbiota and Metabolome. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 824001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824001>

- Li, Z., Wang, X., Alberdi, A., Deng, J., Zhong, Z., Si, H., Zheng, C., Zhou, H., Wang, J., Yang, Y., Wright, A.-D. G., Mao, S., Zhang, Z., Guan, L., & Li, G. (2020). Comparative Microbiome Analysis Reveals the Ecological Relationships Between Rumen Methanogens, Acetogens, and Their Hosts. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01311>
- Liang, Y. S., Li, G. Z., Li, X. Y., Lü, J. Y., Li, F. D., Tang, D. F., Li, F., Deng, Y., Zhang, H., Wang, Z. L., & Weng, X. X. (2017). Growth performance, rumen fermentation, bacteria composition, and gene expressions involved in intracellular pH regulation of rumen epithelium in finishing Hu lambs differing in residual feed intake phenotype. *Journal of Animal Science*, *95*(4), 1727-1738. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1134>
- Lines, D. S., Pitchford, W. S., Bottema, C. D. K., Herd, R. M., & Oddy, V. H. (2014). Selection for residual feed intake affects appetite and body composition rather than energetic efficiency. *Animal Production Science*, *58*(1). <https://doi.org/10.1071/AN13321>
- Liquet, B., Cao, K.-A. L., Hocini, H., & Thiébaud, R. (2012). A novel approach for biomarker selection and the integration of repeated measures experiments from two assays. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-325>
- Liu, H., Jiang, H., Hao, L., Cao, X., Degen, A., Zhou, J., & Zhang, C. (2021). Rumen Bacterial Community of Grazing Lactating Yaks (*Poephagus grunniens*) Supplemented with Concentrate Feed and/or Rumen-Protected Lysine and Methionine. *Animals*, *11*(8), 2425. <https://doi.org/10.3390/ani11082425>
- Liu, H., Xu, T., Xu, S., Ma, L., Han, X., Wang, X., Zhang, X., Hu, L., Zhao, N., Chen, Y., Pi, L., & Zhao, X. (2019a). Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau. *PeerJ*, *7*, e7462. <https://doi.org/10.7717/peerj.7462>
- Liu, J., Xue, C., Sun, D., Zhu, W., & Mao, S. (2019b). Impact of high-grain diet feeding on mucosa-associated bacterial community and gene expression of tight junction proteins in the small intestine of goats. *MicrobiologyOpen*, *8*(6). <https://doi.org/10.1002/mbo3.745>
- Liu, Y., Wu, H., Chen, W., Liu, C., Meng, Q., & Zhou, Z. (2022). Rumen Microbiome and Metabolome of High and Low Residual Feed Intake Angus Heifers. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 812861. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.812861>
- Ljungdahl, L. G. (2008). The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC-2 and Aspects of Its Applied Use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1125*(1), 308-321. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.030>
- Llonch, P., Somarriba, M., Duthie, C. A., Troy, S., Roehe, R., Rooke, J., Haskell, M. J., & Turner, S. P. (2018). Temperament and dominance relate to feeding behaviour and activity in beef cattle : Implications for performance and methane emissions. *Animal*, *12*(12), 2639-2648. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000617>
- Lobley, G. E. (2003). Protein turnover—What does it mean for animal production? *Canadian Journal of Animal Science*, *83*(3), 327-340. <https://doi.org/10.4141/A03-019>
- Lobley, G. E., Connell, A., & Buchan, V. (1987). Effect of food intake on protein and energy metabolism in finishing beef steers. *British Journal of Nutrition*, *57*(3), 457-465. <https://doi.org/10.1079/BJN19870053>

- Lopes, D. R. G., de Souza Duarte, M., La Reau, A. J., Chaves, I. Z., de Oliveira Mendes, T. A., Detmann, E., Bento, C. B. P., Mercadante, M. E. Z., Bonilha, S. F. M., Suen, G., & Mantovani, H. C. (2021). Assessing the relationship between the rumen microbiota and feed efficiency in Nelore steers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00599-7>
- Lopes, D. R. G., La Reau, A. J., Duarte, M. de S., Detmann, E., Bento, C. B. P., Mercadante, M. E. Z., Bonilha, S. F. M., Suen, G., & Mantovani, H. C. (2019). The Bacterial and Fungal Microbiota of Nelore Steers Is Dynamic Across the Gastrointestinal Tract and Its Fecal-Associated Microbiota Is Correlated to Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01263>
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., & Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4(7), 1008-1023. <https://doi.org/10.1017/S175173111000042X>
- Luiting, P., Schrama, J. W., van der Hel, W., & Urff, E. M. (1991). Metabolic differences between white leghorns selected for high and low residual food consumption. *British Poultry Science*, 32(4), 763-782. <https://doi.org/10.1080/00071669108417402>
- Lwin, K. O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., & Matsui, H. (2011). Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Current Microbiology*, 62(4), 1147-1151. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9843-7>
- Ma, Y., Li, Y., Li, Y., Cheng, Y., & Zhu, W. (2020). The enrichment of anaerobic fungi and methanogens showed higher lignocellulose degrading and methane producing ability than that of bacteria and methanogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(9), 125. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02894-3>
- Ma, Z. Y., Zhou, J. W., Yi, S. Y., Wang, M., & Tan, Z. L. (2022). In vitro Inoculation of Fresh or Frozen Rumen Fluid Distinguishes Contrasting Microbial Communities and Fermentation Induced by Increasing Forage to Concentrate Ratio. *Frontiers in Nutrition*, 8, 772645. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.772645>
- Macdonald, K. A., Pryce, J. E., Spelman, R. J., Davis, S. R., Wales, W. J., Waghorn, G. C., Williams, Y. J., Marett, L. C., & Hayes, B. J. (2014). Holstein-Friesian calves selected for divergence in residual feed intake during growth exhibited significant but reduced residual feed intake divergence in their first lactation. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1427-1435. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7227>
- Mader, C. J., Montanholi, Y. R., Wang, Y. J., Miller, S. P., Mandell, I. B., McBride, B. W., & Swanson, K. C. (2009). Relationships among measures of growth performance and efficiency with carcass traits, visceral organ mass, and pancreatic digestive enzymes in feedlot cattle^{1,2}. *Journal of Animal Science*, 87(4), 1548-1557. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0914>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm : Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2015). Swarm v2 : Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>

- Malossini, F., Piasentier, E., & Bovolenta, S. (1990). N-alkane content of some forages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(3), 405-409. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740530313>
- Mao, C. X., & Colwell, R. K. (2005). Estimation of Species Richness : Mixture Models, the Role of Rare Species, and Inferential Challenges. *Ecology*, 86(5), 1143-1153. <https://doi.org/10.1890/04-1078>
- Mao, F., Chen, L., Vinsky, M., Okine, E., Wang, Z., Basarab, J., Crews, D. H., & Li, C. (2013). Phenotypic and genetic relationships of feed efficiency with growth performance, ultrasound, and carcass merit traits in Angus and Charolais steers¹. *Journal of Animal Science*, 91(5), 2067-2076. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5470>
- Marcon, E. (2015). *Mesures de la Biodiversité*. 284.
- Marie-Etancelin, C., Francois, D., Weisbecker, J., Marcon, D., Moreno-Romieux, C., Bouvier, F., & Tortereau, F. (2019). Detailed genetic analysis of feeding behaviour in Romane lambs and links with residual feed intake. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 136(3), 174-182. <https://doi.org/10.1111/jbg.12392>
- Marie-Etancelin, C., Tortereau, F., Gabinaud, B., Martinez Boggio, G., Le Graverand, Q., Marcon, D., De Almeida, M.-L., Pascal, G., Weisbecker, J.-L., & Meynadier, A. (2021). Apart From the Diet, the Ruminal Microbiota of Lambs Is Modified in Relation to Their Genetic Potential for Feed Efficiency or Feeding Behavior. *Frontiers in Microbiology*, 12, 759432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.759432>
- Martello, L. S., da Luz e Silva, S., da Costa Gomes, R., da Silva Corte, R. R. P., & Leme, P. R. (2016). Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in *Bos indicus* cattle in tropical conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60(1), 173-181. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1015-9>
- Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants : From microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>
- Martin, M. J., Dórea, J. R. R., Borchers, M. R., Wallace, R. L., Bertics, S. J., DeNise, S. K., Weigel, K. A., & White, H. M. (2021). Comparison of methods to predict feed intake and residual feed intake using behavioral and metabolite data in addition to classical performance variables. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8765-8782. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20051>
- Martin, P., Taussat, S., Vinet, A., Krauss, D., Maupetit, D., & Renand, G. (2019). Genetic parameters and genome-wide association study regarding feed efficiency and slaughter traits in Charolais cows. *Journal of Animal Science*, 97(9), 3684-3698. <https://doi.org/10.1093/jas/skz240>
- Martinez Boggio, G., Meynadier, A., Daunis-i-Estadella, P., & Marie-Etancelin, C. (2021). Compositional analysis of ruminal bacteria from ewes selected for somatic cell score and milk persistency. *PLOS ONE*, 16(7), e0254874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254874>
- Martins, S. V., Madeira, A., Lopes, P. A., Pires, V. M. R., Alfaia, C. M., Prates, J. A. M., Moura, T., & Soveral, G. (2015). Adipocyte membrane glycerol permeability is involved in the anti-adipogenic effect of conjugated linoleic acid. *Biochemical and Biophysical*

- Matika, O., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Riggio, V., & Headon, D. J. (2013). Genetic factors controlling wool shedding in a composite Easycare sheep flock. *Animal Genetics*, 44(6), 742-749. <https://doi.org/10.1111/age.12070>
- Matysiak, J., Dereziński, P., Klupczyńska, A., Matysiak, J., Kaczmarek, E., & Kokot, Z. J. (2014). Effects of a Honeybee Sting on the Serum Free Amino Acid Profile in Humans. *PLoS ONE*, 9(7), e103533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103533>
- Mayes, R. W., Lamb, C. S., & Colgrove, P. M. (1986). The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *The Journal of Agricultural Science*, 107(1), 161-170. <https://doi.org/10.1017/S0021859600066910>
- McBride, B. W., & Kelly, J. M. (1990). Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver : A review. *Journal of Animal Science*, 68(9), 2997. <https://doi.org/10.2527/1990.6892997x>
- McBride, B. W., & Milligan, L. P. (1985). Influence of feed intake and starvation on the magnitude of Na⁺,K⁺-ATPase(EC 3.6.1.3)-dependent respiration in duodenal mucosa of sheep. *British Journal of Nutrition*, 53(3), 605-614. <https://doi.org/10.1079/BJN19850070>
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson. (2011). *Animal Nutrition, 7th Edition*. Pearson Education.
- McDonnell, R. P., Hart, K. J., Boland, T. M., Kelly, A. K., McGee, M., & Kenny, D. A. (2016). Effect of divergence in phenotypic residual feed intake on methane emissions, ruminal fermentation, and apparent whole-tract digestibility of beef heifers across three contrasting diets1. *Journal of Animal Science*, 94(3), 1179-1193. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0080>
- McGovern, E., Kenny, D. A., McCabe, M. S., Fitzsimons, C., McGee, M., Kelly, A. K., & Waters, S. M. (2018). 16S rRNA Sequencing Reveals Relationship Between Potent Cellulolytic Genera and Feed Efficiency in the Rumen of Bulls. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1842. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01842>
- McGovern, E., McGee, M., Byrne, C. J., Kenny, D. A., Kelly, A. K., & Waters, S. M. (2020). Investigation into the effect of divergent feed efficiency phenotype on the bovine rumen microbiota across diet and breed. *Scientific Reports*, 10(1), 15317. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71458-0>
- McIntosh, R. P. (1967). An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. *Ecology*, 48(3), 392-404. <https://doi.org/10.2307/1932674>
- McLoughlin, S., Spillane, C., Claffey, N., Smith, P. E., O'Rourke, T., Diskin, M. G., & Waters, S. M. (2020). Rumen Microbiome Composition Is Altered in Sheep Divergent in Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01981>
- McManus, C. M., Faria, D. A., Lucci, C. M., Louvandini, H., Pereira, S. A., & Paiva, S. R. (2020). Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology*, 155, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.047>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not : Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, *10*(4), e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Meale, S. J., Chaves, A. V., He, M. L., Guan, L. L., & McAllister, T. A. (2015). Effects of various dietary lipid additives on lamb performance, carcass characteristics, adipose tissue fatty acid composition, and wool characteristics. *Journal of Animal Science*, *93*(6), 3110-3120. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8437>
- Meale, S. J., Morgavi, D. P., Cassar-Malek, I., Andueza, D., Ortigues-Marty, I., Robins, R. J., Schiphorst, A.-M., Laverroux, S., Graulet, B., Boudra, H., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2017). Exploration of Biological Markers of Feed Efficiency in Young Bulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(45), 9817-9827. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03503>
- Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R. V., Jost, S., Ottenwalder, B., Schlotterer, C., & Boenigk, J. (2010). Diversity in a hidden world potential and limitation of next-generation sequencing. *Molecular Ecology*, *19* (Suppl_1), 32-40.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., & Visscher, P. T. (2014). Anaerobic Metabolism : Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. In *Treatise on Geochemistry* (p. 273-359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00808-1>
- Melo, L. Q., Costa, S. F., Lopes, F., Guerreiro, M. C., Armentano, L. E., & Pereira, M. N. (2013). Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption1. *Journal of Animal Science*, *91*(4), 1775-1783. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4999>
- Mercier, P., Lewis, M. J., Chang, D., Baker, D., & Wishart, D. S. (2011). Towards automatic metabolomic profiling of high-resolution one-dimensional proton NMR spectra. *Journal of Biomolecular NMR*, *49*(3-4), 307-323. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9480-x>
- Metzler-Zebeli, B. U., Lawlor, P. G., Magowan, E., McCormack, U. M., Curiao, T., Hollmann, M., Ertl, R., Aschenbach, J. R., & Zebeli, Q. (2017). Finishing pigs that are divergent in feed efficiency show small differences in intestinal functionality and structure. *PLOS ONE*, *12*(4), e0174917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174917>
- Moallem, U. (2016). Future consequences of decreasing marginal production efficiency in the high-yielding dairy cow. *Journal of Dairy Science*, *99*(4), 2986-2995. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10494>
- Montanholi, Y., Fontoura, A., Swanson, K., Coomber, B., Yamashiro, S., & Miller, S. (2013). Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *55*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-9>
- Montanholi, Y. R., Haas, L. S., Swanson, K. C., Coomber, B. L., Yamashiro, S., & Miller, S. P. (2017). Liver morphometrics and metabolic blood profile across divergent phenotypes for feed efficiency in the bovine. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *59*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0292-1>
- Montanholi, Y. R., Swanson, K. C., Palme, R., Schenkel, F. S., McBride, B. W., Lu, D., & Miller, S. P. (2010). Assessing feed efficiency in beef steers through feeding behavior, infrared thermography and glucocorticoids. *Animal*, *4*(5), 692-701. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991522>

- Montelli, N. L. L. L., Alvarenga, T. I. R. C., Almeida, A. K., Alvarenga, F. A. P., Furusho-Garcia, I. F., Greenwood, P. L., & Pereira, I. G. (2021). Associations of feed efficiency with circulating IGF-1 and leptin, carcass traits and meat quality of lambs. *Meat Science*, *173*, 108379. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108379>
- Moore, K. L., Johnston, D. J., Graser, H.-U., & Herd, R. (2005). Genetic and phenotypic relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and net feed intake, fat, and growth traits in Angus beef cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, *56*, 211-218. <https://doi.org/10.1071/AR04248>
- Moore, S. S., Mujibi, F. D., & Sherman, E. L. (2009). Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. *Journal of Animal Science*, *87*(suppl_14), E41-E47. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1418>
- Moraïs, S., & Mizrahi, I. (2019). Islands in the stream : From individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(4), 362-379. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz007>
- Morgavi, D. P., Martin, C., Jouany, J.-P., & Ranilla, M. J. (2012). Rumen protozoa and methanogenesis : Not a simple cause–effect relationship. *British Journal of Nutrition*, *107*(3), 388-397. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002935>
- Morvan, B., Bonnemoy, F., Fonty, G., & Gouet, P. (1996). Quantitative Determination of H₂-Utilizing Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea from Digestive Tract of Different Mammals. *Current Microbiology*, *32*(3), 129-133. <https://doi.org/10.1007/s002849900023>
- Morvay, Y., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., & Dijkstra, J. (2011). Evaluation of models to predict the stoichiometry of volatile fatty acid profiles in rumen fluid of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *94*(6), 3063-3080. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3995>
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, *49*(3), 231-253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Mucha, S., Tortereau, F., Doeschl-Wilson, A., Rupp, R., & Conington, J. (2022). Animal Board Invited Review : Meta-analysis of genetic parameters for resilience and efficiency traits in goats and sheep. *Animal*, *16*(3), 100456. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100456>
- Muir, S. K., Linden, N., Knight, M., Behrendt, R., & Kearney, G. (2018). Sheep residual feed intake and feeding behaviour : Are ‘nibblers’ or ‘binge eaters’ more efficient? *Animal Production Science*, *58*(8), 1459. <https://doi.org/10.1071/AN17770>
- Münnich, M., Khol-Parisini, A., Klevenhusen, F., Metzler-Zebeli, B. U., & Zebeli, Q. (2018). Graded replacement of maize grain with molassed sugar beet pulp modulated ruminal microbial community and fermentation profile *in vitro* : Sugar beet pulp, rumen microbiota and fermentation *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(3), 991-997. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8547>
- Myer, P. R., Smith, T. P. L., Wells, J. E., Kuehn, L. A., & Freetly, H. C. (2015a). Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency. *PLOS ONE*, *10*(6), e0129174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129174>

- Myer, P. R., Wells, J. E., Smith, T. P. L., Kuehn, L. A., & Freetly, H. C. (2015b). Cecum microbial communities from steers differing in feed efficiency^{1,2,3}. *Journal of Animal Science*, *93*(11), 5327-5340. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9415>
- Myer, P. R., Wells, J. E., Smith, T. P. L., Kuehn, L. A., & Freetly, H. C. (2015c). Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *SpringerPlus*, *4*(1), 454. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1201-6>
- Myer, P. R., Wells, J. E., Smith, T. P. L., Kuehn, L. A., & Freetly, H. C. (2016). Microbial community profiles of the jejunum from steers differing in feed efficiency. *Journal of Animal Science*, *94*(1), 327-338. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9839>
- Naes, T., & Mevik, B.-H. (2001). Understanding the collinearity problem in regression and discriminant analysis. *Journal of Chemometrics*, *15*(4), 413-426. <https://doi.org/10.1002/cem.676>
- Nascimento, C. F., Branco, R. H., Bonilha, S. F. M., Cyrillo, J. N. S. G., Negrão, J. A., & Mercadante, M. E. Z. (2015). Residual feed intake and blood variables in young Nellore cattle. *Journal of Animal Science*, *93*(3), 1318. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8368>
- Nascimento, M. L., Souza, A. R. D. L., Chaves, A. S., Cesar, A. S. M., Tullio, R. R., Medeiros, S. R., Mourão, G. B., Rosa, A. N., Feijó, G. L. D., Alencar, M. M., & Lanna, D. P. D. (2016). Feed efficiency indexes and their relationships with carcass, non-carcass and meat quality traits in Nellore steers. *Meat Science*, *116*, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.01.012>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2021). *Nutrient requirements of dairy cattle* (Eighth revised edition). National Academies Press.
- National Research Council (Éd.). (2007). *Nutrient requirements of small ruminants : Sheep, goats, cervids, and new world camelids*. National Acad. Pr.
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, *13*(1), 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Newbold, C. J., Chamberlain, D. G., & Williams, A. G. (1986). The effects of defaunation on the metabolism of lactic acid in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *37*(11), 1083-1090. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740371105>
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Nicholls, D. G. (1976). Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria. Purine Nucleotide Control of the Ion Conductance of the Inner Membrane, the Nature of the Nucleotide Binding Site. *European Journal of Biochemistry*, *62*(2), 223-228. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10151.x>
- Nkrumah, J. D., Crews, D. H., Basarab, J. A., Price, M. A., Okine, E. K., Wang, Z., Li, C., & Moore, S. S. (2007). Genetic and phenotypic relationships of feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle¹. *Journal of Animal Science*, *85*(10), 2382-2390. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-657>

- Nkrumah, J. D., Okine, E. K., Mathison, G. W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J. A., Price, M. A., Wang, Z., & Moore, S. S. (2006). Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of Animal Science*, *84*(1), 145-153. <https://doi.org/10.2527/2006.841145x>
- Notter, D. R., Ferrell, C. L., & Field, R. A. (1984). Effects of Breed and Intake Level on Growth and Feed Efficiency in Ram Lambs. *Journal of Animal Science*, *58*(3), 560-576. <https://doi.org/10.2527/jas1984.583560x>
- Nozière, P., Glasser, F., & Sauvant, D. (2011). In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: A quantitative review by an empirical approach. *Animal*, *5*(3), 403-414. <https://doi.org/10.1017/S1751731110002016>
- Ojano-Dirain, C. P., Iqbal, M., Cawthon, D., Swonger, S., Wing, T., Cooper, M., & Bottje, W. (2004). Determination of mitochondrial function and site-specific defects in electron transport in duodenal mitochondria in broilers with low and high feed efficiency. *Poultry Science*, *83*(8), 1394-1403. <https://doi.org/10.1093/ps/83.8.1394>
- Ojano-Dirain, C., Pumford, N. R., Iqbal, M., Wing, T., Cooper, M., & Bottje, W. G. (2005). Biochemical evaluation of mitochondrial respiratory chain in duodenum of low and high feed efficient broilers. *Poultry Science*, *84*(12), 1926-1934. <https://doi.org/10.1093/ps/84.12.1926>
- Ojano-Dirain, C., Tinsley, N. B., Wing, T., Cooper, M., & Bottje, W. G. (2007). Membrane potential and H₂O₂ production in duodenal mitochondria from broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) with low and high feed efficiency. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *147*(4), 934-941. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.029>
- Old, C. A., & Garrett, W. N. (1985). Efficiency of Feed Energy Utilization for Protein and Fat Gain in Hereford and Charolais Steers. *Journal of Animal Science*, *60*(3), 766-771. <https://doi.org/10.2527/jas1985.603766x>
- Old, C. A., & Garrett, W. N. (1987). Effects of Energy Intake on Energetic Efficiency and Body Composition of Beef Steers Differing in Size at Maturity. *Journal of Animal Science*, *65*(5), 1371-1380. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6551371x>
- Oliveira, L. F., Ruggieri, A. C., Branco, R. H., Cota, O. L., Canesin, R. C., Costa, H. J. U., & Mercadante, M. E. Z. (2018). Feed efficiency and enteric methane production of Nellore cattle in the feedlot and on pasture. *Animal Production Science*, *58*(5), 886. <https://doi.org/10.1071/AN16303>
- Oono, R. (2017). A confidence interval analysis of sampling effort, sequencing depth, and taxonomic resolution of fungal community ecology in the era of high-throughput sequencing. *PLOS ONE*, *12*(12), e0189796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189796>
- Ortigues, I. (1991). Adaptation du métabolisme énergétique des ruminants à la sous-alimentation. Quantification au niveau de l'animal entier et de tissus corporels. *Reproduction Nutrition Development*, *31*(6), 593-616. <https://doi.org/10.1051/rnd:19910601>
- Oskolkov, N. (2019, juillet 19). How to tune hyperparameters of tSNE. *Towards Data Science*.

- Osuji, P. O., Gordon, J. G., & Webster, A. J. F. (1975). Energy exchanges associated with eating and rumination in sheep given grass diets of different physical forms. *British Journal of Nutrition*, 34(1), 59-71. <https://doi.org/10.1017/S0007114575000098>
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In K. C. Marshall (Éd.), *Advances in Microbial Ecology* (Vol. 9, p. 1-55). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1
- Paddock, Z. D. (2010). *Energy expenditure in growing heifers with divergent residual feed intake phenotypes: Effects and interactions of metaphylactic treatment and temperament on receiving steers*. [MS Thesis]. Texas A&M University.
- Palarea-Albaladejo, J., & Martín-Fernández, J. A. (2015). zCompositions—R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 143, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.02.019>
- Palarea-Albaladejo, J., Rooke, J. A., Nevison, I. M., & Dewhurst, R. J. (2017). Compositional mixed modeling of methane emissions and ruminal volatile fatty acids from individual cattle and multiple experiments1. *Journal of Animal Science*, 95(6), 2467-2480. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1339>
- Palmonari, A., Stevenson, D. M., Mertens, D. R., Cruywagen, C. W., & Weimer, P. J. (2010). PH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 279-287. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2207>
- Pang, K., Chai, S., Yang, Y., Wang, X., Liu, S., & Wang, S. (2022). Dietary forage to concentrate ratios impact on yak ruminal microbiota and metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 964564. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.964564>
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters : Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples: Primers for marine microbiome studies. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Parella, T. (2006). *Pulse program catalogue : I. 1D and 2D NMR experiments*.
- Park, Y., & Pariza, M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40(3), 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.002>
- Paul, S. S., Kamra, D. N., Sastry, V. R. B., Sahu, N. P., & Agarwal, N. (2004). Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. *Reproduction Nutrition Development*, 44(4), 313-319. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004036>
- Paz, H. A., Hales, K. E., Wells, J. E., Kuehn, L. A., Freetly, H. C., Berry, E. D., Flythe, M. D., Spangler, M. L., & Fernando, S. C. (2018). Rumen bacterial community structure impacts feed efficiency in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 96(3), 1045-1058. <https://doi.org/10.1093/jas/skx081>
- Penner, G. B., Taniguchi, M., Guan, L. L., Beauchemin, K. A., & Oba, M. (2009). Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2767-2781. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1716>

- Peralta, F. E., Boivin, R., & Bost, J. (1985). Déclenchement de l'antipéristaltisme œsophagien chez le mouton. *Reproduction Nutrition Développement*, 25(4B), 777-778. <https://doi.org/10.1051/rnd:19850608>
- Perea, K., Perz, K., Olivo, S. K., Williams, A., Lachman, M., Ishaq, S. L., Thomson, J., & Yeoman, C. J. (2017). Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *Journal of Animal Science*, 95(6), 2585. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1222>
- Pereira, M. C. S., Cruz, G. D., Arrigoni, M. D. B., Rigueiro, A. L. N., Silva, J., Carrara, T. V. B., Santos, P. C. S., Cursino, L. L., & Millen, D. D. (2016). Relationships of feedlot performance, feeding behavior, rumen morphometrics, and carcass characteristics of Nellore cattle differing in phenotypic residual feed intake1. *Journal of Animal Science*, 94(10), 4287-4296. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0579>
- Perkins, S. D., Key, C. N., Marvin, M. N., Garrett, C. F., Foradori, C. D., Bratcher, C. L., Kriese-Anderson, L. A., & Brandebourg, T. D. (2014). Effect of residual feed intake on hypothalamic gene expression and meat quality in Angus-sired cattle grown during the hot season1,2. *Journal of Animal Science*, 92(4), 1451-1461. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7020>
- Pind, P. F., Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (2003). A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1), 54-61. <https://doi.org/10.1002/bit.10537>
- Playne, M. J. (1985). Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(8), 638-644. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360803>
- Poehlein, A., Schneider, D., Soh, M., Daniel, R., & Seedorf, H. (2018). Comparative Genomic Analysis of Members of the Genera *Methanospaera* and *Methanobrevibacter* Reveals Distinct Clades with Specific Potential Metabolic Functions. *Archaea*, 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/7609847>
- Popova, M., Morgavi, D. P., Doreau, M., & Martin, C. (2011). Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRAE Productions Animales*, 24(5), 447-460. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.5.3277>
- Prins, R. A., Lankhorst, A., van der Meer, P., & Van Nevel, C. J. (1975). Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen lipolytic organism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 41(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/BF02565031>
- Pulina, G., Avondo, M., Molle, G., Francesconi, A. H. D., Atzori, A. S., & Cannas, A. (2013). Models for estimating feed intake in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(9), 675-690. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013000900010>
- Puniya, A. K., Salem, A. Z. M., Kumar, S., Dagar, S. S., Griffith, G. W., Puniya, M., Ravella, S. R., Kumar, N., Dhewa, T., & Kumar, R. (2015). Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity : A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), 550-560. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60837-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60837-6)
- Purser, D. B., & Moir, R. J. (1966). Rumen Volume as a Factor Involved in Individual Sheep Differences. *Journal of Animal Science*, 25(2), 509-515. <https://doi.org/10.2527/jas1966.252509x>

- Ransom-Jones, E., Jones, D. L., McCarthy, A. J., & McDonald, J. E. (2012). The Fibrobacteres : An Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microbial Ecology*, *63*(2), 267-281. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9998-1>
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M., & Smith, D. R. (1997). Methanogenesis : Genes, genomes, and who's on first? *Journal of Bacteriology*, *179*(19), 5975-5986. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.5975-5986.1997>
- Reid, J. T., & Huffman, C. F. (1949). Some Physical and Chemical Properties of Bovine Saliva which May Affect Rumen Digestion and Synthesis. *Journal of Dairy Science*, *32*(2), 123-132. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(49\)92019-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(49)92019-6)
- Richardson, E. C., & Herd, R. M. (2004). Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *44*(5), 431-440. <https://doi.org/10.1071/EA02221>
- Richardson, E. C., Herd, R. M., Archer, J. A., & Arthur, P. F. (2004). Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *44*(5), 441-452. <https://doi.org/10.1071/EA02219>
- Ricordeau, G., Tchamitchian, L., Brunel, J. C., Nguyen, T. C., & François, D. (2020). La gestion des populations : La race ovine INRA 401 : un exemple de souche synthétique. *INRAE Productions Animales*, *5*(HS), 255-262. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1992.5.HS.4300>
- Rikhardsson, G., Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1991). Effects of cimaterol on energetics and carcass characteristics of Suffolk ewe lambs. *Journal of Animal Science*, *69*(1), 396. <https://doi.org/10.2527/1991.691396x>
- Rius, A. G., Kittelmann, S., Macdonald, K. A., Waghorn, G. C., Janssen, P. H., & Sikkema, E. (2012). Nitrogen metabolism and rumen microbial enumeration in lactating cows with divergent residual feed intake fed high-digestibility pasture. *Journal of Dairy Science*, *95*(9), 5024-5034. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5392>
- Rivera-Pinto, J., Egozcue, J. J., Pawlowsky-Glahn, V., Paredes, R., Noguera-Julian, M., & Calle, M. L. (2018). Balances : A New Perspective for Microbiome Analysis. *MSystems*, *3*(4), e00053-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00053-18>
- Robinson, D. L., Goopy, J. P., Hegarty, R. S., & Vercoe, P. E. (2010). Repeatability, Animal and Sire Variation in 1-hr Methane Emissions & Relationships with Rumen Volatile Fatty Acid Concentrations. *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Special topics: Animal breeding and the environmental challenges-Lecture Sessions*, 0712.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics : An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, *13*(11), e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Rompala, R. E., Johnson, D. E., Rumpler, W. V., Phetteplace, H. W., Specht, S. M., & Parker, C. F. (1991). Energy utilization and organ mass of Targhee sheep selected for rate and efficiency of gain and receiving high and low planes of nutrition. *Journal of Animal Science*, *69*(4), 1760. <https://doi.org/10.2527/1991.6941760x>
- Rosales Nieto, C. A., Ferguson, M. B., Briegel, J. R., Hedger, M. P., Martin, G. B., & Thompson, A. N. (2019). Pre-pubertal growth, muscle and fat accumulation in male and female sheep—Relationships with metabolic hormone concentrations, timing of puberty

- and reproductive outcomes. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(12), 1596-1603. <https://doi.org/10.1111/rda.13568>
- Rosales Nieto, C. A., Thompson, A. N., Macleay, C. A., Briegel, J. R., Hedger, M. P., Ferguson, M. B., & Martin, G. B. (2014). Relationships among body composition, circulating concentrations of leptin and follistatin, and the onset of puberty and fertility in young female sheep. *Animal Reproduction Science*, 151(3-4), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.008>
- Rossi, J., Herzig, K.-H., Vöikar, V., Hiltunen, P. H., Segerstråle, M., & Airaksinen, M. S. (2003). Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor $\alpha 2$. *Journal of Clinical Investigation*, 112(5), 707-716. <https://doi.org/10.1172/JCI200317995>
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(S1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>
- Russell, J. B. (1998). The Importance of pH in the Regulation of Ruminant Acetate to Propionate Ratio and Methane Production In Vitro. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3222-3230. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75886-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75886-2)
- Russell, J. R., Sexten, W. J., Kerley, M. S., & Hansen, S. L. (2016). Relationship between antioxidant capacity, oxidative stress, and feed efficiency in beef steers. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2942-2953. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0271>
- Saatchi, M., Beever, J. E., Decker, J. E., Faulkner, D. B., Freetly, H. C., Hansen, S. L., Yampara-Iquise, H., Johnson, K. A., Kachman, S. D., Kerley, M. S., Kim, J., Loy, D. D., Marques, E., Neibergs, H. L., Pollak, E. J., Schnabel, R. D., Seabury, C. M., Shike, D. W., Snelling, W. M., ... Taylor, J. F. (2014). QTLs associated with dry matter intake, metabolic mid-test weight, growth and feed efficiency have little overlap across 4 beef cattle studies. *BMC Genomics*, 15(1), 1004. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1004>
- Sadet, S. (2007). PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal*, 1(7), 939-944.
- Salami, S. A., Valenti, B., Luciano, G., Lanza, M., Umezurike-Amahah, N. M., Kerry, J. P., O'Grady, M. N., Newbold, C. J., & Priolo, A. (2021). Dietary cardoon meal modulates rumen biohydrogenation and bacterial community in lambs. *Scientific Reports*, 11(1), 16180. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95691-3>
- Salfer, I. J., Crawford, C. E., Rottman, L. W., & Harvatine, K. J. (2021). The effects of feeding rations that differ in neutral detergent fiber and starch within a day on the daily pattern of key rumen microbial populations. *JDS Communications*, 2(6), 334-339. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-0099>
- Sanders, H. L. (1968). Marine Benthic Diversity: A Comparative Study. *The American Naturalist*, 102(925), 243-282. <https://doi.org/10.1086/282541>
- Santana, M. H., Utsunomiya, Y. T., Neves, H. H., Gomes, R. C., Garcia, J. F., Fukumasu, H., Silva, S. L., Oliveira Junior, G. A., Alexandre, P. A., Leme, P. R., Brassaloti, R. A., Coutinho, L. L., Lopes, T. G., Meirelles, F. V., Eler, J. P., & Ferraz, J. B. (2014). Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nellore cattle. *BMC Genetics*, 15(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-21>

- Santiago-Rodriguez, T. M., Garoutte, A., Adams, E., Nasser, W., Ross, M. C., La Reau, A., Henseler, Z., Ward, T., Knights, D., Petrosino, J. F., & Hollister, E. B. (2020). Metagenomic Information Recovery from Human Stool Samples Is Influenced by Sequencing Depth and Profiling Method. *Genes*, *11*(11), 1380. <https://doi.org/10.3390/genes11111380>
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., & Broudiscou, L. (2011). Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRAE Productions Animales*, *24*(5), 433-446. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.5.3276>
- Schanbacher, B. D., Hahn, G. L., & Nienaber, J. A. (1982). Effects of Contrasting Photoperiods and Temperatures on Performance Traits of Confinement-Reared Ewe Lambs¹. *Journal of Animal Science*, *55*(3), 620-626. <https://doi.org/10.2527/jas1982.553620x>
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., & Wilton, J. W. (2004). Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. *Canadian Journal of Animal Science*, *9*.
- Schiavon, S., Cecchinato, A., Pegolo, S., Dannenberger, D., Tagliapietra, F., & Bittante, G. (2019). Dose response of rumen-protected conjugated linoleic acid supplementation to fattening bulls and heifers on growth, and carcass and meat quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *jpn.13107*. <https://doi.org/10.1111/jpn.13107>
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011). Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*, *6*(12), e27310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027310>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2006). Toward a census of bacteria in soils. *PLoS Comput. Biol.*, *2*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092>
- Seddik, H., Xu, L., Wang, Y., & Mao, S. Y. (2019). A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. *Animal*, *13*(8), 1614-1622. <https://doi.org/10.1017/S1751731118003269>
- Serão, N. V., González-Peña, D., Beever, J. E., Faulkner, D. B., Southey, B. R., & Rodriguez-Zas, S. L. (2013). Single nucleotide polymorphisms and haplotypes associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genetics*, *14*(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-94>
- Shabat, S. K. B., Sasson, G., Doron-Faigenboim, A., Durman, T., Yaacoby, S., Berg Miller, M. E., White, B. A., Shterzer, N., & Mizrahi, I. (2016). Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal*, *10*(12), 2958-2972. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.62>
- Shaffer, K. S., Turk, P., Wagner, W. R., & Felton, E. E. D. (2011). Residual feed intake, body composition, and fertility in yearling beef heifers¹². *Journal of Animal Science*, *89*(4), 1028-1034. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3322>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, *27*, 379-423.
- Sherman, E. L., Nkrumah, J. D., Murdoch, B. M., Li, C., Wang, Z., Fu, A., & Moore, S. S. (2008a). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and

- carcass merit in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 86(1), 1-16. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-799>
- Sherman, E. L., Nkrumah, J. D., Murdoch, B. M., & Moore, S. S. (2008b). Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle : Feed efficiency in beef cattle. *Animal Genetics*, 39(3), 225-231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01704.x>
- Shi, H., Zhang, T., Li, C., Wang, J., Huang, J., & Li, Z. (2017). *Trans* -10, *cis* -12-Conjugated Linoleic Acid Affects Expression of Lipogenic Genes in Mammary Glands of Lactating Dairy Goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(43), 9460-9467. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02377>
- Shi, W., Moon, C. D., Leahy, S. C., Kang, D., Froula, J., Kittelmann, S., Fan, C., Deutsch, S., Gagic, D., Seedorf, H., Kelly, W. J., Atua, R., Sang, C., Soni, P., Li, D., Pinares-Patiño, C. S., McEwan, J. C., Janssen, P. H., Chen, F., ... Rubin, E. M. (2014). Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Research*, 24(9), 1517-1525. <https://doi.org/10.1101/gr.168245.113>
- Shin, E. C., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Kim, E. J., Kim, Y. K., Choi, B. R., An, J. M., Kang, J. M., Kim, H., & Yun, H. D. (2004). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 378-383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02304.x>
- Silvestre, A. M., Pinto, A. C. J., Schleifer, W. F., Miranda, L. S., Silva, L. A. F., Casali, D. M., Souza, K. L. R., Gasparini, V. G. L., Cruz, G. D., Suen, G., & Millen, D. D. (2022). Relationships of the Microbial Communities with Rumen Epithelium Development of Nellore Cattle Finished in Feedlot Differing in Phenotypic Residual Feed Intake. *Animals*, 12(7), 820. <https://doi.org/10.3390/ani12070820>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688-688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smith, P. E., Waters, S. M., Gómez Expósito, R., Smidt, H., Carberry, C. A., & McCabe, M. S. (2020). Synthetic Sequencing Standards : A Guide to Database Choice for Rumen Microbiota Amplicon Sequencing Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 606825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606825>
- Smith, P. E., Waters, S. M., Kenny, D. A., Kirwan, S. F., Conroy, S., & Kelly, A. K. (2021). Effect of divergence in residual methane emissions on feed intake and efficiency, growth and carcass performance, and indices of rumen fermentation and methane emissions in finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, 99(11), skab275. <https://doi.org/10.1093/jas/skab275>
- Snelling, T. J., Auffret, M. D., Duthie, C.-A., Stewart, R. D., Watson, M., Dewhurst, R. J., Roehe, R., & Walker, A. W. (2019). Temporal stability of the rumen microbiota in beef cattle, and response to diet and supplements. *Animal Microbiome*, 1(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0018-y>
- Soder, K. J., Brito, A. F., Hafla, A. N., & Rubano, M. D. (2016). Effect of starchy or fibrous carbohydrate supplementation of orchardgrass on ruminal fermentation and methane output in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4464-4475. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10471>

- Sok, M., Ouellet, D. R., Firkins, J. L., Pellerin, D., & Lapierre, H. (2017). Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *Journal of Dairy Science*, *100*(7), 5241-5249. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12447>
- Söllinger, A., Tveit, A. T., Poulsen, M., Noel, S. J., Bengtsson, M., Bernhardt, J., Frydendahl Hellwing, A. L., Lund, P., Riedel, K., Schleper, C., Højberg, O., & Urich, T. (2018). Holistic Assessment of Rumen Microbiome Dynamics through Quantitative Metatranscriptomics Reveals Multifunctional Redundancy during Key Steps of Anaerobic Feed Degradation. *MSystems*, *3*(4), e00038-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00038-18>
- Solomon, K. V., Haitjema, C. H., Henske, J. K., Gilmore, S. P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., Brewer, H. M., Purvine, S. O., Wright, A. T., Theodorou, M. K., Grigoriev, I. V., Regev, A., Thompson, D. A., & O'Malley, M. A. (2016). Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science*, *351*(6278), 1192-1195. <https://doi.org/10.1126/science.aad1431>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H.-W., & Richards, T. A. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, *19*, 21-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
- Storm, A. C., Kristensen, N. B., & Hanigan, M. D. (2012). A model of ruminal volatile fatty acid absorption kinetics and rumen epithelial blood flow in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *95*(6), 2919-2934. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4239>
- Storm, E., Ørskov, E. R., & Smart, R. (1983). The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants : 2. The apparent digestibility and net utilization of microbial N for growing lambs. *British Journal of Nutrition*, *50*(2), 471-478. <https://doi.org/10.1079/BJN19830115>
- St-Pierre, B., & Wright, A.-D. G. (2012). Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*Vicugna pacos*). *BMC Microbiology*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-1>
- Susenbeth, A., Mayer, R., Koehler, B., & Neumann, O. (1998). Energy requirement for eating in cattle. *Journal of Animal Science*, *76*(10), 2701. <https://doi.org/10.2527/1998.76102701x>
- Sutherland, T. M. (1965). The Correlation between Feed Efficiency and Rate of Gain, a Ratio and Its Denominator. *Biometrics*, *21*(3), 739. <https://doi.org/10.2307/2528555>
- Sykes, A. R., & Coop, R. L. (1977). Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *The Journal of Agricultural Science*, *88*(3), 671-677. <https://doi.org/10.1017/S0021859600037369>
- Sylvester, J. T., Karnati, S. K. R., Yu, Z., Morrison, M., & Firkins, J. L. (2004). Development of an Assay to Quantify Rumen Ciliate Protozoal Biomass in Cows Using Real-Time PCR. *The Journal of Nutrition*, *134*(12), 3378-3384. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3378>
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., & Benno, Y. (1999). Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, *11*.

- Tan, R. S. G., Zhou, M., Li, F., & Guan, L. L. (2021). Identifying active rumen epithelial associated bacteria and archaea in beef cattle divergent in feed efficiency using total RNA-seq. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100064. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100064>
- Tanner, J. M. (1949). Fallacy of Per-Weight and Per-Surface Area Standards, and Their Relation to Spurious Correlation. *Journal of Applied Physiology*, 2(1), 1-15. <https://doi.org/10.1152/jappl.1949.2.1.1>
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Tardivel, P. J. C., Canlet, C., Lefort, G., Tremblay-Franco, M., Debrauwer, L., Concordet, D., & Servien, R. (2017). ASICS: An automatic method for identification and quantification of metabolites in complex 1D 1H NMR spectra. *Metabolomics*, 13(10), 109. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1244-5>
- Taussat, S., Boussaha, M., Ramayo-Caldas, Y., Martin, P., Venot, E., Cantalapiedra-Hijar, G., Hozé, C., Fritz, S., & Renand, G. (2020). Gene networks for three feed efficiency criteria reveal shared and specific biological processes. *Genetics Selection Evolution*, 52(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00585-z>
- Taussat, S., Saintilan, R., Krauss, D., Maupetit, D., Fouilloux, M.-N., & Renand, G. (2019). Relationship between feed efficiency and slaughter traits of French Charolais bulls. *Journal of Animal Science*, 97(6), 2308-2319. <https://doi.org/10.1093/jas/skz108>
- Tavares, M. R., Pavan, I. C. B., Amaral, C. L., Meneguello, L., Luchessi, A. D., & Simabuco, F. M. (2015). The S6K protein family in health and disease. *Life Sciences*, 131, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.03.001>
- Thomas, C. M., Desmond-Le Quémener, E., Gribaldo, S., & Borrel, G. (2022). Factors shaping the abundance and diversity of the gut archaeome across the animal kingdom. *Nature Communications*, 13(1), 3358. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31038-4>
- Thompson, S., Schaefer, A. L., Crow, G. H., Basarab, J., Colyn, J., & Ominski, K. (2018). Relationship between residual feed intake and radiated heat loss using infrared thermography in young beef bulls. *Journal of Thermal Biology*, 78, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.10.007>
- Toral, P. G., Hervás, G., Fernández-Díez, C., Belenguer, A., & Frutos, P. (2021). Rumen biohydrogenation and milk fatty acid profile in dairy ewes divergent for feed efficiency. *Journal of Dairy Science*, 104(5), 5569-5582. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19061>
- Tortereau, F., Marie-Etancelin, C., Weisbecker, J.-L., Marcon, D., Bouvier, F., Moreno-Romieux, C., & François, D. (2020). Genetic parameters for feed efficiency in Romane rams and responses to single-generation selection. *Animal*, 14(4), 681-687. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002544>
- Toutou, F., Tortereau, F., Bret, L., Marty-Gasset, N., Marcon, D., & Meynadier, A. (2022). Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Ruminal and Plasma Metabolomic Data. *Metabolites*, 12(4), 304. <https://doi.org/10.3390/metabo12040304>
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Cimmino, F., Catapano, A., Carta, G., Pirozzi, C., Murru, E., Lama, A., Meli, R., Bergamo, P., Banni, S., & Mollica, M. P. (2020). Decreased Metabolic Flexibility in Skeletal Muscle of Rat Fed with a High-Fat Diet Is Recovered

- by Individual CLA Isomer Supplementation via Converging Protective Mechanisms. *Cells*, 9(4), 823. <https://doi.org/10.3390/cells9040823>
- Tripathi, V. K., Sehgal, J. P., Puniya, A. K., & Singh, K. (2007). Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. *Archives of Animal Nutrition*, 61(5), 416-423. <https://doi.org/10.1080/17450390701556759>
- Troegeler-Meynadier, A., Palagiano, C., & Enjalbert, F. (2014). Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term *in vitro* incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(4), 704-713. <https://doi.org/10.1111/jpn.12128>
- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation : Principles and Possibilities of Interventions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- United States Census Bureau. (2020). *International database [Online database]*. https://www.census.gov/data-tools/demo/idb/#/country?COUNTRY_YR_ANIM=2021
- Ushida, K., Kayouli, C., De Smet, S., & Jouany, J. P. (1990). Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *British Journal of Nutrition*, 64(3), 765-775. <https://doi.org/10.1079/BJN19900078>
- van der Maaten, L., & Hinton, G. (2008). Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, 9, 2579-2605.
- Van Gastelen, S., Dijkstra, J., Binnendijk, G., Duval, S. M., Heck, J. M. L., Kindermann, M., Zandstra, T., & Bannink, A. (2020). 3-Nitrooxypropanol decreases methane emissions and increases hydrogen emissions of early lactation dairy cows, with associated changes in nutrient digestibility and energy metabolism. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8074-8093. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17936>
- Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*, 42(1-2), 73-97. <https://doi.org/10.1007/BF00394043>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- van Houtert, M. F. J. (1993). The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages : A review. *Animal Feed Science and Technology*, 43(3-4), 189-225. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90078-X](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90078-X)
- van Nevel, C. J., Demeyer, D. I., & van de Voorde, G. (1985). Effect of Defaunating the Rumen on Growth and Carcass Composition of Lambs. *Archiv Für Tierernaehrung*, 35(5), 331-337. <https://doi.org/10.1080/17450398509425190>
- Ventto, L., Leskinen, H., Kairenius, P., Stefański, T., Bayat, A. R., Vilkki, J., & Shingfield, K. J. (2017). Diet-induced milk fat depression is associated with alterations in ruminal biohydrogenation pathways and formation of novel fatty acid intermediates in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 117(3), 364-376. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000010>

- Voisinet, B. D., Grandin, T., Tatum, J. D., O'Connor, S. F., & Struthers, J. J. (1997). Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science*, 75(4), 892. <https://doi.org/10.2527/1997.754892x>
- Wagner, T., Wegner, C.-E., Kahnt, J., Ermler, U., & Shima, S. (2017). Phylogenetic and Structural Comparisons of the Three Types of Methyl Coenzyme M Reductase from Methanococcales and Methanobacteriales. *Journal of Bacteriology*, 199(16). <https://doi.org/10.1128/JB.00197-17>
- Wallace, R. J., McKain, N., Shingfield, K. J., & Devillard, E. (2007). Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*, 48(10), 2247-2254. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700271-JLR200>
- Wallmeier, J., Samol, C., Ellmann, L., Zacharias, H. U., Vogl, F. C., Garcia, M., Dettmer, K., Oefner, P. J., Gronwald, W., & GCKD Study Investigators. (2017). Quantification of Metabolites by NMR Spectroscopy in the Presence of Protein. *Journal of Proteome Research*, 16(4), 1784-1796. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00057>
- Wang, Y., & LêCao, K.-A. (2020). Managing batch effects in microbiome data. *Briefings in Bioinformatics*, 21(6), 1954-1970. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz105>
- Waterlow, J. C. (1995). Whole-Body Protein Turnover in Humans—Past, Present, and Future. *Annual Review of Nutrition*, 15, 57-92.
- Wegl, G., Grabner, N., Köstelbauer, A., Klose, V., & Ghanbari, M. (2021). Toward Best Practice in Livestock Microbiota Research : A Comprehensive Comparison of Sample Storage and DNA Extraction Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 12, 627539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.627539>
- Wei, X., Ouyang, K., Long, T., Liu, Z., Li, Y., & Qiu, Q. (2022). Dynamic Variations in Rumen Fermentation Characteristics and Bacterial Community Composition during In Vitro Fermentation. *Fermentation*, 8(6), 276. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060276>
- Welch, C. B., Lourenco, J. M., Krause, T. R., Seidel, D. S., Fluharty, F. L., Pringle, T. D., & Callaway, T. R. (2021a). Evaluation of the Fecal Bacterial Communities of Angus Steers With Divergent Feed Efficiencies Across the Lifespan From Weaning to Slaughter. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 597405. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.597405>
- Welch, C. B., Lourenco, J. M., Seidel, D. S., Krause, T. R., Rothrock, M. J., Pringle, T. D., & Callaway, T. R. (2021b). The Impact of Pre-Slaughter Fasting on the Ruminal Microbial Population of Commercial Angus Steers. *Microorganisms*, 9(12), 2625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122625>
- Welch, C. M., Thornton, K. J., Murdoch, G. K., Chapalamadugu, K. C., Schneider, C. S., Ahola, J. K., Hall, J. B., Price, W. J., & Hill, R. A. (2013). An examination of the association of serum IGF-I concentration, potential candidate genes, and fiber type composition with variation in residual feed intake in progeny of Red Angus sires divergent for maintenance energy EPD. *Journal of Animal Science*, 91(12), 5626-5636. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6609>

- Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., van Duijnhoven, J. P. M., & van Dorsten, F. A. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), 81-89. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0099-6>
- Wheadon, N. M., McGee, M., Edwards, G. R., & Dewhurst, R. J. (2014). Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *British Journal of Nutrition*, 7.
- Williams, K. T., Weigel, K. A., Coblenz, W. K., Esser, N. M., Schlessner, H., Hoffman, P. C., Su, H., & Akins, M. S. (2019). Effect of diet energy density and genomic residual feed intake on prebred dairy heifer feed efficiency, growth, and manure excretion. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4041-4050. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15504>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wong, J. W. H., Durante, C., & Cartwright, H. M. (2005). Application of Fast Fourier Transform Cross-Correlation for the Alignment of Large Chromatographic and Spectral Datasets. *Analytical Chemistry*, 77(17), 5655-5661. <https://doi.org/10.1021/ac050619p>
- Wright, A.-D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L., & Smith, K. D. (2004). Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1263-1270. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1263-1270.2004>
- Wynn, R. J., Daniel, Z. C. T. R., Flux, C. L., Craigon, J., Salter, A. M., & Buttery, P. J. (2006). Effect of feeding rumen-protected conjugated linoleic acid on carcass characteristics and fatty acid composition of sheep tissues. *Journal of Animal Science*, 84(12), 3440-3450. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-159>
- Xi, Y. M., Wu, F., Zhao, D. Q., Yang, Z., Li, L., Han, Z. Y., & Wang, G. L. (2016). Biological mechanisms related to differences in residual feed intake in dairy cows. *Animal*, 10(8), 1311-1318. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000343>
- Xie, Y., Sun, H., Xue, M., & Liu, J. (2022). Metagenomics reveals differences in microbial composition and metabolic functions in the rumen of dairy cows with different residual feed intake. *Animal Microbiome*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00170-3>
- Xu, X., Xie, Z., Yang, Z., Li, D., & Xu, X. (2020). A t-SNE Based Classification Approach to Compositional Microbiome Data. *Frontiers in Genetics*, 11, 620143. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.620143>
- Xue, M.-Y., Xie, Y.-Y., Zhong, Y., Ma, X.-J., Sun, H.-Z., & Liu, J.-X. (2022). Integrated metagenomics reveals new ruminal microbial features associated with feed efficiency in dairy cattle. *Microbiome*, 10(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01228-9>
- Yang, H., Heirbaut, S., Jeyanathan, J., Jing, X. P., De Neve, N., Vandaele, L., & Fievez, V. (2022a). Subacute ruminal acidosis phenotypes in periparturient dairy cows differ in ruminal and salivary bacteria and in the in vitro fermentative activity of their ruminal microbiota. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 3969-3987. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21115>
- Yang, W. Z., & Beauchemin, K. A. (2007). Altering Physically Effective Fiber Intake Through Forage Proportion and Particle Length: Chewing and Ruminal pH. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2826-2838. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0032>

- Yang, X., Wang, W., Wang, X., Zhang, D., Li, X., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, J., Xu, D., Cheng, J., Li, W., Zhou, B., Lin, C., Zeng, X., Zhai, R., Ma, Z., Liu, J., Cui, P., & Zhang, X. (2022b). Polymorphism in ovine *ADCY8* gene and its association with residual feed intake in Hu sheep. *Animal Biotechnology*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2145294>
- Yeaman, J. C., Waldron, D. F., & Willingham, T. D. (2013). Growth and feed conversion efficiency of Dorper and Rambouillet lambs1. *Journal of Animal Science*, 91(10), 4628-4632. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-6226>
- Yin, X., Ji, S., Duan, C., Tian, P., Ju, S., Yan, H., Zhang, Y., & Liu, Y. (2021). Age-Related Changes in the Ruminal Microbiota and Their Relationship With Rumen Fermentation in Lambs. *Frontiers in Microbiology*, 12, 679135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679135>
- Yurtseven, S., Cetin, M., Can, A., Boga, M., Sahin, T., & Turkoglu, H. (2009). Effect of Different Feeding Method on Methane and Carbon Dioxide Emissions Milk Yield and Composition of Lactating Awassi Sheep. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(6), 278-287. <https://doi.org/10.3923/ajava.2009.278.287>
- Zehavi, T., Probst, M., & Mizrahi, I. (2018). Insights Into Culturomics of the Rumen Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01999>
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., & Enjalbert, F. (2013). Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), 504-514. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12011>
- Zeng, T., Chen, L., Du, X., Lai, S. J., Huang, S. P., Liu, Y. L., & Lu, L. Z. (2016). Association analysis between feed efficiency studies and expression of hypothalamic neuropeptide genes in laying ducks. *Animal Genetics*, 47(5), 606-609. <https://doi.org/10.1111/age.12457>
- Zhang, D., Zhang, X., Li, F., Yuan, L., Zhang, Y., Li, X., Zhao, Y., Song, Q., Li, G., & Wang, W. (2021a). Polymorphisms in ovine *ME1* and *CAI* genes and their association with feed efficiency in Hu sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 138(5), 589-599. <https://doi.org/10.1111/jbg.12541>
- Zhang, F., Ekine-Dzivenu, C., Vinsky, M., Basarab, J. A., Aalhus, J. L., Dugan, M. E. R., & Li, C. (2017). Phenotypic and genetic relationships of residual feed intake measures and their component traits with fatty acid composition in subcutaneous adipose of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 95(7), 2813. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1451>
- Zhang, Y. K., Zhang, X. X., Li, F. D., Li, C., Li, G. Z., Zhang, D. Y., Song, Q. Z., Li, X. L., Zhao, Y., & Wang, W. M. (2021b). Characterization of the rumen microbiota and its relationship with residual feed intake in sheep. *Animal*, 15(3), 100161. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100161>
- Zhang, Y., Li, F., Chen, Y., Wu, H., Meng, Q., & Guan, L. L. (2020a). Metatranscriptomic Profiling Reveals the Effect of Breed on Active Rumen Eukaryotic Composition in Beef Cattle With Varied Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 11, 367. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00367>

- Zhang, Z., Niu, X., Li, F., Li, F., & Guo, L. (2020b). Ruminal cellulolytic bacteria abundance leads to the variation in fatty acids in the rumen digesta and meat of fattening lambs. *Journal of Animal Science*, 98(7), skaa228. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa228>
- Zhou, M., Ghoshal, B., Stothard, P., & Guan, L. L. (2021). Distinctive roles between rumen epimural and content bacterial communities on beef cattle feed efficiency : A combined analysis. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100085>
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L. L. (2009). Assessment of the Microbial Ecology of Ruminal Methanogens in Cattle with Different Feed Efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6524-6533. <https://doi.org/10.1128/AEM.02815-08>
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L. L. (2010). Characterization of Variation in Ruminal Methanogenic Communities under Different Dietary and Host Feed Efficiency Conditions, as Determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3776-3786. <https://doi.org/10.1128/AEM.00010-10>
- Zhou, M., Peng, Y.-J., Chen, Y., Klinger, C. M., Oba, M., Liu, J.-X., & Guan, L. L. (2018). Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation : Implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0447-y>

Liste des publications et communications :

Articles de recherche :

Touitou, Florian, Flavie Tortereau, Lydie Bret, Nathalie Marty-Gasset, Didier Marcon, et Annabelle Meynadier. 2022. « Evaluation of the Links between Lamb Feed Efficiency and Rumen and Plasma Metabolomic Data ». *Metabolites* 12 (4): 304.

<https://doi.org/10.3390/metabo12040304>.

Participations à des congrès :

* Présentation orale EAAP 2020 : Session 62: Dairy sheep and goat systems: new research in genes, nutrition and management

Divergent selection on residual feed intake in Romane meat sheep breed to dissect biological process

Touitou, F., Marie-Etancelin, C., Weisbecker, J.-L., Marcon, D., François, D., Bessa, R., Meynadier, A., Tortereau, F.

Abstract

Feed efficiency is a trait of major interest for all livestock species because breeding efficient animals is not only cost-saving but also leads to a decrease of environmental impacts. The biological processes underlying feed efficiency are poorly described in sheep. In our INRAE experimental farm of La Sapinière we have developed divergent lines of Romane meat sheep, the divergence being established on their breeding values for residual feed intake. The phenotype of male lambs (fed ad libitum with low-energy concentrate pellets) is obtained from the recording of daily feed intakes, body weights and body composition traits during a 6-week period starting from 90 days of age. After this first period of phenotyping, rumen and blood samples were taken from each individual. Lambs were then controlled during an additional 6 weeks period for their intake of forage, and after this period, the same sampling was performed. All the samples were analysed for metabolomics through NMR. The spectra were then analysed using the ASICS R-package. Analysis of ruminal fatty acids were performed through GC equipped with FID and a 100m-column after identification of peaks using GC coupled to Mass Spectrometer. Relative abundances of ruminal bacteria were obtained after 16s rRNA gene Miseq sequencing and FROGS pipeline analysis. Multivariate and discriminant analysis (PLS-DA) methods implemented in the MixOmics R-package were applied. After two generations of selection, efficient lambs ate 130 g less concentrates during the first period, and 100 g less forage during the second period than less efficient lambs. After each period of ontrol, we identified metabolites that discriminate the efficient lambs from the less efficient ones, such as butyrate and choline chloride in plasma of lambs fed with concentrate and L-lysine and L-leucine in plasma of lambs fed with forage. These results from blood metabolomics will be combined with ruminal metabolomics (including fatty acids) and microbiota data to identify pathways involved in feed efficiency in sheep fed with different diets.

* Présentation orale EAAP 2021 : Session 73 Next generation in animal nutritional science (Young Scientists Session)

Plasmatic and ruminal metabolomes of lambs divergently selected on residual feed intake
Touitou, F ; Tortereau, F ; Marty-Gasset, N ; Vialaneix, N ; Lefort, G ; Meynadier, A.

In ruminants, feed efficiency is a complex trait involving the host and its ruminal microbiota. In meat sheep, little is known about their joint action on animal efficiency. The objective of this work was to explore the ruminal and plasmatic metabolome differences between genetically divergent lines on residual feed intake (RFI). Rumen and blood samples were taken from male lambs belonging to the two divergent lines selected on RFI estimated under a 100% concentrate diet. Samples were taken twice: firstly when lambs were around 3 month-old and fed the same diet as their ancestors did during selection and secondly when lambs were 7-9 month-old and fed a diet with 1/3 concentrate and 2/3 dactylis hay. Rumen samples were taken using an oesophageal probe and blood samples were taken at the jugular vein before being centrifuged to separate plasma from blood cells. All the samples were frozen. Preparation of the samples consisted in several centrifugations and addition of a phosphate buffer. Samples were then analysed using NMR spectrometry and integrated with the ASICS R package. Data was then analysed both using a mixed linear model using the sasLM R package and multivariate analysis using mixOmics R package (PLS and PLS-DA). Because of the great effect of diet, concentrate and forage based data must be separately analysed. Rumen samples did not present many differences between lines under the concentrate diet and under the forage diet, no metabolite was differently expressed. Multivariate analysis on rumen samples did not separate the two lines well. On the contrary, plasma samples showed interesting differences between the 2 lines with amino acids being (under both diets) more present in plasma samples from less efficient animals than in samples from efficient ones. In both diets, plasma samples from efficient lambs had significantly ($P < 0.05$) more citrate than samples from less efficient lambs. It seems that plasmatic metabolome gives a better insight in the understanding of the differences between lines, ruminal metabolome will be analysed with microbiota data in ulterior works

* Poster EAAP 2022 : Session 80 : Free Communications

Rumen fatty acids linked to phenotypes in Romane lambs selected for feed efficiency
Touitou, F., Alves, S., Tortereau, F., Bessa, R., Meynadier, A.

Abstract :

Improving feed efficiency (FE) is a central tool to make animal production more sustainable. However, the mechanisms underlying the individual variation in FE remain unknown. Links between the ruminal microbiota and FE have been proposed. Among the ruminal processes, microbial metabolism of the dietary lipids is responsible for the formation of bioactive intermediates that could be involved in FE variability. To test this hypothesis, 277 Romane lambs divergently selected for Residual Feed Intake (RFI) were fed a 100% concentrate diet during 6 weeks when 4-month old (CONC phase) and 167 of them, the most extreme in terms of RFI genetic values were then fed a mixed diet during 6 weeks when 9 to 11-month old (MIX phase). During both phases, phenotypes (Body Weight (BW), Average Daily Feed Intake (ADFI) and Body Composition (BC) parameters) were recorded and RFI retrieved from a multiple linear regression of ADFI on metabolic BW, average growth (ADG) and BC. At the end of each period ruminal fluid was sampled and 70 long-chain fatty acids (FA) were analyzed by gas chromatography. Fatty acid profiles, expressed as percentages, were CLR-transformed after zero-replacement by geometric bayesian method and finally corrected for environmental effects. A PLS-DA approach was used to discriminate the RFI lines or phenotypic groups based on RFI on their rumen FA profiles. No difference was found in either case whatever the diet. Similarly, multiple regression models performed on phenotypes to search for links with either specific FA or groups of FA did not highlight any association despite the variability of the FA proportions and phenotypes. A PLS analysis revealed that the strongest link was between C18:1t10 and ADG during the CONC phase and between C18:0 and ADFI during the MIX phase but Pearson correlation coefficients were low ($r = 0.30$ and $r = 0.36$, respectively). Contrary to milk production, meat production does not vary according to ruminal FA profile. Nevertheless, variations in the quality of this meat can be expected.

Participations à des séminaires :

* Présentation orale au séminaire BIOSIS 2022

Digestive efficiency in ruminants : a feed- rumen microbiota-host triangular relationship

Florian Touitou

Digestive efficiency has soon been described as one of the main factors influencing feed efficiency in livestock. Indeed, the latter is often described by the comparison of the amount of feed ingested either as a ratio (Feed Conversion Ratio; FCR) or a linear relationship (Residual Feed Intake; RFI). Digestive efficiency is characterized by the ability to release nutrients that can be absorbed and metabolized by the host from feed macromolecules. The particularity of ruminants resides in the importance of microbial digestion in a vast structure, called rumen, prior to the glandular stomach and the small intestine. Most of the animal's energy is obtained by the ruminal absorption of microbial catabolites called Volatile Fatty Acids (VFA). Hence, an efficient and well-fed microbial community is one the pillars of feed efficiency. Feed components shape the microbiota and some molecules both feed-derived and added can influence digestive efficiency.

Annexes :

Annexe 1 : Récapitulatif des études menées liant l'efficience alimentaire et les bactéries ruminales utilisées pour le Tableau I.2.1. et le Tableau I.2.2. Les régimes ont été classés en trois catégories selon la proportion de fourrages et de concentrés : CON = >65% concentrés, FOR = <35% concentrés, MIX = [35-65%] concentrés. ANCOM = Analysis of Compositions of Microbiomes, ANOVA = Analysis of Variance, FDR= False Discovery Rate, GLM = Generalized Linear Model, LDA = Linear Discriminant Analysis, PERMANOVA = Permutational Analysis of Variance.

Etude	Espèce	Régime	Prélèvement	Indice EA	Méthode statistique	N
Andrade 2022	Zébu	MIX	Rumen/abattoir	RFI	ANCOM, FDR	26
Auffret 2020	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	GLM	72
Bowen 2020	Bovin	MIX	Rumen/sonde	RFI/FCR	Kruskal-Wallis, FDR	79
Brooke 2019	Bovin	CON	Fèces	RFI	LDA score >3	6
Carberry 2012	Bovin	CON	Rumen/sonde	RFI	Corrélations partielles de Pearson	28
Carberry 2012	Bovin	FOR	Rumen/sonde	RFI	Corrélations partielles de Pearson	28
Ellison 2019	Ovin	FOR	Rumen/sonde	RFI	GLM log-it puis GLM	20
Elolimy 2018	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	LM	12
Freetly 2020	Bovin	CON	Rumen/abattoir	GMQ	PERMANOVA, hierarchical test, FDR	16
Hernandez-Sanabria 2010	Bovin	CON	Rumen/sonde	RFI	Maximum Likelihood fitting sur bandes PCR-DGGE	42
Jami 2014	Bovin	CON	Rumen/sonde	RFI	Corrélations de Pearson	15
Jewell 2015	Bovin	FOR	Rumen/sonde	RFI	ANOVA sur arcsin(%)	22
Krueger 2009	Bovin	CON	Rumen/sonde	RFI	ANOVA	12
Li 2022	Ovin	MIX	Rumen/abattoir	FCR	Corrélations de Spearman	10
Li 2019	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	ANOVA sur arcsin(%)	48
Li 2017	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	LDA score >2	20
Liang 2017	Ovin	CON	Rumen/sonde	RFI	ANOVA sur log(%)	20
Liu 2022	Bovin	MIX	Rumen/abattoir	RFI	ANOVA, FDR	12
Lopes 2021	Zébu	MIX	Rumen/abattoir	RFI	White's non-parametric t-test	27
McCann 2014	Zébu	FOR	Rumen/sonde	RFI	GLM of log(p/(1-p))	16
McGovern 2018	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	Corrélations de Spearman et t-test sur racine(%)	49
McLoughlin 2020	Ovin	CON	Rumen/abattoir	FCR	Corrélations de Spearman et test de Wilcoxon FDR	26
Myer 2015	Bovin	CON	Rumen/sonde	Groupes GMQ/MSI	ANOVA, FDR	32
Paz 2018	Bovin	FOR	Rumen/sonde	FCR	LDA score >2	32
Parea 2017	Ovin	FOR	Rumen et intestin/abattoir	RFI	ANOVA, Bonferroni	12
Rius 2012	Bovin	FOR	Rumen/sonde	RFI	ANOVA	16
Shabat 2016	Bovin	MIX	Rumen/sonde	RFI	Test de Wilcoxon, correction de Westfall et Young.	48
Silvestre 2022	Zébu	CON	Rumen/abattoir	RFI	PERMANOVA, FDR	27
Tan 2021	Bovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	Test de Kruskal-Wallis, FDR	18
Welch 2021	Bovin	CON	Fèces	RFI	ANOVA	15
Xie 2022	Bovin	MIX	Rumen/sonde	RFI	PERMANOVA, test de Wilcoxon, LDA score >2	18
Xue 2022	Bovin	MIX	Rumen/sonde	FCR	Corrélations de Spearman, test de Wilcoxon	18
Zhang 2021	Ovin	CON	Rumen/abattoir	RFI	Corrélations de Spearman, FDR, LDA score >4	185

Annexe 2 : Protocole d'extraction et d'amplification de l'ADN.

Extraction :

Aussitôt après décongélation, 85 μL de contenu ruminal liquide de chaque échantillon ont été prélevés et transférés dans un puits de lyse contenant 400 μL de « BashingBead Buffer » dont les microbilles ont permis suite à un passage au broyeur MM400 (Retsch, Haan, Allemagne) à 30 Hz pendant 15 min afin de lyser les parois et membranes cellulaires et de libérer l'ADN.

À la suite de ce broyage, les échantillons ont été centrifugés à 4500g pendant 5 min et 230 μL de surnageant ont été transférés dans un bloc 96-puits dont les puits étaient préalablement chargés par 750 μL de « Genomic Lysis Buffer ». L'objectif de ce tampon est de finir la lyse des cellules, de dégrader l'ARN et de préparer l'ADN pour une adhésion suffisante à la colonne utilisée subséquentement. Le bloc a ensuite été couvert par une feuille aluminium adhésive et agité manuellement.

Après centrifugation à 4500 g pendant 5 min le surnageant de chaque puits a été transféré dans une plaque « Silicon-A Plate » montée sur une plaque de récupération et cet ensemble a été centrifugé dans les mêmes conditions, plusieurs fois si nécessaire pour que le surnageant passe dans la plaque de récupération. Ensuite, 200 μL de « DNA PreWash Buffer » ont été ajoutés et la « Silicon-ATM Plate » qui a été centrifugée à 3000 g pendant 5 min avant que 500 μL de « DNA Wash Buffer » n'y soient ajoutés et que la plaque subisse une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions.

Enfin, la « Silicon-A Plate » a été placée sur une « Silicon-A HRC Plate », elle-même montée sur une « Elution Plate » avant que 50 μL de « DNA Elution Buffer » n'y soient ajoutés. L'ensemble des trois plaques a alors été centrifugé à 3500 g pendant 3 min. Pour assurer une meilleure purification l'ADN, l'éluat a été récupéré et réincorporé au sommet de l'ensemble avant une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. L'ADN purifié a été récupéré dans l'« Elution Plate » ensuite recouverte d'un film adhésif et conservée à -20°C en attendant l'amplification.

Amplification :

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S pour identification subséquente des bactéries et des archées et celle du gène codant pour l'ARN 18S pour identification des eucaryotes ruminants ont été réalisées séparément. Après centrifugation de l' « Elution Plate » à 1000 g pendant une minute, dans le premier cas l'ADN extrait a été conservé pur. Ensuite, 1 µL de la solution contenant l'ADN a été prélevé et ajouté à 49µL d'un mix pour PCR1 MiSeq contenant 40 µL d'eau ppi, 5 µL d'un tampon « 10X MTPTM Taq Buffer » (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), 1 µL de d'un mix de désoxyribonucléotides tri-phosphates (dNTP) à 10 mmol/L, 1,25 µL d'un d'amorces Forward et 1,25 µL d'amorces Reverse à 20 µmol/L et 0,5 µL de Taq ADN polymérase.

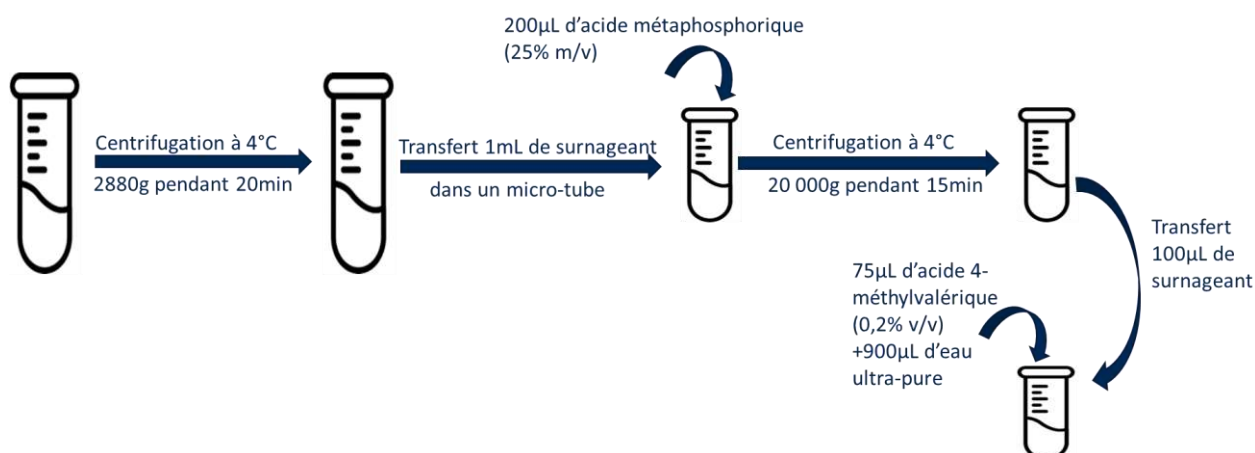
Pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, les amorces utilisées étaient les amorces 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') et 926R (5'-CCGYCAATTCMTTRAGT-3') utilisées par Parada et al. précédées des adaptateurs Genotoul : CTTTCCTACACGACGCYCYCCGATCT (Forward) et GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTC (Reverse). Ces amorces ciblent les régions hypervariables V4-V5 ce qui permet une couverture des archées en plus des bactéries contrairement au séquençage des régions V3-V4 (Fadeev et al., 2021; Parada et al., 2016)

Pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 18S, les amorces utilisées étaient les amorces 566F (5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCC-3') et 1200R (5'-CCGTGTTGAGTCAAATTAAG -3') précédées des adaptateurs Genotoul. Ces amorces permettent l'amplification de la région V4 de l'ARNr 18S par l'amorce 566F et de la région V9 par l'amorce 1200R (Stoeck et al., 2010).

À l'issue de l'amplification, la présence d'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose avec tampon TBE (Tris, Borate, EDTA). La présence d'une bande de migration dans tous les échantillons et d'une absence de bande pour le témoin négatif a permis de valider l'amplification.

Annexe 3 : Analyse chromatographique des acides gras volatils issus de prélèvements de contenu liquide ruminal.

Les échantillons ont d'abord été décongelés puis centrifugés à 2 880 g pendant 20 minutes à 4°C afin d'éliminer les particules grossières. Puis, 1 mL de surnageant a été transféré dans un microtube contenant 200 µL d'acide métaphosphorique à 25% (m/v) conformément à la méthode de Playne et al. (1985) et ce tube a été centrifugé à 20 000 g pendant 15 minutes à 4°C (Playne, 1985). L'intérêt de cet ajout d'acide méta-phosphorique est d'une part la précipitation des protéines de l'échantillon et d'autre part son acidification (Pind et al., 2003). Par la suite, 100 µL du surnageant ainsi obtenu sont transférés dans un flacon d'injection en verre contenant 900 µL d'eau ultra-pure et 75 µL d'un standard interne, l'acide 4-méthylvalérique à 0,2% (v/v), possédant des caractéristiques de volatilité proches de celles des acides gras volatils que l'on cherche à doser et ne faisant initialement pas partie de l'échantillon.



La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne DB-FFAP d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,53 mm et d'une épaisseur de film de 1 µm (réf. 125-3232, Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis d'Amérique) dont la forte polarité de la phase stationnaire permet de séparer efficacement des composés assez polaires comme les AGV. La longueur de la colonne permet une résolution suffisante et évite d'avoir des pics évasés. L'injection a été réalisée, en mode splitless, à 250°C et la séparation faite à débit de diazote constant (4mL/min) selon le programme de température suivant : 100°C pendant 5 min puis une augmentation de 6°C/min jusqu'à 148°C et enfin une augmentation de 20°C/min jusqu'à 188°C où le programme était stabilisé pendant 11 min. La température du DIF a été pré-réglée à 250°C.

Les signaux chromatographiques ont été acquis à l'aide d'une interface A2D (ThermoFisher Scientific, Waltham, US) et retraités avec le logiciel Chromeleon (version 7.2.10, ThermoFisher Scientific, Waltham, US). La quantification des AGV dans chacun des

échantillons a été réalisée à l'aide d'une droite d'étalonnage interne, élaborée à l'aide de 6 solutions d'étalonnage. La concentration en standard interne (0.2% d'acide 4- methylvalérique) dans chacune des solutions est de 15.9 mmole/L.

Concentration des AGV dans chacune des solutions (mmole/L)						
Solution étalon	Acide acétique	Acide propionique	Acide isobutyrique	Acide butyrique	Acide isovalérique	Acide valérique
A	2,5	0,810	0,085	0,625	0,098	0,074
B	5,0	1,620	0,170	1,250	0,196	0,147
C	10,0	3,24	0,340	2,500	0,392	0,294
D	25,0	8,1	0,850	6,250	0,98	0,735
E	75,0	24,3	2,550	18,750	2,94	2,205
F	150,0	48,6	5,1	37,5	5,88	4,410

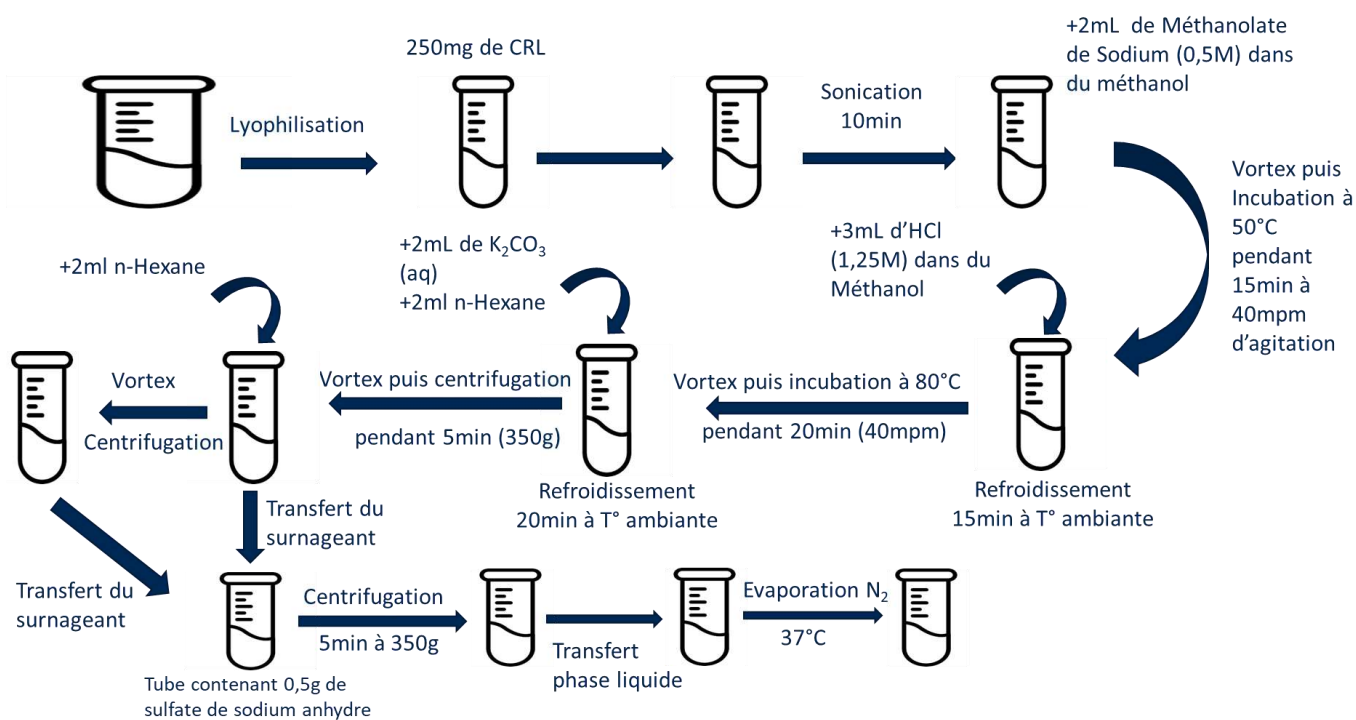
Les acides gras volatils utilisés pour le dosage (acide acétique, propionique, butyrique, valérique, isovalérique et isobutyrique (Sigma Aldrich, St-Louis ; US)) ainsi que le standard interne avaient tous une pureté supérieure à 99%. La concentration de chacun des composés a été directement calculée à l'aide du logiciel de retraitement.

Annexe 4 : Analyse chromatographique des esters méthyliques d'acides gras issus de la méthylation des acides gras du contenu liquide ruminal.

Les échantillons de contenu ruminal ont d'abord été lyophilisés, puis 250 mg de contenu lyophilisé ont été introduits dans des tubes en verre pour incubation avec un bouchon muni d'un septum en téflon pour éviter l'évaporation des acides gras lors des phases d'incubation. Puis, 1 mL de toluène et 1 mL d'un standard interne d'acide nonadécanoïque (C19:0) à la concentration d'1 mg/mL dans de l'hexane ont été ajoutés aux tubes qui ont ensuite été placés dans un sonicateur pendant 10 minutes afin de favoriser la dissolution des composés hydrophobes du lyophilisat dans les solvants apolaires.

À la suite de cela, un processus de méthylation en deux temps, par catalyse basique puis acide a été réalisé afin d'obtenir des esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Tout d'abord, 2 mL de méthanolate de sodium à 0,5 mol/L ont été ajoutés aux tubes, agités pendant 10 secondes avant d'être placés dans un bain-marie à 50°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 3 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 1,25 mol/L dans du méthanol ont été ajoutés et les tubes, après agitation, ont été placés dans un second bain-marie à 80°C pendant 20 minutes. Au cours de cette deuxième incubation, les échantillons étaient soumis à une agitation régulière à 40 mouvements par minute.

Après refroidissement, 2 mL d'une solution aqueuse de carbonate de potassium (K_2CO_3) à 6% (m/v) ont été ajoutés en deux fois pour éviter une trop forte effervescence. Cette addition présente le double intérêt de neutraliser l'échantillon en termes de pH et, par la formation d'un précipité de séparer l'échantillon en deux phases, l'une aqueuse de densité supérieure et l'autre organique contenant les EMAG. Ensuite, 2 mL de n-hexane contenant 25 mg/L d'hydroxytoluène butylé (BHT) ont été ajoutés aux tubes. Ce dernier a été utilisé pour protéger les EMAG formés de l'oxydation. Les tubes ont ensuite été agités puis centrifugés à 350 g pendant 5 minutes à température ambiante afin de récupérer le surnageant dans un nouveau tube contenant 0,5 mg de sulfate de sodium anhydre. Cette étape, de l'ajout de du n-hexane à la récupération du surnageant a été réalisée une seconde fois et après que le second surnageant ait été ajouté au premier, le tube les contenant a été agité. L'addition de sulfate de sodium anhydre a permis d'éliminer les potentiels résidus aqueux subsistants. La phase liquide a ensuite été transférée dans des tubes de verre dans lesquels l'hexane a été évaporé sous flux constant de diazote à 37°C. À l'issue de cette évaporation le contenu des tubes a été re-suspendu dans un millilitre d'hexane et transféré dans des flacons d'injection.



Une fois les échantillons préparés, les EMAG ont été analysés par un chromatographe Shimadzu GC 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire Supelco FS CAP SLB-IL111 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis d'Amérique) de longueur 100 m, de diamètre 0,25 mm et épaisseur de film 0,20 µm. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250°C et 280°C. Au cours du processus, une température de 50°C a été maintenue pendant une minute puis augmentée progressivement de 50°C/minute jusqu'à 150°C, maintenue à cette température pendant 20 minutes puis augmentée progressivement de 1°C/minute jusqu'à 190°C puis de 2°C/minute jusqu'à 220°C et maintenue à cette température pendant 40 minutes. La séparation a été réalisée sous flux constant d'hélium à 1 ml/minute avec un split ratio de 50:1. Lorsque la séparation des pics, en particulier celle du C18 :1 t10 et du C18 :1t11, était insuffisante du fait d'une trop forte concentration de l'échantillon, celui-ci était réanalysé avec une injection avec un split ratio de 100 :1.

L'identification des échantillons a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) permettant une séparation efficace des composés d'un échantillon et leur identification grâce à leur rapport masse/charge et les temps de rétention associés aux différents composés ont été utilisés pour les repérer sur le spectre de CPG. Les différents pics ont été intégrés pour quantification.

Cette intégration a été réalisée à l'aide du logiciel GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japon). Les aires obtenues ont été corrigées en fonction de la réponse relative obtenue à partir de dilutions en série de standards de concentration connue ramenée à la réponse de l'acide gras le plus concentré, à savoir l'acide stéarique (C18 :0). Les réponses relatives obtenues sont d'autant plus proches de 1 que le nombre de carbones du methyl-ester d'acide gras dosé est proche de la référence choisie, avec une réponse relative plus faible pour un nombre inférieur de carbones et une réponse plus forte pour un nombre plus élevé de carbones du fait de la différence de polarité entre les différentes molécules (Kuzdzal-Savoie & Kuzdzal, 1967). Entre l'ester d'acide laurique (C12 :0) et l'ester d'acide montanique (C28 :0) les réponses relatives sont comprises entre 0,93 et 1,06 donc les coefficients de correction, qui sont l'inverse des réponses relatives sont compris entre 1,08 et 0,94. Pour cette raison, pour les EMAG pour lesquels nous ne disposons pas de standard, un coefficient de correction de 1 (équivalent à la moyenne des coefficients de correction) a été appliqué.

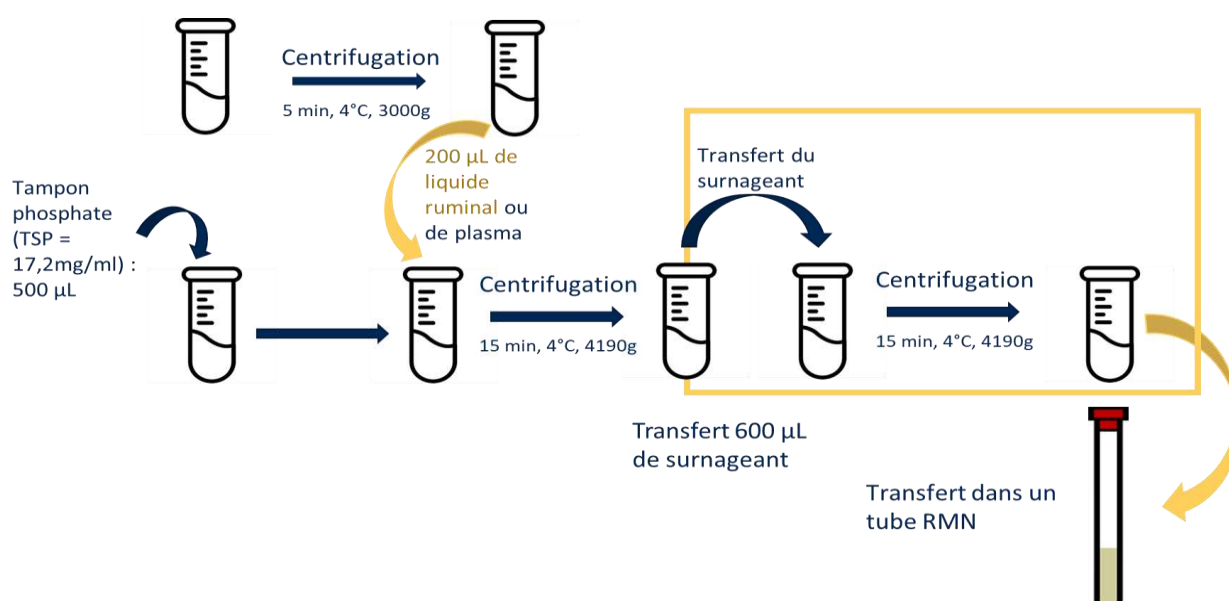
Une fois les aires corrigées obtenues, les concentrations des différents EMAG dans l'échantillon initial ont été déterminées par :

$$C_x = \frac{A_x}{A_{si}} \times C_{si}, \text{ avec } C_x \text{ et } C_{si} \text{ les concentrations de l'EMAG et du standard}$$

interne (C19 :0) et A_x et A_{si} leurs aires respectives.

Annexe 5 : Préparation des échantillons de plasma et de contenu ruminal pour analyse par spectrométrie RMN et paramètres d'acquisition des spectres.

Après décongélation, 200 μL d'échantillon ont été transférés dans un microtube de 2 mL dans lequel 500 μL de tampon phosphate (pH=7) contenant 17.2 mg de TSP (Trimethylsilylpropanoic acid) pour 100 mL ont été ajoutés. Les microtubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 4 190 g à 4°C. Pour les échantillons de contenu ruminal, à la suite de cette centrifugation, 600 μL ont été transférés dans un second microtube soumis une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. À l'issue de ces étapes, 600 microlitres de surnageant ont été transférés dans un tube RMN pour acquisition des spectres.



Les échantillons ont été conservés à 300 K pendant l'acquisition des spectres réalisée sur un spectromètre Bruker AVANCE III HD 600 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) avec un programme cpmgpr1D Bruker pulse. Ce programme se définit par une séquence de Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG) qui consiste en une pré-saturation du solvant par une impulsion de faible intensité orthogonale au champ magnétique suivie d'une succession de quatorze impulsions répétées à 180° par rapport au champ magnétique et d'une période d'acquisition au cours de laquelle le signal sinusoïdal décroît exponentiellement (Parella, 2006). Le temps d'acquisition (TA) est fixé à 1,36s de façon à optimiser la réception du signal sans pour autant acquérir trop de bruit. La séquence est répétée 256 fois pour les échantillons de plasma et 512 fois pour les échantillons de jus de rumen de façon à maximiser le ratio signal/bruit avec un temps de relaxation entre deux séquences de 2,0s. La taille du spectre a été fixée à 20 ppm ce qui correspond à 12 000 Hz et résulte l'acquisition de 32 640 points.

Résumé :

En élevage de ruminants allaitants, l'alimentation représente la très grande majorité des coûts d'élevage. De ce fait, l'efficacité alimentaire, caractérisée par l'aptitude d'un animal à optimiser sa production par rapport à sa consommation alimentaire, s'est imposée comme un moyen de limiter les coûts d'élevage mais aussi les rejets polluants par une meilleure valorisation de la ration. Cependant, les déterminants de l'efficacité alimentaire sont encore méconnus bien que des pistes aient été avancées, notamment concernant l'efficacité digestive ou la partition des nutriments et de l'énergie entre différents tissus corporels et entre besoins d'entretien et besoins de production. Par ailleurs, tout porte à penser que ces déterminants sont variables selon les conditions d'élevage et en particulier selon la ration distribuée aux animaux. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'efficacité alimentaire, en particulier en lien avec la communauté microbienne ruminale et les produits issus de son activité. L'étude a été réalisée sur des agneaux mâles de race Romane issus de lignées divergentes obtenues par sélection génétique des animaux les plus efficaces et les moins efficaces sur la base de la consommation moyenne résiduelle. Au total, 277 agneaux, répartis sur trois années et issus des deuxième et troisième générations de sélection ont été phénotypés pendant 6 semaines sous un régime 100% concentrés (CONC) et parmi eux, 167 agneaux, extrêmes en termes d'efficacité, ont par la suite été phénotypés sous un régime mixte (MIX). A l'issue de chaque phase, un échantillon de contenu ruminal et un échantillon de sang ont été collectés. La composition microbienne du rumen a été étudiée par séquençage des gènes codants pour l'ARNr 16S et l'ARNr 18S, respectivement pour les procaryotes et les eucaryotes et des analyses par chromatographie en phase gazeuse des échantillons ruminiaux et par RMN des échantillons ruminiaux et sanguins ont permis de doser les métabolites présents dans le rumen ou dans le plasma des agneaux. La première conclusion des travaux de cette thèse est, conformément à la littérature existante chez le bovin allaitant, une absence de corrélation entre l'efficacité alimentaire phénotypique aux régimes CONC et MIX. Globalement aucune association n'a été démontrée entre les compositions microbiennes ou les métabolites ruminiaux et l'efficacité alimentaire quel que soit le régime. En particulier, aucune différence de profil en acides gras volatils n'a été observée entre lignées ou entre animaux phénotypiquement efficaces ou inefficaces. Par ailleurs, les genres procaryotes ou eucaryotes associés avec l'efficacité alimentaire phénotypique diffèrent entre les deux régimes et les associations entre genres microbiens et efficacité alimentaire ne sont pas identiques entre les différentes années de prélèvements. Finalement, l'étude des métabolites plasmatiques, en tant que reflets du

métabolisme de l'animal, a mis en évidence une concentration plus importante en citrate chez les animaux de la lignée efficiente quel que soit le régime, ainsi que chez les animaux phénotypiquement efficaces au régime CONC. En revanche, les animaux inefficients avaient des concentrations plus importantes en acides aminés circulants. Cette découverte implique que la sélection génétique pour l'efficacité alimentaire a pu avoir un effet sur le métabolisme du citrate et/ou des acides aminés et ouvre la porte à de nouvelles études ciblées sur les mécanismes métaboliques associés à l'efficacité alimentaire comme l'efficacité de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale ou le turnover protéique.

Abstract

Feeding costs represent the vast majority of the money spent on raising ruminants for meat production. Thus, improving feed efficiency, *i.e.* the capacity of an animal to optimize its production in relation to its feed intake, has emerged as a good way to reduce breeding costs as well as pollutants resulting from dietary losses. However, mechanisms driving feed efficiency in ruminants remain poorly understood to this day, even though assumptions have been made regarding digestive efficiency or nutrients and energy partitioning between different tissues or between maintenance and production needs for example. Moreover, breeding conditions, particularly the diet, could influence feed efficiency and shift potential explanatory mechanisms. In this context, the main goal of this thesis was to explore the phenomena underlying feed efficiency, particularly by studying rumen microbial community and metabolites produced by its activity in growing Romane male lambs from divergent genetic lines built by selecting the most and the least efficient animals on the basis of their residual feed intake (RFI). In total, 277 lambs coming from the second and third generation of selection were phenotyped over three years, under a 100% concentrate (CONC) diet and among these 167 extreme animals were subsequently phenotyped under a mixed diet (MIX). At the end of each 6-week phenotyping phase a blood sample and a ruminal content sample were collected. Sequencing of the DNA extracted from rumen samples using primers for 16S rRNA gene and 18S rRNA gene for prokaryotes and eukaryotes respectively was used to evaluate rumen microbial communities. Gas-Chromatography was used to dose rumen metabolites and NMR was used to dose both rumen and plasma metabolites. The first conclusion of this work is the absence of correlation between phenotypic RFI in phase CONC and in phase MIX, which is consistent with the literature in growing beef cattle. No particular correlation was found between microbial communities or rumen metabolites and feed efficiency whatever the diet. In particular, no difference in VFA profile was highlighted between genetic lines or animals differing in phenotypic efficiency. Furthermore, prokaryotic and eukaryotic genera associated with either feed efficiency or inefficiency were different between diets and were not consistent between years of sampling. Finally, animals belonging to the efficient line had a higher plasma citrate concentration whereas inefficient animals had higher plasma amino acids concentrations. This discovery implies that genetic selection on feed efficiency may have impacted citrate and/or amino acids metabolism and opens the door to further studies targeting metabolic mechanisms associated with feed efficiency such as the activity of the mitochondrial oxidative phosphorylation or as protein turnover.

Auteur : Florian TOUITOU

Titre : Comprendre le lien entre l'activité des microorganismes présents dans le rumen, le métabolisme de l'hôte et l'efficacité alimentaire des agneaux.

Directrices de thèse : Dr Flavie TORTEREAU et Pr Annabelle MEYNADIER

Résumé :

L'efficacité alimentaire, caractérisée par l'aptitude d'un animal à optimiser sa production par rapport à sa consommation alimentaire, s'est imposée comme un moyen de limiter les coûts d'élevage mais aussi les polluants potentiels par une meilleure valorisation de la ration. Cependant, les déterminants de l'efficacité alimentaire sont encore méconnus bien que des pistes aient été avancées, notamment concernant l'efficacité digestive ou la partition des nutriments et de l'énergie entre différents tissus corporels et entre besoins d'entretien et besoins de production. L'objectif principal de ce travail était d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'efficacité alimentaire, en particulier en lien avec la communauté microbienne ruminale et les produits issus de son activité.

Conformément à la littérature existante chez le bovin allaitant, l'efficacité alimentaire phénotypique sous un régime concentré ou à dominante de fourrages ne sont pas corrélées. Par ailleurs, les genres procaryotes ou eucaryotes associés avec l'efficacité alimentaire phénotypique différent entre les deux régimes et les associations entre genres microbiens et efficacité alimentaire ne sont pas reproduits d'un prélèvement à l'autre. Globalement aucune association n'a été démontrée entre les métabolites ruminiaux et l'efficacité alimentaire quel que soit le régime. En particulier, aucune différence de profil en acides gras volatils n'a été observée entre lignées ou entre animaux phénotypiquement efficaces ou inefficaces. Finalement, l'étude des métabolites plasmatiques a mis en évidence une concentration plus importante en citrate chez les animaux de la lignée efficace quel que soit le régime, ainsi que chez les animaux phénotypiquement efficaces au régime CONC. En revanche, les animaux inefficaces avaient des concentrations plus importantes en acides aminés circulants. Cette découverte implique que la sélection génétique pour l'efficacité alimentaire a pu avoir un effet sur le métabolisme du citrate et/ou des acides aminés et ouvre la porte à de nouvelles études ciblées sur les mécanismes métaboliques associés à l'efficacité alimentaire comme l'efficacité de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale ou le turnover protéique.

Mots-clés : efficacité alimentaire, RFI, agneaux, microbiote ruminal, métabolome.

Discipline administrative : Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition