



HAL
open science

Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation et relations avec les performances des animaux

Mathilde Le Sciellour Hazon

► **To cite this version:**

Mathilde Le Sciellour Hazon. Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation et relations avec les performances des animaux. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2019. Français. NNT : 2019NSARB323 . tel-02966534

HAL Id: tel-02966534

<https://theses.hal.science/tel-02966534>

Submitted on 14 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *Biologie et physiologie animales*

Par

Mathilde LE SCIELLOUR HAZON

**« Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation
et relations avec les performances des animaux »**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 29 octobre 2019
Unité de recherche : Agrocampus Ouest, INRA UMR 1348 Physiologie, Environnement et
Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE)
Thèse N° : B-323 – 2019-15

Rapporteurs avant soutenance :

Sandrine GRASTEAU Directrice de recherche, INRA Val de Loire, UMR 0083 BOA
Philippe FRAVALO Professeur, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire

Composition du Jury :

Présidente :	Lucile MONTAGNE	Professeure, Agrocampus Ouest, INRA UMR 1348 PEGASE
Examineurs :	Patricia LEPAGE	Chargée de recherche, INRA Jouy-en-Josas, UMR 1319 MICALIS
	Mahendra MARIADASSOU	Chargé de recherche, INRA Jouy-en-Josas, UR 1404 MalAGE
	Mathieu CASTEX	Directeur R&D, Société Lallemand Animal Nutrition
Dir. de thèse :	David RENAUDEAU	Directeur de recherche, INRA St Gilles, UMR 1348 PEGASE
Co-dir. de thèse :	Olivier ZEMB	Chargé de recherche, INRA Toulouse, UMR 1388 GenPhySE

Thèse de doctorat

Agrocampus Ouest

Comue Université Bretagne Loire

Ecole Doctorale n°600 : Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Biologie et physiologie animales

Par **Mathilde LE SCIELLOUR HAZON**

Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation et relations avec les performances des animaux

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 29 octobre 2019.

Unité de recherche : Agrocampus Ouest, INRA UMR 1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Élevage (PEGASE)

Thèse N° : B-323 – 2019-15

Composition du Jury :

Présidente :	Lucile MONTAGNE	Agrocampus Ouest, INRA UMR 1348
Rapporteur :	Sandrine GRASTEAU Philippe FRAVALO	INRA Val de Loire, UMR 0083 Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire
Examineurs :	Patricia LEPAGE Mahendra MARIADASSOU Mathieu CASTEX	INRA Jouy-en-Josas, UMR 1319 INRA Jouy-en-Josas, UR 1404 Directeur R&D, Société Lallemand Animal Nutrition
Dir. de thèse :	David RENAUDEAU	INRA St Gilles, UMR 1348
Co-dir. de thèse :	Olivier ZEMB	INRA Toulouse, UMR 1388

Résumé

Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation et relations avec les performances des animaux

L'amélioration de l'efficacité alimentaire (EA) est un enjeu important pour la filière porcine. L'EA est un phénotype complexe faisant intervenir un grand nombre de fonctions chez le porc. Au travers son rôle dans le métabolisme de son hôte et le maintien de sa santé, le microbiote intestinal est susceptible d'impacter les performances de l'hôte et en particulier son EA. Ce travail de thèse vise à étudier les modifications de composition du microbiote intestinal du porc soumis à différents facteurs environnementaux et à évaluer les relations entre cette composition microbienne et les performances de l'hôte. Pour cela, les données de trois études réalisées sur des porcs en croissance-finition (entre 60 et 1 200 porcs par étude) soumis à des perturbations de natures différentes (aliment riche en fibres, aliment contaminé par des mycotoxines (DON) ou exposition à un stress thermique chronique ou aigu) ont été utilisées. L'analyse du microbiote a été réalisée sur la base de prélèvements de fèces obtenus avant et après les perturbations. Parallèlement, des phénotypes en lien avec l'EA de l'hôte ont été mesurés afin d'évaluer et quantifier les relations entre les performances du porc et son microbiote intestinal.

L'analyse bio-informatique et statistique approfondie des données microbiennes a montré que les perturbations environnementales impactent la composition du microbiote fécal mais que cet effet n'est généralement que transitoire. Selon la nature du challenge (régime alimentaire standard vs. riche en fibre, exposition à un stress thermique chronique ou aigu, et aliment contaminé par DON), l'impact sur la composition du microbiote intestinal diffère. Les données d'abondances relatives des OTU permettent de discriminer les groupes de porcs suivant des facteurs de variation qualitatifs mais ne permettent pas d'établir des modèles de prédiction quantitatifs entre les performances et les profils bactériens. Des phénomènes de redondance fonctionnelle pourraient expliquer la faible capacité prédictive de ces modèles. Une approche écosystémique basée sur la notion d'entérotype a été utilisée pour caractériser le microbiote. Ces travaux montrent que les entérotypes peuvent être instables au cours du temps chez le porc mais peuvent être associés à des phénotypes, notamment en lien avec la robustesse. Ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'utilisation fonctionnelle des données microbiennes pour l'étude des performances de l'hôte.

Mots-clés : microbiote, porc, efficacité alimentaire, fibres, stress thermique, mycotoxines

Abstract

Intestinal microbiota in pigs, variation factors and relationships with animals' performance

Improving feed efficiency (FE) is a major preoccupation for pig production. The FE is a complex trait dealing with lots of functions in pig. The intestinal microbiota is known to play a key role in host metabolism and health with subsequent impact on its performance. The PhD program aimed at studying the modifications of the intestinal microbiota composition on pigs exposed to several environmental perturbations and to evaluate the relationships between digestive microbiota composition and the host performance. Data from three experimental studies conducted on growing-finishing pigs (60 to 1.200 depending on the study) which were exposed to different perturbations [high fiber diet, diet contaminated by mycotoxin (DON), or exposed to acute or chronic heat stress] have been used. The microbiota analysis was based on fecal samples collected before and after the perturbations. Phenotypes directly or indirectly related to FE were measured to evaluate and to quantify the relationships between the host performance and its microbiota.

A detailed bioinformatic and statistical analysis of the microbial data demonstrated that the environmental perturbations affect the fecal microbiota composition but these effects were generally transient. Depending on the nature of the challenge (standard or high fiber diet, exposition to a chronic or acute heat stress, or DON-contaminated diet), the impact on fecal microbiota composition seemed to differ. In this PhD program, the relative abundance of the OTU does not allow to implement quantitative prediction models of pig performance. Functional redundancy found in the microbiota related information could explain the low predictive capacity of these models. An ecosystemic approach based on the enterotypes was used to characterize the microbiota. This work shows that enterotypes are unstable across ages in pigs but that they can be related to phenotypes, in particular those in relation with robustness. These results offer some promising perspectives on the functional use of microbiota data to study the host performance.

Keywords: microbiota, pig, feed efficiency, fiber, heat stress, mycotoxins

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes encadrants, David Renaudeau et Olivier Zemb, pour m'avoir fait confiance en m'engageant pour réaliser cette thèse ainsi que pour tout ce qu'ils m'ont apporté durant ces trois années intenses. Grâce à cela, j'ai eu l'opportunité de me former sur un sujet passionnant, très complet et plein d'avenir.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Etienne Labussière, Hélène Gilbert, Sébastien Dejean, Jordi Estellé-Fabrellas et Mathieu Castex, pour leurs conseils, leur aide, leur disponibilité et tous les échanges constructifs que nous avons pu avoir tout au long de la thèse.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Lucile Montagne, Sandrine Grasteau, Philippe Fravallo, Patricia Lepage et Mahendra Mariadassou, qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Je souhaite aussi remercier les financeurs de ma thèse: le département PHASE de l'INRA et la région Bretagne, ainsi que le projet européen Feed-a-Gene et le projet ANR PigHeat. Je remercie aussi Etienne Labussière, Jean-Luc Gourdine, Hélène Gilbert et Juliette Riquet pour m'avoir permis d'utiliser les données de certains de leurs essais dans le cadre de ma thèse.

Je remercie l'UMR PEGASE qui m'a accueillie durant ces trois ans sur le site de l'INRA de St Gilles, ainsi que l'UMR GenPhySE à Castanet-Tolosan où j'ai passé près de 3 mois pour l'analyse de mes échantillons.

En particulier, un grand merci aux techniciennes, stagiaires, doctorants, post-doc, CDD et chercheurs de l'équipe NED de l'unité GenPhySE avec qui j'ai passé de bons moments. Merci Béatrice pour m'avoir formée aux analyses de laboratoire. Merci beaucoup Céline pour m'avoir secondée dans la montagne d'analyses qu'il y avait à faire.

A St Gilles, je souhaite remercier les techniciens d'élevage, prêts à me donner un coup de main dès le début de matinée ou à courir derrière les cochons. Merci Yolande pour m'avoir

accueillie à mon arrivée et m'avoir accompagnée à l'élevage, pour bien commencer la thèse ! Je remercie aussi tous les autres collègues de l'unité avec qui j'ai pu travailler à un moment ou un autre et ceux avec qui j'ai partagé des pauses.

Merci à tous les doctorants, stagiaires et post-doc avec qui j'ai partagé un bout du parcours : Samir, Auriane, Séverine, Elise V., Hauteclaire, Katia, Clémence, Pierre, Alice, Cléo, David, Sophie, Hieu, Raphael, Rafael, Elise D., Linh Chi, Alessandra, Mélanie et Moshen. Merci à tous pour les moments partagés dans la bonne humeur, les rigolades et les « critiques », mais toujours avec bienveillance. Je me rappellerais entre autre des piques niques au bord du lac, qui nous offraient de véritables bouffées d'oxygène.

Je remercie mes co-bureau, Samir, Lianne, Mélaine, Haute-Claire et Aira, avec qui j'ai passé plus ou moins de temps à discuter, travail ou non. Je souhaite adresser un merci particulier à Samir qui m'a formé sur toutes les bases de l'analyse statistique sur le microbiote.

Plus largement, je remercie ma famille et mes amis pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse. Merci à toutes celles et ceux qui ont prêté une oreille attentive et qui ont pu me conseiller au cours de la thèse et pour la suite. Merci Louissette pour ton aide.

Un merci particulier à Matthieu pour son soutien quotidien.

Merci à tous.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	6
Liste des figures	14
Liste des tableaux	20
Liste des abréviations	22
Liste des communications	24
1. Articles.....	24
2. Posters.....	25
3. Présentations orales	26
Introduction.....	27
I. Etude bibliographique	29
1. Définition du microbiote intestinal	30
1.1. Définition globale.....	30
1.1.1. Généralités sur la caractérisation du microbiote	30
1.1.2. Composition générale du microbiote porcin.....	32
1.2. Facteurs de variation de la composition du microbiote digestif	35
1.2.1. Variabilité entre études et effets confondus entre différents facteurs de variation.....	35
1.2.2. Facteurs de variation de la composition du microbiote liés à l’animal ...	36
1.2.3. Facteurs de variation de la composition du microbiote liés à l’environnement	43
2. Relation entre le microbiote intestinal et l’efficacité alimentaire (EA) de l’hôte.....	56
2.1. Relations générales entre microbiote et efficacité alimentaire	58

2.2.	Rôle du microbiote dans la régulation hormonale de l'ingestion	60
2.3.	Rôle du microbiote dans la composante digestive de l'efficacité alimentaire.....	64
2.3.1.	Rôle du microbiote dans la dégradation et fermentation des fibres alimentaires	64
2.3.2.	Actions du microbiote et temps de transit	67
2.3.3.	Rôle du microbiote dans le développement du tube digestif	69
2.4.	Rôle du microbiote dans la composante métabolique de l'efficacité alimentaire	70
2.4.1.	Rôle du microbiote dans la santé de l'hôte	70
2.4.2.	Rôle du microbiote dans l'activité de l'hôte	76
2.4.3.	Rôle du microbiote dans la nature des dépôts corporels	76
2.5.	Comment piloter le microbiote au bénéfice de l'hôte ?	78
2.5.1.	Pilotage par les antibiotiques	79
2.5.2.	Pilotage par les prébiotiques	79
2.5.3.	Pilotage par les probiotiques	80
2.5.4.	Pilotage par transplantation fécale	80
3.	Conclusion de l'étude bibliographique et hypothèses de travail	82
II.	Description des méthodes utilisées pour caractériser la composition du microbiote.....	86
1.	Des fèces au séquençage.....	87
2.	Des séquences aux tables d'OTU et aux fonctions (analyse bio-informatique) .	89
3.	Analyses statistiques.....	90
3.1.	Méthodes de normalisation.....	90
3.1.1.	Raréfaction.....	91
3.1.2.	Total Sum Scaling	92
3.1.3.	Centered Log Ratio.....	93

3.1.4.	Comparaison des méthodes de normalisation.....	93
3.2.	Analyses descriptives	96
3.2.1.	Analyse de la diversité microbienne.....	98
3.2.2.	Représentation non supervisée de la composition microbienne	98
3.2.3.	Analyse de l'impact de facteurs de variation sur la composition microbienne.....	99
3.2.4.	Regroupement en entérotypes	99
3.3.	Analyses discriminantes	101
3.3.1.	DAPC et (sparse)PLS-DA	101
3.3.2.	Comparaison des méthodes de prédiction DAPC vs sPLS-DA.....	102
3.4.	Analyses de corrélation	103
3.5.	Analyses prédictives d'un phénotype quantitatif.....	105
III.	Etude Expérimentale	106
1.	Article 1, effet de la teneur en fibre du régime alimentaire sur la digestibilité et la composition du microbiote fécal de porcs en croissance-finition	106
1.1.	Abstract.....	109
1.2.	Introduction.....	109
1.3.	Material and methods	111
1.3.1.	Animals and experimental design	111
1.3.2.	Measurements	113
1.3.3.	Chemical analysis and DNA sequencing.....	114
1.3.4.	Calculations and statistical analysis	115
1.4.	Results	117
1.4.1.	Animal performance and digestibility coefficients	117
1.4.2.	Microbiota data	120
1.4.3.	Relationships between digestibility and microbiota.....	124
1.5.	Discussion.....	125

1.5.1. The increase of digestibility in aging animals was not linked to the microbiota.....	126
1.5.2. Robust effect of the diet on digestibility and microbiota	126
1.5.3. Resilience of the microbiota biomarkers to diet perturbations	128
1.5.4. Correlations between digestibility and microbiota.....	128
1.6. Conclusion	131
1.7. Supporting information	131
1.8. Acknowledgements	132
1.9. References.....	132
2. Article 2, effet de challenges thermiques chronique et aigu sur la composition du microbiote fécal, les performances de production et la thermorégulation de porcs en croissance.....	133
2.1. Abstract.....	136
2.2. Introduction.....	137
2.3. Material and methods	137
2.3.1. Animals and experimental design	138
2.3.2. Measurements and samples.....	138
2.3.3. DNA sequencing	140
2.3.4. Calculations and statistical analyses.....	140
2.4. Results	142
2.4.1. Animal performance	142
2.4.2. Impact of an HS on microbiota composition	144
2.4.3. Effect of the enterotypes on performance and thermoregulation.....	149
2.5. Discussion.....	153
2.5.1. Performance and thermoregulatory response to HS.....	153
2.5.2. Microbiota composition response to HS.....	154
2.5.3. Enterotypes and heat challenge perturbation	156

2.6.	Acknowledgements	157
2.7.	References.....	157
3.	Article 3, effets à court et long terme d'expositions courtes à un aliment contaminé au déoxynivalénol sur la composition du microbiote fécal de porcs	158
3.1.	Abstract.....	161
3.2.	Introduction.....	162
3.3.	Material and methods	162
3.3.1.	Animals and experimental design	163
3.3.2.	Measurements	164
3.3.3.	DNA sequencing	164
3.3.4.	Calculations and statistical analysis	165
3.4.	Results	166
3.4.1.	Animal performance	166
3.4.2.	Microbiota composition.....	167
3.4.3.	Relationships between performance and microbial functionality	172
3.5.	Discussion.....	175
3.6.	Conclusion	178
3.7.	Supporting information	178
3.8.	Acknowledgements	179
3.9.	References.....	179
4.	Article 4, comparaison de méthodes de régression statistique pour prédire un phénotype à partir de l'information du microbiote	180
4.1.	Abstract.....	183
4.2.	Introduction.....	183
4.3.	Material and methods	184
4.3.1.	Description of the experimental dataset	184
4.3.2.	Statistical analysis	187

4.4.	Results	189
4.4.1.	Experimental dataset	189
4.4.2.	Models comparison on real data.....	189
4.4.3.	Models comparison including artificial OTU	190
4.5.	Discussion.....	192
4.6.	Conclusion	194
4.7.	References.....	194
5.	Complément de bibliographie : notion de redondance fonctionnelle et d'entérotipe	195
6.	Article 5, analyse longitudinale de la composition du microbiote et des entérotypes de porcs entre le post-sevrage et la finition.....	197
6.1.	Abstract.....	200
6.2.	Introduction.....	200
6.3.	Material and methods	201
6.3.1.	Animals and experimental design	201
6.3.2.	Measurements	202
6.3.3.	DNA sequencing	202
6.3.4.	Calculations and statistical analysis	203
6.4.	Results	204
6.5.	Discussion.....	211
6.6.	Conclusion	214
6.7.	Supplementary materials	214
6.8.	Acknowledgements	215
6.9.	References.....	215
IV.	Discussion Générale	216
1.	Facteurs de variation de la composition du microbiote chez le porc	216

1.1. Quelle part de variabilité du microbiote est expliquée par les facteurs de variation ?.....	216
1.2. Effet du type génétique sur la composition du microbiote.....	218
1.3. Effet de l'âge sur la composition du microbiote fécal	221
1.4. Variations à court et long termes face aux perturbations environnementales.....	224
2. Le microbiote : un outil pour classer les animaux selon leur condition d'élevage ?.....	228
3. Le microbiote : un outil pour prédire des performances de l'hôte ?.....	231
3.1. Corrélation entre la composition microbienne et les phénotypes de l'hôte.....	232
3.1. Prédiction quantitative des phénotypes	236
4. Entérotypes	242
Conclusion	248
Références.....	250
Annexes.....	286
1. Abstract, EAAP 2018, Effect of heat stress on faecal microbiota composition in swine: preliminary results.....	286
2. Abstract et poster, EAAP 2018, Effect of successive fibre diets on nutrient digestibility and faecal microbiota composition in pigs	288
3. Abstract et poster, ASAS 2019, Acute challenges with deoxynivalenol contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs.....	291
4. Abstract et poster, ASAS 2019, Can we predict feed efficiency using fecal microbiota information?	293
5. JRP 2020, Impact d'expositions courtes et répétées au déoxynivalénol sur les performances et la composition microbienne fécale du porc en finition.....	295
6. Abstract, article du projet Sevrobust.....	296

Liste des figures

Figure I-1 : Abondance relative par phylum suivant la section du tube digestif chez des porcs de plus de 90 jours d'âge.	34
Figure I-2 : Abondance relative par phylum suivant l'âge dans des fèces de porcs.....	38
Figure I-3 : Composition des fibres alimentaires, méthodes de dosage et action du microbiote sur la digestibilité des différents éléments.	45
Figure I-4 : Utilisation de l'énergie ingérée chez un porc en croissance de 60 kg et composantes de l'efficacité alimentaire.....	58
Figure I-5 : Action des acides gras volatiles (AGV) sur la sécrétion de ghréline et impact sur la croissance, la régulation de l'ingéré et du métabolisme lipidique. (Tschöp et al., 2000; Cowley et al., 2003).....	61
Figure I-6 : Action des acides gras volatiles (AGV) sur la sécrétion de leptine, peptide tyrosine tyrosine (PYY) et glucagon like peptide-1 (GLP-1) et impact sur la régulation de l'ingéré et du métabolisme lipidique.	63
Figure I-7 : Rôle du microbiote dans la digestion des composés alimentaires et produits absorbés par l'hôte.....	65
Figure I-8 : Rôle du microbiote dans la transformation de glucides en acides gras volatiles et en gaz.	66
Figure I-9 : Action du microbiote et vitesse de transit au niveau du côlon.	68
Figure I-10 : Rôle du microbiote dans le développement du tube digestif.	70
Figure I-11 : Rôle du microbiote dans l'immunité de l'hôte.....	73

Figure I-12 : Rôle du microbiote dans la détoxification de la bile et du Déoxynivalenol (DON).(Cheng et al., 2010; Berthiller et al., 2011; Saint-Cyr et al., 2013; Gratz et al., 2018)	75
Figure I-13 : Synthèse des facteurs de variation de la composition du microbiote intestinal et des performances de l'hôte.....	83
Figure I-14 : Synthèse des rôles du microbiote favorisant une bonne efficacité alimentaire de son hôte.	85
Figure II-1 : Procédure d'extraction d'ADN, de séquençage et d'analyse bio-informatique pour l'étude du microbiote fécal.	86
Figure II-2 : Impact de la méthode de normalisation sur la distribution des valeurs d'une OTU par échantillon suivant l'abondance relative de cette OTU.	91
Figure II-3 : Exemple de normalisation Total Sum Scaling (TSS).	92
Figure II-4 : Formule utilisée dans la méthode de normalisation Centered Log Ratio (CLR).....	93
Figure II-5 : Exemple numérique de normalisation Centered Log Ratio (CLR).	93
Figure II-6 : Impact de la méthode de normalisation (TSS puis CLR vs raréfaction) sur une analyse discriminante par DAPC.	94
Figure II-7 : Impact de la profondeur de séquençage sur une analyse discriminante par DAPC.....	95
Figure II-8 : Analyses statistiques utilisées pour l'étude de données microbiennes, en lien avec des facteurs de variation qualitatifs ou des données phénotypiques quantitatives.....	97
Figure II-9 : Comparaison des OTU constituant les modèles de prédiction par DAPC et sPLS-DA.	102
Figure II-10 : Comparaison des résultats obtenus par corrélation de Pearson ou analyse de corrélation canonique régularisée entre les coefficients de digestibilité de l'hémicellulose, de la cellulose, de l'azote (N) ou de l'énergie et les abondances des OTU.	104

Figure III-1 : Experimental design and changes in the dietary treatments according to the experimental period. LF and HF are for low and high fiber diets, respectively.	112
Figure III-2 : Evolution of digestibility coefficient of energy across periods 1 to 4 for the low-fiber (orange) or high-fiber (darkblue) diets in Duroc (▲), Large-White (◇) and Pietrain (●) pigs.	119
Figure III-3 : Score plot of two-component sPLS-DA model showing feces samples clustering according to the breed with percentage of variance captured for each principal component (Δ: Duroc, □: Large-White, O: Pietrain) for the animals fed low-fiber diet during period 1.	121
Figure III-4 : Discrimination of the breed through sPLS-DA across periods 1 to 4 for the low-fiber (orange) or high-fiber (darkblue) diets.	121
Figure III-5 : Score plot of two-component sPLS-DA model showing feces sample clustering according to the diet with percentage of variance captured for each principal component (Δ: Low-fiber diet, o: High-fiber diet).....	122
Figure III-6 : Variations of the relative abundance of predictive OTUs of diet effect.....	123
Figure III-7 : Correlated OTUs (represented by dots colored according to the taxonomical family of the corresponding bacteria) to digestibility coefficients (energy, N, hemicellulose and cellulose) in low-fiber diet through Pearson correlation.	124
Figure III-8 : Experimental design: pigs were raised under temperate (n = 558) or tropical (n = 564) environments between 11 and 26 wk of age.....	139
Figure III-9 : Effect of a chronic heat stress represented by temperate and tropical climates (TEMP and TROP, respectively) on average daily gain (ADG ₁₁₋₂₃), average daily feed intake (ADFI ₁₁₋₂₃), and feed conversion ratio (FCR ₁₁₋₂₃) between 11 and 23 wk of age, on body weight at 23 wk of age (BW ₂₃) and on skin and rectal temperatures at 23 wk of age (ST ₂₃ and RT ₂₃ , respectively).....	143
Figure III-10 : Effect of an acute heat challenge applied from wk 24 to 26 on average daily gain (ADG), skin temperature (ST) and rectal temperature (RT).	144

Figure III-11 : Venn diagrams of the operational taxonomic units differentially abundant in a GLM analysis, aggregated at family level, between TEMP23 vs. TEMP26, and between TEMP23 vs. TROP23.....	146
Figure III-12 : Functional pathways differentially abundant between the temperate climate at 23 wk (TEMP23) and 26 wk of age (TEMP26) and the tropical climate at 23 wk of age (TROP23).....	147
Figure III-13 : Score plot of two-component sparse partial least square discriminant analysis models showing feces samples clustering according to the environment (TEMP23: under temperate climate at wk 23 of age; TEMP26: under temperate climate after a 3-wk heat challenge period; TROP23: under tropical climate at wk 23 of age) with percentage of variance captured for each principal component.....	148
Figure III-14 : Distribution of the microbial enterotypes 1 (E1) and 2 (E2) in 23-wk old pigs raised in temperate (TEMP23) or tropical (TROP23) climates.....	149
Figure III-15 : Abundance (% and counts) of the four main genera contributing to the microbial enterotypes 1 (E1 in red) and 2 (E2 in turquoise).....	150
Figure III-16 : Experimental design.....	164
Figure III-17 : Bray-Curtis distance between treatment groups and controls at 99, 119, 140 and 154 days of age represented in a non-metric multidimensional scaling (nMDS).	168
Figure III-18 : OTU differentially abundant between control group (CC) and treatment groups: group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days (DC), group fed a DON-contaminated diet between 134 and 140 days (CD), group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days and between 134 and 140 days (DD).....	171
Figure III-19 : MINT sparse Partial Least Square Discriminant Analysis based on pathways abundance at 119 days (○) and 140 days (Δ).....	172
Figure III-20 : Plots of the correlations between the abundance of the artificial OTU built from the observed OTU in the fecal samples and feed efficiency of the pigs associated to the fecal samples.	186

Figure III-21 : Pipeline of artificial OTU building from an observed OTU to artificially reorganized and biased OTU.....	187
Figure III-22 : Learning and validation R^2 from partial least square regression (PLSR), sparse partial least square regression (sPLSR) and random forest regression (RF) applied on real dataset to prediction feed efficiency.	190
Figure III-23 : Evaluation of the partial least square regression (in blue), sparse partial least square regression (in red) and random forest regression without qualitative variables (in green) models using mean R^2 from the validation subset on 100 iterations.	191
Figure III-24 : Evolution of the relative abundance of 10 main genera across ages in female pigs.	206
Figure III-25 : Relative abundance (%) of the three main genera contributing (a) to the two enterotypes in post-weaning PWE1 (in orange) and PWE2 (in green), and (b) to the three enterotypes in finishing FE1 (in red), FE2 (in turquoise) and FE3 (in grey).....	208
Figure III-26 : Number of pigs switching between enterotypes according (a) to the sex type (castrated males and females) or (b) to the exposition to mycotoxins via the diet.....	210
Figure III-27 : Number of female pigs switching between enterotypes (FE1 and FE2) during the finition stage (between 99 and 154 d of age).	211
Figure IV-1 : Pourcentage de variabilité de la table d'abondance d'OTU attribuée par analyse de variance en composantes principales aux facteurs de variation étudiés dans les essais 1 (A), 2 (B) et 3 (C et D), en incluant les interactions entre ces différents facteurs. ...	217
Figure IV-2 : OTU différenciellement abondantes entre les Large White (LW), Piétrain (PI) et Duroc (DU).....	220
Figure IV-3: Evolution de la diversité microbienne fécale en fonction de l'âge entre les semaines 7 et 22 dans les essais 1 (A) et 3 (B).	222
Figure IV-4 : Evolution de la composition du microbiote fécal à l'échelle du genre suivant l'âge entre les semaines 13 et 22 dans l'essai 3.	224

Figure IV-5 : Variations des abondances relatives d'OTU impactées par un challenge au déoxynivalénol (DON) entre 13 et 22 semaines d'âge (S13 et S22).....	226
Figure IV-6 : Schéma de l'évolution d'une composition microbienne soumise à une perturbation.	227
Figure IV-7 : Corrélations de Pearson significatives entre l'abondance d'OTU et l'indice de consommation (IC) ou la consommation moyenne journalière (CMJ) dans l'essai 2.	233
Figure IV-8 : Structuration d'un jeu de données par un facteur externe : exemples des essais 1 (A : prédiction de la valeur du coefficient d'utilisation digestive de l'énergie à partir du microbiote prélevé à 14, 17, 20 et 23 semaines d'âge) et 2 (B : prédiction du poids vif à 23 semaines à partir du microbiote prélevé à 23 semaines d'âge).	237
Figure IV-9 : Evaluation de la prédiction de l'efficacité alimentaire (EA) par la régression des moindres carrés partiels (PLSR), la sparse PLSR (sPLSR) et la régression en forêts aléatoires (RF) par le coefficient de détermination (R^2).....	241
Figure IV-10 : Entérotypes (SE1 à SE4) identifiés chez des porcelets à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage représentés dans une analyse en coordonnées principales (PCOA).	244
Figure IV-11 : Abondance par genre suivant les entérotypes (SE1 à SE4) identifiés chez des porcelets à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage.	246

Liste des tableaux

Table I-1: Classification des principaux taxons bactériens cités dans le manuscrit.	31
Table I-2: Analyse comparative de l'abondance relative (%) par phylum chez le porc, le poulet, le lapin, le rat, la souris et l'homme.	33
Table I-3: Abondance relative (%) par phylum suivant la race dans des fèces de porcs de plus de 84 jours d'âge.	42
Table I-4: Variations du microbiote suivant l'aliment ingéré par le porc.	46
Table I-5: Variation du microbiote suivant le stress thermique.	55
Table III-1 : Composition of the experimental diets ¹	113
Table III-2 : Effect of diet, breed and period on growing and feeding performances in growing pigs ¹	118
Table III-3 : Relative percentage at phylum level in samples collected in temperate climate before (TEMP23) and after (TEMP26) an acute heat challenge and in tropical climate (TROP23).	145
Table III-4 : Effect of the microbial enterotype (E1 and E2) established at 23 wk of age on production traits, thermoregulatory responses and microbial diversity (least square means) in temperate (TEMP) and tropical (TROP) climates.	151
Table III-5 : Effect of the microbial enterotype (E1 and E2) established at 23 wk of age on production traits, thermoregulatory responses and microbial diversity (least square means) after an acute heat stress in temperate climate.	152
Table III-6 : Adjusted false discovery rate p-values (P_{FDR}) using Benjamini-Hochberg method resulting from 999 iterations of a pairwise MANOVA analysis between control (CC) and treatment groups exposed to a DON-contaminated diet.	168

Table III-7 : Relative abundance (%) of families and genera in fecal samples collected in the four different experimental groups ¹ at 99, 119, 140 and 154 days of age.	170
Table III-8 : Regularized canonical correlations (rCCA) ¹ between functional pathways relative abundance and the average daily feed intake (ADFI) ² , the average daily gain (ADG) and the feed efficiency (FE) of pigs.	174
Table III-9 : Observed correlations between artificial OTU and feed efficiency after simulating the randomness of sequencing draw (i.e. applying a binomial draw on reorganized OTU).....	190
Table III-10 : Age effect on female pigs' fecal microbiota diversity and phyla relative abundance.	205
Table III-11 : Effect of the finishing enterotypes on the performance of the pigs.	209
Table IV-1 : Synthèse des résultats des analyses sPLS-DA dans les différents dispositifs expérimentaux.....	229
Table IV-2 : Fonctions biologiques issues de prélèvements de microbiote à 23 semaines d'âge corrélées significativement à l'indice de consommation de porcs entre 11 et 23 semaines d'âge élevés en environnement tempéré (essai 2).	235
Table IV-3 : Résultats de prédiction par PLS de phénotypes liés à l'efficacité alimentaire dans les essais 1 et 2.	238
Table IV-4 : Corrélations de Pearson observées entre les OTU fictives et l'efficacité alimentaire (EA).....	240
Table IV-5 : Effectifs de porcelets présentant les entérotypes SE1 à SE4 à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage.	245

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADF	Acid detergent fiber
ADFI	Average daily feed intake
ADG	Average daily gain
ADL	Acid detergent lignin
AGV	Acide gras volatile
AUC	Area under the curve
BW	Body weight
CC	Groupe témoin dans l'essai 3
CD	Groupe expérimental dans l'essai 3
CLR	Centered log ratio
CMJ	Consommation moyenne journalière
CUD	Coefficient d'utilisation digestive
CYP	Cytochrome P450
DAPC	Analyse discriminante en composantes principales
DC	Groupe expérimental dans l'essai 3
DD	Groupe expérimental dans l'essai 3
DM	Dry matter
DOM-1	De-époxy-déoxynivalenol
DON	Déoxynivalenol
E1 et E2	Enterotypes 1 et 2
EA	Efficacité alimentaire
EM	Energie métabolisable
FCR	Feed conversion ratio
FDR	False discovery rate
FE	Feed efficiency
FE1 et FE2	Entérotypes en finition 1 et 2
GLM	Modèles linéaires généralisés
GLP-1	Glucagon like peptide-1
GMQ	Gain moyen quotidien
HF	High fiber diet
HS	Heat stress
IC	Indice de consommation
IgA	Immunoglobuline A
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KO	KEGG orthologue
LF	Low fiber diet
LW	Large White
MSEP	Mean square error prediction criterion
MINT sPLS-DA	Multivariate integrative sparse partial least square discriminant analysis
NDF	Neutral detergent fiber
NMDS	Positionnement multidimensionnel non-métrique
OM	Organic matter
OTU	Operationnal taxonomic unit

PCR	Polymerase chain reaction
PERMANOVA	Analyse de variance avec permutation
(s)PLS-DA	Analyse discriminante par les moindres carrés partiels (avec sélection de variables)
(s)PLSR	Régression des moindres carrés partiels (avec sélection de variables)
PVCA	Analyse de variance en composantes principales
PWE1 et PWE2	Entérotypes en post-sevrage 1 et 2
rCCA	Analyse de corrélation canonique régularisée
RF	Random forest
RT	Rectal temperature
SCFA	Short chain fatty acid
ST	Skin temperature
TEMP	Temperate climate
TROP	Tropical climate
TSS	Total sum scaling

Liste des communications

1. Articles

Le Sciellour, M., E. Labussière, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2018. Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs. PLoS ONE. 13:e0206159. doi:10.1371/journal.pone.0206159.

Le Sciellour, M., O. Zemb, I. Hochu, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi, Y. Billon, J.-L. Gourdine, and D. Renaudeau. 2019. Effect of chronic and acute heat challenges on fecal microbiota composition, production, and thermoregulation traits in growing pigs. Journal of Animal Science. 97(9):3845-3858. doi:10.1093/jas/skz222.

Le Sciellour, M., D. Renaudeau, and O. Zemb. 2019. Longitudinal analysis of the microbiota composition and enterotypes of pigs from post-weaning to finishing. Microorganisms. 7(12), 622. doi:10.3390/microorganisms7120622.

Le Sciellour, M., O. Zemb, and D. Renaudeau. Transient effect of single or repeated acute deoxynivalenol dietary challenge on fecal microbiota composition in finishing pigs. (En révision pour Animal)

Le Sciellour, M., S. Dejean, D. Renaudeau, and O. Zemb. TECHNICAL NOTE: Comparison of statistical regression methods to predict a phenotype using microbiota information. (Soumis dans JAS)

Le Sciellour, M., A.-M. Serviento, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2020. Impact d'expositions courtes et répétées au déoxynivalénol sur les performances et la composition microbienne fécale du porc en finition. Journées de la Recherche Porcine.

2. Posters

En congrès

Le Sciellour, M., E. Labussière, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2018. Effect of successive fibre diets on nutrient digestibility and faecal microbiota composition in pigs. In: Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Wageningen Academic Publishers, Wageningen (Pays-Bas) 978-908686-323-5, Dubrovnik, Croatia. p. 208.

Le Sciellour, M., O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019. Acute challenges with a DON-contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs. In: Austin, Texas, Etats-Unis. (A paraître dans Journal of Animal Science, E. Suppl.)

Le Sciellour, M., S. Dejean, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019. Can we predict feed efficiency using fecal microbiota information? In: Austin, Texas, Etats-Unis. (A paraître dans Journal of Animal Science, E. Suppl.)

Autre

Le Sciellour, M., 2017. Relationship between pig gut microbiota and feed efficiency. Séminaire des doctorants du département INRA Génétique Animale, Bruz, France.

Le Sciellour, M., O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019. Acute challenges with a DON-contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs. Journées scientifiques de l'école doctorale EGAAL, Rennes, France.

3. Présentations orales

En congrès

Le Sciellour, M., I. Hochu, O. Zemb, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi, Y. Billon, J.-L. Gourdine, and D. Renaudeau. 2018. Effect of heat stress on faecal microbiota composition in swine: preliminary results. In: Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Wageningen Academic Publishers, Wageningen (Pays-Bas) 978-908686-323-5, Dubrovnik, Croatia. p. 705.

Le Sciellour M., A. Serviento, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2020. Impact d'expositions courtes et répétées au déoxynivalénol sur les performances et la composition microbienne fécale du porc en finition (accepté pour présentation orale aux JRP 2020) (Annexe 1)

Autre

Le Sciellour, M. 2017. Impact of normalisation on the comparison of microbiota of pigs fed two different diets. Journées NEM, Saint Pée sur Nivelle, France.

Le Sciellour, M. 2019. How to predict phenotypes using microbiota composition information? Journées NEM, Nantes, France.

Le Sciellour, M. 2018. How to predict phenotypes using microbiota composition information? European project Feed-a-Gene meeting, Saint Gilles, France.

Journées des doctorants de l'UMR 1348 PEGASE, INRA en 2017, 2018 et 2019 : présentation du sujet de thèse et de l'avancement du travail.

Le Sciellour M. 2017. Ma thèse en 180 secondes. Journée Natural Concept, Groupe Grimaud, Rennes, France.

Introduction

En production porcine, la part des coûts alimentaires dans les charges de production est comprise entre 60 et 70%. La maîtrise de ces coûts est donc un paramètre clé pour maintenir la rentabilité économique des élevages de porc. Pour atteindre cet objectif, les éleveurs sont en attente d'animaux toujours plus efficaces, c'est-à-dire maximisant leur rendement taux de muscles/ingéré alimentaire. Outre l'impact économique, l'amélioration de l'efficacité alimentaire (EA) est un levier important pour réduire les rejets d'éléments polluants dans l'environnement et limiter la compétition entre l'alimentation animale et l'alimentation humaine pour l'accès aux matières premières.

L'EA est définie par un rapport entre un gain de poids vif sur une quantité d'aliment ingéré pendant une période donnée. Le phénotypage de ce caractère en élevage est long et coûteux. La consommation individuelle des animaux doit être suivie quotidiennement sur plusieurs semaines afin de calculer l'efficacité propre à chaque individu. A l'échelle individuelle, il existe une forte variabilité dans la manière dont l'animal valorise les différents nutriments de la ration qu'il ingère. Cette variabilité, en grande partie génétique, est aussi fortement dépendante de l'environnement (alimentation, conditions sanitaires, climat, etc.) dans lequel l'animal est élevé. La recherche de nouveaux indicateurs de l'EA est essentielle pour quantifier et valoriser cette variabilité interindividuelle dans de futurs programmes de sélection. Elle pourrait aussi permettre de proposer de nouvelles stratégies alimentaires basées sur l'utilisation des concepts d'alimentation de précision et tirant profit de cette variabilité. Par ailleurs, ces nouveaux indicateurs devraient permettre de mieux prendre en compte les principaux déterminants de l'efficacité digestive et métabolique de l'aliment par l'animal.

Le microbiote intestinal joue un rôle prépondérant dans le métabolisme de son hôte, notamment en fermentant les fibres indigestibles par l'hôte. Son action augmente la digestibilité des aliments et ainsi l'EA. Par ailleurs, le microbiote participe au maintien de la bonne santé digestive et favorise des conditions optimales pour la digestion. La possibilité de collecter facilement des fèces et le faible coût de caractérisation du microbiote comparé au phénotypage complet des performances des porcs en font un levier intéressant pour améliorer l'EA.

Ce travail de thèse cherche à caractériser l'impact de différents facteurs de variation sur la composition du microbiote fécal porcin (âge, race, transitions alimentaires, expositions courtes et répétées à des mycotoxines, exposition à des stress thermiques). Il cherche également à mettre en relation la composition du microbiote fécal des porcs avec leurs performances. L'analyse du microbiote s'est basée sur des données de séquençage. Cependant, les mécanismes d'action du microbiote n'ont pas été évalués.

La première partie de ce manuscrit de thèse fait l'état des lieux des résultats de la littérature. Elle traite des facteurs de variation de la composition du microbiote fécal porcin puis des rôles fonctionnels du microbiote possiblement impliqués dans la variation de l'EA de l'hôte.

La deuxième partie de ce manuscrit décrit les méthodes d'analyse statistique utilisées, celles-ci représentant une grande partie du travail de thèse réalisé.

La troisième partie présente les résultats obtenus lors de la thèse sous la forme de 5 articles scientifiques. Tous les résultats seront ensuite discutés dans une dernière partie.

I. Etude bibliographique

Le microbiote commensal d'un individu hôte représente l'ensemble des micro-organismes (bactéries, archées, levures, champignons, virus) hébergés par l'hôte mais qui n'impactent pas négativement son métabolisme et sa santé. Le microbiote commensal s'oppose ainsi au microbiote pathogène. Le microbiote est situé à l'interface entre un organisme hôte et le milieu extérieur (Hoffmann, 2017; Strube et al., 2018)¹ et recouvre notamment les muqueuses (Sun et al., 2015; Adhikari et al., 2019). Il peut aussi être présent dans certains organes tels que dans la mamelle (Falentin et al., 2016; Metzger et al., 2018). En particulier, le microbiote intestinal inclut toutes les espèces microbiennes présentes dans l'intestin d'un organisme hôte. Chez le porc, le microbiote contenu dans les fèces est constitué à 98% de bactéries et 2% d'archées et d'eucaryotes (Xiao et al., 2016). On estime qu'entre 1×10^{10} et 1×10^{11} bactéries sont présentes par gramme de contenu digestif dans le côlon (Gaskins et al., 2002).

La composition du microbiote diffère entre les espèces ayant des modes de vie, des environnements et des régimes alimentaires très différents. Des similarités se retrouvent chez les monogastriques car leur système digestif est proche comparé à celui des ruminants. Au sein d'un même individu, la composition du microbiote digestif diffère suivant sa localisation dans le tractus digestif et pour un segment donné et évolue dans le temps, notamment lorsque l'hôte est soumis à des perturbations extérieures (changement d'alimentation, modification du statut sanitaire de l'élevage...).

Cette étude bibliographique définit dans une première partie la composition du microbiote porcine et décrit les principaux facteurs de variation liés à l'animal ou à son environnement d'élevage. Une seconde partie s'intéresse aux rôles fonctionnels du microbiote intestinal en lien avec les performances de l'hôte au travers de la régulation de l'ingéré alimentaire, de la fermentation des fibres, du développement du tube digestif, du maintien de sa santé et du métabolisme des lipides et protéines. Cette partie recense les rôles principaux du microbiote

¹ Dans cette thèse, les auteurs sont référencés par nom de famille et année de publication. Dans le cas où deux auteurs ayant le même nom ont publié la même année, l'initiale du prénom des auteurs a été ajoutée.

mais ne constitue pas une liste exhaustive des voies d'action possibles du microbiote sur son hôte.

1. Définition du microbiote intestinal

1.1. Définition globale

1.1.1. Généralités sur la caractérisation du microbiote

Initialement, les analyses de microbiote étaient basées sur de la culture bactérienne, difficiles à développer à haut débit. Des analyses basées sur des migrations sur gel (Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant ou Polymorphisme de Conformation des Simples brins) ont ensuite permis une analyse un peu plus fine des compositions bactériennes. Enfin, depuis les années 1980, des méthodes de séquençage de gènes microbiens permettent une analyse plus fine, plus rapide et à plus grande échelle (Lane et al., 1985). Ainsi, l'analyse de la composition microbienne peut être réalisée au travers du séquençage du gène de l'ARN 16S bactérien (Rapin et al., 2017). Ce gène présente des régions conservées (stables entre toutes les bactéries) permettant de l'isoler lors du séquençage. De plus il présente aussi des régions variables entre les espèces bactériennes permettant de les différencier. Les séquences issues de régions variables de ce gène sont regroupées suivant leur similarité en unité taxonomiques opérationnelles, nommées OTU (Operational Taxonomic Units) (Goodrich et al., 2014). La composition microbienne est ensuite caractérisée par le nombre de séquences attribuées à une OTU.

Si la séquence est déjà connue, une affiliation taxonomique peut être attribuée à chaque OTU (Quast et al., 2013). Le niveau taxonomique le plus fin est le genre ; viennent ensuite la famille, l'ordre, la classe puis le phylum, qui représente le plus haut niveau de regroupement taxonomique bactérien. A partir de données issues du gène de l'ARN 16S, il est difficile d'être plus précis que le genre en termes de taxonomie car la précision requise pour assigner une espèce bactérienne est généralement supérieure à la précision utilisée pour définir les OTU (Goodrich et al., 2014; Rosselló-Móra and Amann, 2015). La Table I-1 indique la classification des principaux taxons bactériens qui seront cités dans le manuscrit. Ceci ne constitue pas une liste exhaustive de la taxonomie bactérienne.

Table I-1: Classification des principaux taxons bactériens cités dans le manuscrit.

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
			<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
			<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>
				<i>Faecalibacterium</i>
			<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>
				<i>Blautia</i>
			<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>
			<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
				<i>Sarcina</i>
	<i>Peptococcaceae</i>			
	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>
				<i>Megasphaera</i>
<i>Selenomonadaceae</i>			<i>Mitsuokella</i>	
<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Turicibacter</i>	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>
				<i>Alloprevotella</i>
			<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>
				<i>Salmonella</i>
		<i>Enterobacter</i>		
<i>Aeromonadales</i>	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Succinivibrio</i>		
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
		<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
		<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>
<i>Fibrobacteres</i>	<i>Fibrobacteria</i>	<i>Fibrobacterales</i>	<i>Fibrobacteriaceae</i>	<i>Fibrobacter</i>
<i>Tenericutes</i>				

1.1.2. Composition générale du microbiote porcin

Le microbiote intestinal porcin est composé à 98% de bactéries appartenant aux phyla *Firmicutes* (65,9% +/- 15,5%), *Bacteroidetes* (23,3% +/- 16,4%), *Proteobacteria* (1,7% +/- 0,6%) et *Spirochaetes* (3,6% +/- 4,9%) (Holman and Chénier, 2014; Xiao et al., 2016; Holman et al., 2017). Les 2% restants sont répartis entre les archées et les eucaryotes. Dans une méta-analyse réalisée sur 20 publications traitant de la composition du microbiote porcin à différentes localisations dans le tube digestif, il a été observé que les genres *Clostridium*, *Alloprevotella*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *RC9* et *Subdoligranulum* sont représentés dans 90% des échantillons (Holman et al., 2017). Dans cette étude, 99% des échantillons contenaient les genres *Prevotella*, *Clostridium*, *Alloprevotella*, *Ruminococcus* et *RC9*.

La composition du microbiote de différentes espèces est présentée dans la Table I-2. Proportionnellement, l'abondance en *Firmicutes* est plus élevée dans les fèces humaines comparativement au porc, au détriment de l'abondance en *Bacteroidetes*. Le séquençage complet du génome microbien du porc montre que seulement 1% des gènes du microbiote fécal porcin est partagé par 100% des animaux d'élevage testés (Xiao et al., 2016). Seul 0,2% de la totalité des gènes microbiens identifiés dans des fèces de porc sont retrouvés dans des fèces de souris ou d'homme. Cela démontre une grande spécificité de la composition microbienne selon l'espèce. Cependant, ces gènes communs correspondent à 3 157 fonctions biologiques, soit 69,3% de la totalité des fonctions retrouvées chez le porc, 84,9% chez l'homme et 92,4% chez la souris. Il est présumé que ces fonctions ubiquitaires pourraient être indispensables au fonctionnement de l'écosystème digestif. Ces résultats semblent donc suggérer qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les différentes populations bactériennes et par conséquent que des communautés d'espèces différentes peuvent aboutir à la même fonction globale.

Table I-2: Analyse comparative de l'abondance relative (%) par phylum chez le porc, le poulet, le lapin, le rat, la souris et l'homme.

Références	Espèce	Localisation	Abondance relative par phylum (%)					
			<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Tenericutes</i>
(Kanengoni et al., 2015; Niu et al., 2015; Pajarillo et al., 2015; Zhao et al., 2015; Han et al., 2018; Lu et al., 2018)	Porc	Fèces	65,9	23,3	1,7	3,6	0,4	0,5
(Zhang et al., 2012)	Rat	Fèces	53,5	34,8	6,2	nc	1,2	nc
(Tap et al., 2009)	Homme	Fèces	79,4	16,9	1,0	nc	2,5	nc
(Mesa et al., 2017)	Poulet	Cæcum	61,4	29,0	4,5	0,0	0,1	4,2
(Michelland et al., 2012)	Lapin	Cæcum	92,5	3,1	0,4	nc	nc	nc
(Everard et al., 2014)	Souris	Cæcum	41,5	44,9	1,4	nc	0	6,3

nc : non communiqué

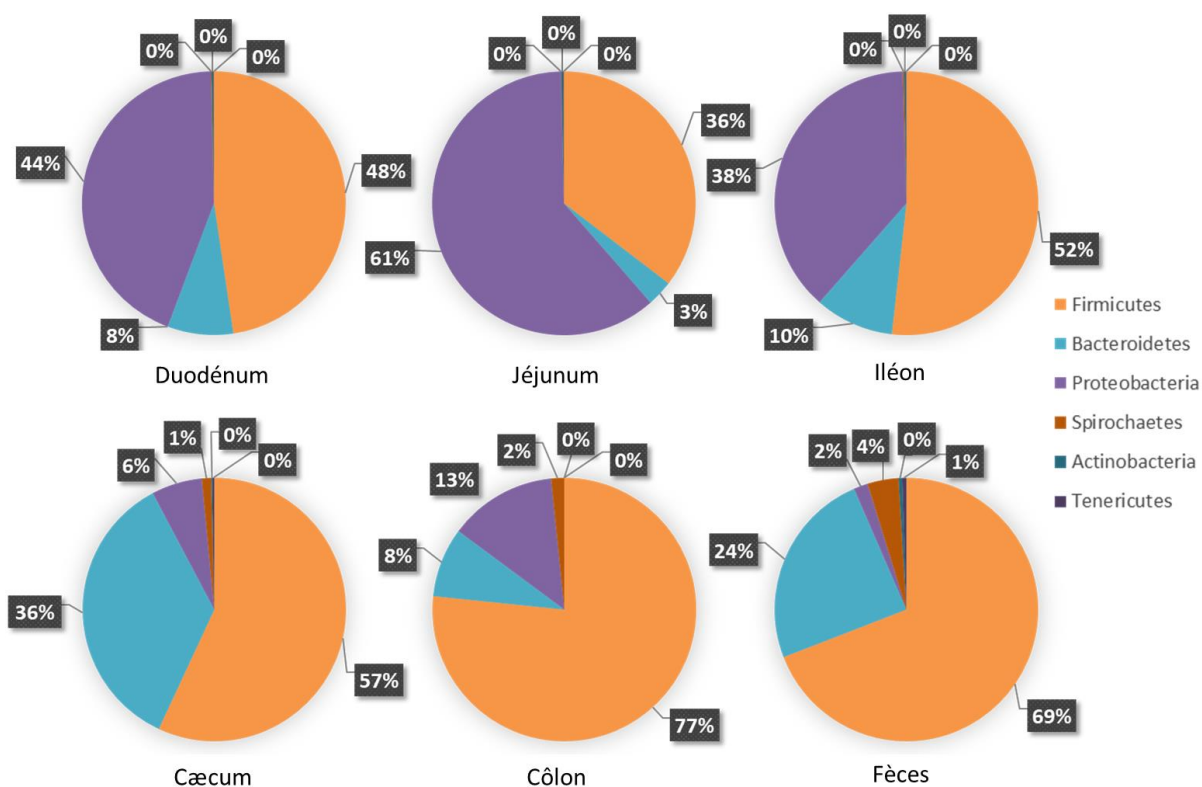


Figure I-1 : Abondance relative par phylum suivant la section du tube digestif chez des porcs de plus de 90 jours d'âge.

Les données sont issues de différentes publications : Duodénum (Gao et al., 2019), jéjunum (Zhao et al., 2015; Gao et al., 2019), iléon (Zhao et al., 2015; Fan et al., 2017; Gao et al., 2019), cæcum (Zhao et al., 2015; Gao et al., 2019), côlon (Zhao et al., 2015), fèces (Kanengoni et al., 2015; Niu et al., 2015; Pajarillo et al., 2015; Zhao et al., 2015; Han et al., 2018; Lu et al., 2018).

Chez le porc, la composition du microbiote intestinal varie suivant la localisation dans le tractus digestif. De l'amont vers l'aval, les principaux segments intestinaux étudiés sont le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le cæcum, le côlon et le rectum. D'après les résultats disponibles dans la littérature, 38 à 61% des bactéries présentes dans l'intestin grêle de porcs âgés de plus de 90 jours appartiennent au phylum *Proteobacteria* (Figure I-1). Cependant, ce phylum ne représente que 2 à 13% des bactéries du gros intestin. A l'inverse, les *Firmicutes* (entre 57 et 77%) et les *Bacteroidetes* (entre 8 et 36%) prédominent dans le gros intestin. Au sein d'un même phyla, les abondances des genres bactériens peuvent également différer entre les segments du tube digestif. Ainsi, les *Prevotella* dominent dans le côlon tandis que les *Lactobacillus* et *Clostridium* dominent dans l'intestin grêle (Crespo-Piazuelo et al., 2018). A

l'échelle du genre, si les abondances bactériennes de l'iléon et du jéjunum d'une part et de celles du cæcum et du côlon d'autre part sont très fortement corrélées (> 90%), la relation entre composition du microbiote fécal et de l'intestin grêle est beaucoup moins forte (< 40%) (Zhao et al., 2015). Chez le porc, l'analyse du microbiote fécal ne reflète donc qu'une partie de la composition microbienne réelle des segments en amont dans le tube digestif de l'hôte. Cette conclusion est partagée par Rist et al. (2012) qui montrent qu'une variation du niveau alimentaire chez des porcelets sevrés impacte la composition du microbiote iléal mais n'a aucun effet sur le microbiote fécal. Au-delà de l'abondance relative des différentes populations bactériennes, la diversité microbienne est généralement plus élevée dans le gros intestin où la majeure partie des fermentations microbiennes a lieu comparativement à l'intestin grêle (Crespo-Piazuelo et al., 2018; Quan et al., 2018).

Dans un segment donné du tube digestif, il existe des différences de composition entre les populations bactériennes localisées dans la lumière du tube digestif et celles en contact direct avec la muqueuse intestinale. Dans le côlon par exemple, les *Firmicutes* sont plus abondantes dans le liquide digestif du porc tandis que les *Bacteroidetes* et *Synergistetes* prédominent dans les communautés associées à la muqueuse intestinale (Sun et al., 2015; Burrough et al., 2017; Adhikari et al., 2019). De plus, le microbiote associé aux muqueuses est plus diversifié que celui présent dans le lumen (Sun et al., 2015). D'après ces auteurs, ces différences spatiales de composition microbienne pourraient être liées à des variations locales de composition du milieu (pH, substrats différents...). Ainsi, chez l'homme, la bactérie *Akkermansia muciniphila* ne se développe que lorsqu'elle est associée au mucus et ses conditions optimales de développement sont 35°C et 6,5 de pH (Derrien et al., 2004).

1.2. Facteurs de variation de la composition du microbiote digestif

1.2.1. Variabilité entre études et effets confondus entre différents facteurs de variation

Parmi les nombreux facteurs pouvant influencer la composition du microbiote dans le tube digestif chez le porc, il est possible de différencier les facteurs liés à l'hôte des facteurs liés à son environnement d'élevage. Cependant, la grande variabilité entre les méthodes d'analyse utilisées dans les différentes études complique la comparaison de leurs résultats. Par exemple,

l'étude de la composition du microbiote à partir du séquençage du gène de l'ARN 16S peut s'intéresser à différentes régions de ce gène, donnant des résultats légèrement différents (Huse et al., 2008). En amont du séquençage, les méthodes d'extraction et d'amplification de l'ADN par PCR donnent des résultats légèrement différents d'une copie à une autre d'un même échantillon (Sinclair et al., 2015). Ces biais techniques concourent à introduire de la variabilité entre les études.

De plus, certains facteurs testés peuvent être confondus avec d'autres facteurs de variation, connus pour impacter le microbiote intestinal. Ainsi, la comparaison de la composition microbienne entre deux types sexuels ou deux types génétiques peut mettre en évidence des différences d'abondance bactérienne. Or ces différences d'abondance peuvent être liées aux effets directs des facteurs testés mais également à des effets indirects liés, par exemple, à des différences de niveau d'ingestion, de comportement alimentaire, de morphologie etc., eux-mêmes pouvant impacter la composition microbienne (Rist et al., 2012). Sachant que les niveaux d'ingestion ne sont généralement pas décrits dans les articles scientifiques ne traitant que de microbiote, il n'est alors pas possible de déterminer si la différence d'abondance résulte de ces effets directs ou indirects.

Plus généralement, de nombreux facteurs de variation sont confondus et entraînent de fortes disparités, notamment dans les proportions de bactéries associées à chaque phylum. Ainsi, une première étude identifie plus de 90% des bactéries de l'iléon au phylum *Firmicutes* (Looft et al., 2014) tandis qu'une seconde étude ne distingue que 19% de *Firmicutes* et 80% de *Proteobacteria* (Zhao et al., 2015). Entre ces deux études, les conditions d'élevage, les régimes alimentaires, les âges diffèrent. Il est donc indispensable d'analyser les compositions microbiennes en tenant compte des possibles facteurs de variation animaux et environnementaux.

1.2.2. Facteurs de variation de la composition du microbiote liés à l'animal

1.2.2.1. Effet de l'âge sur le microbiote intestinal

Chez le porc, l'évolution du microbiote selon l'âge peut être analysée en différenciant trois grandes périodes dans la vie productive de l'animal : l'allaitement, la période du sevrage et l'engraissement.

Naissance et allaitement : acquisition du microbiote

A la naissance, le tube digestif d'un mammifère est considéré stérile, la possibilité d'un début de colonisation in utero par des bactéries issues du tube digestif de la mère étant controversée (Jiménez et al., 2008; Perez-Muñoz et al., 2017). Le jeune mammifère acquiert son premier microbiote quand il est mis en contact ou ingère des bactéries présentes dans son environnement (vulve et mamelle de la truie, lait, excréments de sa mère, de ses frères et sœurs de portée, etc.). Il semble que l'environnement a un impact plus important sur la composition du microbiote des porcelets que la génétique de la mère. En effet, plusieurs études n'ont pas démontré d'effet génétique de la mère sur la composition du microbiote de porc (Thompson et al., 2008; Mach et al., 2015). Il est difficile de distinguer un effet génétique de la mère sur la composition du microbiote d'une simple transmission par contact de la mère à sa progéniture. Pour cela, Bian et al. (2016) ont comparé des porcelets de deux races (effet génétique de la mère) ayant été allaités par leur mère biologique ou par une mère d'adoption de l'autre race. Ils ont ainsi pu montrer que la race et un facteur « adoption » ont tous les deux un impact sur la composition du microbiote des porcelets avant sevrage.

Chez les porcelets 2 jours après la naissance, le microbiote est dominé par des *Escherichia coli* et des *Lactobacillus* (Konstantinov et al., 2006; Schokker et al., 2018). La composition microbienne évolue très tôt durant la phase d'allaitement : une abondance relative de 9,0% d'*E. coli* dans le jéjunum à 2 jours d'âge est réduite à 1,9% dès 14 jours d'âge, de même que l'abondance en *Streptococcus* passe d'environ 2,5% suivant les espèces bactériennes à moins de 1,0% (Schokker et al., 2018). Ces tendances moyennes cachent des différences interindividuelles importantes. Chez l'homme, chaque enfant développe un microbiote unique et le rythme de colonisation est différent pour chaque bactérie suivant l'individu (Palmer et al., 2007). De manière similaire chez le porcelet, les différences individuelles de composition microbienne au niveau du côlon observées 24 h après la naissance sont conservées à 21 jours d'âge lorsque les animaux sont élevés dans des isolateurs afin d'éviter toute influence de l'environnement (Merrifield et al., 2016). Chez le porc, cette variabilité interindividuelle de la composition du microbiote digestif à la naissance observée pourrait être en partie liée à des différences de poids vifs à la naissance. Ainsi, Li et al. (2018) montrent que des porcelets présentant un faible poids de naissance ont une faible abondance en *Faecalibacterium* à trois jours d'âge et une faible abondance en *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Prevotella* à 21 jours d'âge. Selon ces auteurs, ces variations d'abondances pourraient se traduire par des

différences dans le métabolisme des lipides et des acides aminés. L'évolution de la composition du microbiote du porc en fonction de son âge est décrite dans la Figure I-2. Cette synthèse des résultats de la littérature montre qu'avant le sevrage, le microbiote fécal porcine est composé en moyenne à 41% de *Firmicutes*, 46% de *Bacteroidetes*, 7% de *Proteobacteria* et 4% de *Spirochaetes*.

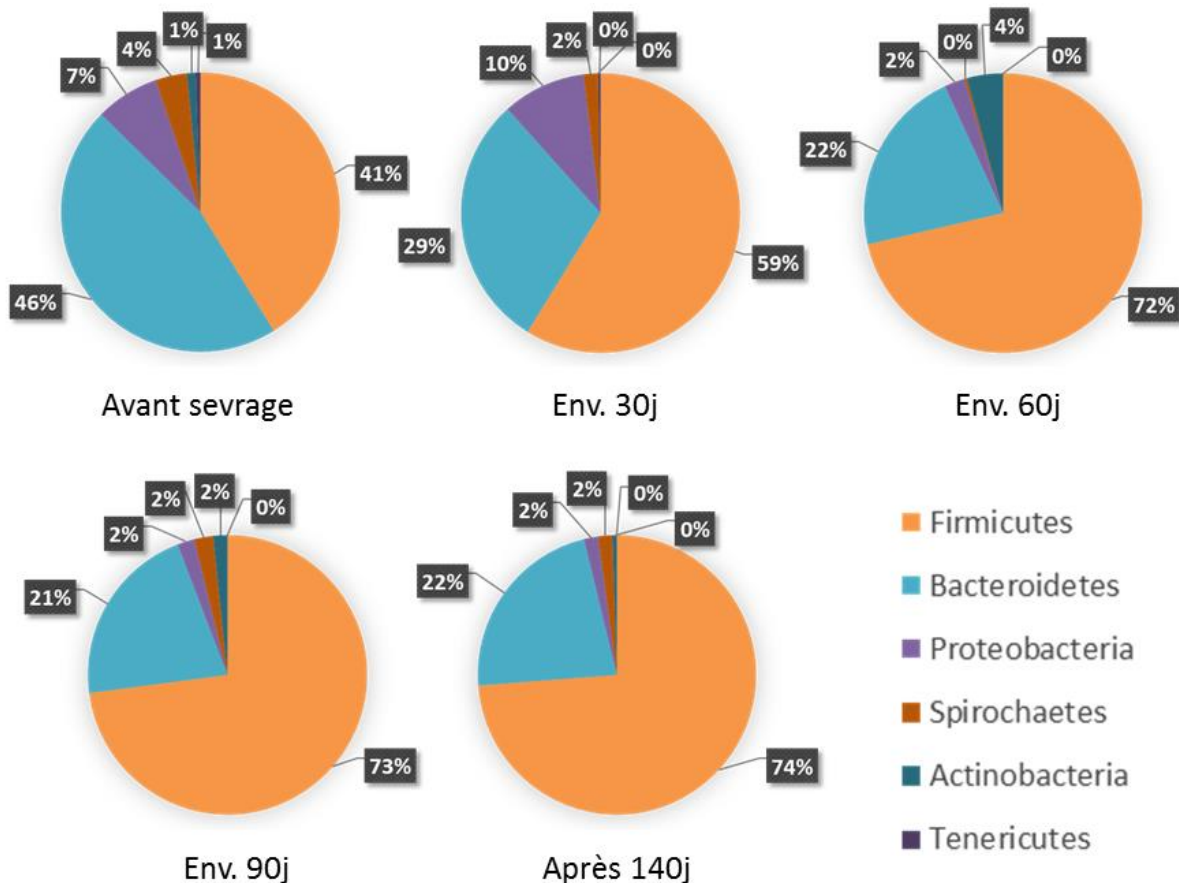


Figure I-2 : Abondance relative par phylum suivant l'âge dans des fèces de porcs.

Les données sont issues de différentes publications : avant sevrage (Guevarra et al., 2018; Han et al., 2018; Lu et al., 2018), à environ 30 j (Niu et al., 2015; Zhao et al., 2015; Guevarra et al., 2018), à environ 60j (Niu et al., 2015; Zhao et al., 2015; Han et al., 2018), à environ 90 j (Niu et al., 2015; Zhao et al., 2015; Han et al., 2018; Lu et al., 2018), après 140 j d'âge (Niu et al., 2015; Zhao et al., 2015; Han et al., 2018; Lu et al., 2018).

Concernant l'évolution de la diversité microbienne (définie dans la partie Matériel et Méthodes) pendant la phase d'allaitement, les résultats sont beaucoup moins clairs : les études présentent des résultats très divers avec des indices de Shannon variant de $2,14 \pm 0,21$

(Schokker et al., 2018) à 5,45 (Schokker et al., 2014) dans l'intestin grêle et de $3,12 \pm 0,06$ (Schokker et al., 2018) à $4,70 \pm 0,25$ (Zhang et al., 2019) dans le gros intestin.

Sevrage : bouleversement de la composition du microbiote

Pour les porcelets, le sevrage est une période particulièrement critique du fait du stress causé par l'exposition à de nouveaux congénères mais surtout à cause du changement d'alimentation (lactée vers solide) et ses conséquences sur la structure et le fonctionnement du tube digestif (Guevarra et al., 2019). Comme pour les autres mammifères, les bactéries ayant colonisé les différents segments intestinaux lors de l'allaitement sont exposées à un nouveau substrat, ce qui entraîne des modifications dans la composition du microbiote intestinal. Durant cette période transitoire, une légère baisse de la diversité peut être observée chez le porcelet (Pollock et al., 2018) et l'abondance en *Enterobacteriaceae* peut augmenter (Yang et al., 2015). De nombreuses bactéries pathogènes appartiennent à cette famille, notamment certaines appartenant à *Escherichia coli*, et pourraient être à l'origine des problèmes sanitaires (diarrhées) rencontrés à cette période.

Dans les premiers jours suivant le sevrage, la quantité d'aliment ingérée par le porcelet est très fortement réduite. De plus, la nouvelle alimentation solide est nettement moins riche en énergie mais plus riche en protéines et polysaccharides complexes. Le microbiote se diversifie, se complexifie, afin de s'adapter au nouveau régime (Holman and Chénier, 2014; Niu et al., 2015). Aussitôt après sevrage, l'abondance en *Prevotella* (Pollock et al., 2018) et en *Lactobacillus* augmente (Guevarra et al., 2018). L'augmentation de l'abondance en *Prevotella* serait probablement due à la capacité de ces bactéries à produire des enzymes qui clivent les polysaccharides des parois végétales (Flint et al., 2008), présentes en plus grande quantité dans le nouveau régime alimentaire.

Post-sevrage et après

Trois semaines après le sevrage, la diversité microbienne augmente (Holman and Chénier, 2014; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2015) et le nombre d'espèces microbiennes observées peut être multiplié par 2,5 (Holman and Chénier, 2014). Ceci pourrait provenir de la diversification progressive des matières premières utilisées dans la fabrication des régimes alimentaires. La composition du microbiote évolue pour se stabiliser vers 3 mois d'âge (Zhao et al., 2015; Han et al., 2018) (Figure I-2). Cette apparente stabilité est conditionnée à l'absence de perturbation environnementale. En moyenne, chez des porcs en croissance de 60

à 190 jours d'âge, le microbiote fécal est largement dominé par les *Firmicutes* (73%) et les *Bacteroidetes* (22%) (Figure I-2). Les autres phyla sont minoritaires (Looft et al., 2014). A l'échelle des genres, de fortes évolutions sont observées avec l'âge. En particulier, les abondances en *Prevotella*, *Streptococcus* et *Clostridium* augmentent ; à l'inverse, les abondances en *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Enterobacteria* diminuent (Dicksved et al., 2015; Mach et al., 2015; Han et al., 2018; Lu et al., 2018). Chez des truies adultes, les *Prevotella* et *Oscillospira* représentent 50% du microbiote fécal (Kubasova et al., 2017). Une étude comparative de la composition microbienne fécale entre des truies multipares vides non allaitantes et des porcs de 150 jours d'âge a identifié 11% d'OTU spécifiques aux truies (Niu et al., 2019), suggérant une légère différence de composition microbienne. Cependant, il est difficile d'évaluer l'impact de l'âge dans cette étude, les prélèvements ayant été réalisés sur des animaux différents et n'ayant pas reçu le même régime alimentaire.

1.2.2.2. Effet du sexe sur le microbiote intestinal

En se basant sur les résultats publiés dans la littérature, les effets du type sexuel sur la composition ou la diversité du microbiote sont variables. Chez la souris, il a été démontré que la composition microbienne intestinale pouvait être partiellement influencée par les hormones sexuelles (Org et al., 2016). Chez le porc, aucune différence de composition microbienne à l'échelle des genres, des OTU et des fonctions biologiques n'a été observée entre mâles castrés et femelles (Xiao et al., 2016; Verschuren et al., 2018). Cependant, les mâles entiers peuvent être discriminés des femelles par leur abondance en *Bifidobacterium* et *Butyricoccus pullicaecorum* (Verschuren et al., 2018). Il arrive que ces différences entre sexes disparaissent, probablement suite à l'effet d'autres facteurs environnementaux tels que le stress du sevrage et le changement d'alimentation (Han et al., 2018). En termes de diversité, les résultats sont variables selon les études. Yang et al. (2017) identifient une plus grande diversité chez des porcs femelles de 140 jours d'âge (environ 575 OTU observées) comparée à celle des mâles entiers (environ 530 OTU observées) (H. Yang et al., 2017) alors que Verschuren et al. (2018) ne montrent aucune différence de diversité liée au type sexuel.

1.2.2.3. Effet du type génétique sur le microbiote intestinal

Variabilité inter types génétiques

La composition du microbiote digestif du porc selon le type génétique est décrite dans la littérature (Table I-3). Malheureusement, peu d'études comparent plusieurs races dans les mêmes conditions expérimentales. Quelle que soit la race, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* prédominent. Cependant, il existe une variabilité importante inter et intra-type génétique. Par exemple, chez des porcs Large White, l'abondance en *Firmicutes* varie de 35 à 92% suivant les études (Table I-3). Ces résultats montrent qu'il est difficile d'étudier un effet race ou génétique indépendamment de facteurs externes (environnement sanitaire, conduite alimentaire, historique de l'animal...). Parmi les nombreux facteurs confondants, des différences de niveau d'ingestion et de comportement alimentaire peuvent expliquer les variations dans la composition microbienne. C'est notamment le cas lors d'une comparaison entre porcs de race Piétrain et Large White. Par ailleurs, les animaux de races différentes étudiés dans un même essai proviennent généralement d'élevages différents ou peuvent être élevés dans des cases séparées avec des conséquences potentielles sur la composition microbienne (Pajarillo et al., 2014).

Même si le microbiote intestinal d'un animal est façonné par ses interactions avec l'environnement, une part de la variation de sa composition pourrait avoir une origine génétique. Les différences de microbiote fécal issu de trois races porcines (Tibetan, Yorkshire et Rongchang) sont partiellement retrouvées après transplantation chez des souris (Diao et al., 2016) ce qui pourrait supporter cette hypothèse. Cependant, dans cette étude, il semble que les trois races proviennent en réalité de trois fermes différentes. Cette étude confirme la difficulté d'évaluer l'impact du type génétique sur la composition du microbiote indépendamment de la multitude des autres facteurs de variation.

Table I-3: Abondance relative (%) par phylum suivant la race dans des fèces de porcs de plus de 84 jours d'âge.

Référence	Race	Abondance relative par phylum (%)					
		<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Tenericutes</i>
Diao et al. (2016)	Large White	35,3	50,8	3,3	5,2	0,2	0,8
Pajarillo et al. (2014)	Large White	42,0	51,4	3,4	1,9	0,1	0,5
Zhao et al. (2015)	Large White	91,8	4,9	2,0	0,6	0,0	nc
Pajarillo et al. (2014)	Landrace	45,6	47,6	1,3	3,4	0,1	0,6
Pajarillo et al. (2014)	Duroc	39,6	57,0	2,0	0,5	0,2	0,3
Pajarillo et al. (2015)	Duroc	54,5	39,7	1,4	0,6	nc	1,4
Kanengoni et al. (2015)	Large White x Landrace	75,1	6,9	nc	13,9	nc	nc
Han et al. (2018)	Duroc x (Landrace x Large White)	44,7	47,9	0,9	2,6	nc	nc
Lu et al. (2018)	Duroc x (Landrace x Large White)	74,9	18,1	1,7	1,5	1,0	0
Diao et al. (2016)	Tibetan	39,2	36,3	3,3	15,3	0,1	0,4
Diao et al. (2016)	Rongchang	45,4	34,1	2,8	11,8	0,2	0,9

nc : non communiqué

Variabilité intra type génétique

La variabilité intra type génétique peut être évaluée par le calcul de l'héritabilité qui représente, pour une population donnée, la part de la variance génétique dans la variation totale d'un caractère. Actuellement, peu de travaux ont quantifié l'héritabilité de la composition du microbiote chez le porc. Estellé et al. (2016) indiquent que 19 genres bactériens présentent des héritabilités significatives allant de $0,13 \pm 0,10$ à $0,55 \pm 0,16$ respectivement pour les *Streptococcus* et les *Ruminococcus*. Les causes de cette variabilité de l'héritabilité de l'abondance des différentes populations bactériennes ne sont pas connues. Une héritabilité significativement différente de zéro pour l'abondance en *Clostridium coccoïdes* rapportée à l'abondance en *Lactobacillus* a été calculée chez des volailles ($h^2 = 0,10$) (Mignon-Grasteau et al., 2015). Dans cette étude, les héritabilités de l'abondance de chaque genre ne sont pas significatives ($h^2 = 0,04$ et $0,07$ pour *Clostridium coccoïdes* et *Lactobacillus*, respectivement). De même, Zhao et al. (2013) n'ont calculé aucune héritabilité d'abondances microbiennes significative, probablement dû en partie au faible effectif étudié.

Des héritabilités significatives supposent qu'une partie de la variation de la composition du microbiote a une origine génétique. Dans une étude utilisant des porcs clonés (et donc partageant le même matériel génétique), il n'a pas été démontré que la variabilité phénotypique interindividuelle de la composition microbienne variait par rapport à des animaux non clonés élevés dans les mêmes conditions (Pedersen et al., 2013). Ceci pourrait signifier que la part de la variation d'origine génétique sur la variabilité du microbiote entre individus est relativement faible ou suggère un poids relatif important de l'environnement dans cette variabilité.

1.2.3.Facteurs de variation de la composition du microbiote liés à l'environnement

Le microbiote intestinal est un écosystème dans lequel de nombreuses bactéries cohabitent. En l'absence de perturbations extérieures, l'écosystème est stable. Lorsque l'environnement d'élevage (environnement sanitaire, alimentation...) change ou en cas d'antibiothérapie (cf. partie 1.2.3.1), le microbiote peut dévier de son état stable avec des conséquences potentielles sur le métabolisme de l'hôte. Dans ce cas, on parle de dysbiose. La durée et la sévérité d'une dysbiose varie selon la nature et la sévérité de la perturbation. La

dysbiose peut être transitoire et rapide notamment dans le cas d'un épisode de diarrhée. À l'inverse, la dysbiose peut perdurer comme chez l'homme où il a été observé que l'obésité, le diabète de type II et l'athérosclérose sont des syndromes de dérégulation métabolique, en partie associés à une modification prolongée du microbiote intestinal (Jin et al., 2013).

En production porcine, des dysbioses peuvent provenir de changements dans la conduite alimentaire (nature ou quantité d'aliment), de l'utilisation d'antibiotiques, prébiotiques, probiotiques, de modifications des conditions sanitaires de l'élevage ou toutes autres situations de stress subies par les animaux. Une dysbiose n'entraîne pas systématiquement de conséquences négatives pour l'hôte. Ces différents éléments seront développés dans la partie suivante.

1.2.3.1. Conduite alimentaire

Au cours de sa vie productive, le porc reçoit différents régimes alimentaires adaptés à l'évolution de ses besoins nutritionnels. Ces aliments sont formulés principalement à partir de céréales (blé, orge, maïs), de tourteaux d'oléo-protéagineux (tourteaux de soja, colza, tournesol), de protéagineux (pois, féverole) et de différents coproduits (sons, remoulages, drèches, etc.) (IFIP, 2013). Ces aliments composés apportent les nutriments nécessaires à la croissance ou à la reproduction des animaux (énergie, acides aminés, minéraux, vitamines, etc.). Une part non négligeable de l'énergie absorbée par l'hôte provient des produits de fermentations des polysaccharides indigestibles par les populations bactériennes présentes dans le gros intestin (Rérat, 1996; Anguita et al., 2006). Ces fermentations varient selon des caractéristiques propres à l'animal (type génétique, stade physiologique, etc.) ainsi que par le niveau d'ingestion, la composition de l'aliment et en particulier la nature et quantité de fibres ingérées.

Impact de la composition de l'aliment

Les fibres alimentaires sont définies comme étant des polymères glucidiques composés de 10 unités monomériques ou plus, qui ne sont pas hydrolysés par les enzymes endogènes présentes dans l'intestin grêle des monogastriques (FAO, 2017). Ces polymères glucidiques sont classés en oligosaccharides ou polysaccharides. Parmi ces polysaccharides se trouvent l'amidon résistant et les constituants principaux des parois végétales tels que la pectine, la cellulose et l'hémicellulose (polysaccharides amyliques solubles ou insolubles) (Figure I-3). Entre 30 et 70% de l'amidon résistant est dégradé en acides gras volatiles (AGV) par les

bactéries dans le côlon puis absorbé par l'hôte (Fuentes-Zaragoza et al., 2010). Les fibres solubles sont plus rapidement fermentées dans le tractus digestif par les bactéries commensales que les fibres insolubles pour lesquelles aucune fermentation ou presque n'est réalisée dans l'intestin grêle (Agyekum and Nyachoti, 2017).

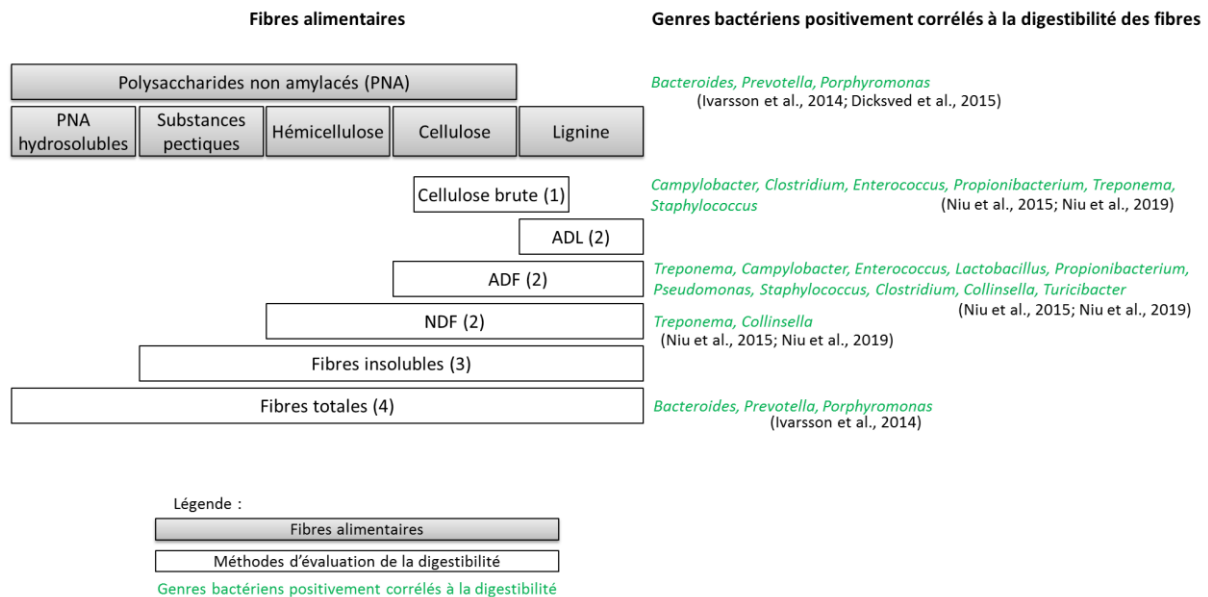


Figure I-3 : Composition des fibres alimentaires, méthodes de dosage et action du microbiote sur la digestibilité des différents éléments.

Adapté de (Gidenne, 1996).

Méthodes de caractérisation chimique de la nature des polysaccharides complexes :

(1) Méthode de Weende (1850)

(2) NDF : neutral detergent fiber ; ADF : acid detergent fiber ; ADL : acid detergent lignin (Van Soest and Wine, 1967)

(3) (Carré et al., 1989)

(4) (Prosby et al., 1985)

Table I-4: Variations du microbiote suivant l'aliment ingéré par le porc.

Type de fibre Aliment	Impact sur le microbiote	Référence
Amidon résistant		
Amidon de pomme de terre (vs. amidon de maïs)	= Diversité (Shannon, Simpson) ↗ <i>Turicibacter</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Blautia</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Prevotellaceae</i> ...	Sun et al. (2015)
	↘ <i>Clostridium</i> , <i>Treponema</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> , ...	
	= Diversité ↗ <i>Turicibacter</i> , <i>Blautia</i> spp., <i>Ruminococcus</i> spp.	Sun et al. (2016)
	↘ <i>Sarcina</i> , <i>Clostridium</i>	
Amidon de maïs et amidon de pomme de terre (vs. farine de blé)	= <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> , groupe <i>Blautia coccooides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.	Nielsen et al. (2014)
Amidon de maïs (vs. riz cuit)	↗ <i>Bacteroides</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.	Durmic et al. (1998)
	↘ <i>Lactobacilli</i>	
Amidon de tapioca (vs. amidon de pomme de terre pré-gélatinisé)	= Fonctions liées à la dégradation de l'amidon ou d'autres polysaccharides ↗ <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Veillonellaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Prevotellaceae</i>	Umu et al. (2015)
	↘ Diversité (Shannon), <i>Clostridiaceae</i>	
	↗ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Enterococcus</i> , <i>Dialister</i> , <i>Mitsuokella</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	Haenen et al. (2013a)
	↘ <i>Firmicutes</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Pseudomonas</i> , ...	
	= Diversité (Shannon, Simpson) ↗ Uncultured <i>Clostridia</i> IV, <i>Rhodobacter</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Faecalibacterium</i> spp., <i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Eubacterium</i> spp., <i>Fusobacterium</i> , <i>Betaproteobacteria</i> spp.	Haenen et al. (2013b)
	↘ <i>Streptococcus</i> spp., <i>Gammaproteobacteria</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Clostridium cluster XIVa</i> spp., Uncultured <i>Spirochaetes</i> , ...	

Table I-4 (suite) : Variations du microbiote suivant l'aliment ingéré par le porc.

Type de fibre Aliment	Impact sur le microbiote	Référence
Cellulose et hémicellulose		
Farine de luzerne déshydratée (vs. maïs et graines de soja)	= Nombre de bactéries ↗ Bactéries cellulolytiques	Varel et al. (1984)
Hémicellulose		
Blé, son de blé (vs. farine de blé)	↗ <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Clostridium Leptum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ↘ <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Roseburia</i>	Heinritz et al. (2016b)
Flocons de seigle et son de blé traité par enzymes (vs. farine de blé)	↗ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> , groupe <i>Blautia coccooides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.	Nielsen et al. (2014)
Polysaccharide non amylic soluble		
Chicorée sauvage (vs. mélange de blé, orge et avoine)	↘ <i>Prevotellaceae</i>	Dicksved et al. (2015)
Gomme		
Gomme de guar (vs. riz cuit)	↗ <i>Eubacterium</i> spp. ↘ <i>Lactobacilli</i>	Durmic et al. (1998)

La Table I-4 décrit l'impact de la nature des fibres alimentaires sur la composition microbienne intestinale du porc d'après les résultats publiés dans la littérature. La composition du microbiote intestinal des porcs varie suivant la composition du régime, sans que la diversité du microbiote soit impactée (Haenen et al., 2013b; Sun et al., 2015; Sun et al., 2016; Verschuren et al., 2018). Une augmentation de la quantité d'amidon résistant entraîne notamment une augmentation des abondances en *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae* et une diminution des *Lactobacillus* spp. (Haenen et al., 2013b; Sun et al., 2015; Umu et al., 2015; Sun et al., 2016). A l'inverse, l'abondance en *Lactobacillus* spp. augmente avec la teneur en hémicellulose (Nielsen et al., 2014; Heinritz et al., 2016b). Les différences observées pour un même type de fibres issues de la même matière première peuvent dépendre du régime utilisé comme témoin (Table I-4). Ainsi, selon la nature de la céréale utilisée dans le régime témoin (riz cuit ou farine de blé), l'impact d'un régime riche en amidon de maïs sur l'abondance en *Lactobacilli* est différent (Durmic et al., 1998; Nielsen et al., 2014). De plus, suivant la matière première, l'impact de l'origine des fibres sur le microbiote intestinal peut différer. Ainsi, l'apport de pectine par deux sources différentes entraîne des modifications différentes de la composition microbienne avec notamment quatre fois plus de *Prevotellaceae* et onze fois moins de *Megasphaera* dans les fèces dans le cas d'un régime à base de fourrage de luzerne comparé à de la pulpe de betterave (Ivarsson et al., 2014).

L'impact de l'alimentation, en particulier de la nature et de la composition des fibres, sur la composition du microbiote peut s'expliquer de différentes manières. L'augmentation des fermentations bactériennes et la production d'AGV liée à l'augmentation de la teneur en fibres alimentaires entraîne une diminution du pH dans tous les segments intestinaux (Ngoc et al., 2012). Cette modification des conditions de milieu dans lequel se développent les populations bactériennes pourrait expliquer une partie de la variation de leur composition. En effet, *in vitro*, les populations qui produisent du lactate (ex : *Streptococcus*) sont dominantes dans des cultures en milieu acide (pH = 6,0) par rapport à des populations qui produisent de l'acétate ou du propionate (ex : *Veillonella*, *Bacteroides*, *Escherichia*). Ces dernières sont dominantes dans des milieux plus basique avec un pH compris entre 6,5 et 6,9 (Ilhan et al., 2017).

Plus généralement, la variation de l'apport en fibres modifie la composition de l'aliment (réduction des apports en amidon, en matières grasses et en protéines) et donc la composition du substrat avec lequel les bactéries sont en contact. Etant donné la spécificité de certaines

bactéries pour fermenter certains substrats, elles peuvent ne plus se trouver dans des conditions favorables à leur développement. C'est le cas de *Ruminococcus flavefaciens* qui fermente la cellulose mais pas le glucose, tandis que *Bacteroides succinogenes* dégrade ces deux substrats. Dans cet exemple, *B. succinogenes* pourrait se développer dans un milieu riche en glucose contrairement à *R. flavefaciens* (Varel et al., 1984).

Deux études chez la souris démontrent qu'une nouvelle composition de microbiote est mise en place dès les premiers jours suivant une transition alimentaire et que la plupart des changements microbiens sont réversibles lors d'un retour au régime alimentaire initial (Carmody et al., 2015; Sonnenburg et al., 2016). Cependant, certaines abondances microbiennes initiales peuvent n'être que partiellement retrouvées comme c'est le cas pour des souris de retour à un régime riche en fibres après 7 semaines d'exposition à un régime pauvre en fibres : seuls 28% des OTU retrouvent leur abondance initiale (Sonnenburg et al., 2016). Un nouvel état stable est atteint durant les 6 semaines suivantes. Chez le porc, un équilibre compositionnel et fonctionnel du microbiote intestinal est atteint 3 semaines après une transition alimentaire entre un aliment standard et des aliments à base de maïs et farine de soja ou à base de maïs et pois (Tilocca et al., 2017). Cependant, aucune étude ne s'est actuellement intéressée à l'impact à court et à long terme de changements répétés de régime alimentaire sur la composition microbienne fécale des porcs.

Impact du niveau d'ingestion et de la présentation de l'aliment

La composition du régime alimentaire n'explique qu'une partie de la variation de composition du microbiote. Chez le porc, seulement 16% de la variance de la composition du microbiote est expliquée par une variation de la composition de l'aliment (Haenen et al., 2013a). D'autres facteurs tels que la forme de présentation de l'aliment ou le fractionnement des apports alimentaires pourraient également influencer la composition du microbiote. Chez le porc, une présentation de l'aliment sous forme de farine avec de grosses particules comparativement à des granulés entraîne une augmentation du nombre et de la proportion de *Bifidobacterium* et une diminution de l'abondance en *Salmonella* (Lebel et al., 2017). Concernant la restriction alimentaire, une réduction de l'ingéré chez le mouton est liée à une diminution de la masse de bactéries associées à la fraction solide dans le rumen (Rodríguez et al., 2003). Chez le poulet, la quantité d'aliment ingérée est positivement corrélée à l'abondance en *Turicibacter* et négativement corrélée à l'abondance en *Lactobacillus* (Siegerstetter et al., 2018). En production porcine, certaines conduites alimentaires visent à

rationner l'animal pour limiter un dépôt de gras excessif en fin d'engraissement. L'impact de cette restriction sur la composition du microbiote porcine est actuellement peu documenté. Le Floch et al. (2014) montre une augmentation de l'abondance en *Lactobacillus* chez des animaux restreints. Pour des conditions expérimentales relativement similaires, une diminution de l'abondance de cette famille bactérienne est observée par Rist et al. (2012). La différence d'âge et de niveau de restriction appliquée dans ces deux expérimentations pourrait en partie expliquer ces effets contradictoires. Cependant, dans ces deux études, l'abondance relative en *Clostridium* est augmentée en cas de restriction alimentaire.

Impact des mycotoxines au travers du déoxynivalénol

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des champignons. En particulier, le déoxynivalénol (DON) est produit par *Fusarium* spp. Cette mycotoxine est présente naturellement dans les céréales telles que le blé ou le maïs [entre 50 et 60% des cultures sont contaminées (Schatzmayr and Streit, 2013)] et est donc incorporée dans les aliments en même temps que ces céréales qui constituent une part importante (40-60%) des régimes alimentaires porcins. La mycotoxine DON est toxique pour l'animal qui l'ingère. Cette toxicité s'illustre par des dommages au niveau des cellules épithéliales intestinales, une réponse inflammatoire, une détérioration de la santé et l'apparition de diarrhées (Bouhet and Oswald, 2005; Sobrova et al., 2010). Ces perturbations entraînent une réduction des performances des animaux souvent médiée par une forte diminution de l'ingestion alimentaire.

Dans une expérience *in vitro* réalisée sur des fèces de porc, aucun changement visible de la composition microbienne n'a été observé suite à une exposition à DON (Eriksen et al., 2002). Peu d'études *in vivo* chez le porc évaluent l'impact de l'ingestion de DON sur la composition du microbiote intestinal. D'après Reddy et al. (2018a), la diversité microbienne n'a pas été modifiée. En revanche, les effets sur la composition microbienne varient suivant les études. D'après Waché et al. (2008), la composition microbienne n'est pas modifiée à la suite d'une exposition courte à DON (< 14 jours). Après 4 semaines d'exposition à DON, seule l'abondance en bactéries aérobies mésophiles est augmentée. Une seconde étude sur des porcs recevant un aliment contaminé par DON durant 4 semaines montre une augmentation de l'abondance en *Lactobacillus* (7,6% vs. 0,2% en situation témoin) et une diminution des abondances en *Faecalibacterium* (0,7% vs. 1,3%) et *Clostridiaceae* (0,6% vs. 2,1%) (Reddy et al., 2018a). L'impact limité d'une exposition à DON sur la composition microbienne

intestinale pourrait être en partie expliqué par la rapide élimination de DON par absorption intestinale et excrétion dans les urines (Prelusky et al., 1988; Eriksen et al., 2003; Dänicke et al., 2004; Nagl et al., 2014), ce qui limite l'exposition du microbiote lui-même à DON. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'intéresse à l'impact d'expositions répétées à DON sur les évolutions à court et long termes de la composition microbienne intestinale chez le porc.

Impact des antibiotiques

Les traitements antibiotiques dans les élevages porcins impactent la composition microbienne. En effet, les antibiotiques sont par définition des agents détruisant ou inhibant la croissance des microorganismes. Bien que l'utilisation d'antibiotiques ait fortement diminué ces dernières années, ces molécules restent notamment utilisées au moment du sevrage, parfois en prévention de l'impact d'un changement d'alimentation sur la santé intestinale. L'effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal est variable. Il dépend de l'antibiotique utilisé, de la dose administrée, du mode d'administration, de l'animal étudié et de la période de traitement (Zeineldin et al., 2019). Dans tous les cas, des changements importants sont visibles au niveau de l'abondance des différentes populations bactériennes du microbiote intestinal.

Certaines études montrent que suite à un traitement antibiotique (mélange de chlorotétracycline, sulfaméthazine et pénicilline), le microbiote est moins diversifié (Allen et al., 2011) tandis que d'autres antibiotiques (ex : chlorotétracycline) n'entraînent pas de différence de diversité (Allen et al., 2011; Holman and Chénier, 2014). Bien que la diversité ne soit pas impactée, l'abondance de certaines bactéries peut varier notamment lors d'un traitement à la chlorotétracycline qui diminue l'abondance en *Lactobacillus* chez le porc (Holman and Chénier, 2014). De même, l'administration de lincomycine à des porcelets au sevrage entraîne une diminution du nombre de bactéries coliformes potentiellement pathogènes (Namkung et al., 2004). Lorsque plusieurs antibiotiques sont administrés en même temps, de forts changements d'abondance microbienne peuvent être observés : diminution des *Lactobacillus*, augmentation des *Streptococcus* et diminution des *Prevotella* dans le cas d'une administration combinée de olaquinox, oxytétracycline et kitasamycine (Mu et al., 2017). La réaction microbienne aux antibiotiques diffère suivant la localisation dans le tube digestif avec notamment une augmentation de l'abondance en *Treponema* uniquement dans la lumière du colon ou de *Faecalibacterium* uniquement au niveau de la muqueuse iléale (Mu et al., 2017).

Les modifications de composition microbienne peuvent intervenir aussitôt après la prise d'antibiotiques ou à plus long terme. Ainsi chez le porc, l'antibiotique tylosine administré en concentration subthérapeutique modifie l'abondance de 26 OTU, dont une diminution des *Cyanobacteria* et *Fibrobacteres*, et une augmentation des *Streptococcus* et des *Coprococcus* en début de traitement (Holman and Chénier, 2014). Après 21 jours de traitement, ces modifications sont suivies d'une diminution des proportions de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes* (Holman and Chénier, 2014).

1.2.3.2. Environnement d'élevage

L'environnement physique de l'élevage peut avoir des effets importants sur le microbiote de l'hôte. White et al. (2019) montrent que le microbiote présent dans la poussière des élevages porcins varie d'un bâtiment à l'autre au sein d'une même ferme ainsi que d'une ferme à l'autre. Ceci pourrait impacter la composition du microbiote intestinal des porcs de ces élevages. Par ailleurs, de fortes disparités de composition microbienne intestinale sont observées chez des porcs élevés en plein air comparativement à des contemporains élevés en bâtiment (Mulder et al., 2009). Ces auteurs montrent que des porcelets élevés en extérieur présentent un microbiote iléal enrichi en *Firmicutes* et *Lactobacillus*, appauvri en *Clostridia* (*Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*) et *Prevotellaceae* et exempt de *Bacteroidaceae*. En élevage extérieur comparativement à l'élevage en claustration, le microbiote semble être dominé par quelques grands phyla composés de bactéries connues pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé. Sur la base de l'étude des fonctions biologiques associées aux variations environnementales des abondances bactériennes, les animaux élevés en extérieur présentent une plus grande tolérance immunitaire et une réduction des réponses pro-inflammatoires (Mulder et al., 2009; Mulder et al., 2011). Ceci suggère un lien entre l'environnement des porcs, les conditions sanitaires et la composition de leur microbiote.

Des porcs élevés dans des conditions d'hygiène très contrôlées ne présentent pas la même évolution de la composition du microbiote au cours du temps comparé à des animaux élevés en ferme commerciale (Mulder et al., 2011). Un haut niveau sanitaire limite le nombre de micro-organismes présents dans l'environnement des porcs et limite ainsi la diversification du microbiote (Inman et al., 2010). Ainsi, des porcelets élevés dans des isolateurs exempts de pathogènes, et n'ayant donc été exposés à des micro-organismes que lors de leurs 24 premières heures de vie, présentent une composition microbienne intestinale à 12 et 28 jours d'âge moins diversifiée que leurs frères de portée restés sous la mère (Inman et al., 2010).

Chez des porcs en croissance, de bonnes conditions d'hygiène (nettoyage et désinfection quotidiens des cases) sont liées à une augmentation de l'abondance en *Blautia wexlerae*, *Turicibacter sanguinis* et *Butyricoccus* par comparaison avec des porcs élevés dans des conditions sanitaires dégradées (Le Floch et al., 2014).

Des bactéries potentiellement pathogènes sont présentes dans les élevages de porcs et peuvent être ingérées par les animaux. La colonisation par des bactéries pathogènes perturbe l'équilibre microbien intestinal et se répercute sur la santé de l'hôte. Ainsi, la baisse de diversité observée deux jours après une colonisation naturelle par *Salmonella Typhimurium* est associée à une forte diminution de bactéries bénéfiques pour la santé digestive de l'hôte (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) (Argüello et al., 2018). Ces perturbations peuvent aboutir à diverses maladies telles que les diarrhées post-sevrage. Dans ce cas, la colonisation par les bactéries pathogènes *Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens* est facilitée par le stress alimentaire (changement de la composition de l'aliment, réduction de l'ingestion) entraînant une dégradation de la fonction de barrière iléale et de la réponse immunitaire (Fairbrother et al., 2005; McLamb et al., 2013; Ruiz et al., 2016; Mesonero-Escuredo et al., 2018).

Avec les conditions sanitaires d'élevage, le climat est l'un des principaux facteurs affectant les performances des porcs. L'impact d'un stress thermique sur la composition du microbiote a très peu été étudié chez le porc. Dans une étude réalisée in vitro sur des fèces de porcs, une augmentation de la température de culture de 25 à 35°C entraîne une diminution de la diversité microbienne (Werner et al., 2014). L'impact de stress thermique a été davantage étudié chez les volailles ou les ruminants (Table I-5). Chez le canard, l'exposition à un stress thermique n'entraîne pas de modification de la diversité microbienne (He et al., 2019). Chez le poulet de chair, les effets de la température sur la composition du microbiote sont variables. Ainsi, lors d'une augmentation de température ambiante de 22 à 33°C, une réduction de l'abondance en *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et une augmentation de *Streptococci* et *Clostridium* ont été observées (Song et al., 2014) (Table I-5). Ces variations vont dans le sens d'une diminution de la santé digestive des animaux qui sera développée dans la partie 2.4.1. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Sohail et al. (2015) concernant les *Lactobacillus* et les *Clostridiaceae*. Ces différences pourraient provenir de différences de durée et de sévérité des périodes de stress thermique. Au sein d'une même étude, l'impact d'un stress thermique sur la composition microbienne fluctue dans le temps (Shi et al., 2019): l'abondance en *Firmicutes* augmente après 7 jours d'exposition à un stress thermique

chronique de 36°C en moyenne, diminue après 14 jours pour revenir au niveau de base après 28 jours. La variation de la composition du microbiote lors d'une exposition à la chaleur pourrait être liée à un effet direct de la température sur le microbiote ou à des effets indirects notamment à la suite d'une réduction de l'ingéré. Cependant, les études actuelles ne permettent pas de distinguer ces différents effets.

Table I-5: Variation du microbiote suivant le stress thermique.

Référence	Espèce	Stress		Humidité	Variation de la composition
		Nature	Niveau		
Lan et al. (2004)	Poulet (lignée nc)	Aigu	38°C pendant 48 h	55%	↘ <i>Lactobacillus</i>
Burkholder et al. (2008)	Poulet de chair	Aigu	30°C pendant 48 h	nc	↗ <i>Salmonella Enteritidis</i>
Song et al. (2014)	Poulet de chair	Chronique	33°C, 10 h/j pendant 20 j	70%	↘ <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i> ↗ bactéries coliformes et <i>Clostridium</i>
Sohail et al. (2015)	Poulet de chair	Chronique	35°C pendant 42 j	nc	↘ <i>Corynebacteriaceae</i> , <i>Aerococcaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Brevibacteriaceae</i> et <i>Streptococcaceae</i> ↗ <i>Lactobacillus</i>
Suzuki et al. (1983)	Poulet (lignée pondeuse)	Chronique	25°C ou 35°C	55%	↗ <i>Streptococci</i> , <i>Staphylococci</i> , <i>Peptococcaceae</i> et <i>Clostridia</i>
Zhu et al. (2019)	Poule pondeuse	Chronique	Entre 25,2 et 29,4°C en été	Entre 56 et 79%	↘ <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Turicibacter</i> ↗ <i>Bacteroides</i>
He et al. (2019)	Canard	Chronique	32°C, 8 h/j pendant 21 j	nc	↘ <i>Lactobacillus</i>
Suzuki et al. (1983)	Rat	Chronique	25°C ou 31°C	55%	↗ <i>Enterobacteria</i> et <i>Staphylococci</i>
Tajima et al. (2007)	Vache laitière	Chronique	20, 28 ou 33°C pendant 2 semaines	60%	Pas de modification du microbiote ruminal
Tajima et al. (2007)	Vache laitière	Chronique	20, 28 ou 33°C pendant 2 semaines	80%	Différence de composition du microbiote ruminal entre 20°C et les deux autres températures. Absence d'analyse taxonomique.
Chen et al. (2018)	Vache laitière	Aigu	3 jours d'exposition à un indice température-humidité de 80,5		Pas de différence significative d'abondance microbienne

nc : non communiqué

1.2.3.3. Environnement social

Le contact entre les animaux favorise le développement de flores microbiennes. Par l'exploration de son environnement, le porc est notamment en contact avec les fèces de ses congénères et peut en ingérer, enrichissant ainsi naturellement une partie de son microbiote intestinal. C'est le cas pour les porcelets au contact de leur mère. C'est aussi le cas entre porcs élevés dans une même case. Les animaux élevés ensemble présentent une plus grande similarité de composition du microbiote intestinal que ceux élevés dans des cases séparées (Thompson et al., 2008; H. Yang et al., 2017). Cependant, malgré les similarités, le microbiote de chaque individu reste relativement unique (H. Yang et al., 2017).

L'impact de la densité animale dans les cases d'élevage sur la composition du microbiote varie suivant les études. Après un mois de test sur des porcs mâles Duroc × (Landrace × Large White) d'environ 40 kg logés dans des cases de densité 2,46 m²/porc, 1,23 m²/porc ou 0,82 m²/porc, aucune différence significative de diversité microbienne n'a été observée (L. Li et al., 2017). Les différents groupes n'ont pas présenté de différences de composition microbienne dans le jéjunum, l'iléon ou le cæcum (L. Li et al., 2017). A l'inverse, chez le rat, une densité animale très élevée entraîne une augmentation du nombre de *Staphylococci*, *Corynebacteria*, *Streptococci*, *Bacteroidaceae* et *Peptococcaceae* dans l'iléon et les fèces (Suzuki et al., 1983). Dans ce cas, le développement de populations bactériennes potentiellement néfastes pour l'hôte pourrait être lié à un fort stress social.

2. Relation entre le microbiote intestinal et l'efficacité alimentaire (EA) de l'hôte

L'EA est un phénotype d'intérêt majeur en élevage porcin. Dans un contexte économique très compétitif où les charges liées à l'alimentation représentent plus de 60% des coûts de production (IFIP, 2017), l'EA reste un paramètre clé pour assurer la rentabilité des élevages. Outre l'impact économique, l'amélioration de l'EA est un levier important pour réduire les rejets d'éléments polluants (azote, gaz à effet de serre...) dans l'environnement et réduire la compétition pour l'accès aux ressources entre alimentation humaine et animale.

Depuis 30 ans, l'EA du porc est en constante augmentation grâce à la sélection génétique associée à des améliorations significatives dans la conduite (notamment alimentaire) des

animaux. En pratique, la sélection des porcs est réalisée dans des conditions d'élevage (niveau sanitaire, technicité des éleveurs, conditions climatiques...) souvent éloignées des conditions d'élevage de production. Il en résulte une détérioration de l'EA dans les conditions d'élevage commercial, d'autant plus importantes que les conditions de sélection et d'élevage sont éloignées. Dans ce contexte, la recherche d'une plus grande robustesse (définie comme la capacité d'un animal à exprimer son potentiel génétique dans une large gamme d'environnements) est une priorité pour améliorer l'efficacité globale de l'élevage. Parmi les facteurs environnementaux qui interagissent avec le potentiel génétique de l'animal, l'environnement sanitaire et le climat sont les plus importants à prendre en compte.

L'hôte et son microbiote agissent en complémentarité. L'hôte présente des conditions de vie favorables au développement de populations bactériennes, avec une température stable, un milieu anaérobie dans les intestins et la présence de nutriments. De son côté, le microbiote participe au maintien de la bonne santé du tube digestif et son activité fermentaire fournit des substrats énergétiques utilisables par l'hôte. L'étude de souris axéniques (c.-à-d. exemptes de flore microbienne) comparées à des souris conventionnelles a démontré qu'environ 10% des gènes exprimés par l'hôte sont régulés par le microbiote, notamment les fonctions liées à l'immunité, la prolifération cellulaire ou le métabolisme (Sommer et al., 2015). La complémentarité entre le microbiote intestinal et son hôte est telle qu'il est parfois question de « super-organisme » (Goodacre, 2007). Le microbiote se positionne alors comme un caractère potentiellement intéressant dans le cadre d'une sélection des animaux sur leur EA et/ou leur robustesse dans des environnements variés.

La suite de cette partie s'intéresse aux relations fonctionnelles entre le microbiote et l'EA de l'hôte. Dans un premier temps, le caractère « EA » et ses principales composantes seront décrits. Ensuite le rôle du microbiote dans la régulation hormonale de l'ingestion sera développé. Puis le rôle du microbiote dans la composante digestive de l'EA sera analysé au travers de son action sur le temps de transit, sur le développement du tube digestif et dans le maintien de la santé du tube digestif. Enfin le rôle du microbiote sur la composante métabolique de l'EA sera étudié à travers son implication dans les besoins d'entretien, dans le métabolisme des lipides et des protéines. Enfin, un dernier paragraphe détaillera comment piloter la composition du microbiote au bénéfice de l'hôte.

2.1. Relations générales entre microbiote et efficacité alimentaire

L'EA est définie comme le rapport entre le gain de poids et la quantité d'aliment ingéré sur une période donnée. En élevage, l'indice de consommation (IC) est utilisé préférentiellement à l'EA. Il représente la quantité d'aliment nécessaire à l'animal pour un gain marginal d'un kilogramme de poids vif et est donc égal à l'inverse de l'EA. Ainsi, plus la valeur d'IC est élevée, moins l'animal est efficace.

D'un point de vue énergétique, l'EA représente le ratio entre l'énergie retenue et l'énergie ingérée par l'animal. La décomposition de l'utilisation de l'énergie chez un porc en croissance de 50 kg est décrite dans la Figure I-4. Environ 40% de l'énergie ingérée est retenue par l'animal sous forme de tissus gras et maigres. Les 60% restant constituent des pertes d'énergie liées à ce que l'animal ne digère pas (pertes fécales : 11%) ou ne métabolise pas (pertes urinaires et gazeuses : 4%), ainsi que des pertes sous forme de chaleur liées à l'activité physique (10%), aux dépenses liées à l'utilisation digestive et métabolique de l'aliment (12%) et au métabolisme de base de l'animal (23%).

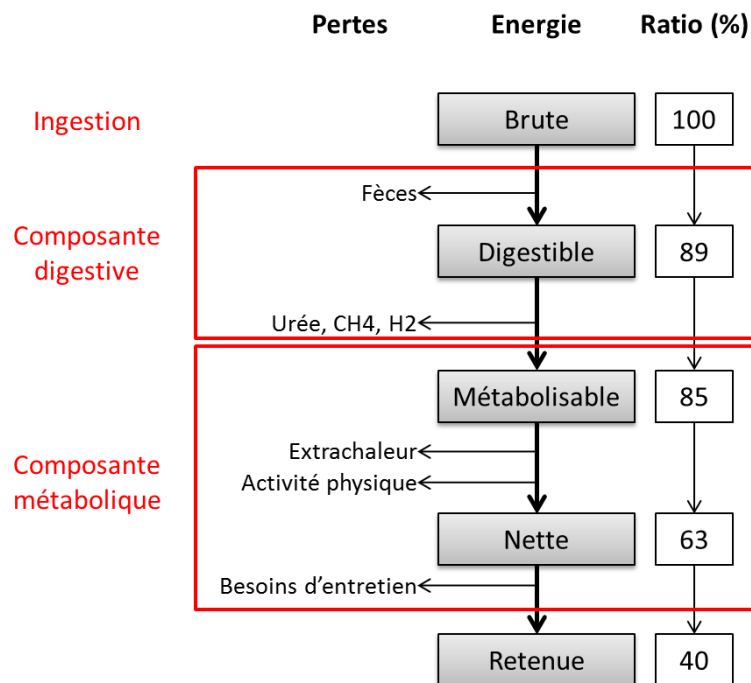


Figure I-4 : Utilisation de l'énergie ingérée chez un porc en croissance de 60 kg et composantes de l'efficacité alimentaire.

Adapté de IFIP (2013).

Pour un animal d'un type génétique et un type sexuel donnés, nourri avec une ration répondant à ses besoins protéiques et énergétiques, les principaux déterminants de l'EA sont le niveau d'ingestion, la capacité de digestion, le niveau d'activité physique et les besoins d'entretien liés principalement à la thermorégulation et au maintien de la santé.

Le microbiote, à travers son rôle dans la dégradation des aliments ingérés, dans le métabolisme et dans la santé de son hôte peut impacter les composantes digestives et métaboliques de l'EA. Chez la volaille, certaines bactéries du microbiote intestinal ont été reconnues comme étant associées à une bonne ou mauvaise EA de l'hôte (Torok et al., 2011; Stanley et al., 2013; Torok et al., 2013; Stanley et al., 2016). Chez le porc, les relations entre la composition du microbiote et l'EA ont été décrites principalement par comparaison de populations d'animaux extrêmes pour leur EA et chez des lignées sélectionnées de manière divergente sur leur consommation alimentaire résiduelle.

Les différences de compositions microbiennes observées chez les porcs classés comme extrêmes sur la base de leur EA sont variables suivant les études. McCormack et al. (2017) n'observent aucune différence d'abondance d'OTU entre les porcs extrêmes pour leur EA (régime à base de blé, orge et soja). A l'inverse, Verschuren et al. (2018) ont identifié trois OTU permettant de séparer les porcs efficaces des porcs non efficaces avec un régime à base de blé, d'orge et de coproduits alimentaires. De plus, des résultats dans la littérature semblent indiquer une relation entre la diversité du microbiote et l'EA. En effet, Quan et al. (2018) montrent une plus grande diversité microbienne dans le côlon et le cæcum chez des porcs efficaces. Cependant, cette différence n'est pas retrouvée dans l'iléon. Dans cette étude, moins de 50 OTU (c.à.d. 0,09% de la totalité des OTU identifiées) présentent des différences d'abondance entre les deux populations variant pour leur EA. Sur la base de ces OTU, l'inférence fonctionnelle montre que le métabolisme des acides aminés et des glycanes est plus développé chez les animaux efficaces.

Dans les lignées divergentes, les porcs sélectionnés pour leur faible consommation résiduelle (et donc efficaces) possèdent une proportion plus élevée de *Lactobacillus* dans le microbiote cæcal que les porcs non efficaces (Vigors et al., 2016a; Tan et al., 2017). Cependant, aucune différence n'est observée concernant les abondances en *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Enterobacteria* et *Bacteroides* dans le côlon ou le cæcum (Vigors et al., 2016b). L'implication de *Lactobacillus* dans l'EA semble être corroborée par des résultats

obtenus chez la volaille (Mignon-Grasteau et al., 2015) et par le fait qu'une supplémentation alimentaire en *Lactobacillus* chez le poulet permet d'améliorer l'IC de 6,4% via une réduction de la consommation moyenne journalière (Altaher et al., 2015).

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer les différences de compositions microbiennes intestinales entre les animaux dont l'EA varie :

1) La variation de la composition du microbiote pourrait être la conséquence indirecte d'une sélection de l'hôte sur l'EA. Les animaux efficaces ont généralement des niveaux d'ingestion, un comportement alimentaire voire un métabolisme déviant par rapport aux animaux moins efficaces (Young et al., 2011; Vigors et al., 2016b; Gilbert et al., 2017). Ces variations de phénotypes directement liées à la sélection de l'hôte pourraient impacter le « milieu intestinal » (pH, environnement nutritif) dans lequel se développe le microbiote et favoriser ainsi le développement de certaines populations bactériennes au détriment d'autres (Rist et al., 2012; Siegerstetter et al., 2018). De fait, cette hypothèse implique donc l'absence de lien fonctionnel entre le microbiote et son hôte concernant l'EA.

2) Une seconde hypothèse est que le phénotype « efficace » résulte d'une sélection conjointe du microbiote et de son hôte. Dans ce cas, l'amélioration de l'EA de l'hôte pourrait être en partie liée à la présence de populations bactériennes telles que les *Lactobacillus*, améliorant l'efficacité digestive et plus généralement à la santé de l'hôte (Rea et al., 2010; Lan et al., 2017; Castilho et al., 2019). La suite de la bibliographie se base sur cette hypothèse et s'attache à décrire comment le microbiote peut avoir un rôle sur le niveau d'ingestion et les composantes digestive et métabolique de l'EA chez le porc.

2.2. Rôle du microbiote dans la régulation hormonale de l'ingestion

Le niveau d'ingestion est un élément clé dans l'EA. En effet, le niveau alimentaire détermine la quantité d'énergie que l'animal a à sa disposition pour satisfaire ses besoins d'entretien et déposer des lipides et protéines pour satisfaire ses besoins de production. Chez des souris, il semble que le microbiote participe à la régulation de l'appétit de son hôte par l'intermédiaire des rôles fonctionnels des AGV, produits de l'activité bactérienne (Engelstoff et al., 2013). Il existerait donc une interaction entre le développement de populations

bactériennes et le niveau d'ingestion. Cet effet pourrait être médié par une action sur les hormones impliquées dans la régulation de l'ingestion (ghréline, leptine, etc.).

La ghréline, peptide synthétisé par les cellules entéroendocrines, est une hormone qui présente des propriétés orexigènes et qui est donc susceptible de stimuler l'appétit (Kojima et al., 1999) (Figure I-5). Ainsi chez le porc, la ghréline induit une augmentation de la consommation moyenne journalière et du gain de poids chez le porc (Salfen et al., 2004; Vizcarra et al., 2007). Chez l'homme, la présence d'AGV dans le tube digestif inhibe la sécrétion de ghréline avec un effet négatif sur l'appétit (Engelstoft et al., 2013; Rahat-Rozenbloom et al., 2017). Ces effets passeraient par l'activation via l'acétate ou le propionate du récepteur GRP43 dans les cellules L du côlon humain (Karaki et al., 2008) ou par l'activation du récepteur GRP81 par le lactate (Engelstoft et al., 2013) (Figure I-5). Une fois activés, ces récepteurs pourraient inhiber la sécrétion de ghréline (Engelstoft et al., 2013) (Figure I-5).

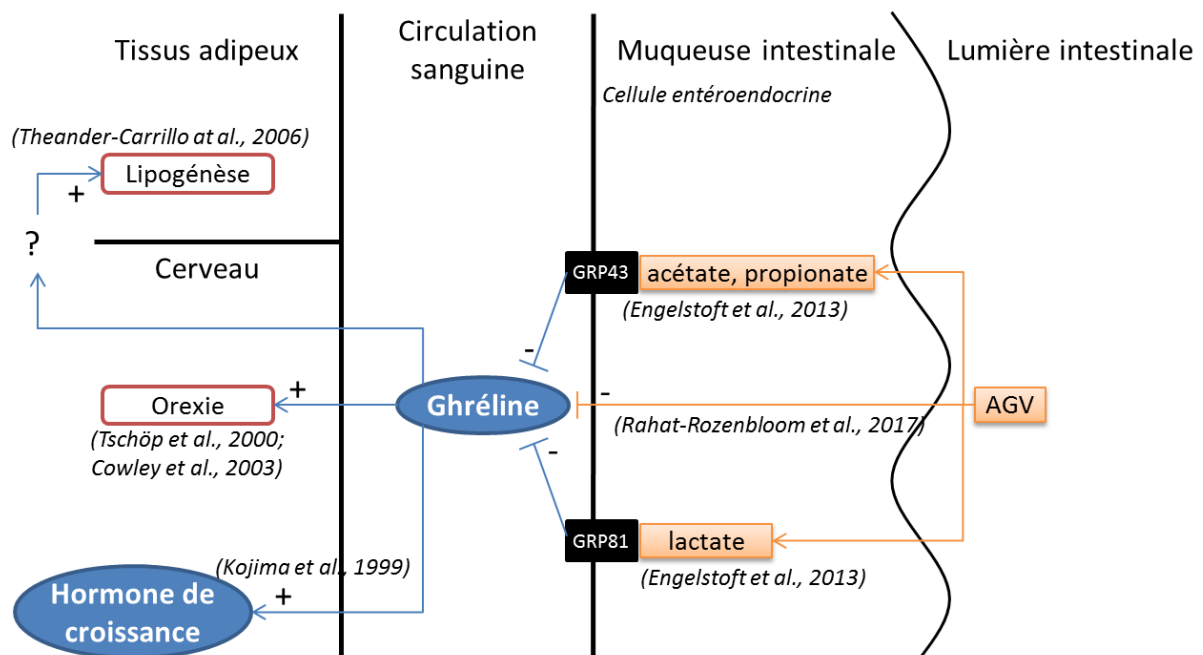


Figure I-5 : Action des acides gras volatils (AGV) sur la sécrétion de ghréline et impact sur la croissance, la régulation de l'ingéré et du métabolisme lipidique.

Le microbiote pourrait également réguler l'ingestion de l'hôte via des effets sur la sécrétion d'hormones anorexigènes telles que la leptine sécrétée par les adipocytes (Xiong et al., 2004), le peptide PYY et le glucagon like peptide-1 (GLP-1) sécrétés par les cellules

entéroendocrines (Tazoe et al., 2008). Ces hormones sont impliquées dans la régulation centrale de l'ingestion (Elmquist et al., 1998; Batterham et al., 2004; Drucker, 2005) (Figure I-6). Des souris axéniques présentent une plus forte concentration en leptine dans le sang et un plus faible niveau d'ingestion volontaire que des souris conventionnelles (Bäckhed et al., 2004). Les mécanismes d'action des AGV sur la sécrétion de leptine sont assez similaires à ceux décrits pour la ghréline. En se liant à des récepteurs couplés à des protéines G présents sur la membrane des adipocytes, le propionate entraîne le relargage de leptine dans le sang induisant une réduction de l'appétit (Brown et al., 2003; Xiong et al., 2004). L'action des AGV sur la sécrétion de PYY et GLP1 est variable suivant les études : deux études chez l'homme (Freeland and Wolever, 2010; Chambers et al., 2015) ont démontré une augmentation de la sécrétion de PYY et GLP-1 par les cellules du gros intestin en présence de propionate et d'acétate (concentrations sanguines comprises entre 15 et 30 $\mu\text{mol/L}$ et entre 75 et 175 $\mu\text{mol/L}$, respectivement), induisant une réduction de l'ingéré. A l'inverse, deux autres études (Byrne et al., 2016; Rahat-Rozenbloom et al., 2017) ne démontrent aucun impact d'une augmentation de la concentration en propionate et acétate (concentrations sanguines comprises entre 1 et 8 $\mu\text{mol/L}$ et entre 10 et 90 $\mu\text{mol/L}$, respectivement) sur la concentration sanguine en PYY et GLP-1. Ceci suggère un effet dose-dépendant de la concentration en AGV issus des fermentations microbiennes sur la régulation hormonale de l'ingestion.

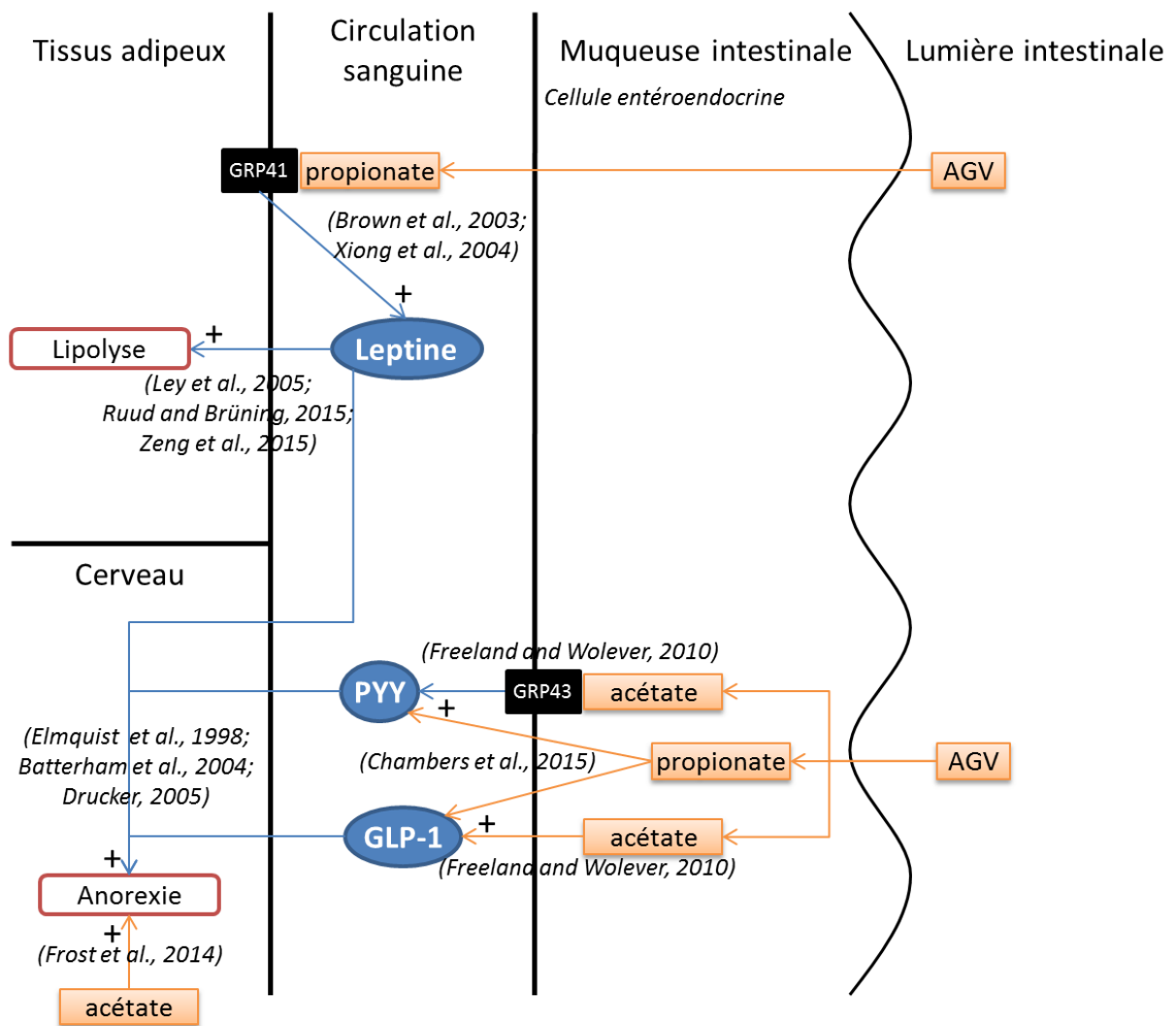


Figure I-6 : Action des acides gras volatiles (AGV) sur la sécrétion de leptine, peptide tyrosine tyrosine (PYY) et glucagon like peptide-1 (GLP-1) et impact sur la régulation de l'ingéré et du métabolisme lipidique.

Au-delà de leur action locale sur la sécrétion d'hormones et peptides anorexigènes ou orexigènes, les AGV circulant peuvent agir directement sur des organes éloignés du tube digestif. Ainsi l'acétate peut agir directement au niveau central, en particulier dans l'hypothalamus, et avoir une action anorexigène chez les souris (Frost et al., 2014). De manière générale, le microbiote, par l'intermédiaire de la production d'AGV et de la régulation de la production d'hormones circulantes pourrait réguler l'ingestion et donc l'EA de l'hôte.

2.3. Rôle du microbiote dans la composante digestive de l'efficacité alimentaire

La digestion met en jeu des processus complexes impliquant des réactions enzymatiques et des procédés mécaniques. En effet, l'activité motrice du tube digestif conditionne le temps de mise en contact entre les enzymes digestives et le bol alimentaire dans chaque compartiment de l'intestin. Le microbiote pourrait contribuer à améliorer la capacité digestive de son hôte en agissant à la fois sur les phases enzymatiques et mécaniques de la digestion. En effet, l'une des principales fonctions du microbiote est de dégrader puis fermenter les fibres alimentaires grâce à un équipement enzymatique que ne possède pas l'hôte. Par ailleurs, les produits de fermentation pourraient stimuler ou inhiber la motricité intestinale et ainsi avoir un impact sur le transit. Plus généralement, le microbiote joue un rôle dans le développement de la santé du tube digestif ce qui pourrait directement augmenter la capacité d'absorption de nutriments et indirectement agir sur le métabolisme de l'hôte.

2.3.1. Rôle du microbiote dans la dégradation et fermentation des fibres alimentaires

Grâce à un ensemble d'enzymes dont l'hôte n'est pas pourvu, le microbiote facilite l'assimilation de substrats et de résidus alimentaires non digestibles par l'hôte (Looft et al., 2014; Quan et al., 2018). Les oligosaccharides complexes (hémicelluloses, celluloses, pectines) sont notamment hydrolysés en sucres simples. En particulier, les liaisons β 1-4 glycosidiques reliant les différentes unités de glucose dans la cellulose ne peuvent être dégradées que par l'enzyme β 1-4 glucosidase, uniquement produite par les bactéries dans le côlon (Fioramonti, 2014). La fermentation de ces sucres simples par le microbiote aboutit à la production d'AGV, en grande partie absorbés au niveau du gros intestin (Figure I-7). La fermentation est l'un des rôles les plus importants du microbiote dans la complémentarité avec l'hôte : 13% des gènes bactériens identifiés dans des fèces de porcs sont reliés au métabolisme des glucides (Lamendella et al., 2011). Les principales voies de production des AGV à partir de glucides sont présentées dans la Figure I-8. Chez les porcs sélectionnés pour leur EA, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du pyruvate sont surexprimés (Tan et al., 2017). Or le pyruvate est un élément pivot des fermentations (Figure I-8). Par ces voies, l'EA des animaux pourrait donc être reliée à la capacité fermentaire de leur microbiote.

De manière plus anecdotique, il semble que certaines bactéries dégradent des acides aminés en AGV par désamination puis décarboxylation (Rasmussen et al., 1988). Ainsi, *E. coli* dégrade l'arginine et la lysine, *Lactobacillus* dégrade l'histidine (Morris and Fillingame, 1974) et différentes souches de *Clostridium* produisent du propionate ou du butyrate à partir de la thréonine, la valine, la leucine ou l'isoleucine (Elsden and Hilton, 1978). Les AGV ainsi produits dans le gros intestin peuvent alors être absorbés par l'hôte.

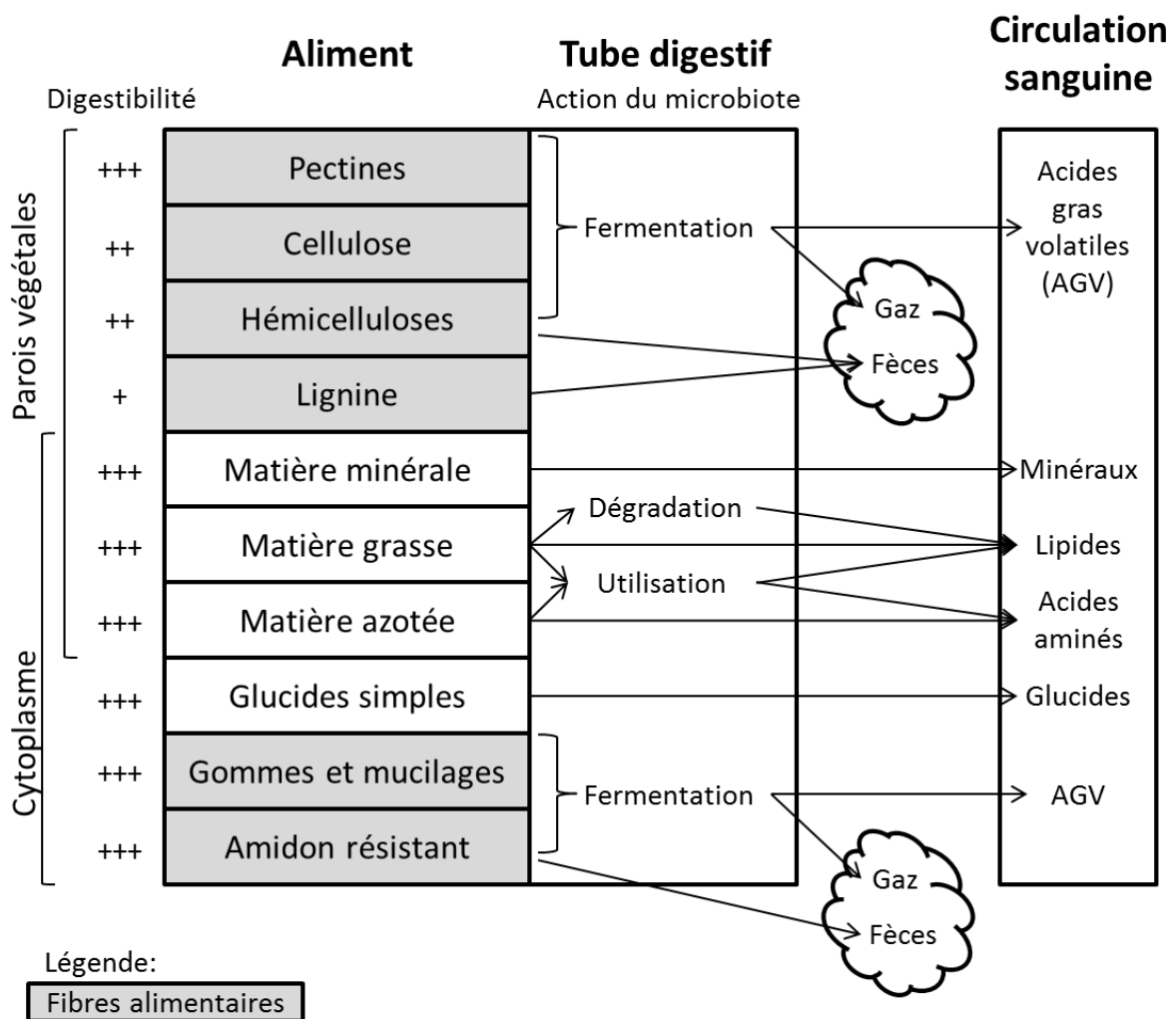


Figure I-7 : Rôle du microbiote dans la digestion des composés alimentaires et produits absorbés par l'hôte.

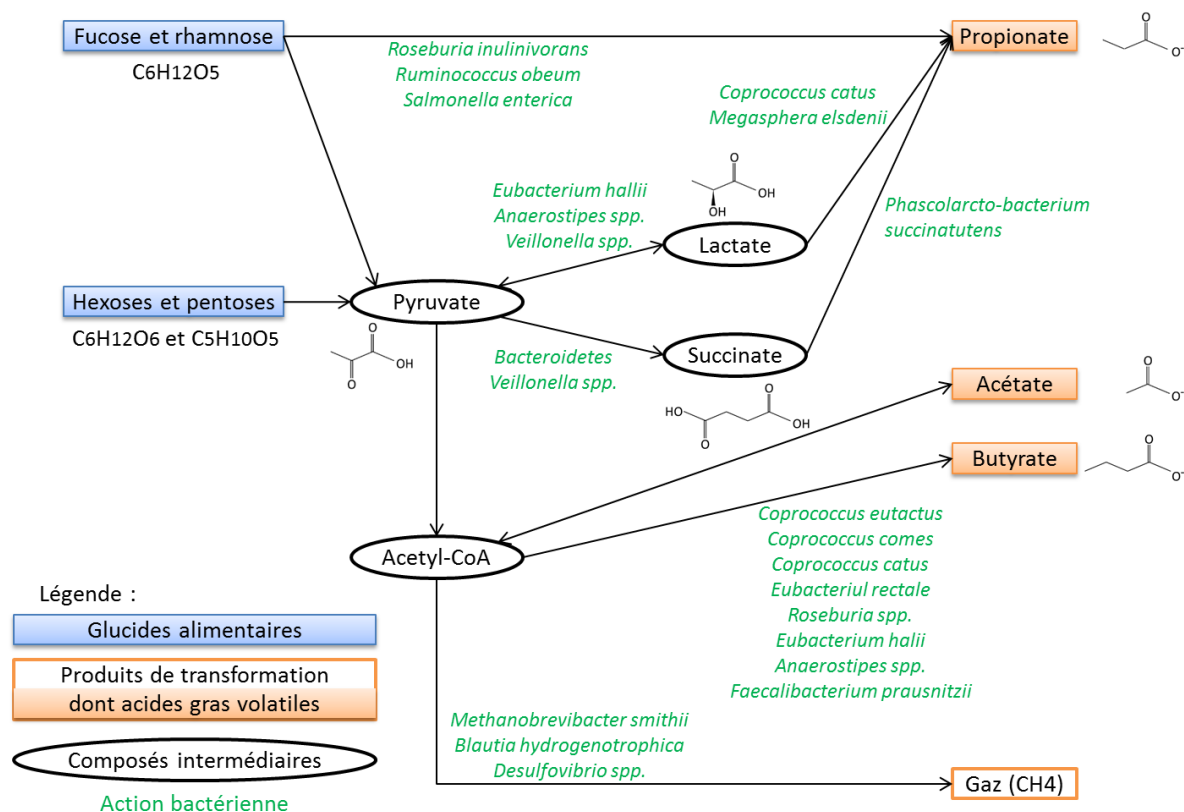


Figure I-8 : Rôle du microbiote dans la transformation de glucides en acides gras volatiles et en gaz.

Adapté de Louis et al. (2014) et Abolbaghaei et al. (2018).

Chez le porc, environ 95% de ces AGV sont absorbés dans le gros intestin à un rythme de $9,4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Argenzio and Southworth, 1975). Ceci est comparable au rythme d'absorption mesuré chez l'homme ($8,1 \mu\text{mol}$ d'acétate $/\text{cm}^2/\text{h}$) (McNeil et al., 1978). Le butyrate et l'acétate sont notamment utilisés comme source d'énergie par les cellules épithéliales (Roediger, 1982; Clausen and Mortensen, 1995; Jørgensen et al., 1997) alors que le propionate est absorbé dans le sang et est récupéré par le foie comme substrat pour la lipogénèse et la glycogénèse (Bloemen et al., 2009).

En dégradant les fibres non digestibles par l'hôte, le microbiote permet d'augmenter la quantité d'énergie disponible pour l'hôte, principalement sous forme d'acides gras à courtes chaînes (principalement acétate, propionate et butyrate). Chez le porcelet sevré, la proportion de l'énergie totale absorbée attribuée aux AGV issus des fermentations varie entre 1,6% et 6,1% pour des régimes entre 128 à 160 g NDF/kg (Rérat, 1996). Chez des porcs en croissance, cette proportion varie entre 7 à 18% pour des régimes entre 78 à 24 grammes de

polysaccharides non amylacés par kilogramme d'aliment (Anguita et al., 2006). L'activité fermentaire des bactéries est variable suivant le type de fibre et la souche bactérienne analysée. Dans une étude *in vitro*, la capacité de dégradation de différents substrats fibreux varie suivant la souche bactérienne (*Clostridium* vs. *Ruminococcus*) (Varel et al., 1989). Les bactéries *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* et *Prevotella* possèdent des gènes codant pour des enzymes (xylanases, cellulases) qui dégradent un large panel de polysaccharides (Varel et al., 1989; Flint et al., 2008; Ellekilde et al., 2014; Kovatcheva-Datchary et al., 2015), ce qui leur permet de se développer dans des milieux variés. A l'inverse, les *Clostridiaceae* possèdent plus de phosphotransférases transportant une grande variété de mono et disaccharides (ex : glucose) et leur conférant un métabolisme interne plus efficace en milieu appauvri en polysaccharides (Biddle et al., 2013). En pratique, la spécificité de substrat permet ainsi à diverses bactéries de se développer dans un même milieu et d'optimiser l'utilisation des polysaccharides présents dans le bol alimentaire. Cette spécificité est en partie illustrée par la présence de corrélations significatives entre l'abondance de certaines bactéries et des coefficients d'utilisation digestive de certaines fibres. Par exemple, l'abondance relative en *Treponema* a été corrélée positivement à la digestibilité de la cellulose chez des porcs de 60 à 150 jours d'âge mais n'est pas corrélée à la digestibilité de l'hémicellulose (Niu et al., 2015). De ces résultats, un microbiote riche en *Treponema* pourrait ainsi être susceptible de favoriser une bonne digestibilité d'un régime riche en cellulose.

2.3.2. Actions du microbiote et temps de transit

Chez la souris, Kashyap et al. (2013) montrent qu'une augmentation de la vitesse de transit est corrélée à une diminution de l'abondance relative en *Bacteroidaceae* et une augmentation de l'abondance relative en *Lachnospiraceae*. Cette étude démontre une connexion entre les mécanismes impliqués dans la variation du transit intestinal et la variation de la composition du microbiote mais ne montre pas de lien de cause à effet. Cependant, des éléments permettent de supposer une action de l'activité fermentaire du microbiote sur la motilité.

En effet, par l'intermédiaire des AGV produits lors de la fermentation (Figure I-8), le microbiote agit aussi sur la motilité du tube digestif (Figure I-9). Chez le rat, les AGV présents dans la lumière du tube digestif limitent la motilité du côlon proximal (Fukumoto et al., 2003). Les effets des AGV sur la motricité semblent dépendre de leur concentration et de

leur nature (Richardson et al., 1991; Cherbut et al., 1998; Fukumoto et al., 2003). A forte dose, les AGV inhibent la motilité. En particulier, l'acétate diminue significativement la vitesse de transit à partir d'une concentration de 20 mM tandis que 100 mM de butyrate sont nécessaires pour obtenir un ralentissement de la vitesse de transit (Richardson et al., 1991). Par ailleurs, l'action du microbiote sur la motilité du tube digestif pourrait être sous la dépendance d'une chaîne de réactions incluant à la fois les AGV présents dans le gros intestin et le neuropeptide PYY. En effet, une infusion d'AGV dans le tube digestif de rats ou de porcs entraîne une augmentation de la concentration en PYY dans le sang et une inhibition de la motilité du côlon (Cherbut et al., 1998; Cucho et al., 2000). Cet effet est indépendant de la concentration en AGV absorbés dans la circulation sanguine de l'hôte (Cucho et al., 2000).

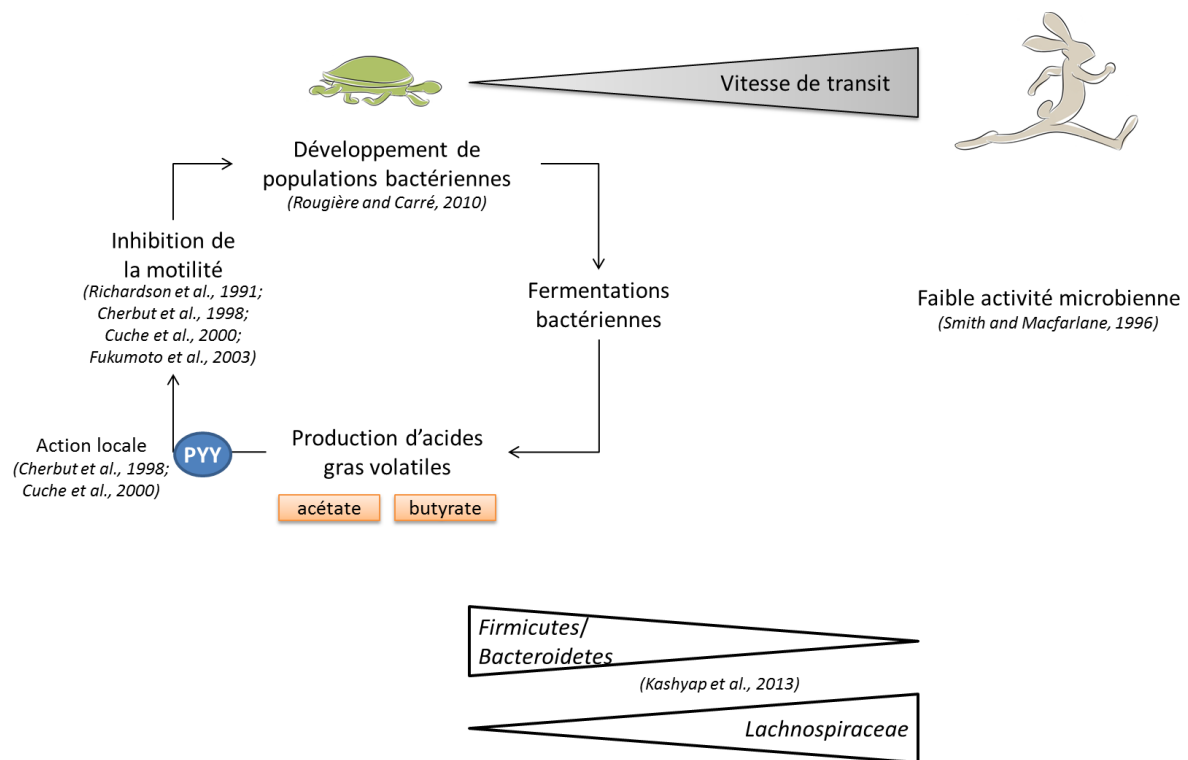


Figure I-9 : Action du microbiote et vitesse de transit au niveau du côlon.

En pratique, des modifications du transit sont généralement observées quand la teneur en fibre de l'aliment change (Spiller et al., 1986; Le Goff et al., 2002; Kashyap et al., 2013). Ainsi, chez le porc, le temps de transit varie de 3,7 à 4,3 h dans l'intestin grêle et de 35,6 à 44,4 h dans le gros intestin quand la teneur en fibres passe de 144 à 235 g/kg (Wilfart et al., 2007b). Cet effet peut être expliqué par la capacité des fibres à retenir de l'eau et augmenter le volume du bol alimentaire ce qui stimule la motricité du tube digestif par une action

mécanique sur la paroi digestive (Stanogias and Pearce, 1985; Rijnen et al., 2001). Une modification du transit peut avoir un effet sur le développement du microbiote au niveau du côlon. Dans une situation extrême testée *in vitro*, un temps de rétention de 27,1 h réduit l'activité microbienne qui peut cependant être rétablie lorsque le temps de rétention augmente (66,7 h) (Smith and Macfarlane, 1996) (Figure I-9). Cependant, ces temps de rétentions s'écartent des situations physiologiques observables chez les porcs.

Il s'établit donc un équilibre, au niveau du tube digestif et en particulier du côlon, entre l'action mécanique des fibres favorisant une accélération du transit et l'action des AGV ralentissant le transit. Cette action des AGV semble dépendre de leur concentration dans le tube digestif. Le ralentissement du transit, notamment au niveau du côlon, pourrait se traduire par une meilleure digestion des fibres par le microbiote et possiblement par une meilleure EA. Même si le lien entre la vitesse de transit et l'EA semble établi chez le poulet (Rougière and Carré, 2010), le rôle spécifique du microbiote reste à démontrer, notamment chez le porc.

2.3.3. Rôle du microbiote dans le développement du tube digestif

Le microbiote intervient dans le développement du tube digestif par l'intermédiaire de l'action des produits de fermentation qui modulent la prolifération des entérocytes (Frankel et al., 1994). Des études sur le porc et la volaille ont démontré qu'en l'absence de flore microbienne, l'épithélium intestinal se différencie et se renouvelle mal, les villosités sont moins épaisses (Thompson and Trexler, 1971; Chowdhury et al., 2007) (Figure I-10). Par ailleurs, la maturation morphologique de l'iléon est ralentie chez des porcelets placés en isolateur après la naissance, dont le développement et la diversification de populations microbiennes intestinales est fortement limité (Mulder et al., 2011). Le microbiote, par l'intermédiaire des AGV, pourrait agir sur le développement du tube digestif et favorise des conditions optimales d'absorption des nutriments.

Selon Stappenbeck et al. (2002), la colonisation microbienne du tube digestif chez des souris axéniques est nécessaire au développement du réseau capillaire au niveau des villosités de l'intestin grêle. Plus particulièrement, l'action du microbiote semble s'exercer par l'intermédiaire de facteurs tissulaires (Reinhardt et al., 2012) et sur les cellules de Paneth qui en réponse produisent des composés favorisant le développement du réseau capillaire (Stappenbeck et al., 2002). Une irrigation développée de l'épithélium intestinal favorise alors une bonne absorption des métabolites. L'action du microbiote sur le développement de

l'épithélium intestinal, du système circulatoire associé et sur la perméabilité intestinale pourrait également participer à améliorer l'efficacité digestive de l'hôte.

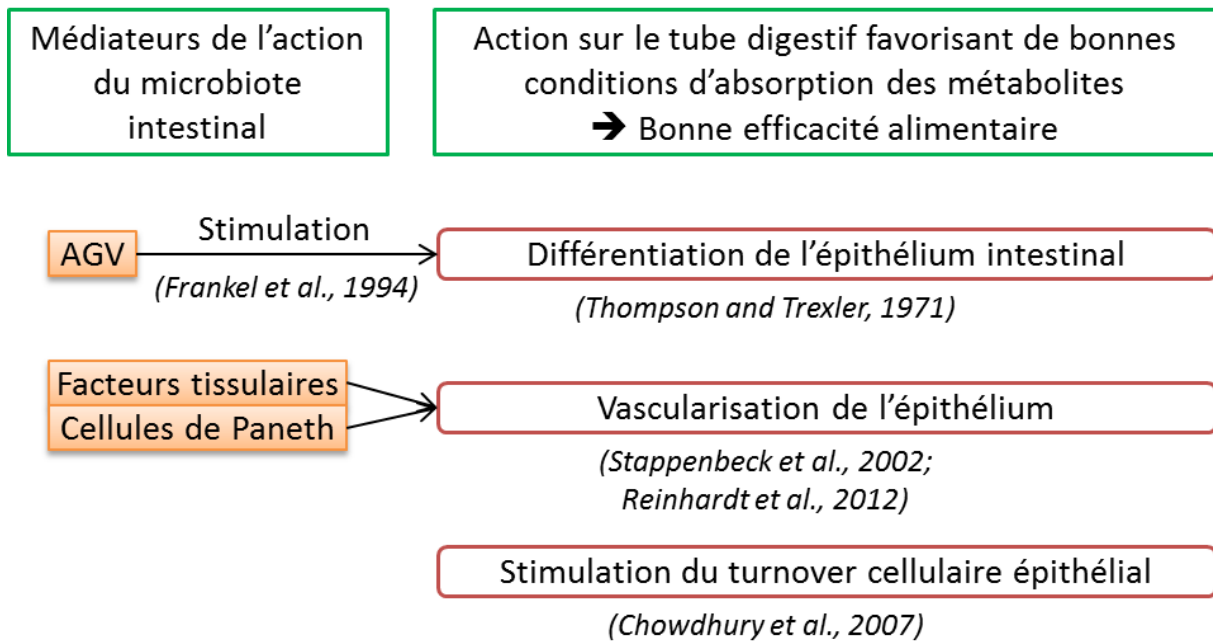


Figure I-10 : Rôle du microbiote dans le développement du tube digestif.

2.4. Rôle du microbiote dans la composante métabolique de l'efficacité alimentaire

Comme indiqué dans la Figure I-4, l'efficacité de l'utilisation de l'énergie métabolisable chez le porc dépend principalement de la nature et de la quantité d'énergie déposée sous forme de protéines et de lipides, de son activité physique et de ses besoins d'entretien. Ces derniers couvrent le métabolisme de base de l'animal et les besoins liés à la thermorégulation (lutte contre le froid) et la santé (coûts énergétiques liés aux réponses inflammatoires). Cette partie de la bibliographie a pour objectif de décrire comment le microbiote peut agir sur ces différentes composantes et d'en évaluer les conséquences potentielles sur l'EA de l'hôte.

2.4.1. Rôle du microbiote dans la santé de l'hôte

Chez un porc en croissance de 60 kg, 26% de l'énergie totale et 41% de l'énergie métabolisable (EM) ingérées sont utilisés pour les besoins d'entretien (Figure I-4). En moyenne, les besoins d'entretien d'un porc en croissance s'élève à 1,0 MJ d'EM/kg^{0,60}/j (Van

Milgen et al., 1998). En cas d'inflammation subclinique, ces besoins doivent être réévalués d'environ 10% pour prendre en compte le coût énergétique lié aux dépenses de santé (Campos et al., 2014). Logiquement, pour un même ingéré énergétique, la dégradation de l'état sanitaire de l'animal aura donc des conséquences sur son EA. De nombreux résultats de la littérature montrent qu'une variation de la composition du microbiote peut impacter la santé de son hôte notamment lorsque l'abondance relative des bactéries pathogènes est trop importante. Ainsi, l'augmentation de l'abondance relative en *Enterobacteriaceae* (Dou et al., 2017), *Bacteroidetes* et *Prevotella* (Q. Yang et al., 2017) au moment du sevrage est associée chez le porcelet à une augmentation de l'occurrence des diarrhées. De même, une augmentation de l'abondance de *Prevotella* a été observée lors de maladies inflammatoires chroniques (insuffisance rénale, arthrite, désordres métaboliques etc.), surtout étudiées chez l'homme (Scher et al., 2013; Wong et al., 2014; Larsen, 2017). A l'inverse, une augmentation de l'abondance relative en *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium prausnitzii* et l'augmentation de la concentration en AGV dans le tube digestif et dans la circulation sanguine favorisent une bonne santé digestive (C.S. Cheng et al., 2018). Outre les AGV, les vitamines K et B, produites notamment par *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* et *Fusobacterium* (Canny and McCormick, 2008; Le Gall et al., 2009), présentent des propriétés anti-inflammatoires et jouent un rôle dans l'immunité de l'hôte (Mozos et al., 2017; Halder et al., 2019; Yoshii et al., 2019). L'impact du microbiote sur la santé est médié par de nombreux composés et active de nombreuses voies de réponse dans l'organisme hôte. Certains mécanismes d'action du microbiote sur la santé du tube digestif (fonction de barrière) et la santé générale de l'hôte sont développés ci-dessous.

2.4.1.1. Rôle de barrière contre les pathogènes

Les bactéries commensales jouent un rôle de barrière en s'implantant dans le système digestif et contrôlent ainsi localement les risques d'infection. Ceci participe au maintien d'une bonne santé digestive et générale de l'hôte. Les bactéries commensales limitent l'implantation de bactéries pathogènes par des mécanismes de résistance à la colonisation entre populations microbiennes (Buffie and Pamer, 2013; Calenge et al., 2014). Un premier mécanisme identifié est la compétition pour le substrat entre bactéries commensales et pathogènes : chez des souris, les bactéries commensales telles que *Bacteroidetes thetaiotaomicron* utilisent la quasi-totalité du substrat nutritif, empêchant ainsi le développement de populations pathogènes comme *Citrobacter rodentium* (Kamada et al., 2012).

Un second mécanisme est lié à la production d'inhibiteurs de pathogènes par les bactéries commensales. Par exemple, la présence de butyrate ou autres AGV issus des processus fermentaires microbiens limite le développement de populations de *Salmonella* et d'*E. Coli* (Shin et al., 2002; Gantois et al., 2006). Certaines bactéries (ex : *Bacteroides thuringiensis*, *Lactobacillus spp.*) sont aussi capables de produire des facteurs peptides antibactériens ciblant d'autres bactéries pathogènes (ex : *Clostridium difficile*) (Rea et al., 2010; Castilho et al., 2019). Ce rôle de barrière par le microbiote est complété par la sécrétion de molécules antimicrobiennes par l'hôte. C'est notamment le cas des immunoglobulines A qui limitent la prolifération des bactéries commensales et pathogènes (Suzuki et al., 2007). Le rôle de barrière au niveau de l'épithélium digestif résulte donc d'une interaction entre les mécanismes de défense du microbiote commensal et de l'hôte face aux pathogènes.

Cependant, exceptionnellement, le microbiote commensal peut nourrir les pathogènes, voire les activer alors qu'ils étaient avirulents (Rolhion and Chassaing, 2016). Ainsi *Bacteroidetes thetaiomicron* peut produire une quantité élevée de succinate qui conduit à une colonisation anormale par *Clostridium difficile* (Ng et al., 2013; Ferreyra et al., 2014). Cette réaction détériore la santé digestive de l'hôte. En conséquence, une part plus importante de l'énergie ingérée par l'hôte est utilisée pour rétablir une bonne santé, d'où une réduction de l'EA (Littman and Pamer, 2011).

2.4.1.2. Rôle dans l'immunité de l'hôte

En plus du rôle de barrière face aux pathogènes, les bactéries commensales jouent un rôle dans le système immunitaire de l'hôte (Figure I-11). Les bactéries filamenteuses segmentées (principalement des *Clostridiaceae*) ancrées dans la muqueuse intestinale stimulent la maturation des lymphocytes B et T (Imaoka et al., 2004; Chung et al., 2012; Rolhion and Chassaing, 2016). Cette action semble dépendre de l'espèce animale. Après la naissance, chez le porc et autres espèces d'élevage, contrairement à l'homme ou la souris, l'amplification du nombre de lymphocytes B dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale n'est réalisée que s'il y a stimulation par le microbiote intestinal (Lanning et al., 2005). En particulier chez le porcelet de 2 semaines d'âge dont le tube digestif a été colonisé par du microbiote, des IgA, marqueurs de la maturation des lymphocytes B, sont présents dans le sang (Butler et al., 2002). Au contraire, aucune immunoglobuline A (IgA) n'a été observée chez les porcelets axéniques. De plus, à 2 semaines d'âge, la colonisation microbienne induit la transcription de nombreux gènes dans l'épithélium intestinal dont celui du complexe

majeur d'histocompatibilité (Chowdhury et al., 2007). Ce complexe est présent à la surface des cellules infectées notamment par des bactéries pathogènes et présente les antigènes qui seront reconnus par les lymphocytes T, entraînant une réponse immunitaire. Le microbiote intestinal est ainsi impliqué dans la régulation des processus inflammatoires de son hôte.

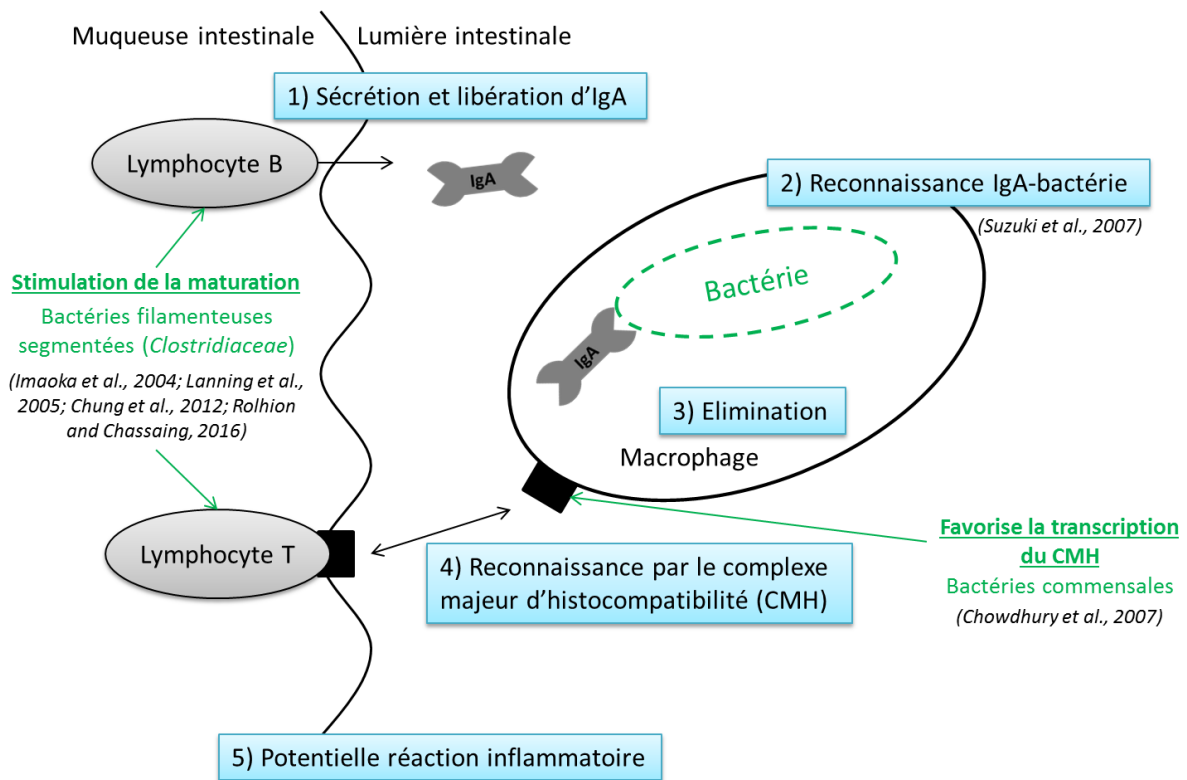


Figure I-11 : Rôle du microbiote dans l'immunité de l'hôte.

Les effets du microbiote sont représentés en vert.

L'action du microbiote sur la réponse inflammatoire de l'hôte peut être médiée par différents composés. Chez l'homme, au niveau local dans le tube digestif, le propionate et l'acétate produits par fermentation par le microbiote se lient avec le récepteur GPR43 (Brown et al., 2003; Le Poul et al., 2003) impliqué dans l'expression de cellules immunitaires (Maslowski et al., 2009). Le butyrate, stimule la production et sécrétion de mucus et est un inhibiteur potentiel de l'inflammation (Cornick et al., 2015). Outre les AGV, d'autres produits bactériens (lipopolysaccharides, peptidoglycanes, flagellines) sont aussi susceptibles d'activer le système immunitaire de l'hôte, entraînant une réponse inflammatoire (Plaizier et al., 2008). En cas d'inflammation, la demande en énergie pour les cellules immunitaires augmente ce qui impacte l'EA de l'hôte.

2.4.1.3. Rôle dans la détoxification du tube digestif

Au travers de son alimentation, le porc est susceptible d'ingérer des molécules (ex : mycotoxines) détériorant sa santé. Les céréales utilisées pour formuler les régimes complets pour le porc peuvent être contaminées par des mycotoxines. Celles-ci peuvent avoir un impact sur les performances et la santé des animaux (cf. partie I-1.2.3.1). Or, le microbiote participe à la détoxification par dé-époxydation de DON en De-époxy-déoxynivalenol (DOM-1), une forme jusqu'à 500 fois moins toxique que DON (Schatzmayr et al., 2006) (Figure I-12). La forme DOM-1 est sans effet sur les paramètres zootechniques, la réponse immunitaire, l'intestin ou le foie (pas de dommage tissulaire) contrairement à DON (Pierron, 2016). Ainsi, jusqu'à 100% du DON arrivant dans le côlon est ainsi transformé, notamment par des souches d'*Eubacterium*, *Clostridiales*, *Anaerophilum*, *Collinsella* et *Bacillus* (Schatzmayr et al., 2006; Yu et al., 2010). De plus, certaines souches de *Lactobacillus* et de *Propionibacterium* peuvent se lier à DON par leur paroi cellulaire et éliminer entre 18 et 93% de DON du milieu liquide (El-Nezami et al., 2002; Niderkorn et al., 2006; Niderkorn, 2007) (Figure I-12). L'action du microbiote avant la fin du gros intestin permet la détoxification complète de la forme libre DON et participe ainsi au maintien de la santé générale de l'hôte.

De plus, l'individu lui-même sécrète des composés potentiellement toxiques dans l'intestin grêle : les acides biliaires. Les acides biliaires sont pour la plupart réabsorbés dans l'iléon mais une partie passe dans le côlon. Ils sont alors dégradés en acides biliaires secondaires par des hydrolases produites par les bactéries *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Listeria* (Jones et al., 2008; Ramírez-Pérez et al., 2017) (Figure I-12). Cette dégradation permet de conserver un équilibre et une bonne santé digestive. Lorsqu'il est perturbé, comme c'est le cas lors d'une sous-nutrition chez les porcelets, on observe une diminution de l'abondance en *Lactobacillus* associée à une accumulation d'acides biliaires secondaires et une détérioration de la fonction de barrière contre les pathogènes (Lin et al., 2019) avec des conséquences potentiellement négatives sur la santé de l'hôte.

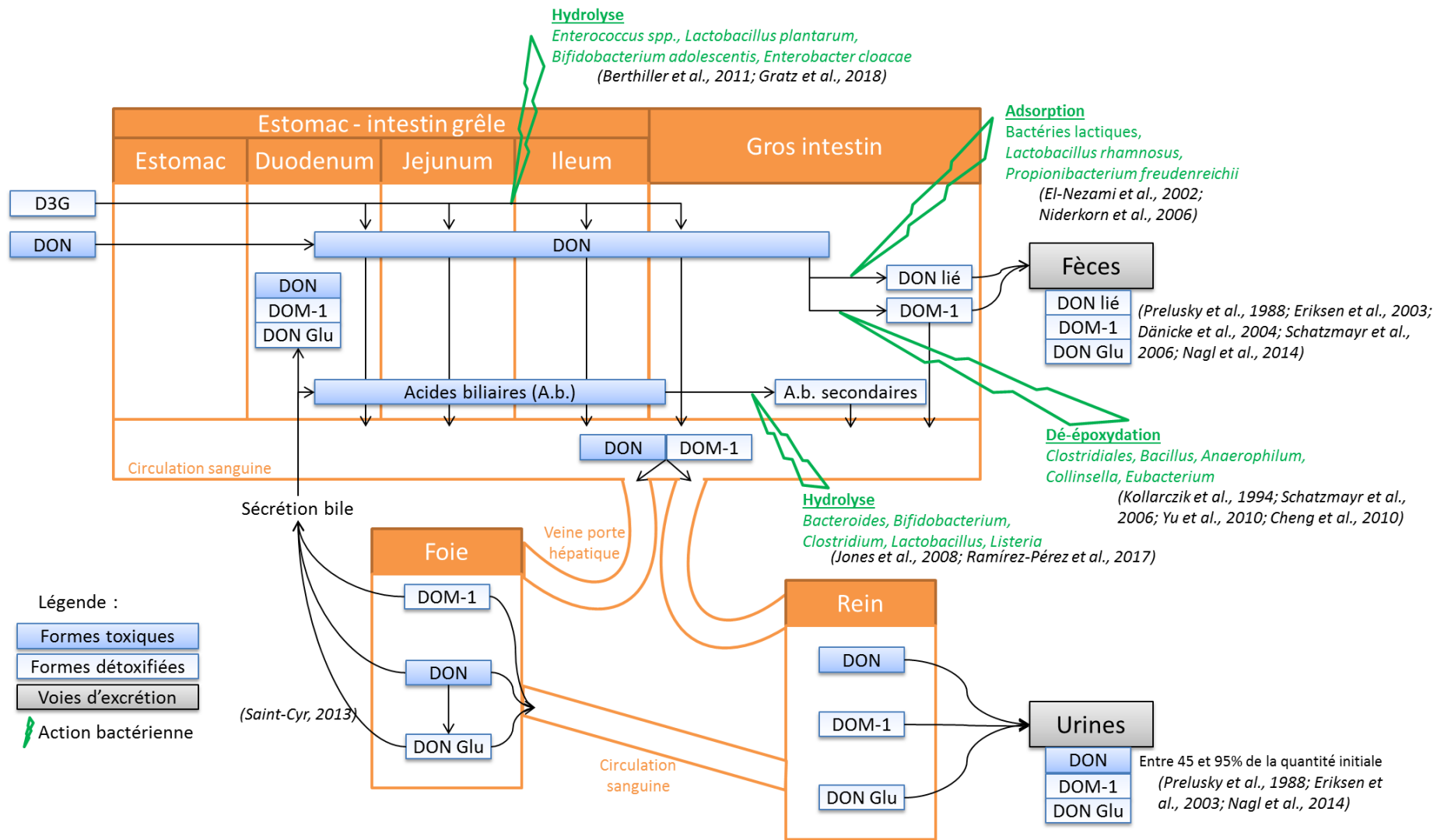


Figure I-12 : Rôle du microbiote dans la détoxification de la bile et du Déoxynivalenol (DON).

2.4.2. Rôle du microbiote dans l'activité de l'hôte

Les besoins d'entretien de l'hôte comprennent l'énergie nécessaire au maintien de la santé et celle requise par l'activité de l'animal. Une augmentation du niveau d'activité de l'hôte augmente les besoins en énergie et diminue la part d'énergie disponible pour les besoins de production, limitant ainsi l'EA. Chez le porc en croissance, en moyenne 8 à 10% de EM ingérée est utilisée pour couvrir les dépenses liées à l'activité physique (Labussière et al., 2011). Actuellement, peu d'études s'intéressent au rôle du microbiote dans la régulation de l'activité physique du porc. Cependant, l'implication du microbiote dans le comportement de l'hôte a été démontrée chez l'homme et la souris (Collins et al., 2013). La transplantation de microbiote fécal d'un individu anxieux ou dépressif présentant une activité physique faible chez des souris receveuses normales entraîne une réduction de l'abondance en *Lactobacillus*, une augmentation de l'abondance en *Akkermansia* (Li et al., 2019) et le développement d'un syndrome « anxieux-dépressif » (Luo et al., 2018; Li et al., 2019). Ce type de comportement suite à un transfert de microbiote a été retrouvé chez la caille (Kraimi et al., 2019), ce qui suggère un phénomène répandu dans le règne animal. La régulation du comportement par le microbiote se ferait via une action directe au niveau central (hippocampe) (Luo et al., 2018). Ces premiers résultats semblent indiquer que la variation de la composition du microbiote pourrait avoir un effet sur le comportement de l'hôte : la variation de la dépense énergétique associée pourrait avoir des conséquences sur l'EA de l'hôte.

2.4.3. Rôle du microbiote dans la nature des dépôts corporels

2.4.3.1. Métabolisme lipidique

Comme évoqué précédemment, l'EA est fonction de la nature et de la composition des dépôts corporels. D'un point de vue énergétique et compte tenu de la différence de densité énergétique entre les lipides (39,8 kJ/g) et les protéines (23,8 kJ/g), un individu efficace est un animal qui dépose une part importante de l'énergie ingérée en lipides corporels (Van Milgen and Noblet, 2003). L'influence du microbiote sur le métabolisme des lipides a notamment été démontrée par l'étude de transplantation de microbiote sur des animaux axéniques. Ainsi, le phénotype obèse a été reproduit sur des souris axéniques à la suite de la transplantation de flore de souris ou porc obèses (Turnbaugh et al., 2006; Yan et al., 2016). Chez l'homme, 4,5% de la variation de l'indice de masse corporelle et 6,0% de la variation de la concentration en triglycérides dans le sang sont expliqués par une variation de composition du microbiote (Fu

et al., 2015). Certaines populations bactériennes ont été identifiées comme ayant un impact sur le métabolisme lipidique de l'hôte. Les individus (homme ou porc) « gras » présentent une abondance élevée de bactéries appartenant au phylum *Actinobacteria*, aux familles *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* ou aux genres *Prevotella*, *Treponema* et *Bacteroides* (Turnbaugh et al., 2009; He et al., 2016; Fang et al., 2017). Les gènes identifiés comme associés à l'obésité sont majoritairement impliqués dans le métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés (Turnbaugh et al., 2009) et confèrent aux individus obèses une plus grande capacité à utiliser l'énergie de leur alimentation pour déposer des lipides (Turnbaugh et al., 2006).

Il reste cependant à déterminer les mécanismes sous-jacents de ce contrôle du métabolisme lipidique par le microbiote. Les effets du microbiote sur le métabolisme lipidique de l'hôte pourraient être liés aux rôles fonctionnels des AGV sur l'ingestion (cf. partie 2.2). Ainsi, l'excédent énergétique lié à une augmentation du niveau d'ingestion serait alors stocké sous forme de lipides corporels. Plus directement, le microbiote pourrait moduler la réponse de l'hôte qui utiliserait préférentiellement l'énergie ingérée pour déposer du gras (au détriment du maigre) sans que le niveau d'ingestion change. Le microbiote agirait ainsi directement sur la synthèse des acides gras dans les tissus corporels. Chez le porcelet, l'ingestion d'AGV entraîne une réduction de la synthèse enzymatique d'acides gras dans les muscles et les tissus adipeux abdominaux (Jiao et al., 2018). Cette régulation du métabolisme lipidique au niveau des adipocytes semble être sous contrôle hormonal (ghréline et leptine), médié par les AGV (Figure I-5, Figure I-6). Une augmentation de la concentration sanguine en AGV inhibe la sécrétion de ghréline (Rahat-Rozenbloom et al., 2017) et favorise la sécrétion de leptine (Brown et al., 2003; Xiong et al., 2004; Jiao et al., 2018). La ghréline, par l'intermédiaire de mécanismes encore mal connus dans le cerveau, peut agir sur le métabolisme des adipocytes, favorisant la lipogenèse (Theander-Carrillo et al., 2006). A l'inverse, la leptine a une action lipolytique (Ruud and Brüning, 2015; Zeng et al., 2015) comme l'illustre une mutation sur le gène de la leptine conduisant à des souris obèses (Ley et al., 2005). Lorsque les fermentations augmentent, l'organisme hôte semble donc s'orienter vers un déstockage des lipides par l'intermédiaire de l'action des AGV sur la sécrétion de la ghréline et de la leptine.

2.4.3.2. Métabolisme des protéines et acides aminés

Les acides aminés d'origine bactérienne peuvent contribuer à la synthèse protéique de l'hôte. Ces mécanismes sont notamment très connus chez les ruminants (Bergen, 2015). Dans une moindre mesure, des travaux montrent que chez le porc, une petite partie des acides aminés microbiens se retrouve incorporée dans les protéines corporelles de l'hôte (Fuller and Reeds, 1998). Dans une étude basée sur l'enrichissement des acides aminés en azote marqué (N^{15}), Torrallardona et al. (Torrallardona et al., 2003a; Torrallardona et al., 2003b) montrent que ces acides aminés synthétisés *de novo* par le microbiote peuvent être absorbés au niveau iléal et participer à la synthèse protéique. Selon ces auteurs, la lysine d'origine microbienne pourrait contribuer à près de 10% des besoins d'un porc de 20 kg. Compte tenu de la différence de profil d'acides aminés entre la protéine microbienne et la protéine d'origine alimentaire, le complément d'acides aminés d'origine bactérienne pourrait ainsi permettre de compenser le déficit en certains acides aminés essentiels d'origine alimentaire avec potentiellement des effets bénéfiques sur l'EA. Dans l'étude de Torrallardona et al. (2003a), et pour les besoins de l'expérience, la teneur en protéines du régime était très faible (5-6%) et les animaux avaient un niveau d'ingéré énergétique proche des besoins d'entretien ce qui a pu avoir pour effet d'augmenter artificiellement la part de lysine microbienne sur la lysine totale fixée par les animaux. Ainsi, selon Metges (2000), quand les animaux sont alimentés à hauteur de leurs besoins, la part d'acides aminés microbiens incorporés dans la protéine musculaire est très faible.

2.5. Comment piloter le microbiote au bénéfice de l'hôte ?

Le microbiote semble avoir un effet sur le métabolisme, la physiologie et la santé de l'hôte avec des conséquences sur ses performances et notamment sur l'EA. Différentes possibilités existent pour faire varier la composition du microbiote afin d'agir directement sur les performances des animaux. La supplémentation en antibiotiques, prébiotiques ou probiotiques modifie la composition microbienne intestinale. De plus, une nouvelle composition peut être transférée par transplantation fécale. Ces éléments sont brièvement développés dans la partie suivante en se basant sur quelques exemples d'utilisation chez le porc.

2.5.1. Pilotage par les antibiotiques

Depuis les années 1950, les antibiotiques sont connus pour leurs propriétés en tant que facteurs de croissance chez le porc (Luecke et al., 1951; Becker et al., 1952). Cependant, l'impact de la modification de la composition microbienne par les antibiotiques sur l'EA est variable : un traitement à la tiamuline et à la chlortetracycline durant 14 jours en maternité entraîne une augmentation significative de l'EA tandis qu'un traitement au carbadox et à l'oxytetracycline durant la même période ne modifie pas l'EA des porcelets (Puls et al., 2019). Plus généralement, une étude globale de 10 traitements différents à divers antibiotiques, réalisée sur plus de 24 000 porcs, a confirmé l'augmentation significative du gain moyen quotidien (GMQ) des porcs en maternité suite à la supplémentation alimentaire d'antibiotiques mais cette supplémentation n'a pas entraîné de différence de GMQ ou d'EA en finition (Dritz et al., 2002).

Depuis 2006, L'Union Européenne a interdit l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance. Plus récemment en 2018, elle a adopté un texte de loi visant à réduire l'utilisation prophylactique des antibiotiques d'ici 2022. En effet, actuellement, l'un des principaux problèmes de l'utilisation systématique des antibiotiques en élevage est le développement de résistances aux antibiotiques. Des alternatives aux antibiotiques sont alors recherchées pour favoriser une bonne santé des porcs et améliorer les performances de croissance telles que l'utilisation de prébiotiques ou probiotiques.

2.5.2. Pilotage par les prébiotiques

Dans l'objectif de modifier les performances de l'hôte par l'intermédiaire du microbiote, une supplémentation en prébiotiques peut être bénéfique à l'hôte. Ces prébiotiques (principalement des sucres complexes) servent notamment de source d'énergie pour les bactéries commensales et favorisent le développement de certaines populations bactériennes commensales. Ainsi, l'apport d'isomalto-oligosaccharide dans les jours suivant le sevrage augmente les abondances en *Streptococcus* et *Collinsella* et les concentrations en AGV totaux (Wu et al., 2017). En 28 jours de supplémentation, l'apport de prébiotiques a permis une amélioration du gain de poids à travers une amélioration significative de la santé digestive.

2.5.3. Pilotage par les probiotiques

Des bactéries actives peuvent aussi être utilisées comme probiotiques. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants utilisés en compléments alimentaires qui sont bénéfiques pour l'hôte en maintenant l'équilibre microbien intestinal (Canny and McCormick, 2008). En production porcine, les probiotiques sont fortement utilisés dans les semaines suivant le sevrage, où l'utilisation des antibiotiques tend à être réduite. Différents probiotiques peuvent entraîner des modifications de composition du microbiote intestinal (Yang et al., 2015). Les *Lactobacillaceae* sont les probiotiques les plus répandus (Yu et al., 2008; Hou et al., 2015; Dowarah et al., 2017; Valeriano et al., 2017). Par exemple, une supplémentation en *Lactobacillus acidophilus* dans les 45 jours suivant le sevrage augmente le nombre total de *Lactobacillus* et diminue le nombre d'*E. coli*, favorisant une bonne santé digestive des porcelets (Lan et al., 2017). L'EA est alors améliorée. Des levures actives peuvent aussi être utilisées comme probiotique notamment dans le cas d'une perturbation sanitaire ou d'un stress thermique. L'action des levures sur les performances pourrait être médiée par des modifications de composition du microbiote intestinal. Ainsi, chez des porcelets en post-sevrage, la supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae* augmente l'abondance en bactéries potentiellement bénéfiques pour la santé de l'hôte (dont *Lactobacillus*), entraîne une augmentation du gain de poids et de la quantité d'aliment ingéré (Kiros et al., 2018; Kiros et al., 2019) et peut entraîner une augmentation de la croissance compensatrice suite à une contamination aux Salmonelles (Price et al., 2010). Plus généralement, l'apport de probiotiques améliore l'adaptabilité des hommes et animaux face à des situations de stress (Lan et al., 2004; Messaoudi et al., 2011). Ainsi, chez le rat, la supplémentation par une souche de *Bacillus subtilis* a permis de réduire les effets néfastes d'un stress thermique notamment sur la morphologie du tube digestif (Sorokulova et al., 2016). Cependant, le choix des souches utilisées comme probiotiques détermine la réponse de l'hôte : chez le porc, l'ajout de compléments alimentaires à base de *Bacteroides* entraîne ou non une différence dans la digestibilité des fibres suivant la souche bactérienne ingérée (Ziemer et al., 2012).

2.5.4. Pilotage par transplantation fécale

L'administration de probiotique se limite généralement à un nombre restreint de bactéries. A l'inverse, la transplantation de microbiote consiste à administrer une préparation à base de microbiote fécal d'un premier individu à un second individu. Elle est particulièrement étudiée en médecine humaine. Il a été constaté qu'entre deux jumeaux, l'un obèse et l'autre maigre,

l'individu obèse présente une plus grande proportion de gènes pour digérer les lipides, protéines et glucides, d'où une plus grande facilité à extraire et stocker l'énergie à partir de sa nourriture (Turnbaugh et al., 2009). Ce phénotype obèse est transmissible par transfert de microbiote d'un individu obèse à un individu sain (Million et al., 2013; Ellekilde et al., 2014). De même dans le cadre d'une transplantation fécale sur des souris, la différence de composition corporelle (taux de gras et de maigre) chez des porcs utilisés comme donneurs est retrouvée chez les souris receveuses (Yan et al., 2016). Ceci démontre le rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme de son hôte.

Il est possible d'uniformiser la composition du microbiote intestinal par inoculation d'un microbiote identique à plusieurs animaux. Ceci est d'autant plus efficace que le receveur présente une flore peu abondante et peu diversifiée, comme c'est le cas à la naissance ou après un traitement conséquent aux antibiotiques (Ellekilde et al., 2014). Il a été montré chez la volaille que le fait d'uniformiser le microbiote par inoculation dès l'éclosion permet d'uniformiser l'IC (Rinttilä and Apajalahti, 2013). Si l'IC est uniformisé, le troupeau est plus homogène. Il est donc plus facile d'ajuster les rations aux besoins et au potentiel des animaux, ce qui permettra d'avoir moins de pertes d'aliment par refus et d'obtenir l'amélioration de l'EA du troupeau.

A présent, en production porcine, la transplantation fécale pourrait être utile pour prévenir les diarrhées au sevrage en favorisant le transfert de microbiote de la mère aux porcelets (C.S. Cheng et al., 2018). En effet, suite à un transfert de microbiote de porcs adultes, l'abondance en *Escherichia* semble diminuer et la fonction de barrière de l'épithélium intestinal des porcelets semble améliorée (S. Cheng et al., 2018; Hu et al., 2018). Cependant, les transplantations doivent être réalisées avec précaution. McCormack et al. (2018) ont transplanté du microbiote fécal de porcs très efficaces à des truies ou à des porcelets. Les porcelets issus de ces truies ou ayant été transplantés étaient plus légers que leurs contemporains. Les forts changements de composition microbienne qu'elles entraînent peuvent en effet détériorer les performances des hôtes, non adaptés à ce nouveau microbiote.

L'âge des animaux lors du transfert semble influencer la colonisation par le microbiote transplanté. En effet, bien que la composition du microbiote de souris de 8 semaines d'âge soit modifiée suite à une transplantation fécale, une transplantation similaire sur des souris de 3 semaines abouti à une composition microbienne plus proche de l'inoculum (Le Roy et al.,

2019). La transplantation donne de meilleurs résultats lorsque le receveur présente une composition microbienne réduite comme c'est le cas sur des individus ayant reçu des antibiotiques ou axéniques. De plus, Le Roy et al. (2019) démontrent qu'après 9 semaines, la majorité des abondances bactériennes ayant été modifiées suite à la transplantation fécale sont de retour à une situation normale. Le microbiote est résilient.

3. Conclusion de l'étude bibliographique et hypothèses de travail

Le microbiote intestinal est un écosystème dynamique. Sa composition évolue au cours du temps et se stabilise en l'absence de perturbations externes vers environ 3 mois d'âge chez le porc. Cette composition est spécifique pour chaque animal, suivant sa race et son sexe. Cependant, divers facteurs environnementaux peuvent modifier l'équilibre entre les populations bactériennes présentes dans le tube digestif. En particulier, des changements d'alimentation ou l'exposition des porcs à différents stress (sociaux, thermiques, sanitaires) influencent fortement la composition microbienne intestinale. Une synthèse des facteurs de variation de la composition du microbiote décrits précédemment est présentée dans la Figure I-13. Ces perturbations semblent être dépendantes de la nature et de la durée du challenge subi par les animaux. Cependant, actuellement, les effets à court et long termes de challenges répétés au cours de la vie productive de l'animal sont peu décrits.

Un premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser l'impact de répétitions de perturbations (transitions alimentaires entre aliment standard et aliment riche en fibres, ingestion de mycotoxines DON) sur l'évolution à court et long terme du microbiote des porcs ainsi que l'impact de la température sur la composition microbienne, actuellement très peu documentés chez le porc. Pour cela, la thèse s'appuie sur trois essais expérimentaux dont les facteurs de variation sont recensés dans la Figure I-13:

- Le premier essai se base sur des porcs Large White, Piétrain et Duroc de 13 à 22 semaines d'âge ayant reçu alternativement un régime standard ou un régime riche en fibres alimentaires. L'impact de cette alternance de régimes sur la digestibilité des nutriments et sur la composition microbienne fécale est évalué.
- Le deuxième essai porte sur des porcs croisés Large White-Créole élevés sous un climat tropical ou tempéré entre 11 et 23 semaines. Les porcs en climat tempéré ont de

plus été soumis à un stress thermique aigu (30°C) de 3 semaines à partir de 23 semaines d'âge. Cette expérimentation permet d'évaluer l'impact de différentes conditions climatiques (stress chronique vs. aigu) sur la composition du microbiote fécal et de relier cette composition bactérienne aux performances des porcs.

- Le troisième essai est basé sur des porcs Piétrain x (Large White x Landrace) soumis ou non à un challenge alimentaire (aliment contaminé par la mycotoxine DON) d'une semaine à 13, 22 ou 13 et 22 semaines d'âge. Cet essai permet de décrire l'impact de l'ingestion de DON sur la composition du microbiote fécal et de mettre en relation les variations à court et long termes de la composition du microbiote liées à ce challenge avec les variations des performances de l'hôte.

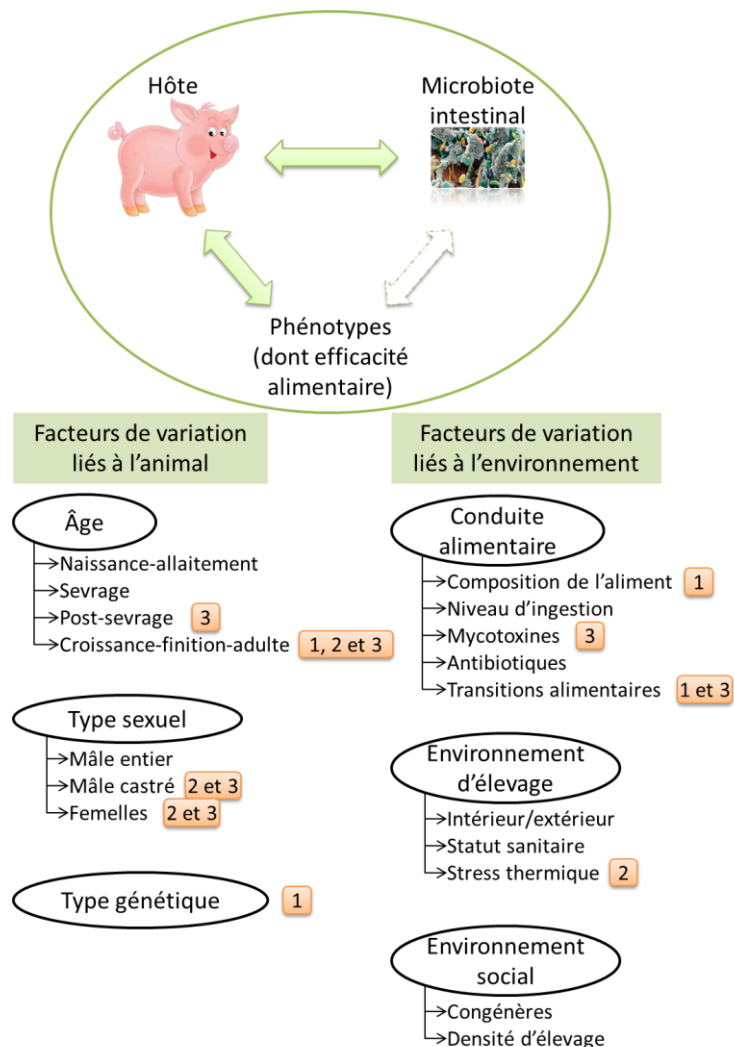


Figure I-13 : Synthèse des facteurs de variation de la composition du microbiote intestinal et des performances de l'hôte.

Les chiffres correspondent aux numéros des articles présentés dans cette thèse.

Même si le rôle spécifique du microbiote sur les performances des porcs est encore à clarifier, il pourrait agir au travers de nombreuses voies. En particulier, le microbiote intestinal participe à la régulation de l'ingestion de l'hôte et joue un rôle prépondérant dans les composantes digestives (transit, développement du tube digestif et santé digestive) et métaboliques (métabolismes lipidique, protéique et la santé générale) de l'EA. Ces effets sont le plus souvent médiés par différents composés (AGV, hormones, vitamines, acides biliaires secondaires, antigènes membranaires ...) (Figure I-14). Certains intermédiaires ont une action locale au niveau de l'épithélium intestinal et/ou agissent sur d'autres organes (foie, tissus adipeux, cerveau). Cette interaction entre le microbiote et son hôte suggère que la composition microbienne (ou la variation de composition) pourrait être utilisée pour prédire les performances de l'hôte et en particulier l'EA. A ma connaissance, les travaux mettant en relation un phénotype lié aux performances et des données microbiennes se sont limités à la classification de classes extrêmes mais n'établissent jamais de relations quantitatives. Au travers des trois dispositifs expérimentaux de la thèse, la possibilité de prédire un phénotype quantitatif à partir d'une composition microbienne fécale a été évaluée.

Enfin, les compositions microbiennes fécales obtenues à différents âges sur les mêmes animaux ont permis d'identifier des évolutions, et notamment des modifications d'écosystèmes microbiens caractérisés en tant qu'entérotypes.

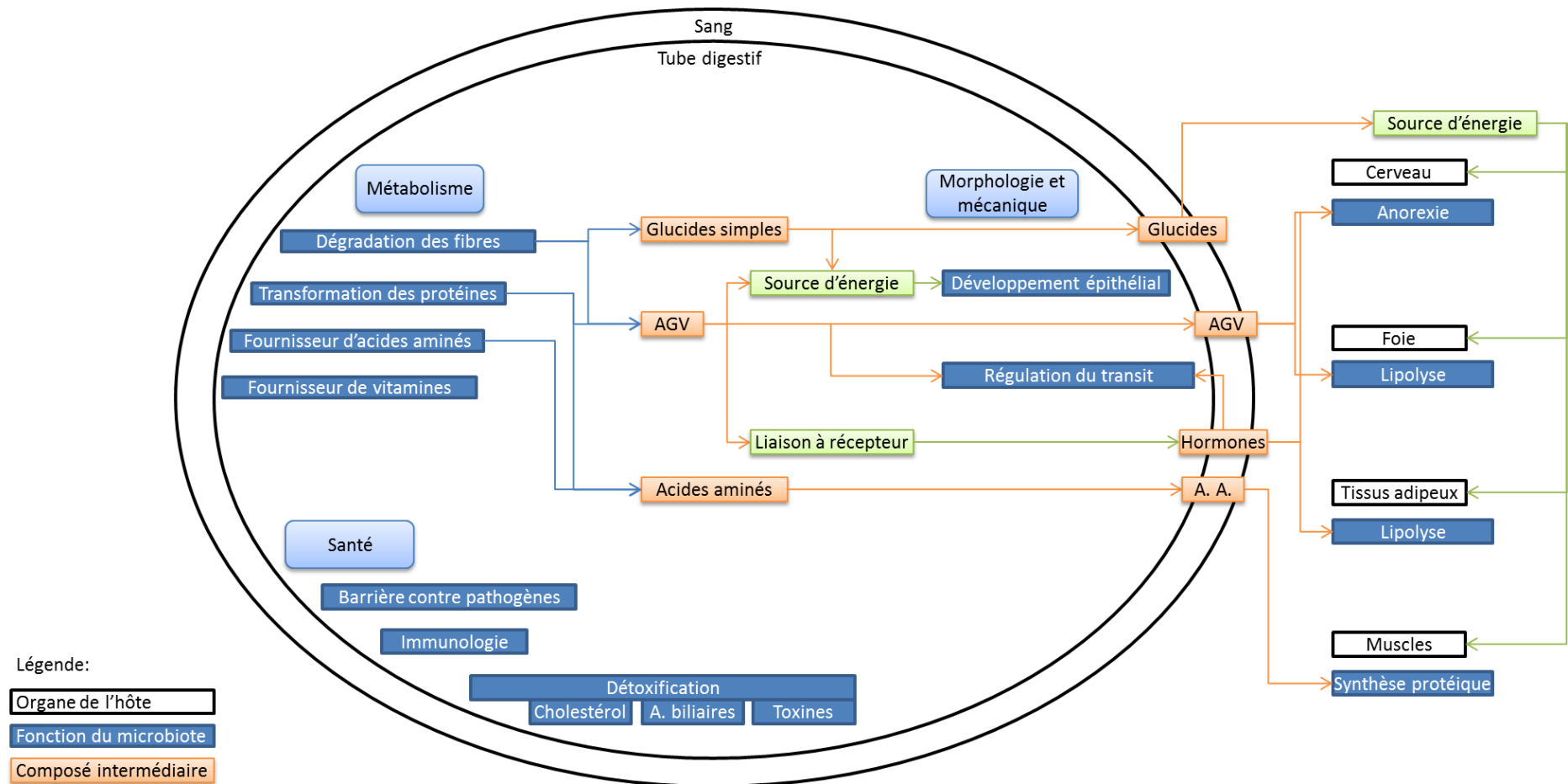


Figure I-14 : Synthèse des rôles du microbiote favorisant une bonne efficacité alimentaire de son hôte.

II. Description des méthodes utilisées pour caractériser la composition du microbiote

Le chapitre suivant détaille les procédures analytiques appliquées aux échantillons de fèces et les analyses statistiques utilisées lors de la thèse pour caractériser la composition du microbiote de porc. La Figure II-1 résume les étapes d'extraction, d'amplification et de séquençage d'ADN ainsi que le traitement bio-informatique des séquences utilisées dans les travaux présentés dans cette thèse pour aboutir à une table d'abondance d'OTU et une table d'assignation taxonomique de ces OTU.

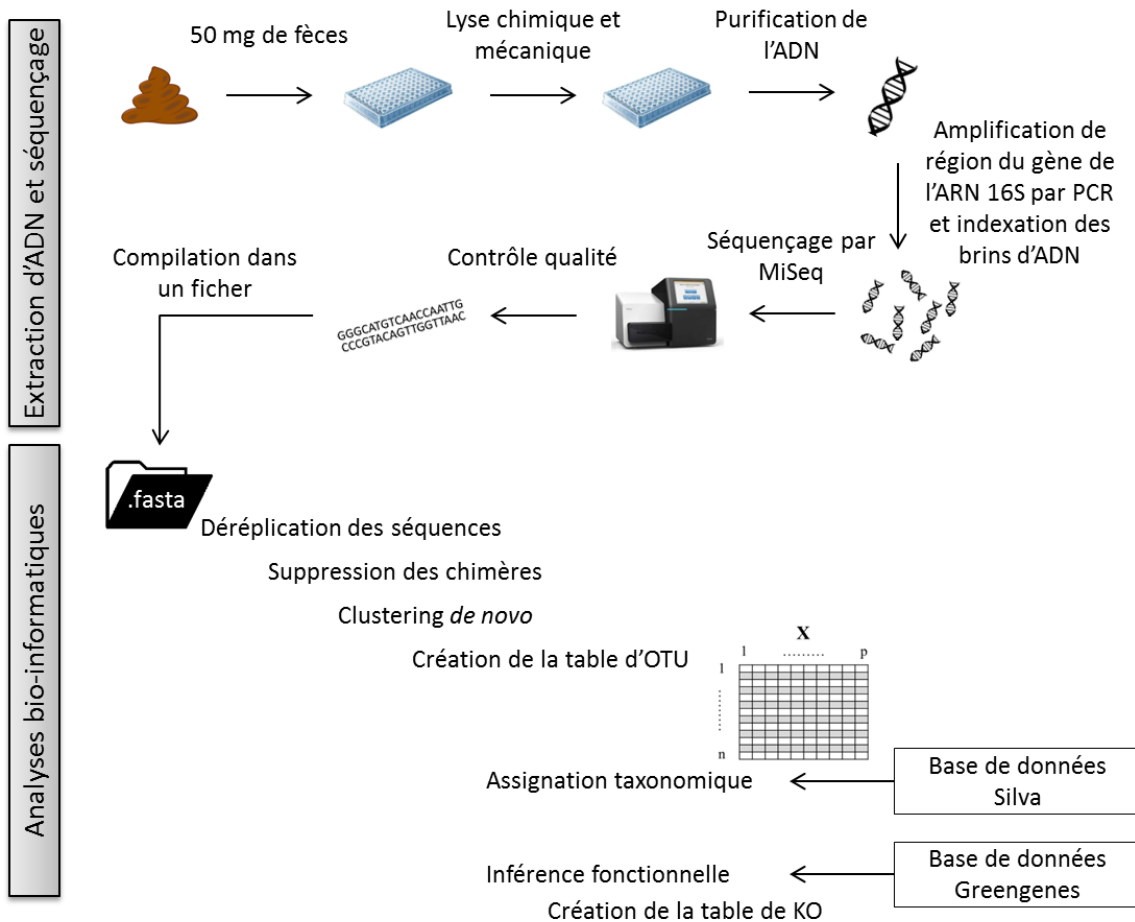


Figure II-1 : Procédure d'extraction d'ADN, de séquençage et d'analyse bio-informatique pour l'étude du microbiote fécal.

1. Des fèces au séquençage

L'ensemble du travail de cette thèse a porté sur l'analyse de fèces de porcs, prélevées à l'extrémité du rectum des porcs. Ce site de prélèvement a été choisi car il est peu invasif pour l'animal et car il permet de multiplier le nombre de prélèvements sur un même animal sans avoir besoin de l'abattre.

En pratique, les fèces sont collectées sur des animaux contentionnés et sont stockées dans des tubes identifiés avec un code barre dans les 5 minutes suivant le prélèvement. Les tubes sont alors immédiatement placés dans de l'azote liquide pour une congélation instantanée en attendant d'être stockés au congélateur à -80°C en prévision de leur future analyse. Cette congélation permet de stopper les dégradations microbiennes. Ainsi, lors de la décongélation, la composition microbienne reflète réellement la composition à l'extrémité du rectum au moment du prélèvement.

Les étapes suivantes d'extraction d'ADN ont été réalisées à l'INRA dans le cadre de cette thèse. Dans chaque alvéole d'une plaque de 96 puits sont placés 50 mg de fèces. Une lyse mécanique est réalisée par bead-beating. L'ADN est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit d'extraction Zymo « ZR-96 Soil Microbe DNA Kit ». Cet ADN peut ensuite être séquençé.

Dans le cadre de la thèse, l'analyse du microbiote se base sur l'étude du gène bactérien de l'ARN 16S. Ce gène est composé de 10 portions codantes dont la séquence est commune à toutes les bactéries. Ces portions peuvent alors être ciblées notamment pour amplifier spécifiquement ce gène par PCR. Le gène de l'ARN 16S comprend aussi 9 portions non codantes qui varient suivant l'espèce bactérienne. L'analyse de ces portions permet alors de classer et dénombrer les bactéries présentes dans l'échantillon de départ (Lane et al., 1985; Wang and Qian, 2009). Dans l'ensemble des travaux mis en place durant cette thèse, il a été choisi de séquençer les régions V3 et V4 du gène de l'ARN 16S afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les études.

Les primers ciblant la région V3-V4 (F460 : CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG et R460 : GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) sont ajoutés dans chaque puit des plaques contenant l'ADN extrait et purifié. L'amplification de la région V3-V4 de l'ADN bactérien est réalisée par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (30

cycles à 65°C). Une première vérification de la qualité d'extraction, une purification et une amplification sont réalisées par électrophorèse. Les plaques d'ADN amplifié sont ensuite envoyées à la plate-forme GeT-PlaGE de Toulouse pour y être séquencées par Illumina MiSeq. Un premier contrôle de la qualité de séquençage est réalisé à la plate-forme. Les séquences trop courtes ou comprenant des nucléotides indéterminés ne sont pas appareillées et sont donc supprimées. Dans chaque run, au minimum un échantillon connu et un blanc sont ajoutés avant le séquençage et permettent de vérifier la qualité du run. Ces échantillons permettent aussi de comparer plusieurs runs, notamment lorsque les échantillons d'une même étude sont répartis sur plusieurs runs. Pour chaque échantillon, l'ensemble des séquences identifiées et validées est regroupé dans un fichier au format FASTQ qui servira de base pour l'analyse bio-informatique de la composition du microbiote.

Les méthodes d'extraction et d'amplification du gène de l'ARN 16S bactérien ne sont pas parfaites et peuvent introduire des biais de comptage du nombre de bactéries. Lors de l'extraction, les cellules non lysées ne permettent pas l'accès à l'ADN lors des étapes suivantes ce qui réduit la quantité d'ADN séquencée (Wintzingerode et al., 1997). De plus, certains éléments peuvent être extraits en même temps que l'ADN et limiter l'efficacité de la PCR. Pour réduire ce biais, l'ADN est purifié, avec le risque de perdre un peu d'ADN lors de cette purification (Wintzingerode et al., 1997). Outre le biais d'extraction, la PCR introduit un biais supplémentaire en sous-estimant les OTU rares (abondance inférieure à 1%) comparé aux OTU abondantes (Gonzalez et al., 2012). Enfin, le nombre de copies du gène de l'ARN 16S varie de 1 à 15 suivant les bactéries : en moyenne, chaque génome bactérien contient 4,2 copies de ce gène (Větrovský and Baldrian, 2013). La méthode d'analyse de la composition microbienne par le gène de l'ARN 16S ne permet donc pas une quantification réelle du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. Des études récentes proposent d'ajouter un standard interne dans les échantillons avant toute extraction et amplification. A partir de la quantité (nombre de séquences d'ADN) connue de standard interne ajouté, il serait alors possible de quantifier l'abondance réelle des OTU (Venkataraman et al., 2018). Ces méthodes n'étaient malheureusement pas encore mises en place lors de l'extraction des échantillons de cette thèse.

2. Des séquences aux tables d'OTU et aux fonctions (analyse bio-informatique)

L'analyse bio-informatique des données de séquençage se base sur les fichiers FASTQ compilés en un unique fichier au format FASTA pour chaque étude. A l'aide du logiciel VSEARCH (Rognes et al., 2016), les séquences sont dérépliquées, les chimères (c'est-à-dire les séquences anormales issues de recombinaisons erronées) sont supprimées. Ensuite, les séquences sont regroupées *de novo* suivant leur similarité : une première séquence est utilisée comme base et appelée centroïde. Une seconde séquence est comparée au centroïde existant. Si la similarité est supérieure à 97%, cette deuxième séquence est considérée comme appartenant au même cluster, nommé unité taxonomique opérationnelle (OTU) (Konstantinidis and Tiedje, 2005). Dans le cas contraire, elle forme un second centroïde. Et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les séquences aient été comparées à tous les centroïdes et regroupées en OTU. Le seuil de similarité est choisi par l'utilisateur. Dans le cadre de cette thèse, le seuil de 97% a été retenu dans les trois études expérimentales afin de permettre la comparaison des résultats entre études.

L'assignation taxonomique est réalisée par comparaison des séquences des centroïdes de chaque OTU à la base de données SILVA (Quast et al., 2013) à l'aide du logiciel Usearch (version 9.2.64_i86-linux32). En dessous de 90% de similarité, l'OTU est considérée comme inconnue.

L'inférence fonctionnelle a été réalisée à partir d'une table d'OTU obtenue via QIIME, puis à l'aide du logiciel PICRUSt (Langille et al., 2013). Pour chaque OTU, le logiciel identifie l'ensemble des fonctions biologiques connues sur la base de la séquence d'ADN à partir de la base de données Greengenes (DeSantis et al., 2006). Afin de respecter une nomenclature commune à toutes les fonctions, celles-ci sont identifiées dans la base de données « Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes » par des KEGG orthologues (KO). Le lien fonctionnel entre OTU et KO suppose donc que le génome de la bactérie correspondante à l'OTU ait été séquencé, que les gènes aient été identifiés et que leur fonction soit connue. Au final, la proportion d'Eucaryotes et de Procaryotes entièrement séquencés avec une inférence fonctionnelle s'élève à 46% (Kanehisa et al., 2016).

L'abondance d'une OTU dans un jeu de données est définie comme le nombre de séquences correspondant à cette OTU. Une abondance relative peut être calculée en rapportant le nombre de séquences d'une OTU au nombre total de séquences du jeu de données. Les abondances (observées et relatives) peuvent être définies à l'échelle de l'OTU, du genre, de la famille... D'un point de vue fonctionnel, l'abondance attribuée à un KO dans un échantillon correspond à la somme des abondances des OTU associées à ce KO.

Suivant les études, l'abondance peut être calculée en conservant toutes les OTU issues du séquençage, après un premier tri sur la rareté de ces séquences (ex : suppression des OTU dont le nombre de séquences est inférieur à 0,01% du nombre total de séquences), voire après suppression de toutes les OTU sans assignation taxonomique. Les abondances peuvent être calculées sur un jeu de données brut ou précédemment normalisé.

3. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques développées ci-dessous a été appliqué aux différents jeux de données de cette thèse. Cette uniformité dans les analyses permet une comparaison des résultats plus facile. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2018).

3.1. Méthodes de normalisation

Selon l'analyse, il peut être nécessaire de normaliser préalablement le jeu de données. Cette étape de normalisation permet de prendre en compte la variabilité entre les échantillons due aux différences d'extraction d'ADN et de séquençage. Certains paquets du logiciel R intègrent directement une étape de normalisation dans leur procédure, d'autres non.

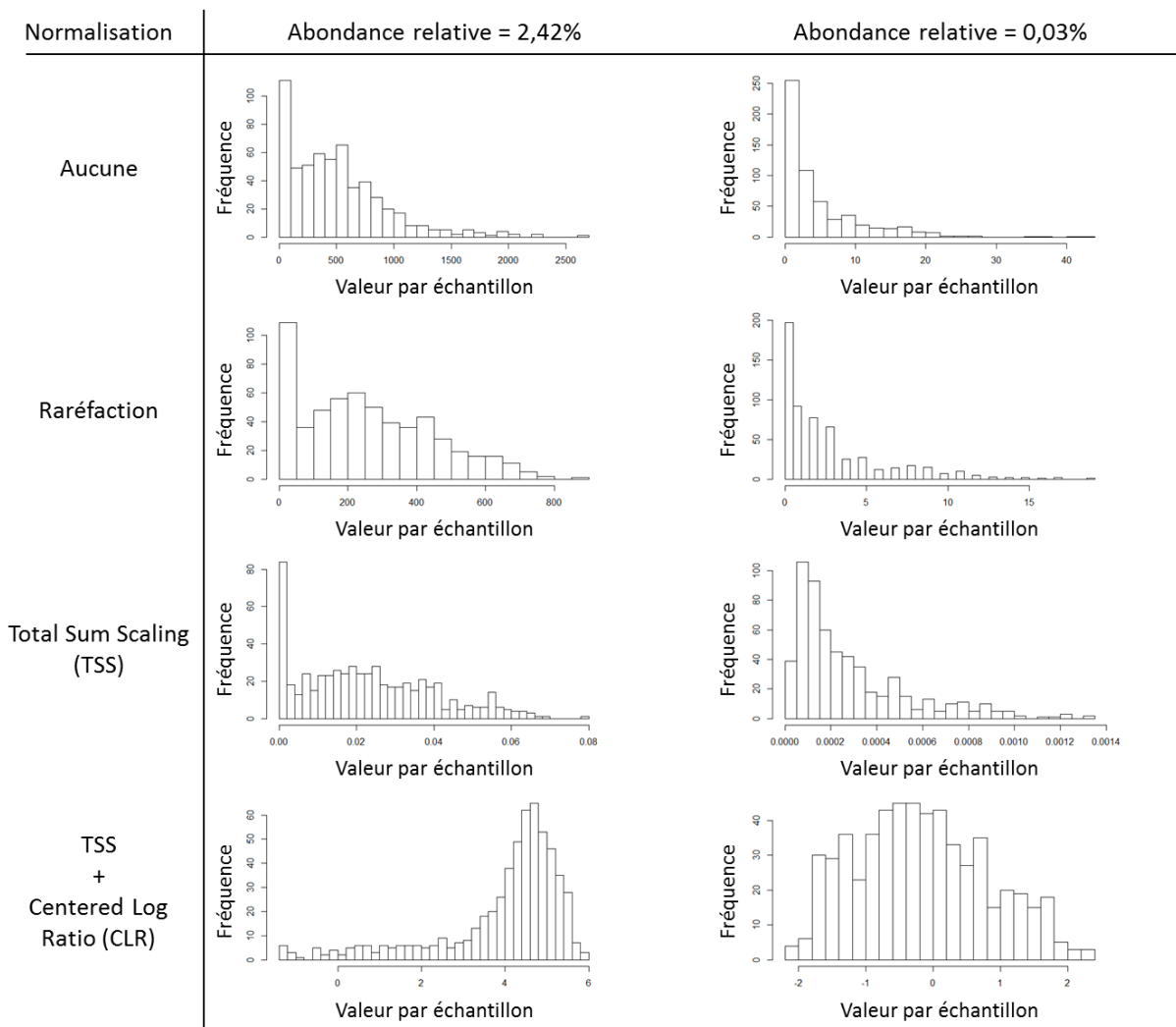


Figure II-2 : Impact de la méthode de normalisation sur la distribution des valeurs d'une OTU par échantillon suivant l'abondance relative de cette OTU.

3.1.1. Raréfaction

Lors de l'extraction d'ADN bactérien puis du séquençage, la quantité d'informations recueillie varie d'un échantillon à un autre. Il en résulte un nombre très variable de séquences par échantillon. Ce nombre de séquences est appelé « profondeur de séquençage ».

La raréfaction permet d'homogénéiser la quantité d'informations contenue dans chaque échantillon sans modifier la distribution des abondances (Figure II-2). Elle consiste à supprimer aléatoirement des séquences d'un échantillon pour atteindre un nombre total de séquence égal dans tous les échantillons d'un jeu de données. La profondeur de séquençage est alors identique dans tous les échantillons.


Mathématiquement, la raréfaction supprime de nombreuses OTU rares tandis que les OTU abondantes sont toujours présentes dans le jeu de données raréfié. Une large part de l'information contenue dans le jeu de données issu du séquençage est supprimée. Ceci amène une controverse sur l'intérêt d'utiliser cette méthode de normalisation (McMurdie and Holmes, 2014). En effet, rien n'indique que l'information supprimée n'est pas intéressante au regard de la question posée. Il a été démontré que des OTU rares pouvaient avoir un intérêt majeur en complétant des fonctions biologiques déjà présentes via des OTU abondantes ou en remplissant certaines fonctions métaboliques spécifiques, notamment celles liées à un métabolisme hormonal (Jousset et al., 2017; Antwis et al., 2019).

Dans certains cas, il est nécessaire d'homogénéiser la quantité d'informations contenue dans chaque échantillon par l'application d'une raréfaction. C'est le cas notamment pour les analyses de diversité. Une surabondance d'OTU dans des échantillons avec une profondeur de séquençage élevée comparés à d'autres échantillons avec une profondeur de séquençage faible biaise le calcul des indices. A l'inverse, d'autres analyses sont plus performantes lorsque la totalité de l'information extraite des échantillons est présente. La meilleure stratégie est alors d'adapter la méthode de normalisation à l'analyse statistique choisie.

3.1.2. Total Sum Scaling

La normalisation Total Sum Scaling (TSS) consiste à remplacer pour chaque combinaison OTU-échantillon le nombre de séquence de l'OTU par son abondance relative dans l'échantillon (Figure II-3). Par cette transformation, la distribution des abondances n'est donc pas impactée et la totalité de l'information issue du séquençage est conservée (Figure II-2).

	OTU 1	OTU 2	OTU 3	Nb total de séquences
Echantillon 1	20	60	120	200
Echantillon 2	10	60	30	100



$$\frac{\text{nb séquences de l'OTU}}{\text{nb séquences de l'échantillon}}$$

	OTU 1	OTU 2	OTU 3	Total
Echantillon 1	0,1	0,3	0,6	1
Echantillon 2	0,1	0,6	0,3	1

Figure II-3 : Exemple de normalisation Total Sum Scaling (TSS).

3.1.3.Centered Log Ratio

La normalisation Centered Log Ratio (CLR) permet de prendre en compte la variabilité de profondeur de séquençage tout en conservant toute l'information présente. Elle est appliquée sur une table d'OTU précédemment normalisée par TSS. Pour chaque combinaison OTU-échantillon, l'abondance relative de l'OTU est remplacée par une valeur calculée comme décrit Figure II-4. La Figure II-5 donne un exemple de cette normalisation. En appliquant cette normalisation, la distribution des abondances des OTU se rapproche d'une loi normale (Figure II-2). La normalisation CLR précédée de TSS est préconisée pour l'utilisation du package MixOmics dans le logiciel R.

$$\mathbf{y} = (y_1, \dots, y_D)' = \left(\log \frac{x_1}{\sqrt[D]{\prod_{i=1}^D x_i}}, \dots, \log \frac{x_D}{\sqrt[D]{\prod_{i=1}^D x_i}} \right)'$$

Abondance relative de l'OTU1
Abondance relative de l'OTU D

Vecteur OTU pour un échantillon
Moyenne géométrique des valeurs d'abondance de toutes les OTU

Figure II-4 : Formule utilisée dans la méthode de normalisation Centered Log Ratio (CLR).

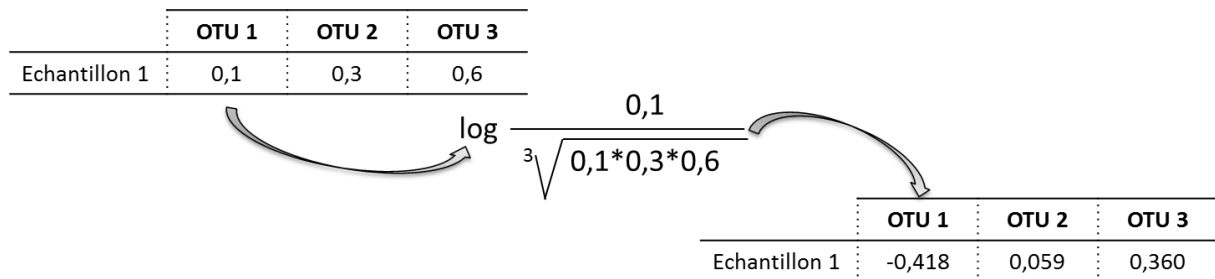


Figure II-5 : Exemple numérique de normalisation Centered Log Ratio (CLR).

3.1.4.Comparaison des méthodes de normalisation

Le jeu de données obtenu après séquençage contient un nombre total de séquences par échantillon très variable (profondeur de séquençage) et la distribution des valeurs d'abondance par OTU ne suit pas une loi normale. Ces deux éléments peuvent biaiser les résultats obtenus. La raréfaction permet de s'affranchir des différences de profondeur de séquençage tandis qu'une normalisation TSS et CLR conserve toute l'information contenue

dans les séquences et rapproche la distribution des abondances d'une loi normale. Dans le cadre de cette thèse, une comparaison des méthodes de normalisation a été réalisée afin d'optimiser les résultats obtenus par analyse discriminante. Elle se base sur le jeu de données issu de l'essai 1 qui sera décrit en détail dans l'article 1. Brièvement, 120 échantillons de fèces porcins ont été prélevés sur des porcs ayant reçu soit un régime riche en fibres, soit un régime standard pendant 3 semaines. Le séquençage du microbiote fécal a abouti à une table d'OTU constituée de 2 780 OTU parmi 233 échantillons.

3.1.4.1. Impact de la méthode de normalisation

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer l'impact de la méthode de normalisation sur la discrimination d'échantillons de microbiote fécal par analyse discriminante en composantes principales (DAPC). Pour cela nous avons comparé les résultats d'analyses en composantes principales (ACP) obtenus avec deux méthodes de normalisation : TSS puis CLR et raréfaction.

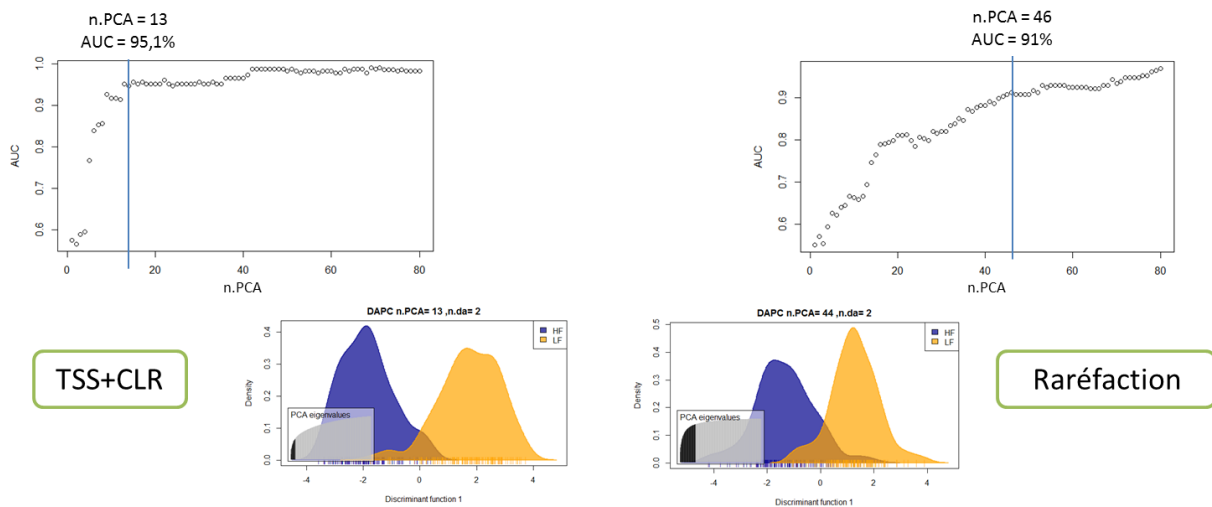


Figure II-6 : Impact de la méthode de normalisation (TSS puis CLR vs raréfaction) sur une analyse discriminante par DAPC.

Dans le cas de la prédiction d'un phénotype qualitatif, le modèle cherche à prédire l'appartenance d'un échantillon à une classe. La classe prédite est alors comparée à la classe réelle connue de l'échantillon. Il en résulte un effectif d'échantillons bien classés, faux positifs ou faux négatifs. Le critère AUC (area under the curve) évalue la qualité de la prédiction à partir des proportions d'individus mal classés (faux positifs ou faux négatifs). Plus l'AUC est proche de 1, meilleure est la prédiction.

L'analyse discriminante réalisée sur une table normalisée par TSS puis CLR nécessite un plus faible nombre de composantes et donne un meilleur résultat (AUC = 95%, 13 composantes) que l'analyse réalisée sur la table d'OTU raréfiée (AUC = 91%, 46 composantes) (Figure II-6). Pour le jeu de données considéré dans cette analyse, le modèle discriminant obtenu après raréfaction est moins performant que celui obtenu après transformation TSS puis CLR.

3.1.4.2. Impact de la profondeur de séquençage sur la normalisation TSS+CLR

Dans un second temps, nous avons cherché à évaluer l'impact de la profondeur de séquençage sur les résultats d'analyse discriminante à partir d'une table d'OTU normalisée par TSS puis CLR. Pour cela, nous avons comparé deux tables d'OTU : la table de comptage directement issue du séquençage comprenant des profondeurs de séquençage variées suivant les échantillons, et la table de comptage raréfiée à une profondeur de séquençage de 5 000 pour tous les échantillons. Sur ces deux tables ont été appliquées les transformations TSS et CLR. Une DAPC a ensuite permis de discriminer les échantillons suivant le régime alimentaire que les porcs avaient reçu.

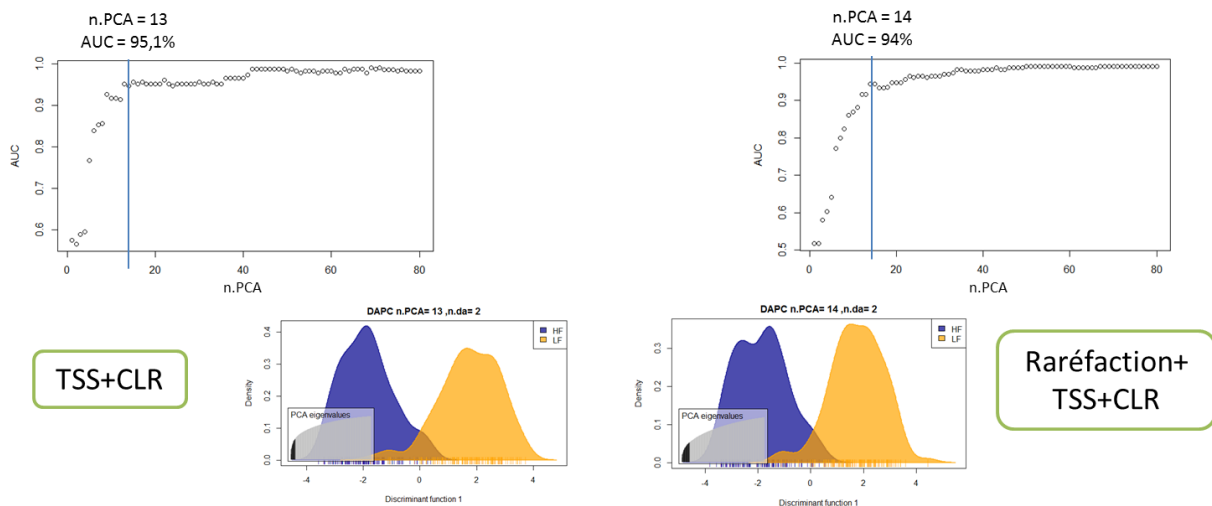


Figure II-7 : Impact de la profondeur de séquençage sur une analyse discriminante par DAPC.

Les résultats de la discrimination sont présentés Figure II-7. Avec ou sans raréfaction, c'est-à-dire à profondeur de séquençage égale ou diverse, les résultats sont équivalents. Il n'y a donc pas d'effet de la profondeur de séquençage sur les résultats de discrimination lorsqu'une normalisation TSS puis CLR est appliquée. Il n'est donc pas utile de raréfier une table de comptage avant d'appliquer une normalisation TSS puis CLR.

Sur la base des résultats de ce travail méthodologique, il a été choisi de mettre en œuvre les analyses discriminantes sur des jeux de données normalisés par TSS puis CLR.

3.2. Analyses descriptives

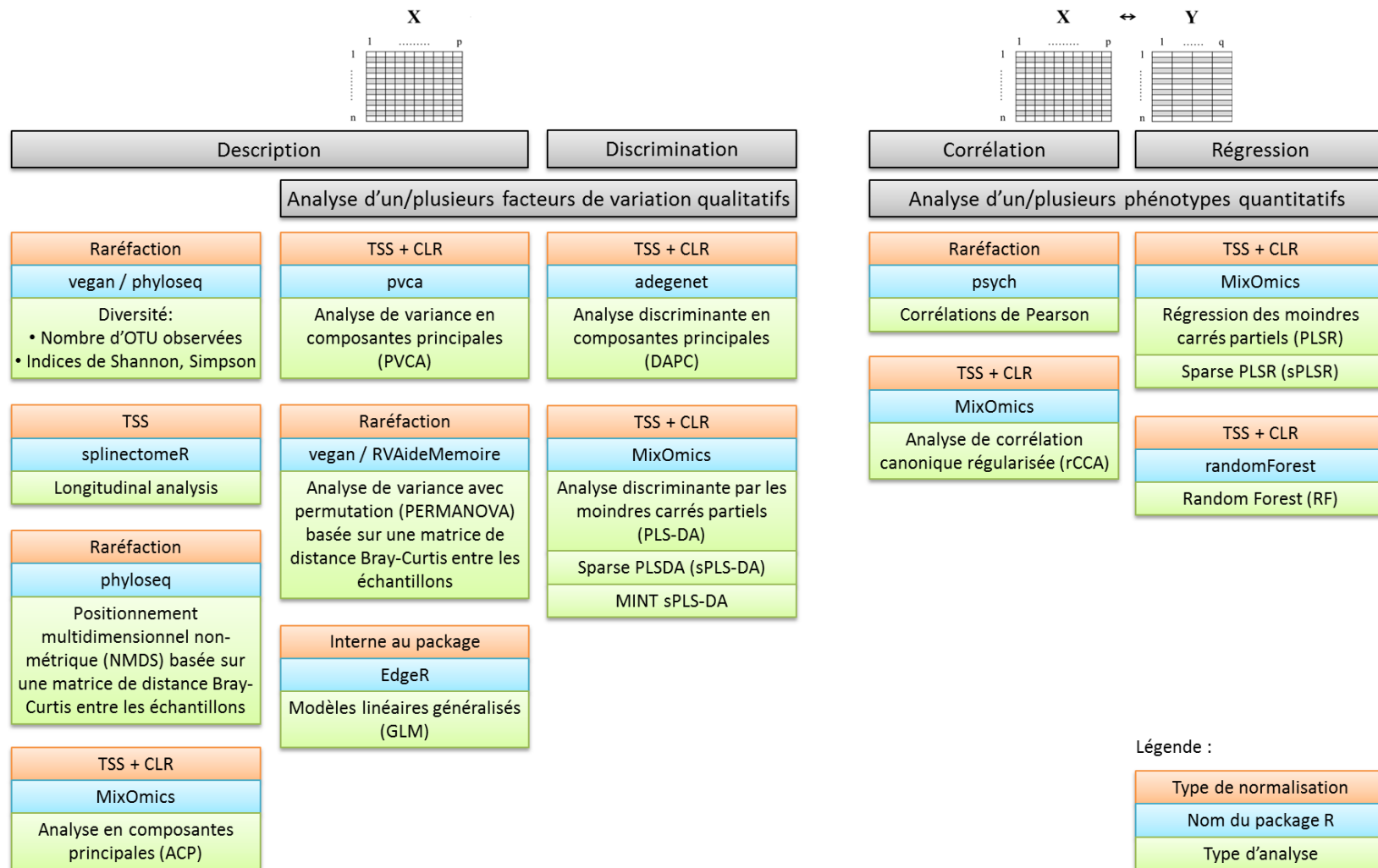


Figure II-8 : Analyses statistiques utilisées pour l'étude de données microbiennes, en lien avec des facteurs de variation qualitatifs ou des données phénotypiques quantitatives.

3.2.1. Analyse de la diversité microbienne

Différents indices permettent d'évaluer la diversité d'un écosystème. Parmi les plus couramment utilisés, l'indice « Observed » rend compte du nombre d'OTU différentes observées dans un échantillon. Les indices de Shannon (H') et de Simpson (λ) caractérisent la diversité alpha en prenant en compte les abondances relatives de chaque OTU selon les équations 1 et 2 (Figure II-8). Ces indices de diversité sont utilisés de manière complémentaire dans les études traitant de la diversité du microbiote.

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i \quad [\text{Equation 1}]$$

$$\lambda = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad [\text{Equation 2}]$$

Avec $p(i) = \frac{n_i}{N}$

i : une OTU

S : nombre total d'OTU différentes

n : nombre de séquences pour l'OTU i

N : nombre total de séquences

3.2.2. Représentation non supervisée de la composition microbienne

Chaque échantillon possède une composition microbienne spécifique. Cependant, une représentation des échantillons sur un plan par une analyse non supervisée peut permettre de relever des similarités de composition. Compte tenu des caractéristiques du jeu de données, l'analyse doit prendre en compte la forte colinéarité entre de nombreuses OTU. Ainsi, une ACP réduit le nombre de composantes et représente les échantillons dans un espace où les axes sont indépendants les uns des autres. De manière un peu plus spécifique, la distance entre tous les échantillons peut être calculée (ex : distance de Bray-Curtis) puis représentée sur un plan qui optimise ces distances. Il s'agit d'un positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) (Dixon, 2003) (Figure II-8).

Des prélèvements répétés de fèces sur les mêmes animaux ont été réalisés durant cette thèse. L'évolution de l'abondance à différentes échelles taxonomiques ont pu être représentées en fonction du temps à l'aide du paquet `splinctomeR` (Figure II-8).

3.2.3. Analyse de l'impact de facteurs de variation sur la composition microbienne

La part de la variance totale du jeu de données microbien attribuée à des facteurs de variation connus (répétition, sexe, régime alimentaire...) peut être étudiée par une analyse de variance en composantes principales (PVCA) (Figure II-8). Cette analyse peut être complétée par une analyse de variance avec permutation (PERMANOVA) appliquée à une matrice de distance telle que Bray-Curtis afin de tester la significativité de l'impact d'un facteur de variation donné sur la composition microbienne (Figure II-8). Pour cette analyse, l'homogénéité de dispersion de la composition microbienne des groupes testés doit être vérifiée.

Plus précisément, l'impact d'un facteur de variation donné sur les abondances des OTU peut être étudié en utilisant des modèles linéaires généralisés (Figure II-8). L'avantage principal du paquet utilisé dans cette thèse (`edgeR`) réside dans les possibilités qu'il offre pour prendre en compte et s'affranchir de l'impact de facteurs de variation déjà connus. Le modèle linéaire généralisé (GLM) est associé au plan d'expérimentation et les abondances des OTU sont comparées pour le facteur testé, toutes choses égales par ailleurs. A ma connaissance, il n'existe pas d'autres moyens de corriger une table de comptage d'OTU pour des facteurs de variation connus.

3.2.4. Regroupement en entérotypes

Le microbiote est un écosystème. Il peut donc être intéressant d'étudier sa composition globale plutôt que de regarder chaque OTU une par une. Une méthode développée par Arumugam et al. (2011) chez l'homme est d'établir des clusters, nommés entérotypes. La méthodologie est développée ci-dessous. Elle se base sur les abondances relatives à l'échelle taxonomique des genres.

Dans un premier temps, la distance entre tous les échantillons est calculée. Pour l'exemple, nous prendrons un jeu de données composé de trois échantillons X, Y et Z.

Prenons deux échantillons X et Y avec pour chacun une abondance relative pour chaque genre. Les abondances sont exprimées en pourcentage de l'abondance totale de l'échantillon afin d'être comparables. Une mesure de divergence entre ces deux échantillons est obtenue par la méthode de Kullback-Leibler :

$$divergence(X, Y) = \sum_i x_i \log \frac{x_i}{y_i}$$

où x et y sont les abondances du genre i dans les échantillons X et Y.

De même, la mesure de divergence est calculée entre les échantillons X et Z.

La distance entre les échantillons Y et Z est alors :

$$distance(Y, Z) = \sqrt{0,5 * divergence(X, Y) + 0,5 * divergence(X, Z)}$$

Les clusters sont établis à partir de l'algorithme PAM (Partitioning Around Medoids) qui est dérivé de l'algorithme des k-means. Le nombre optimal de clusters est déterminé par l'index CH (Calinski-Harabasz). Le nombre de clusters choisi correspond à une valeur de CH maximale. Ceci signifie que la distance au sein du cluster est plus faible que la distance entre les clusters.

La validation des clusters choisis se base sur la méthode de la silhouette. Prenons un échantillon *i* appartenant à un cluster A et B un autre cluster, le plus proche de *i* parmi tous les clusters choisis. La silhouette est calculée comme suit :

$$S(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max(a(i), b(i))}$$

où a et b sont respectivement la distance moyenne entre *i* et les autres échantillons des clusters A et B.

Une silhouette proche de 0 signifie que l'échantillon se situe entre 2 clusters. Une silhouette négative signifie que l'échantillon a été mal classé. Plus la valeur absolue de la silhouette est proche de 1, plus l'échantillon appartient à un cluster.

Chaque cluster validé est un entérotype. Il peut alors être caractérisé par les abondances relatives par genre bactérien des individus qui le compose. Les genres dominants dans chaque entérotype peuvent alors être identifiés.

3.3. Analyses discriminantes

3.3.1. DAPC et (sparse)PLS-DA

Les analyses discriminantes sont des analyses supervisées cherchant à séparer des groupes déjà identifiés d'échantillons à partir de plusieurs variables prédictives. Dans le cas de données microbiennes, les tables d'OTU ont la particularité de présenter plus de prédicteurs que d'échantillons. De plus, un grand nombre d'OTU sont fortement corrélées. Cette structure de jeu de données requiert des analyses spécifiques.

La DAPC se répartit en deux étapes (Jombart et al., 2010) (Figure II-8). Une ACP résume la totalité de la variabilité du jeu de données en un nombre réduit de variables synthétiques (inférieur au nombre d'échantillons) et décorréelées les unes des autres. Elle est suivie d'une analyse discriminante qui établit des variables synthétiques maximisant la variabilité intergroupe et minimisant la variabilité intra-groupes. Dans ce cas, toutes les données d'abondance des OTU à disposition sont utilisées pour établir le modèle.

L'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) (Lê Cao et al., 2011) est adaptée à l'analyse de jeux de données comprenant des données colinéaires et un nombre supérieur de prédicteurs par rapport aux échantillons (Figure II-8). La PLS-DA décompose le jeu de données en variables synthétiques en maximisant la covariance entre les OTU et le phénotype quantitatif à discriminer. Une pénalisation LASSO peut être appliquée pour sélectionner les variables les plus informatives dans le cas d'une sparse PLS-DA (sPLS-DA). En complément, la sPLS-DA peut prendre en compte les mesures répétées sur un même animal. L'ajout du paramètre « multilevel » permet de prendre en compte la part de variabilité de la composition microbienne attribuée à un animal et ainsi d'évaluer précisément la part de variabilité attribuée au facteur testé.

3.3.2. Comparaison des méthodes de prédiction DAPC vs sPLS-DA

La DAPC et la sPLS-DA permettent toutes deux de discriminer des échantillons à partir de la composition microbienne. Afin d'utiliser la méthode la mieux adaptée aux jeux de données de cette thèse, une comparaison des résultats obtenus à partir de ces deux méthodes a été réalisée. Cette comparaison s'appuie sur le jeu de données issu de l'essai 1, comme précédemment utilisé pour comparer les méthodes de normalisation.

Le modèle établi par DAPC à partir de l'ensemble des OTU disponibles dans le jeu de données (2,780 OTU) a permis de prédire l'appartenance des échantillons à un régime fibreux ou non avec 5% d'erreur. De même, le modèle établi par sPLS-DA prédit avec 5% d'erreur. Cependant, ce dernier modèle réduit le nombre de prédicteurs à 26 OTU. Les OTU sélectionnés par la sPLS-DA font partie des principaux contributeurs aux axes de la DAPC (Figure II-9). L'information présente dans les OTU et utilisée pour les modèles de prédiction est donc équivalente entre les méthodes d'analyse. Cependant, l'étape de sélection de variable en sPLS-DA réduit la complexité du modèle et facilite l'interprétation des résultats. Cette analyse sera donc préférentiellement utilisée dans cette thèse.

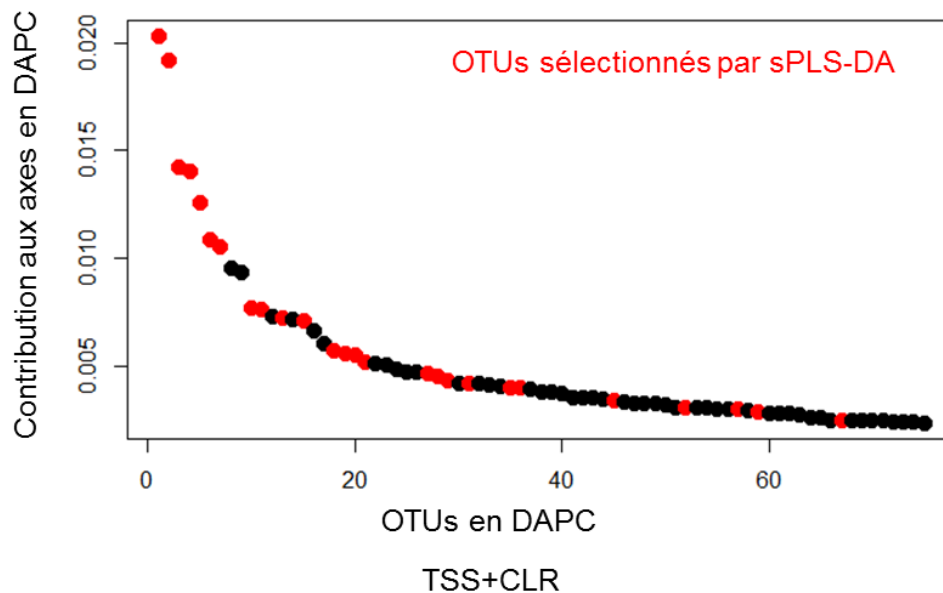


Figure II-9 : Comparaison des OTU constituant les modèles de prédiction par DAPC et sPLS-DA.

3.4. Analyses de corrélation

La relation entre la composition du microbiote et un ou plusieurs phénotypes quantitatifs peut être analysée par corrélation. Les corrélations peuvent être appliquées à différents niveaux taxonomiques : à partir de la table d'abondance des OTU, à l'échelle des genres, des familles... Durant la thèse, deux méthodes de corrélation ont été testées : analyse de corrélation canonique régularisée (rCCA) et corrélation de Pearson (Figure II-8). La corrélation de Pearson établit un degré de relation linéaire entre deux variables (ex : un phénotype et l'abondance d'une OTU). La corrélation canonique recherche des combinaisons linéaires entre les variables de deux jeux de données issus des mêmes échantillons. Elle cherche à réduire le nombre de dimensions en maximisant la corrélation entre les jeux de données. Mathématiquement, la rCCA est adaptée aux grands jeux de données.

Pour tester la significativité des corrélations, la table d'OTU est mélangée aléatoirement avant d'établir la corrélation. Après 100 itérations, les valeurs de corrélation maximales obtenues servent de seuil à partir duquel une corrélation est estimée significative. Les deux méthodes de corrélation précédemment citées ont été comparées et donnent des résultats très semblables.

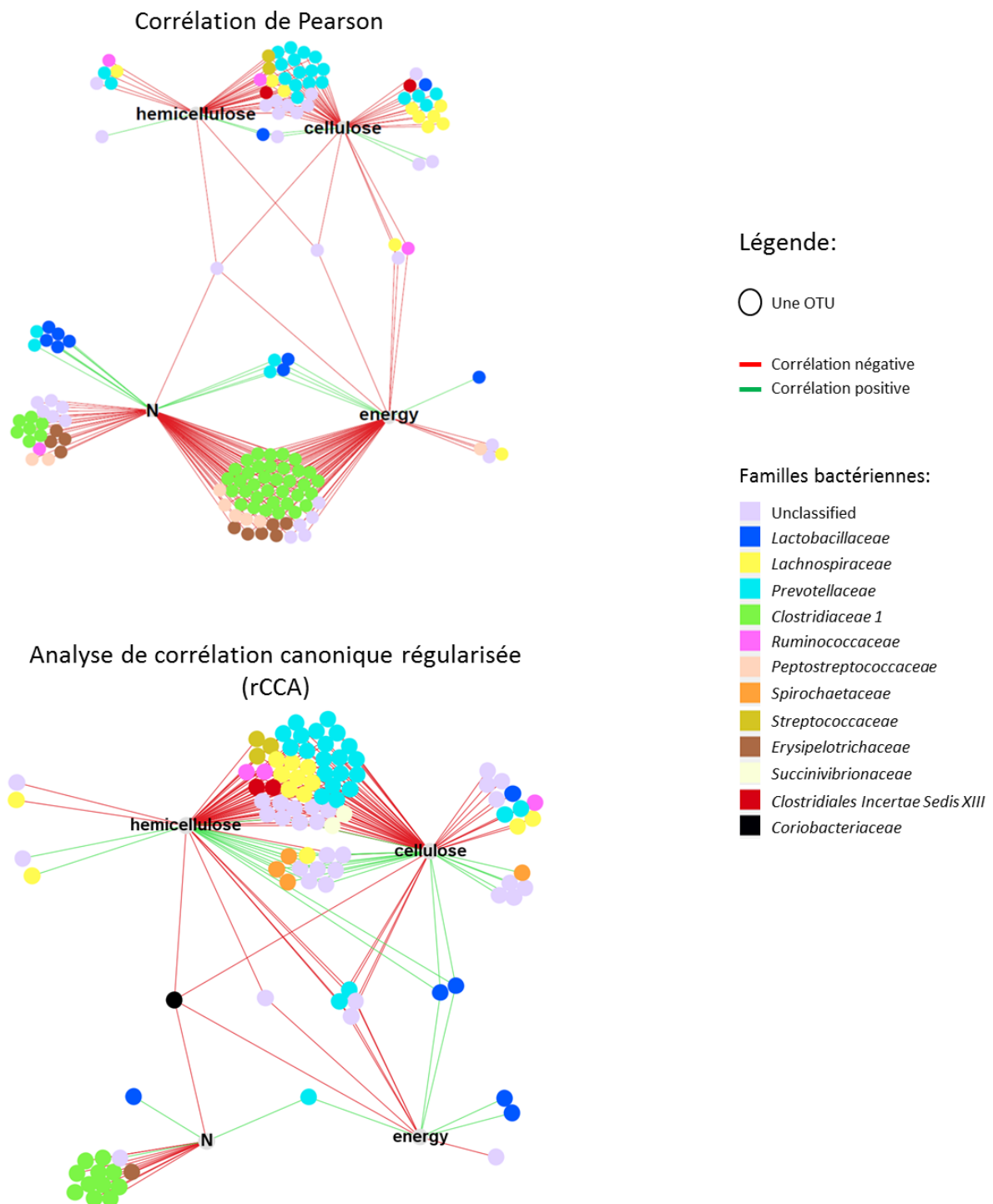


Figure II-10 : Comparaison des résultats obtenus par corrélation de Pearson ou analyse de corrélation canonique régularisée entre les coefficients de digestibilité de l'hémicellulose, de la cellulose, de l'azote (N) ou de l'énergie et les abondances des OTU.

3.5. Analyses prédictives d'un phénotype quantitatif

Afin de prédire un phénotype quantitatif à partir de données de composition microbienne, des méthodes de régression peuvent être utilisées (Figure II-8). La régression des moindres carrés partiels (PLSR) est adaptée dans le cas où le nombre de prédicteurs est supérieur au nombre d'individus. Elle peut être appliquée à plusieurs variables réponses et recherche les relations linéaires pouvant exister entre les phénotypes et les prédicteurs. A l'inverse, la régression en forêts aléatoires (random forest : RF) ne se limite pas aux relations linéaires et ne s'applique qu'à une variable réponse à la fois. La PLSR se base uniquement sur des données quantitatives tandis que la RF peut inclure des variables quantitatives et qualitatives. De plus, la PLSR peut être doublée d'une étape de sélection de variables permettant de réduire le bruit, notamment dû à une forte colinéarité parmi les prédicteurs. Il s'agit alors d'une sparse PLSR (sPLSR) (Lê Cao et al., 2008). Par construction, la RF sélectionne les prédicteurs lors de la création de chaque arbre. Ces méthodes de régression seront développées dans un article présenté dans la partie III-4.

III. Etude Expérimentale

1. Article 1, effet de la teneur en fibre du régime alimentaire sur la digestibilité et la composition du microbiote fécal de porcs en croissance-finition

Présentation de l'étude : L'impact d'une alimentation riche en fibres sur la composition microbienne intestinale du porc est bien documenté. Cependant aucune étude ne s'est intéressée aux effets à court et à long terme de transitions alimentaires répétées entre un aliment conventionnel et un aliment riche en fibres (2,8 vs. 7,7% de cellulose brute) sur la composition du microbiote du porc. Un premier objectif de cet article est donc de décrire l'impact d'une alternance d'une alimentation standard ou riche en fibres sur la composition du microbiote fécal de porcs entre 14 et 23 semaines d'âge issus de trois races : Piétrain, Large White et Duroc.

Outre la description de la variation de la composition du microbiote selon le régime alimentaire ou le type génétique de l'animal, le deuxième objectif de cette étude est d'évaluer les relations entre la composante digestive de l'EA et le microbiote. A ma connaissance, les relations entre ces deux paramètres sont très peu documentées chez le porc.

Principaux résultats : Le changement alimentaire entre un régime standard et riche en fibre (ou inversement), affecte significativement l'abondance de près de 80% des OTU (1 641/2 041 OTU). La composition du microbiote fécal peut être utilisée pour classer les animaux suivant leur régime alimentaire avec une grande précision (3,9% d'erreur de classification dans une sPLS-DA) seulement à partir de 31 OTU. Une fois revenus à un régime standard, les animaux retrouvent un microbiote « standard ». De plus, le microbiote peut être utilisé pour discriminer les porcs suivant leur race (14% d'erreur de classification avec 200 OTU) uniquement quand les animaux sont alimentés avec un aliment standard. Dès lors que les animaux reçoivent un régime riche en fibre, cette distinction des races n'est plus possible, y compris lors d'un retour à un aliment standard.

Cette étude a identifié des OTU significativement corrélées à des coefficients de digestibilité (corrélation maximale de 45%). Plusieurs OTU appartenant aux familles *Clostridiaceae* et *Turicibacter* sont négativement corrélées à la digestibilité des protéines et de l'énergie, à l'inverse d'OTU appartenant au genre *Lactobacillus*. Des OTU appartenant à la famille *Lachnospiraceae* et au genre *Prevotella* sont négativement corrélées à la digestibilité de la cellulose et de l'hémicellulose. Ces résultats suggèrent des propriétés bénéfiques ou défavorables de ces bactéries dans la digestion. Cependant, aucune corrélation significative n'est observée dans le cas d'un régime riche en fibres.

Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs

Short title: Dietary fiber content, nutrient digestibility and microbiota composition in pigs

Le Sciellour Mathilde¹, Labussière Etienne¹, Zemb Olivier^{2*}, Renaudeau David¹

¹PEGASE, INRA, Agrocampus-Ouest, Rennes, France

²GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, Castanet Tolosan, France

*Corresponding author: olivier.zemb@inra.fr

Citation : Le Sciellour, M., E. Labussière, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2018. Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs. PLoS ONE. 13:e0206159. doi:10.1371/journal.pone.0206159.

Cet article s'inscrit dans le cadre du projet européen Feed-a-Gene Project, financé par le programme H2020 de l'Union Européenne sous le numéro d'agrément 633531.

Cet article a été publié le 24 octobre 2018. Toutes les données sont en libre accès dans Sequence Read Archive sous le numéro d'accession SRP160137.

1.1. Abstract

Microbial population in the gastrointestinal tract plays a central role in health and nutrient digestion. The objective of the present study was to investigate the relationships between microbiota and apparent digestibility coefficients with respect to age and diet.

Pigs from Large-White, Duroc or Pietrain breeds were raised under the same housing conditions and fed alternately a low-fiber (LF) and a high-fiber diet (HF) during 4 successive 3-week periods. Data collection for digestibility measurements was achieved during the last week of each period. At the end of each period, fecal microbiota was collected for 16S rRNA gene sequencing. The microbiota remained stable across periods whereas digestibility of energy, crude proteins and cell wall components increased. The microbiota was resilient to diet effect and pigs fed the LF diet were discriminated to those fed the HF diet using 31 predicting OTUs with a mean classification error-rate of 3.9%. *Clostridiaceae* and *Turicibacter* were negatively correlated whereas *Lactobacillus* was positively correlated with protein and energy digestibility coefficients in the LF group. In addition, *Lachnospiraceae* and *Prevotella* were negatively correlated with cell wall component digestibility. In contrast, no significant correlation was found between microbiota composition and digestibility coefficients when pigs were fed the HF diet. Interestingly, it was also no longer possible to distinguish animals from different breeds once the animals were fed a HF diet, so that the microbiota could only trace the breed origin in the first period and in the LF group.

In our experimental conditions, 3 weeks of adaptation to a new diet seems to be sufficient to observe resilience in growing pigs' microbiota. We demonstrated that fecal microbiota can be used to classify pigs according to their dietary treatment. Some bacteria are favorable or unfavorable to digestibility. This suggests that manipulations of bacterial populations can improve digestibility and feed efficiency.

1.2. Introduction

Microbial population in the gastrointestinal tract plays a central role in health and nutrient digestion of the host. A major function of gut microbiota is to break down indigestible carbohydrates into short-chain fatty acids (SCFAs), particularly acetate, propionate and butyrate. These SCFAs are an important energy source for the host. In growing pigs, energy produced from hindgut fermentation of dietary fiber represents 7 to 18% of the total available

energy absorbed by the pig (Anguita et al., 2006). In addition, the positive effect of microbiota on gut health status (Jha and Berrocoso, 2015) can be related to the physiological effects of SCFAs (Müller, 2008). According to Cornick et al. (Cornick et al., 2015), butyrate is a potent inhibitor of inflammation, tumor growth and also stimulates mucus production and secretion with subsequent positive effects on gut health.

The gut microbiota composition changes according to factors related to the animal such as age (Mach et al., 2015; Zhao et al., 2015), health status (Durmic et al., 1998; Pedersen et al., 2013) or growth performances even though 1% of the genes of the gut microbiota are shared between all the pigs (Xiao et al., 2016). According to Ramayo-Caldas et al. (Ramayo-Caldas et al., 2016), microbial clusters dominated either by *Prevotella* or *Ruminococcus* genera allow to discriminate pigs with high or low average daily gain. Environmental factors can also lead to gut microbiota modifications through feeding management or sanitary status of the farm (Le Floch et al., 2014), in-feed antibiotics (Holman and Chénier, 2014) or diet composition. Dietary fiber content seems to be a major driver of gut microbiota composition (Heinritz et al., 2016b). Numerous studies have already focused on the relationship between dietary fiber and pig gut microbiota (Durmic et al., 1998; Haenen et al., 2013b; Verschuren et al., 2018): addition of resistant starch increases total bacterial counts and stimulates healthy gut-associated butyrate-producing *Faecalibacterium prausnitzii* growth in the colon (Haenen et al., 2013b) even though the impact of repeated changes in fiber content in the pig diets has not been evaluated yet.

In growing pigs, the nutrient digestibility increases with the age (Kil et al., 2013), is affected by the breeds (Zhao et al., 2017) and is mainly influenced by dietary management. The digestibility of energy linearly decreases by about 0.8% for each extra percentage of neutral detergent fiber dietary content (Le Goff and Noblet, 2001; Wilfart et al., 2007a; Le Gall et al., 2009). According to these authors, this detrimental effect of dietary fiber is smaller in adult sows when compared to growing pigs. It appears that factors influencing the microbiota composition also affect nutrient digestibility. However, little is known regarding the subsequent consequences of changes in gut microbiota nutrient digestion and metabolism in swine. Data about pig gut microbiota and fiber digestibility remain scarce, but 11 bacterial genera were positively correlated with apparent crude fiber digestibility in Chinese pigs fed low dietary fiber (Niu et al., 2015).

The objectives of the present study were to investigate the effects of dietary fiber content on gut microbiota composition and nutrient digestibility in pigs at different ages and to evaluate the relationships between digestibility and microbiota composition. Pigs originated from 3 different breeds and farms to obtain robust findings.

1.3. Material and methods

This study was conducted in accordance with the French legislation on animal experimentation and ethics, and this research was authorized by the French Ministry of Agriculture to conduct experiments on living animals at the INRA facilities in Saint Gilles, France (agreement 2015091517437619).

1.3.1. Animals and experimental design

A total of 22 Duroc, 20 Large White and 21 Pietrain castrated pigs were used in the study conducted in 2 successive replicates. Each breed originates from a different farm (Large-White pigs originated from the experimental facility of INRA, St Gilles, France. Pietrain pigs came from EARL Lucien Geffrelot, Lamballe, France. Duroc pigs came from EARL Maguer, Elliant, France) and the animals were transferred to our experimental facilities at 20 days of age. All three breeds were raised in our facilities under the same conditions until the start of the experimental period at 11 weeks of age and 29 kg, 35 kg and 37.2 kg mean live body weight (BW) for Duroc, Large White and Pietrain pigs, respectively. Total tract digestibility measurements were conducted over four consecutive 3-week periods (Figure III-1). During each collection period, pigs were housed individually in digestibility cages for a 7-d collection of feces following 14-d of adaptation to the dietary treatment (collection started at 13, 16, 19 and 22 weeks of age). In the 10 first days of adaptation, pigs were housed individually in metal slatted cages (77 × 125 cm). Four days before the starting of the collection period pigs were moved to metabolic slatted cages (52 × 117 cm). The control low-fiber diet (“LF diet”) contained 2.8% of crude fiber and was formulated with cereals (corn, barley and wheat) and soybean meal. The increase in dietary fiber content in the high fiber diet (“HF diet”) was obtained by a partial substitution of corn and soybean meal by wheat bran, rapeseed meal, and soya hulls (Table III-1). This substitution introduced different types of fibers in order to be close to the situations encountered in pig diet in commercial conditions. The ratio digestible lysine/net energy was kept at 0.86% for both diets; amino acids/lysine ratios were similar between diets as well as the digestible phosphorus and the calcium/digestible phosphorus

ratio. Pigs received alternately LF and HF diets during the four 3-weeks periods, starting by LF diet for half of the animals (each breed equally represented) and HF diet for the others (Figure III-1). During the adaptation and the collection periods, fresh diets were offered twice a day as pellets at feeding scale close to the *ad libitum* level. The negligible restriction allowed to homogenize feed intake between pigs within a same breed and to limit feed refusals and spillage that may generate subsequent errors in digestibility measurements. However, it slightly reduced the growth performance compared to the expected ones in pigs fed *ad libitum*. Feed allowance was constant over each 7 days of the collection period and increased between two collection periods in order to adjust to the feeding scale for spontaneous change in voluntary feed intake with BW. Pigs had free access to water. The space allowance in the cage was adjusted each period to optimize the comfort of the animal and the quality of the excreta total collection. Room temperature was set to 24°C.

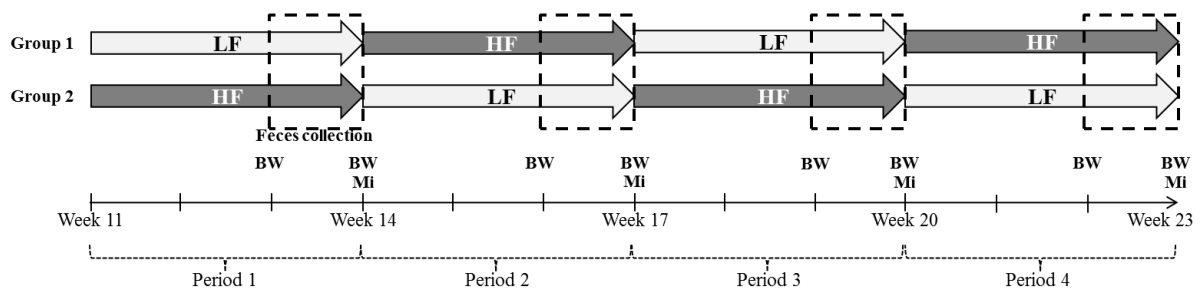


Figure III-1 : Experimental design and changes in the dietary treatments according to the experimental period. LF and HF are for low and high fiber diets, respectively.

Each one-week feces collection period (dashed squared) was preceded by 2 weeks of adaptation to the experimental diet. Feces samples for microbiota (Mi) analysis were collected on the last day of collection period, and body weights (BW) were recorded at the beginning and at the end of the feces collection period.

Table III-1 : Composition of the experimental diets ¹

	LF	HF
Ingredients, %		
Corn	34.58	17.77
Barley	17.77	17.77
Wheat	17.77	17.77
Soybean meal	15.74	9.18
Rapeseed meal	-	1.97
Wheat bran	2.50	15.00
Soybean hulls	-	10.00
Sugar beet pulp	-	5.00
Cane molasses	1.03	0.68
Corn starch	4.25	-
Sunflower oil	1.00	-
L-Lysine HCL	0.33	0.25
L-Threonine	0.15	0.10
L-Tryptophan	0.03	0.01
DL-Methionine	0.08	0.03
Sodium chloride	0.45	0.45
Calcium carbonate	0.82	0.62
Dicalcium phosphate	1.20	1.11
Minerals and vitamins	0.50	0.50
Indigestible markers	1.80	1.80
Digestible Lysine / Net energy	0.86	0.86
Analyzed chemical composition, % ²		
Ash	4.9	5.6
Crude protein	14.4	14.4
Crude fat	3.7	2.7
Crude fiber	2.8	7.7
Neutral detergent fiber	10	20
Acid detergent fiber	3.4	9.5
Acid detergent lignin	0.7	1.4
Gross energy (MJ/kg)	16	16

¹ LF: low-fiber diet; HF: High-fiber diet.

² Chemical compositions were adjusted for a dry matter content of 88%

1.3.2. Measurements

Cumulated feed intake and cumulated potential refusals or spillage over each 7-d collection period were recorded, and the dry matter (DM) of proposed weekly feed and refusals were measured. At the end of each replicate, the 4 feed samples were pooled for further chemical analyses. The BW was measured at the beginning and the end of each collection period. Feces were daily and totally collected once a day, cumulated during the whole collection period and stored at 4°C (Noblet et al., 1993; Le Goff and Noblet, 2001). At

the end of each collection period, feces were weighed, homogenized and three separate samples were prepared, one for freeze drying and further chemical analyses and the others for immediate DM determinations. At the end of the 7 d-collection period, fecal samples were collected aseptically from individual pigs in plastic bags. Fecal samples were thoroughly homogenized and 2 aliquots were frozen with liquid nitrogen until transferring them within 10 minutes to a freezer to be stored at -80°C until analyses.

1.3.3. Chemical analysis and DNA sequencing

Pooled samples of feed and the individual fecal samples were analyzed for DM, ash (incineration at 550°C), nitrogen (N; Dumas method), Weende crude fiber (CF) and gross energy (IKA adiabatic calorimeter) using the methods of AOAC (AOAC, 1990). Cell wall fractions [Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) and Acid Detergent Lignin (ADL)] were determined according to the method of Van Soest et al. (Van Soest and Wine, 1967). Feed samples were also characterized for their fat content using petroleum extraction with prior acid hydrolysis according to AOAC (AOAC, 1990).

Microbial DNA was extracted using beat-beating with the Zymo kit from 50 mg of feces sample according to a method described previously (Verschuren et al., 2018). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using F460 and R460 primers (F460: CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, R460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) and 30 cycles of PCR with an annealing temperature of 65°C. Homemade 6-bases index was incorporated during a second PCR to perform multiplexing. Resulting libraries were pooled by 2 × 250 bp paired-end sequencing on Illumina MiSeq platform according to the manufacturer instructions. Sequences were then paired and cleaned internally in the GeT-PlaGE platform (Toulouse, France) for length, homopolymers and undetermined nucleotides. The quality of the sequences was controlled by adding 4 mock samples of known composition to the run. The quality of the run was checked internally using PhiX, and then each pair-end sequences were assigned to its sample with the help of the previously integrated index. Then proportion of the species was checked after assembly using the FLASH software with at least 10bp overlap and at most 10% mismatch.

Chimeras were removed from the sequences dataset before to be clustered de novo into Operational Taxonomic Units (OTUs) using VSEARCH (Rognes et al., 2016) with a

threshold of 0.97 similarity. A table of relative abundance of each OTU in each sample was created. Usearch9.2.64_i86linux32 was then used for taxonomic assignment based on SILVA database (Quast et al., 2013).

1.3.4. Calculations and statistical analysis

Related to the pigs' performance, the average daily BW gain (ADG) was calculated as the difference between the final and the initial BW of each collection period. The daily feed intake was calculated by the difference between feed allowance and feed refusal. The average daily feed intake (ADFI) was the average value from all the duration of collection period. Feed conversion ratio (FCR) was calculated as the ratio between ADFI and ADG and standardized for the dry matter content.

Hemicellulose and cellulose contents in feed and feces were calculated as the difference between NDF and ADF contents, and between ADF and ADL contents, respectively. Apparent digestibility coefficients of organic matter (OM), energy, N, hemicellulose, cellulose and lignin were calculated for each pig and each period (Noblet et al., 2013).

Statistical analysis was run under R 3.3.2 except for ANOVA models for which SAS (version 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC) was used. A summary of the pipeline analysis is shown in S1 Fig.

Performances traits and digestibility coefficients were analyzed using the mixed model of SAS including the effects of breed (n=3), diet (n=2), period (n=4) and interactions. The effects of breed, diet and collection period were considered as fixed effects. The REPEATED statement was included in the model for accounting for within-pig covariability of repeated measurements made on the same experimental unit during the four consecutive collection periods. Differences between means were assessed through the statistical test of Tukey's least significant difference.

Phyla abundance among diets, breeds and periods was analyzed through chi-squared tests. Diversity of the microbiota was described using the Simpson and the Shannon indexes (vegan R package) on the dataset previously rarefied to 5,000 sequences per sample. Samples under 5,000 sequences have been taken out of statistical analyses. The effects of diet, breed and period on these indexes were analyzed by ANOVA. The mixed model of SAS included the fixed effects of breed, diet and period. The REPEATED statement was included in the model

to account for within-pig covariability of repeated measurements during the four consecutive collection periods.

The effects of the different factors on OTUs were assessed with generalized linear models (glm) using edgeR package in R. This method takes care of multiple factors by fitting glm with the design matrix of the experiment. The dispersion of the OTU abundance is estimated with accuracy, since all sources of variation are accounted for. For example, to extract differentially abundant OTUs between diets, the glm model took into account the variation related to the replicate, breed and period factors. The p-values were then adjusted with false discovery rate (FDR) method. The significance threshold of the adjusted p-value was 0.05. Unfortunately, GLM models from edgeR do not take into account the repeated measures.

The proportions of the explained variance by diet, breed, period or repetition factors are evaluated through the Bioconductor R pvca package.

A Sparse Partial Least Square Discriminant Analysis (sPLS-DA) from MixOmics R package was performed. This method enables to assess the minimal number of OTUs required to predict the group the animals belonged to according to their diet, breed and period. The multilevel parameter in sPLS-DA function is added to take into account the repeated measures for every animal. The OTU table was normalized through Total Sum Scaling (TSS) and Centered Log Ratio (CLR) transformation. Error-rate of the model and stability of the discriminant OTUs was evaluated by M-fold cross-validation in sPLS-DA analysis with 10 folds and repeated 10 times. The OTUs were considered stable if selected in more than 90% of the cross-validation tests.

Pearson correlations between energy, N, cellulose and hemicellulose digestibility coefficients and the OTUs were calculated and p-values were adjusted with FDR method for accounting for multiple tests. The correlation was considered significant when the associated p-value was under 0.05.

1.4. Results

1.4.1. Animal performance and digestibility coefficients

At the end of the experiment, data from 243 collection periods were available. Three animals died before the end of the trial and one collection period was missing for 4 pigs due to sickness. Data related to animal performance and digestibility coefficients are presented in Table III-2. From the analysis of variance, the effect of the repetition was significant ($P < 0.05$) only for the mean BW. These data were not discussed and are only indicative.

Table III-2 : Effect of diet, breed and period on growing and feeding performances in growing pigs¹

	Diet		Breed			Period				RSD ²	p-values ³					
	LF	HF	DU	LW	PI	1	2	3	4		Diet	Breed	Period	DxB	DxP	BxP
N	123	120	80	79	84	64	59	60	60							
BW (kg)	54.5	54.8	50.1 ^a	55.4 ^b	58.2 ^c	35.8 ^a	48.6 ^b	61.0 ^c	74.3 ^d	3.0	0.337	<0.001	<0.001	0.924	0.006	0.734
ADFI (g/d)	1414	1405	1367 ^a	1465 ^b	1397 ^c	1242 ^a	1371 ^b	1462 ^c	1573 ^d	349	0.355	<0.001	<0.001	0.979	0.967	<0.001
ADG (g/d)	673	570	595	621	649	613 ^{ab}	669 ^a	560 ^b	647 ^a	136	<0.001	0.231	0.001	0.034	0.191	<0.001
FCR	2.56	3.18	2.94	2.94	2.73	2.41 ^a	2.68 ^{ab}	3.40 ^c	3.00 ^{bc}	1.06	<0.001	0.670	<0.001	0.709	0.312	0.025
Digestibility coefficients (%)																
OM	88.3	80.6	84.5	84.3	84.8	82.8 ^a	84.1 ^b	85.4 ^c	85.9 ^c	1.7	<0.001	0.211	<0.001	0.240	<0.001	0.061
Energy	86.5	78.3	82.4	82.2	82.7	80.7 ^a	82.1 ^b	83.3 ^c	83.8 ^c	1.8	<0.001	0.223	<0.001	0.336	<0.001	0.073
N	86.0	76.1	80.7 ^a	80.8 ^{ab}	81.8 ^b	78.2 ^a	80.9 ^b	82.1 ^c	83.4 ^d	2.5	<0.001	0.014	<0.001	0.572	0.424	0.089
Cell wall																
NDF	56.5	60.3	58.4	57.6	59.1	52.8 ^a	56.9 ^b	61.1 ^c	63.1 ^c	5.3	<0.001	0.101	<0.001	0.172	0.049	0.002
Hemicellulose	58.8	60.1	59.5	58.9	60.0	54.2 ^a	58.4 ^b	62.4 ^c	63.2 ^c	4.7	0.002	0.206	<0.001	0.072	0.816	<0.001
Cellulose	50.9	63.2	57.1	56.0	57.8	50.7 ^a	54.7 ^b	59.5 ^c	63.4 ^c	7.8	<0.001	0.272	<0.001	0.094	0.002	0.029
Lignin	43.8	56.5	50.3	49.2	51.2	46.7 ^a	50.7 ^{bc}	50.2 ^b	53.6 ^c	7.0	<0.001	0.143	<0.001	0.104	0.022	0.095

¹ LF and HF = low and high fiber diets, respectively. DU, LW, PI for Duroc, Large-White, and Pietrain breed, respectively. n = number of observations, BW = mean live body weight during the collection period, ADFI = average daily feed intake, ADG = average daily gain, OM = organic matter, N = nitrogen, NDF = neutral detergent fiber, hemicellulose: calculated as the difference between neutral detergent fiber and acid detergent fiber, cellulose: calculated as the difference between acid detergent fiber and acid detergent lignin, lignin: acid detergent lignin.

² Residual Standard Deviation.

³ From the ANOVA with diet effect (D, n=2), breed effect (B, n=3), period effect (P, n=4), and interactions. Least square means within one column for the different breeds and periods with the same letter exponent do not differ (P < 0.05).

The digestibility increased linearly over time (Table III-2 and Figure III-2). From the first to the fourth collection periods the digestibility of OM, energy and N reached 3.7, 3.8 and 6.6% improvement, respectively, whereas NDF, hemicellulose, cellulose and lignin digestibility coefficients reached 19.5, 16.6, 25.0 and 14.8% improvement, respectively. In Pietrain and Large White breeds, the digestibility of NDF and hemicellulose significantly increased ($P < 0.05$) from the first to the third collection periods but remained stable thereafter. In contrast, Duroc pigs had stable digestibility coefficients during the first two collection periods and increased linearly during the third and the fourth periods. The digestibility of OM, energy, N, cellulose and lignin (ADL) tended to follow the same evolution as NDF and hemicellulose. This led to a significant interaction between breed and period for the digestibility of NDF, cellulose and hemicellulose ($P < 0.05$). No interaction between breed and diet has been observed ($P > 0.07$).

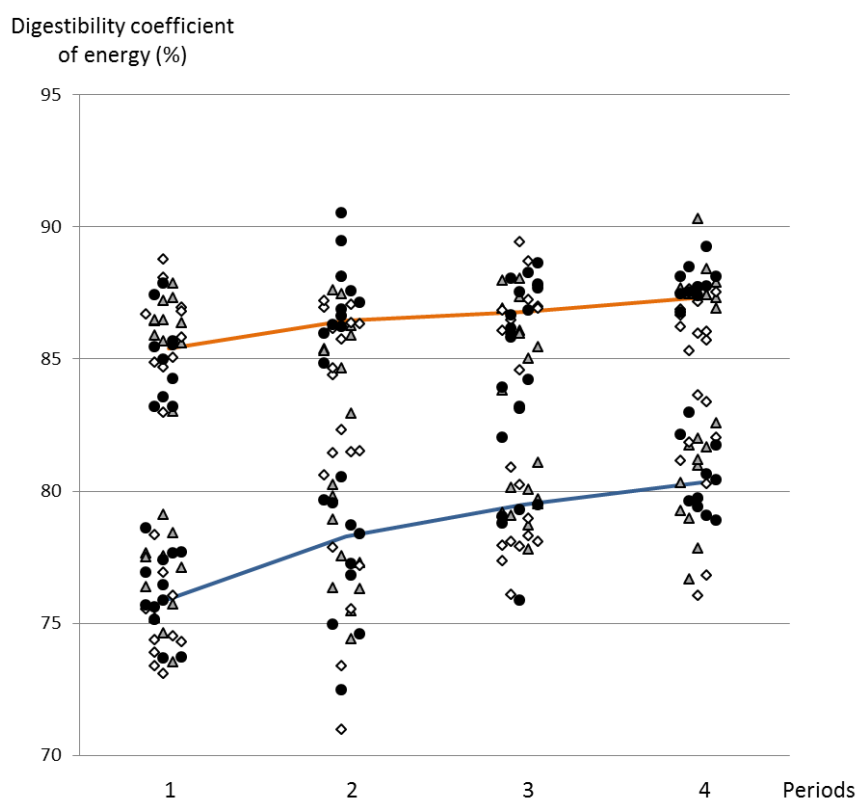


Figure III-2 : Evolution of digestibility coefficient of energy across periods 1 to 4 for the low-fiber (orange) or high-fiber (darkblue) diets in Duroc (▲), Large-White (◇) and Pietrain (●) pigs.

The digestibility of OM, energy, N and lignin were 5 to 10% higher in the LF diet (88.3%, 86.5%, 86.0% and 56.5% vs 80.6%, 78.3%, 76.1% and 43.8%, respectively) (Table 2). In contrast, the digestibility of NDF, cellulose and hemicellulose were 5 to 10% higher in the HF diet (60.3%, 60.1% and 63.2% vs 56.5%, 58.8% and 50.9%, respectively in LF diet).

1.4.2. Microbiota data

A total of 243 feces samples have been collected over the four periods. Among them 229 samples reached more than 5 000 sequences per sample and were kept for further analyses. Maximum number of sequences per sample was 46,827, with an average value of $18,934 \pm 10,686$. The sequences clustering generated 2,780 OTUs, essentially *Firmicutes* (68.3% of total sequences) and *Bacteroidetes* (23.4%) (S2 Fig).

Diversity indexes were independent from the period, the breed and the diet (S3 Fig). However, regarding the variance of the gut microbiota composition, 21%, 1.5% and 32% of the total variance was explained by the effects of the period, the breed and the diet, respectively.

We did not observe a constant shift in the microbiota composition over periods within each dietary treatments as shown by the absence of differentially expressed OTU over time based on the GLM analysis or our inability to discriminate microbial communities between periods (above 50% error-rate) (S4 Fig).

Pigs fed the LF diet during the first collection period could be divided into three distinguished breeds by using the OTU abundance table (Figure III-3). A total of 200 OTUs were selected to minimize the misclassification error-rate (i.e., 13.9%). This misclassification error-rate was based on the comparison, for each pig, between the actual breed and the predicted breed obtained from the sPLS-DA model. For the others collection periods, microbiota composition failed to identify separations between breeds (Figure III-4), suggesting that exposure to the HF diet abolishes the difference between breeds.

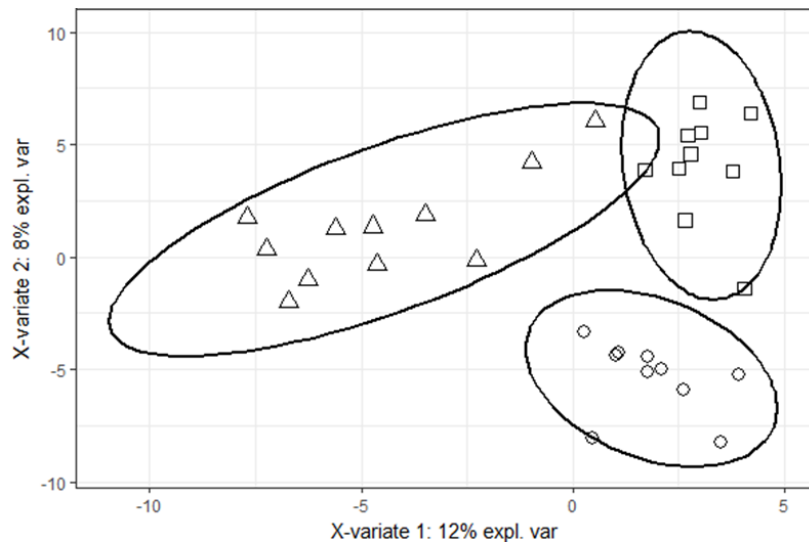


Figure III-3 : Score plot of two-component sPLS-DA model showing feces samples clustering according to the breed with percentage of variance captured for each principal component (Δ : Duroc, \square : Large-White, O : Pietrain) for the animals fed low-fiber diet during period 1.

According to the cross-validation permutation test, the misclassification error-rate was 14%.

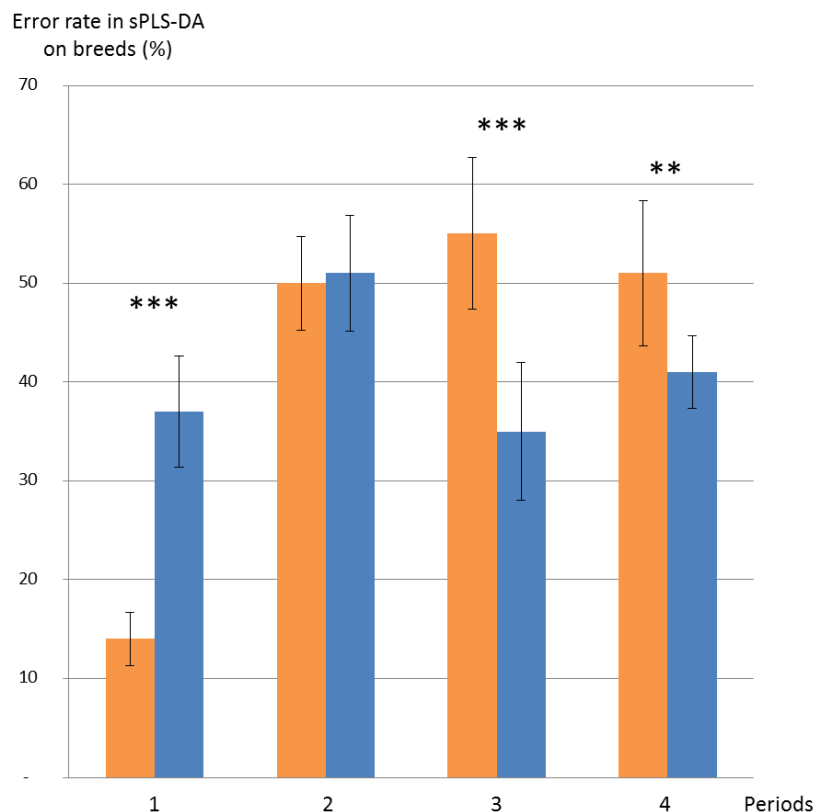


Figure III-4 : Discrimination of the breed through sPLS-DA across periods 1 to 4 for the low-fiber (orange) or high-fiber (darkblue) diets.

T-test resulting in p-value < 0.01: ***; p-value < 0.001: ***.

Irrespective to the breed and the period, microbiota composition was significantly influenced by dietary treatment: 1,641 out of 2,041 OTUs were differentially abundant between LF and HF diets. Unsurprisingly considering the numerous OTUs impacted, sPLS-DA discriminated the LF and HF diets with 3.9% error-rate (Figure III-5) and 31 OTUs were used for the separation. The diet prediction was not altered by the previous diet or previous switches of diets showing the resilience of the biomarkers. When pigs switched from the LF to the HF diet or conversely, the abundance of the 31 OTUs used as predictors increased or decreased drastically (Figure III-6). The 31 predictors have been selected among all OTUs independently of their rarity. Ranking all 2,041 OTUs according to their mean abundance, from frequent OTUs to rare ones, the 6 biomarkers abundant in the HF diet ranged from rank 3 to 1,906 and the 25 OTUs abundant in the LF diet ranged from rank 92 to 1,866. Among the 6 biomarkers abundant in the LF diet were 2 *Treponema*, 1 *Acidaminobacter* and 2 unclassified OTUs from *Bacteroidia* class. As for these 6 OTUs, the 25 biomarkers abundant in the HF diet belonged to the same phyla (12 *Bacteroidetes*, 8 *Spirochaetes* and 6 *Firmicutes*). At family level, 4 OTUs were *Prevotellaceae*, 4 *Clostridiaceae*, 1 *Clostridium* (*sensu stricto* genus), 4 *Spirochaetaceae* (1 *Treponema* and 3 unclassified genera), 1 *Peptostreptococcaceae* (*Clostridium XI* genus) and 13 were unclassified (S1 Table).

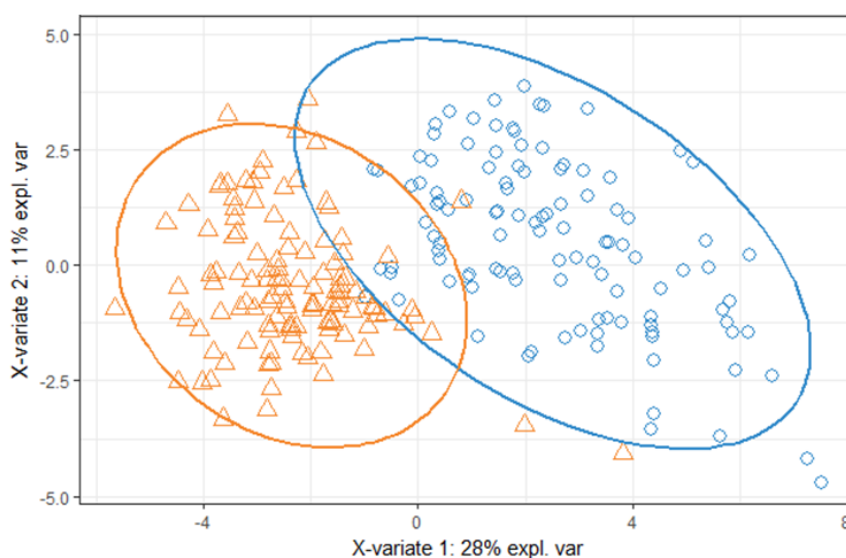


Figure III-5 : Score plot of two-component sPLS-DA model showing feces sample clustering according to the diet with percentage of variance captured for each principal component (Δ: Low-fiber diet, o: High-fiber diet).

According to the cross-validation permutation test, the misclassification error rate was 3.9%.

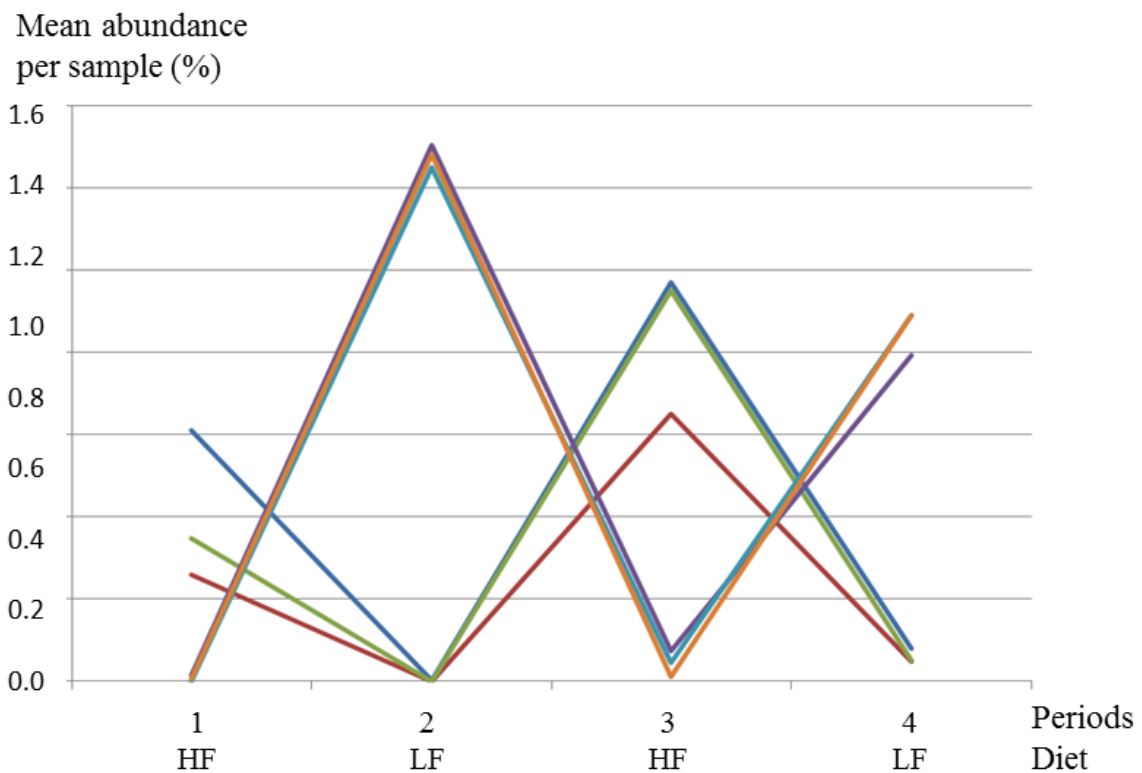
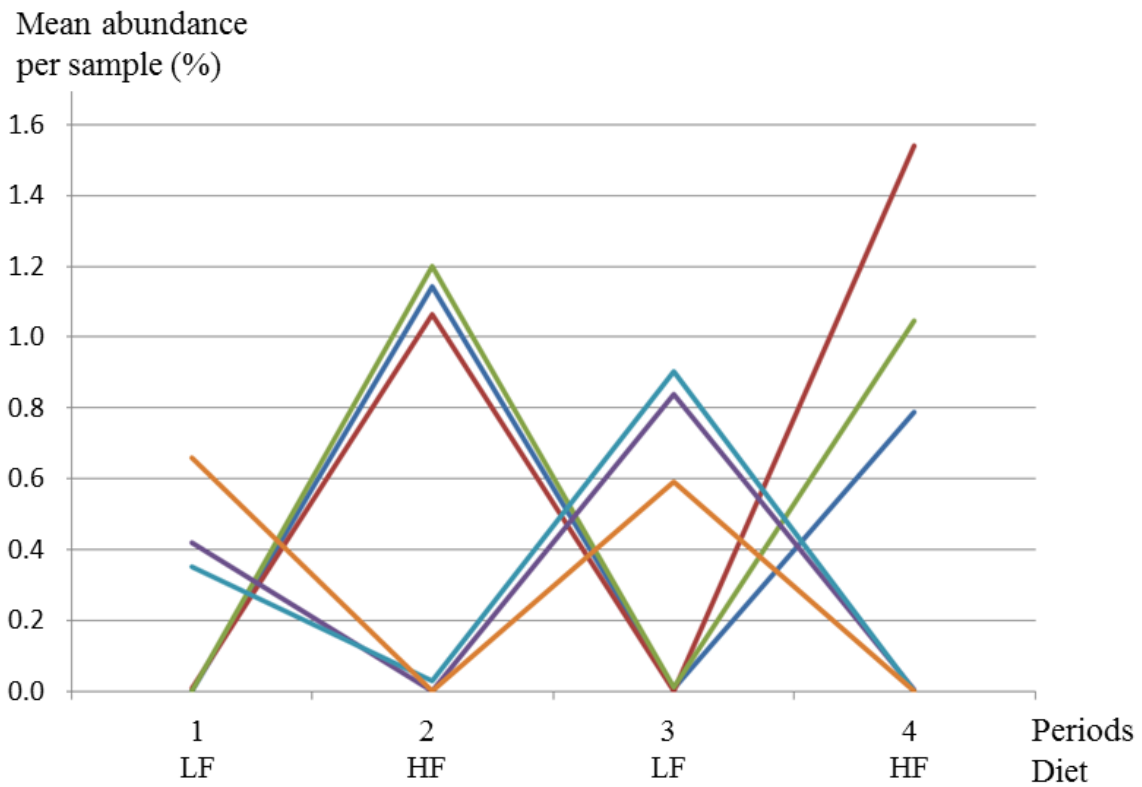


Figure III-6 : Variations of the relative abundancy of predictive OTUs of diet effect.

The three most contributive OTUS from Low-fiber diet (LF) (OTU 514: purple, OTU 1140: light blue, OTU 923: orange) and High-fiber diet (HF) (OTU 792: dark blue, OTU 689: red, OTU 1940: green) are extracted from the sPLS-DA analysis using the contribution on the first principal component.

1.4.3. Relationships between digestibility and microbiota

According to the influence of dietary fiber content on gut microbiota composition, correlations between OTU abundance and digestibility of energy, N and cell wall components were calculated within each dietary treatment.

In the LF diet, 83 and 65 OTUs were significantly correlated ($P < 0.05$) with the digestibility coefficient of N and energy, respectively, and 49 and 37 OTUs were correlated with the digestibility coefficients of cellulose and hemicellulose, respectively (Figure III-7 and S3 Table). Each OTU was either positively or negatively correlated with one or more digestibility coefficient. The significant correlation coefficients ranged from 0.29 to 0.36 in positive correlations (0.31 on average) and from -0.29 to -0.45 in negative correlations (-0.34 on average). In HF diet, no OTU were found to be significantly correlated with digestibility coefficients (S5 Fig).

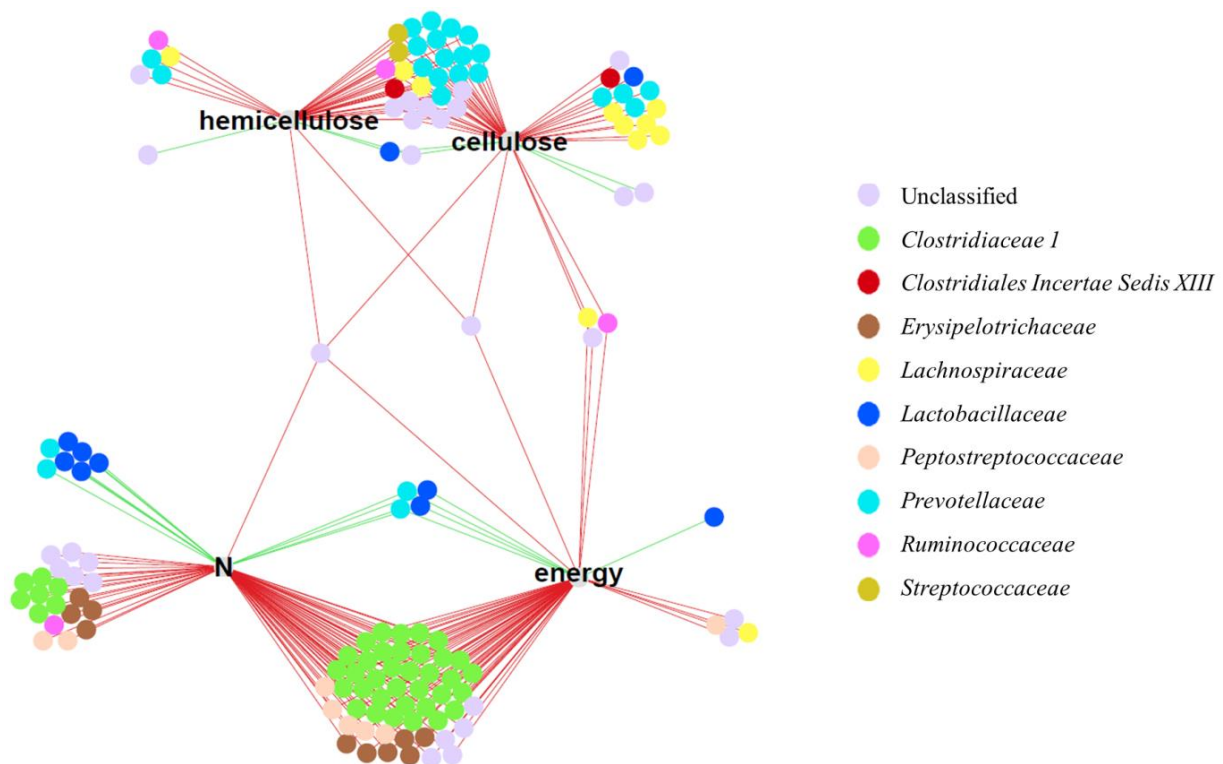


Figure III-7: Correlated OTUs (represented by dots colored according to the taxonomical family of the corresponding bacteria) to digestibility coefficients (energy, N, hemicellulose and cellulose) in low-fiber diet through Pearson correlation.

The negative and positive correlations are represented by red and green lines, respectively.

Clostridiaceae 1 (*Clostridium sensu stricto* and unclassified at genus level), *Erysipelotrichaceae* (*Turcibacter*) and *Peptostreptococcaceae* (*Clostridium XI*) were negatively correlated with energy and N digestibility coefficient whereas *Lachnospiraceae* (*Blautia*, *Coprococcus* and *Dorea* genera) were negatively correlated with the digestibility of energy, cellulose or hemicellulose. Two OTUs belonging to *Clostridiales Incertae Sedis XIII* and 4 *Streptococcus* were negatively correlated with cell wall components digestibility. *Ruminococcaceae* negatively correlated with cellulose, hemicellulose, N and energy digestibility.

Prevotellaceae (mainly *Prevotella* genus) were negatively correlated with the digestibility of cell wall components except for 6 unclassified *Prevotellaceae* which were positively correlated with energy and N digestibility.

Lactobacillaceae were positively correlated with N, energy, cellulose and hemicellulose digestibility except one negatively correlated with cellulose digestibility. The only genus represented in this family was *Lactobacillus*.

1.5. Discussion

Most bacteria in the pig gut in the current experiment (88%) were *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in agreement with previous studies (Xiao et al., 2016; Holman et al., 2017). *Proteobacteria*, *Spirochaetes* and *Synergistetes* were also present in matured pig feces microbiota but in smaller amount (< 8% each), as previously shown (Looft et al., 2014). The gut microbiota in our experiment were dominated by *Ruminococcus* and *Treponema* suggesting that the pigs belonged to the same enterotype (Ramayo-Caldas et al., 2016) and that the analysis methods designed to identify correlations within homogenous groups were relevant.

During the first period of our experiment, the microbiota of the Large White, Duroc and Pietrain animals differed when fed the LF diet. It should be noted that the animals from each breed originate from a different farm but were housed from weaning onwards in the same conditions. Because of a possible confusion between the farm origin and the breed, no conclusion can be made regarding the impact of breed on the microbiota. However the observed differences in microbiota according to the breed/origin emphasized variability in the

animals of our experiment. Then further conclusions about the relationships between microbiota and digestibility are robust with respect to the origin or the breed of the pigs.

1.5.1. The increase of digestibility in aging animals was not linked to the microbiota

According to our results, the digestive utilization of energy, N, OM and cell wall components linearly increased over time. This linear increase is in agreement with published values: energy digestibility increases by 0.9 point per 10 kg BW (Noblet et al., 2013). In our study, the energy digestibility increased by 0.6, 0.8 and 1.0 point in Duroc, Large White and Pietrain pigs, respectively. These lower results compare to the previous ones on Large White growing pigs (Noblet et al., 2013) might be due to the lower daily feed intake in our experiment.

Regarding the microbiota composition, the effects of aging were not as clear as the effect of diet. This might be due to the period alternation with different diets. In addition, diversity indexes and microbiota composition remain generally stable after 3 months of age in growing pigs (Zhao et al., 2015). As a consequence, the lack of change in microbiota composition with the age might reflect the stability of microbiota composition in 3 to 5 months old pigs. Since the improvement of energy, N or cell wall components digestibility over time seemed unrelated to microbial changes in the hindgut, other factors were likely to be responsible. For example the transit rate changes during the pig growth (Noblet and Shi, 1994; Grieshop et al., 2001) which could cause the digestibility improvement with time.

1.5.2. Robust effect of the diet on digestibility and microbiota

In the present study, fibers decreased the energy and OM digestibility as observed previously (Wilfart et al., 2007a). The present study shows a 0.8% reduction of energy digestibility for each 1% increase in NDF content, which is in agreement with the 1% reduction that was previously reported in growing pigs (Le Gall et al., 2009).

Fibers also decreased the digestibility of N which may be due to mechanical erosion of the gut epithelium. This erosion led to more endogenic secretion mainly constituted with proteins (Montagne et al., 2003) and thus increased the N losses in feces. Furthermore, a previous study (Haenen et al., 2013b) observed an increase in bacterial counts with high-fiber diet possibly resulting in an increase of ureic N released in the gut (Neis et al., 2015) and therefore

intensifying fecal N losses and decreasing its digestibility. Because insoluble fibers as wheat bran or soya hulls kept water in their matrix (Bach Knudsen, 2001), nutrients like proteins were trapped and became less available for enzyme activity (Theander et al., 1989). In addition, fibers mechanically acted on gut wall through the increase of the volume to digest (Stanogias and Pearce, 1985; Rijnen et al., 2001) resulting in an increase of colon motility (Le Goff et al., 2002) and a decrease of the transit time (Spiller et al., 1986). The exceeding proteins in the digesta, their lower availability and the decrease of transit time increased the loss of N in the feces, participating to the decrease of the apparent digestibility of N as in our study.

Replacing part of the feed by ingredients containing fibers also had a strong impact on gut microbes. About 80% of the OTUs were differentially abundant between diets irrespective to the period or the breed. The impacts of dietary fiber addition on microbiota composition have been extensively described in pigs (Durmic et al., 1998; Ngoc et al., 2012; Heinritz et al., 2016a) or in humans (Walker et al., 2011; Wu et al., 2011; Chung et al., 2016). The most likely mechanism is the production of SCFAs (Scott et al., 2008; Simpson and Campbell, 2015), which have been shown to exert multiple beneficial effects on host energy metabolism and on the health in the small intestine. As an example, proliferation of the epithelial cells and cell turnover were stimulated by fermentations products (Corrêa et al., 2016; Park et al., 2016), related to an improved digestibility of cell wall components.

The microbial biomarkers used to discriminate pigs fed LF to those fed HF diets in our experiment belonged to *Bacteroidia*, *Clostridia* and *Spirochaetia* classes, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae* and *Spirochaetaceae* families. These results are in agreement with data published in pigs (Verschuren et al., 2018) or in humans (Wu et al., 2011; Gorvitovskaia et al., 2016). A stimulation of the glucose metabolism induced by the ingestion of fiber rich diet by humans led to an increased *Prevotella* abundance (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). In addition, previous studies correlated *Clostridium sp.* to the gut motility (Kashyap et al., 2013; Mignon-Grasteau et al., 2015) which is triggered by fiber ingestion. The third family mainly represented among our predictors was *Spirochaetaceae*. *Treponema* as a member of this family present pectinolytic functions (Liu et al., 2014) suggesting that its abundance may be highly affected by modifications in the dietary fiber content.

1.5.3. Resilience of the microbiota biomarkers to diet perturbations

In the present study, a three-week adaptation period to a given diet was sufficient to stabilize the relative abundance of the microbial biomarkers of the diet suggesting a resilience of the corresponding bacterial populations. Similarly, it has been demonstrated that an equilibrium of the structural and functional composition of the microbiome is reached three weeks after a dietary change in pigs (Tilocca et al., 2017). In addition, previous study analyzed the gut microbiota in mice fed alternately a fiber rich diet followed by a low-fiber diet. The initial microbiota abundance partially recovered in a third period when the mice were fed the first fiber rich diet again (Sonnenburg et al., 2016), showing the resilience of part of the microbiota. According to Camody et al. (2015), in mice, microbial response to a diet perturbation takes only few days to reach a new stable state and most changes in the gut microbiota are reversible. The speed of response of the pig gut microbiota to a challenged diet remains to be determined, especially when the pigs have been previously exposed to the same challenged diet.

1.5.4. Correlations between digestibility and microbiota

In our experimental conditions, correlations between microbiota and digestibility of N, energy, cellulose and hemicellulose were generally low and rarely significant. Indeed, only 142 OTUs out of 2,041 were significantly correlated with digestibility coefficients with a maximum absolute correlation value reaching 0.45. Caution should be used in interpreting results of correlation analysis because a significant correlation does not necessarily imply causation. These correlation values were generally smaller than those previously reported by Niu et al. (2015). This discrepancy could be explained first by differences in the method used for assessing gut microbiota composition. Niu et al. (2015) calculated their correlations at the taxonomical levels phylum, class, order, family and genus using only OTUs with full bacterial taxonomy assignation whereas our calculations were realized at OTU level and used every OTU abundance, with or without taxonomy assignation. The inter-individual variability is generally much higher for OTUs than for higher taxonomic levels, possibly leading to lower correlations values at OTU level. Comparing our correlations with every OTU grouped by taxonomical levels and those from Niu et al. (2015), *Treponema* genus is positively correlated

to cellulose digestibility in both studies but no other correspondence has been found at higher taxonomical level.

Furthermore the contribution of microbiota in nutrient digestion might be limited in growing pigs assuming that the largest amount of energy is digested in the foregut. The energy digested in the hindgut represents only 7 to 18% depending on the dietary fiber content and composition (Anguita et al., 2006). At the same time, the biggest fraction being fermented in the hindgut (non-starch polysaccharides) by the microbiota accounts for 50 to 77% of energy disappearance for the hindgut of the pig. In addition, the relation between microbiota composition and energy harvest is disputed (Murphy et al., 2010; Dalby et al., 2017). Surprisingly however significant correlations were detected in the LF diet rather than in the HF diet in which microbial fermentation was expected to play a larger role.

In the LF diet, we reported significant correlations between microbiota composition and digestibility coefficients of N, energy, cellulose and hemicellulose and these correlations were robust because they were independent of the period, the breed and the farm origin of the animals. The correlated OTUs belonged to 9 bacterial families. Any discussion about the functional impact of microbes on digestibility is more relevant at the OTU level rather than using inferring from higher taxonomic affiliations. Indeed, among the OTUs significantly correlated with digestibility coefficients, the OTUs belonging to 7 families over 9 were either positively or negatively correlated with digestibility coefficients. For example the correlated OTUs belonging to *Clostridiaceae* were all negatively correlated with energy and N digestibility. However, *Lactobacillaceae* and *Prevotellaceae* families were represented by both positively and negatively correlated OTUs. Therefore it is not possible to conclude about the impact of a whole family on digestibility and the relationships between microbiota and digestibility should be described at OTU level.

Surprisingly, OTUs belonging to *Clostridiaceae* family were not associated with cell wall components digestibility in our study even though they have been previously positively correlated with apparent crude fiber digestibility (Niu et al., 2015) and tends to be associated to dietary fiber metabolism (Varel et al., 1989). Intriguingly, OTUs belonging to the *Ruminococcaceae* and to the *Lachnospiraceae* families were negatively correlated with cell wall component digestibility in our study although they possess genes coding for proteins (xylanases, cellulases) to degrade a wide variety of polysaccharides (Biddle et al., 2013) and

may have protection properties against diseases, as their abundance are higher in healthy gut of piglets compared to sick ones (Dou et al., 2017). Therefore their negative impact on cell wall components digestibility was not backed up by the literature.

Our study revealed that the cell wall components digestibility was negatively correlated with OTUs belonging to *Prevotella*. The fermentation abilities of *Prevotella* genus cannot be inferred because *Prevotella (albensis, brevis, bryantii and ruminicola)* poorly ferment hemicellulose (Emerson and Weimer, 2017) but *Prevotella copri* abundance was linked to an improved capacity to ferment complex polysaccharides (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). *Prevotella* were also related to chronic inflammatory diseases, mainly studied in humans (Scher et al., 2013; Larsen, 2017). But this cannot be generalized to all *Prevotellaceae* since OTUs from *Prevotellaceae* family were found in higher abundance in healthy piglets compared to diarrheic ones (Dou et al., 2017). Therefore, some *Prevotellaceae* may have a positive impact in gut health which could explain the positive correlation between energy and N digestibility and undefined *Prevotellaceae* in our study.

As previously reported by Vigers et al. (2016a), our study highlighted a positive link between the abundance of OTUs belonging to *Lactobacillaceae* and digestibility of N and energy. Some bacteria belonging to *Lactobacillaceae* family seems to improve the nutrient digestibility through the fermentation. As an illustration, *Lactobacillus fermentum* supplementation was related to an improved apparent digestibility of crude protein in weaned pigs. Likewise, a *Lactobacillus acidophilus* supplementation increased linearly the apparent digestibility of N, possibly through the stimulation of the hindgut fermentation (Lan et al., 2017). Such a stimulation could be primarily due to the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* (Le et al., 2016). However, *Lactobacillaceae* are also known to improve the health of the small intestine in humans as in animals (Hou et al., 2015; Dowarah et al., 2017) as a probiotic. As a consequence, the positive effect of *Lactobacillaceae* on the ability to digest feed could also be partly due to an indirect effect on gut health.

Surprisingly, no significant correlation was reported between OTU abundance and digestibility coefficients in the HF diet. According to Martens et al. (2011) several bacteria have the ability to metabolize the same dietary fiber substrates. Thus, when a dietary perturbation occurs, different bacterial strains may compete for the substrate and some will expand at the expense of others (Chung et al., 2016; Rolhion and Chassaing, 2016). No

similar reaction in microbiota composition can be observed among the pigs fed a challenged HF diet which prevent from seeing significant correlations between digestibility coefficients and microbiota composition in the HF diet. This assumption is purely speculative and requires further analyses. However the digestion might be improved by providing specific enzymes in the feed according to the challenged diets.

1.6. Conclusion

In growing-finishing pigs, microbiota composition can be used to discriminate with accuracy the animals according to their dietary treatment using 31 bacterial biomarkers. Even though global fecal microbiota composition remained stable across time, our study revealed that three weeks of adaptation to a new diet are sufficient to observe the resilience of these biomarkers. Furthermore, in case of LF diet, protein and energy digestibility coefficients were positively correlated with OTUs belonging to *Lactobacillus* whereas OTUs belonging to *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* and *Prevotella* were negatively correlated with nutrients and cell wall components digestibility. This suggests beneficial or detrimental properties of these bacteria in pig digestion; however their underlying biological functions remain to be determined.

1.7. Supporting information²

S1 Fig. Pipeline of analyses applied on the digestibility coefficients (DC) and the operational taxonomic units (OTUs): Pearson correlation, variance analysis (ANOVA), global linear model (glm) and sparse partial least square discriminant analysis (sPLS-DA).

S2 Fig. No significant variation in microbiota composition at a phylum level between diets (LF: Low-fiber diet; HF: High-fiber diet), breeds (DU: Duroc; LW: Large-White; PI: Pietrain) and periods (per1 to per4) in Khi^2 tests.

S3 Fig. No significant differences between diets (LF: Low-fiber diet; HF: High-fiber diet), breeds (Pietrain, LW: Large-White, Duroc) or periods (periods 1 to 4) in terms of diversity according to the observed abundance (Observed index), the Shannon or the Simpson indexes.

² Les Figures et tableaux supplémentaires sont disponibles dans la version en accès libre en ligne de l'article.

S4 Fig. Score plot of two-component sPLS-DA model showing feces samples clustering according to the period with percentage of variance captured for each principal component (Δ : Period 1, \square : Period 2, O: Period 3, +: Period 4) for the animals fed low-fiber diet or high-fiber diet. According to the cross-validation permutation test, the misclassification error-rates are respectively 52% and 51%.

S5 Fig. Repartition of the OTUs according to the absolute value of their correlation with N, energy, cellulose and hemicellulose digestibility coefficients (figures a, b, c and d, respectively) in high-fiber diet (HF) or in low-fiber diet (LF). The significant correlations are represented in blue.

S1 Table. Contribution and taxonomy of the predictive OTUs of high-fiber (HF) vs low-fiber (LF) diet in sPLS-DA.

S2 Table. Contribution and taxonomy of the predictive OTUs of breed/farm in sPLS-DA in period 1 for pigs fed low-fiber diet.

S3 Table. Pearson correlations and taxonomy of the OTUs correlated with the digestibility coefficients of energy, N, cellulose and hemicellulose.

S4 Table. Phenotypic dataset

1.8. Acknowledgements

The authors want to thank A. Berrée, A. Chauvin, M. Genissel, J. Georges, G. Guillemois, E. Janvier, F. Legouevéc, M.-H. Lohat, V. Piedvache, J.-F. Rouaud for animal care and sample collection, Y. Jaguelin, and A. Marchais for lab analyses, B. Gabinaud for the DNA extractions and the GeT genomic platform for 16S RNA sequencing.

1.9. References

Cf. liste des références à la fin du manuscrit.

2. Article 2, effet de challenges thermiques chronique et aigu sur la composition du microbiote fécal, les performances de production et la thermorégulation de porcs en croissance

Présentation de l'étude : La chaleur est un problème important pour l'élevage de porcs dans de nombreux bassins de production dans les régions tempérées mais également dans les régions tropicales. L'impact du climat sur la composition du microbiote est très peu décrit chez le porc. Dans cette étude, 1 122 porcs appartenant à 23 bandes différentes et issus de 10 familles de verrats différentes ont été phénotypés en phase de croissance dans 2 élevages expérimentaux de l'INRA (UE GENESI en climat tempéré et UE PTEA en climat tropical) dans le cadre du projet PigHeat financé par l'Agence Nationale de Recherche. Des prélèvements de microbiote ont été réalisés à 23 semaines d'âge dans les deux élevages et à 26 semaines d'âge en métropole, après l'application d'un stress thermique aigu (3 semaines à 30°C) à partir de la 23^{ème} semaine. Le premier objectif de cette étude est de décrire l'impact d'un stress thermique chronique ou aigu sur la composition microbienne fécale de porcs en finition. Un deuxième objectif de cette étude est de relier cette robustesse à la composition microbienne intestinale précédant le stress thermique.

Principaux résultats : Le stress thermique chronique affecte significativement l'abondance de 77% des OTU présentes dans le jeu de données tandis que 11% des OTU sont affectées par un stress thermique aigu. Les résultats montrent que le microbiote fécal peut être utilisé comme biomarqueur de l'exposition à un stress thermique. Ainsi 36 OTU permettent de discriminer les animaux élevés dans des conditions tempérées comparé à des conditions tropicales avec 1,7% d'erreur. De même, 32 OTU permettent de discriminer les animaux avant ou après exposition à un stress thermique aigu avec 9,3% d'erreur. L'exposition à un stress thermique impacte les fonctions bactériennes déterminées à partir de l'analyse microbienne fécale. Notamment, des fonctions associées à une détérioration de la santé digestive de l'hôte sont surreprésentées après un stress thermique.

L'analyse des entérotypes a déterminé deux entérotypes, chacun présent à la fois à 23 et 26 semaines d'âge. Les porcs classés à 23 semaines d'âge dans l'entérotipe dominé par des *Lactobacillus* présentent une température rectale moins stable après exposition à un stress thermique aigu comparés aux porcs classés dans l'entérotipe dominé par *Turicibacter*, *Sarcina* et *Clostridium sensu stricto*. Cependant, aucun lien entre les entérotypes et les performances de croissance n'est observé. Entre 23 et 26 semaines d'âge, 34% des porcs changent d'entérotipe. Les raisons de cette instabilité restent inconnues.

**Effect of chronic and acute heat challenges on fecal microbiota composition,
production and thermoregulation traits in growing pigs**

Short title: Heat stress impact on pig fecal microbiota

Le Sciellour Mathilde¹, Zemb Olivier², Hochu Isabelle², Riquet Juliette², Gilbert Hélène², Giorgi Mario³, Billon Yvon⁴, Gourdine Jean-Luc⁵, Renaudeau David^{1*}

¹PEGASE, INRA, AGROCAMPUS OUEST, 35590, Saint-Gilles, France

²GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, 31320, Castanet Tolosan, France

³PTEA, INRA, 97170, Petit-Bourg, France

⁴GenESI, INRA, 17700, Saint-Pierre-d'Amilly, France

⁵URZ, INRA, 97170, Petit-Bourg, France

*Corresponding author: david.renaudeau@inra.fr

Citation : Le Sciellour, M., O. Zemb, I. Hochu, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi, Y. Billon, J.-L. Gourdine, and D. Renaudeau. 2019. Effect of chronic and acute heat challenges on fecal microbiota composition, production, and thermoregulation traits in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 97(9):3845-3858. doi:10.1093/jas/skz222.

Cet article s'inscrit dans le cadre du projet européen Feed-a-Gene Project, financé par le programme H2020 de l'Union Européenne sous le numéro d'agrément 633531, et dans le projet PigHeat financé par l'Agence Nationale de la Recherche française (ANR-12-ADAP-0015).

Cet article a été publié le 2 juillet 2019 en accès libre.

2.1. Abstract

The present study aimed at investigating the impact of heat challenges on gut microbiota composition in growing pigs and its relationship with pigs' performance and thermoregulation responses. From a total of 10 F1 sire families, 558 and 564 backcross Large White × Créole pigs were raised and phenotyped from 11 to 23 wk of age in temperate (TEMP) and in tropical (TROP) climates, respectively. In TEMP, all pigs were subjected to an acute heat challenge (3 wk at 29°C) from 23 to 26 wk of age. Feces samples were collected at 23 wk of age both in TEMP and TROP climate (TEMP23 and TROP23 samples, respectively) and at 26 wk of age in TEMP climate (TEMP26 samples) for 16S rRNA analyses of fecal microbiota composition. The fecal microbiota composition significantly differed between the three environments. Using a generalized linear model on microbiota composition, 182 operational taxonomic units (OTU) and two pathways were differentially abundant between TEMP23 and TEMP26, and 1,296 OTU and 20 pathways between TEMP23 and TROP23. Using fecal samples collected at 23 wk of age, pigs raised under the two climates were discriminated with 36 OTU using a sparse partial least square discriminant analysis that had a mean classification error-rate of 1.7%. In contrast, pigs in TEMP before the acute heat challenge could be discriminated from the pigs in TEMP after the heat challenge with 32 OTU and 9.3% error-rate. The microbiota can be used as biomarker of heat stress exposition. Microbiota composition revealed that pigs were separated into two enterotypes. The enterotypes were represented in both climates. Whatever the climate, animals belonging to the *Turicibacter-Sarcina-Clostridium sensu stricto* dominated enterotype were 3.3 kg heavier ($P < 0.05$) at 11 wk of age than those belonging to the *Lactobacillus* dominated enterotype. This latter enterotype was related to a 0.3°C lower skin temperature ($P < 0.05$) at 23 wk of age. Following the acute heat challenge in TEMP, this enterotype had a less stable rectal temperature (0.34 vs. 0.25°C variation between wk 23 and 24, $P < 0.05$) without impacting growth performance ($P > 0.05$). Instability of the enterotypes was observed in 34% of the pigs, switching from an enterotype to another between 23 and 26 wk of age after heat stress. Despite a lower microbial diversity, the *Turicibacter-Sarcina-Clostridium sensu stricto* dominated enterotype was better adapted to heat stress conditions with lower thermoregulation variations.

Key words: climate, enterotype, heat stress, microbiota, performance, pig

2.2. Introduction

In tropical regions and in temperate countries during summer, high temperatures cause economic losses in pig industry (St-Pierre et al., 2003). These losses are related to negative effects of heat stress (HS) on reproductive and growth performances. The microbiome plays a central role in health, nutrient digestion and more generally in host energetic metabolism (Nicholson et al., 2012). Varying types of stress alter the microbial composition such as social stress in rats (Suzuki et al., 1983), sanitary stress in piglets (Mulder et al., 2009) and HS in poultry (Suzuki et al., 1983; Song et al., 2014) and in dairy cattle (Uyeno et al., 2010). Exposure to HS induces changes in gut microbial composition in broilers with a decrease in the relative abundance of *Lactobacillus* (Lan et al., 2004). If relationships between microbiota composition and performance have been reported in temperate environments (Ramayo-Caldas et al., 2016; Le Sciellour et al., 2018), no results were yet reported under HS conditions. We hypothesize that potential changes in microbiota composition under HS would help the host to cope with stressful conditions. To characterize microbial community composition, the generated datasets using marker gene (i.e. 16S rRNA) survey are generally large and complex (counting data with many zeros, large variance in data distribution, etc.) posing substantial “big data” challenges. As a result, these data require specific multidimensional statistical methods. Recent advances in microbiota analysis allow the description of modifications in microbial abundance using appropriate generalized linear models (Robinson et al., 2010) and discriminant analyses (Lê Cao et al., 2011). The present study aimed at investigating the impact of hot environmental conditions, represented by tropical climate or by an acute HS under temperate climate, on pig fecal microbiota composition and at evaluating how these changes in microbiota composition interplay with animal performance.

2.3. Material and methods

The present study was conducted in accordance to the French legislation on animal experimentation and ethics. The French Ministry of Agriculture authorized the experiment on living animals at the INRA facilities in temperate (TEMP) and tropical (TROP) climates (CE2012-9 from the Animal Care and Use Committee of Poitou-Charentes and 69-2012-2 from the Animal Care and Use Committee of French West Indies and Guyane) under the direction of Y. Billon and J. Fleury (INRA-PTEA; authorization number by the French Ministry of Agriculture and Fisheries: 17015 and 971-2011-03 7704, respectively).

2.3.1. Animals and experimental design

Data used in the present study were obtained from a backcross design in which 60 and 70 Large White (LW) dams in TEMP area (INRA-Génétique, Expérimentation et Systèmes Innovants, Poitou-Charentes, France; 46° N, 0.45° W) and in TROP area (INRA-Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, Guadeloupe, French West Indies; 16° N, 61° W), respectively, were inseminated with the same 10 F1 (LW x Créole) boars. Créole breed is a local tropical breed. Full details on the experimental design are given by Rosé et al. (2017). Finally, 558 and 564 backcross pigs (castrated males and females) in 12 batches were produced in TEMP and TROP climates, respectively.

The general animal management conditions were homogenized in both climates before starting the study. We ensured the consistency of this management by sending farm technicians from the farm in TEMP area to the farm on TROP area, and technicians from the farm in TROP area to the farm on TEMP area. Pigs were weaned at 28-d of age. During the post-weaning period (10 wk), the pigs were housed in pens of 22 animals in the TEMP climate and in pens of 12 animals in the TROP climate. At 10 wk of age, 60 of the 64 pigs were randomly selected and housed in pens of 10 animals of the same sex in both TEMP and TROP climates. After one wk of adaptation, the test period started at wk 11 and ended at wk 23. Whatever the climate, pigs had a free access to water and were fed ad libitum with a commercial grower diet presented as pellets. For practical reasons, the diets in both environments were formulated with different raw materials (wheat, corn, barley and soybean meal in TEMP, and corn and soybean meal in TROP) but resulted in the same chemical and nutritional composition (16.0 vs. 16.4% crude protein and 13.9 and 13.5 MJ digestible energy/kg in TEMP and TROP area, respectively) (Rosé et al., 2017). In both environments, the diets did not contain any antibiotic, pre- or pro-biotic, or any other extracts. At 23 wk of age, TEMP pigs were moved to a climatic room and submitted to a constant ambient temperature of about 29°C (29.0°C ± 1.3°C) for 3 consecutive weeks.

2.3.2. Measurements and samples

The live body weights (BW) were recorded every two wk from 11 to 23 wk of age. The average daily body weight gain (ADG) was calculated from the BW difference between the beginning and the end of each two-week periods. The overall ADG was also calculated from the BW at 11 and 23 wk of age. Feeding stations (ACEMA 128, ACEMO, Pontivy, France)

were used to record daily feed intake. The feed intake of half of the pigs was recorded during wk 11-12, 15-16 and 19-20, whereas the feed intake of the remaining pigs was recorded during wk 13-14, 17-18 and 21-22. Average daily feed intake (ADFI) between 11 and 23 wk of age was then estimated based on these measurements as suggested previously (Schulze et al., 2001). When the feed consumption was not recorded, pigs had free access to a conventional feed dispenser. Feed conversion ratio (FCR) was calculated as the ratio between ADFI and ADG between wk 11 and 23. Rectal temperature (RT) and skin temperature (ST) were measured at wk 19 and 23 in TEMP and TROP and at wk 24 and 26 in TEMP. Digital thermometers (Microlife Corp., Paris, France) were used to measure RT, and ST was measured on the back at the P2 site using a skin surface thermocouple probe (type K, model 88002K-IEC; Omega Engineering Inc., Stamford, CT) connected to a microprocessor based handheld thermometer (model HH-21; Omega Engineering Inc.). Fecal samples were taken directly from the rectum on wk 23 in both climates, and on wk 26 in TEMP (Figure III-8). These samples were immediately stored in barcoded tubes and snap-frozen within 5 minutes in liquid nitrogen before storage at -80°C until DNA extraction.

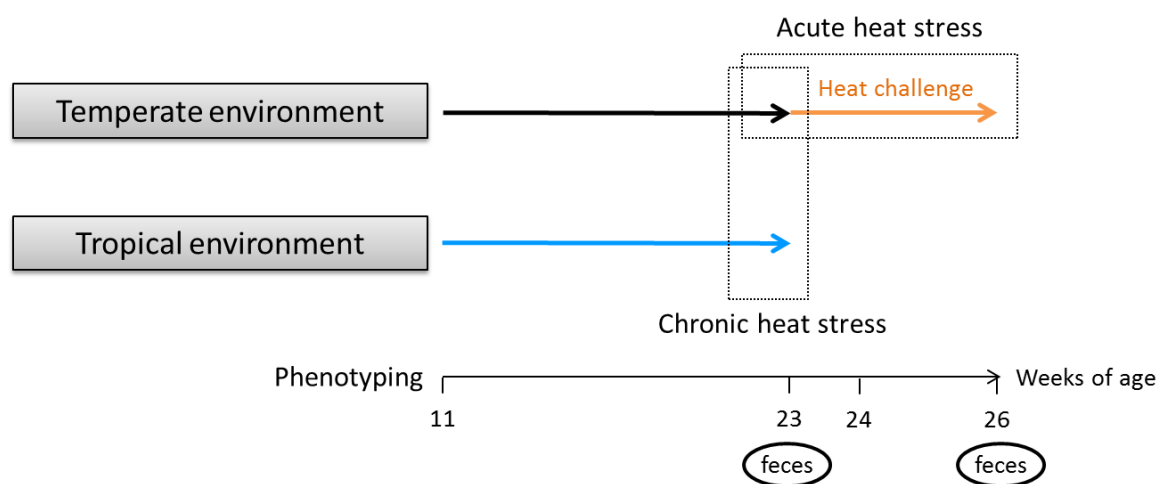


Figure III-8 : Experimental design: pigs were raised under temperate (n = 558) or tropical (n = 564) environments between 11 and 26 wk of age.

The following abbreviations will be used in the current article: TEMP23, TROP23 and TEMP26 will refer to data collected at 23 wk of age on TEMP and TROP, and at 26 wk of age on TEMP climate, respectively. The chronic HS will refer to the comparison between TEMP23 and TROP23. The acute HS will refer to the comparison between TEMP23 and TEMP26.

2.3.3.DNA sequencing

The DNA extraction was performed with the Zimo kit from 50 mg of feces sample according to a method previously described by Verschuren et al. (2018). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene has been amplified by PCR before sequencing on an Illumina MiSeq platform. The amplification used F460 and R460 primers (F460: CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, R460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) and 30 cycles of PCR with an annealing temperature of 65°C. The resulted 2x250bp paired-end sequences were cleaned internally for length, homopolymers and undetermined nucleotides. Sequencing and sequences cleaning have been performed in the GeT-PlaGE platform (Toulouse, France).

The VSEARCH software (Rognes et al., 2016) was used to remove chimeras from the sequences dataset and then to de novo cluster the resulting sequences into operational taxonomic units (OTU) with a threshold of 0.97 similarity. The abundance of each OTU in each sample was recorded. Rare OTU, representing less than 0.01% of the sequences from all samples, were removed. The Usearch software (9.2.64_i86linux32 version) was then used for taxonomic assignation based on SILVA database. The PICRUSt pipeline was applied on the 16S rRNA sequencing data (Langille et al., 2013). The resulting abundance of KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) genes orthologues in each sample was further categorized into biological pathways.

2.3.4.Calculations and statistical analyses

Statistical analyses were performed under the software R version 3.2.5. The effects of the chronic HS on production and thermoregulation traits were analyzed using an ANOVA model with the effect of climate (TEMP vs. TROP), sex type (castrated males vs. females) and sire family (n = 10) as fixed effects, and the batch within each climate as a random effect. The ANOVA model used to test the effect of the acute HS on production and thermoregulation traits included the fixed effects of age (23 vs. 24 vs. 26 wk of age), sex type, sire family and batch. The animal was included in the model as a random effect to account for within-pig covariability of repeated measurements.

The microbial diversity was assessed by the number of species and the Shannon index using the Vegan R package (Oksanen et al., 2018). The proportions of the variance explained

by the environment, the batch, the sex type or the sire family were evaluated by a principal variance component analysis (PVCA) through the Bioconductor R *pvca* package (Bushel, 2018). The effect of the environment (TEMP23, TROP23 and TEMP26) on the relative abundance of the bacteria at the phylum level was evaluated through Wilcoxon tests, using two by two comparisons. Generalized linear models (GLM) were then established using edgeR R package (Robinson et al., 2010) to evaluate the impact of the environment on the abundance of each OTU and of each pathway. The fixed effect of the sex was included in the model. The effect of batch within each climate was considered as a random effect. The analyzed models compared TEMP23 vs. TEMP26, and TEMP23 vs. TROP23 for the OTU, and also TEMP26 vs. TROP23 for the pathways. The *P*-values were adjusted for multiple tests with the Benjamini-Hochberg method. In addition, a threshold was fixed to 0.5 log₂ fold change to extract the most differentially represented pathways in the studied environments.

To predict the environment in which the pigs were raised based on their microbial data, sparse partial least square discriminant analyses (sPLS-DA) were performed by using MixOmics R package (Lê Cao et al., 2011). The sPLS-DA was performed on the OTU table previously normalized through a total sum scaling and centered log ratio transformation. This table was not rarefied and the counts varied between 7,000 and 75,234 sequences/sample. A M-fold cross-validation was performed to evaluate the error-rate of the models with 10 folds and 10 times repetition.

To aggregate abundance profiles into groups with similar bacterial compositions, enterotypes were constituted according to Arumugam et al. (2011). Samples were clustered based on the relative genus abundances using Jensen-Shannon divergence distance and the Partitioning Around Medoids clustering algorithm. The results were assessed for the optimal number of clusters (enterotypes) using the Calinski-Harabasz Index. The statistical significance of the optimal clustering was evaluated by comparing the Silhouette coefficient of the optimal clustering to a distribution of Silhouette coefficients derived from a simulation from 100 different randomized tables which modeled the null distribution with no clustering. The randomized tables were based on the original relative genus abundance table randomly reorganized by sample. Genera abundances between enterotypes were compared using Kruskal-Wallis tests. The effects of the enterotypes on performance and thermoregulatory responses measured between 11 and 23 wk of age and microbial diversity were tested using ANOVA models including the effect of enterotype, climate, sex type, sire family and

interactions. The effect of enterotypes established at 23 wk of age on pigs' performance, thermoregulatory response and microbial diversity during the acute HS in TEMP climate was analyzed by ANOVA. The models included the effect of the batch, sex, sire family and interactions. The models also included random effects: the ADG between 21 and 23 wk of age, the ST and the RT between 19 and 23 wk of age, the number of OTU and the Shannon index at 23 wk of age.

2.4. Results

2.4.1. Animal performance

Between 11 and 23 wk of age, the daily ambient temperature averaged 25.2°C and 26.3°C in TEMP and TROP climates, respectively. On the subset of pigs with fecal samples at 23 wk of age, 520 and 531 pigs had full records for growth performance and thermoregulation responses in TEMP and in TROP, respectively. The ADG and ADFI were lower (754 vs. 836 g/d, SE = 9, $P < 0.05$ and 1.76 vs. 2.22 kg/d, SE = 0.05, $P < 0.05$, respectively) in TROP when compared to the TEMP conditions (Figure III-9). The FCR did not differ between TROP and TEMP climates (2.43 vs. 2.66, SE = 0.09, $P = 0.08$). At 23 wk of age, TEMP pigs were 19 kg heavier (SE = 1, $P < 0.05$) compared to pigs raised under TROP conditions. The RT was 0.1°C greater (SE = 0.03, $P < 0.05$) in pigs raised in the TROP climate compared to pigs raised in the TEMP climate. Similarly, ST was greater in TROP than in TEMP climate (35.7 vs. 34.5°C, SE = 0.2, $P < 0.05$).

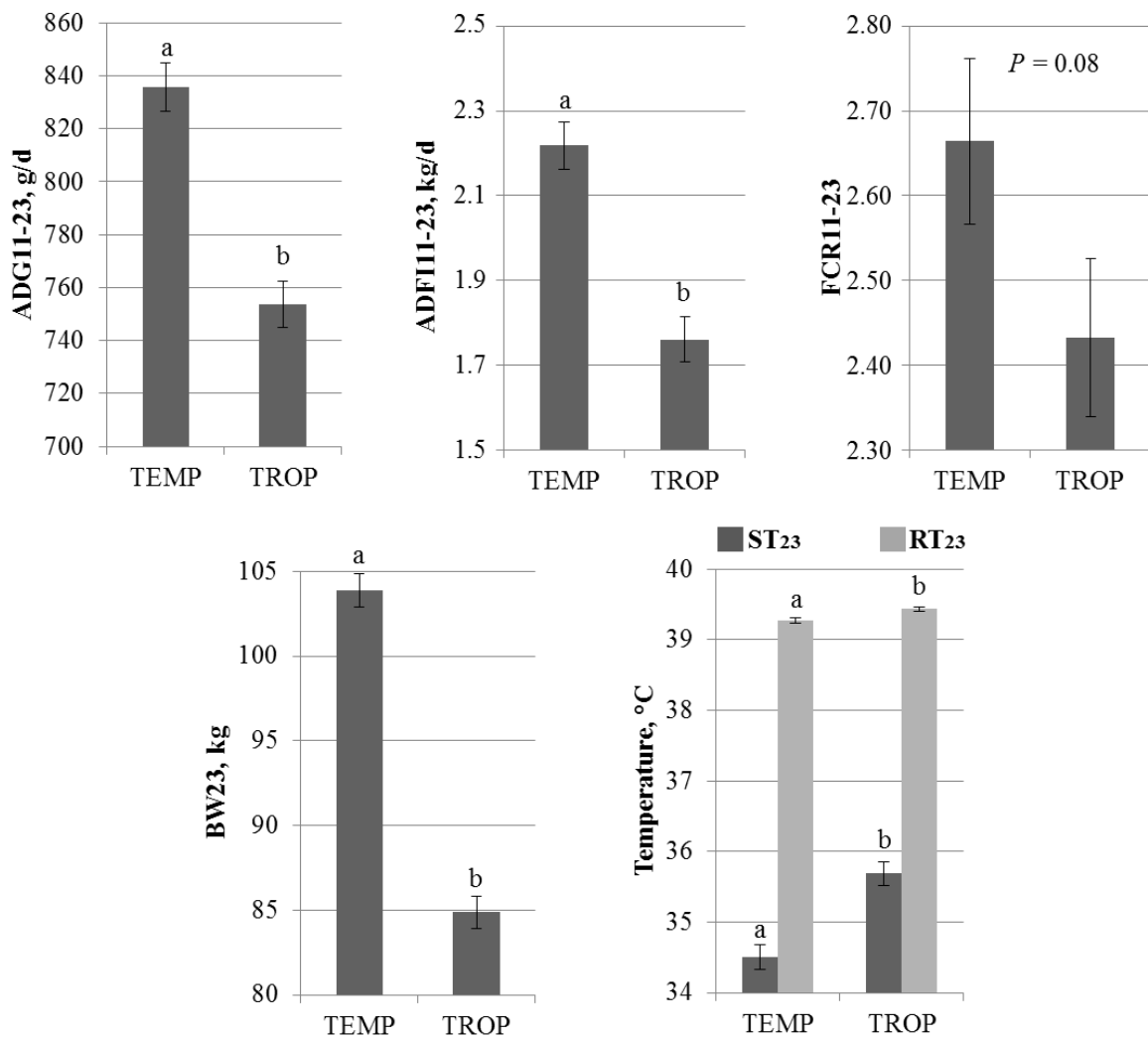


Figure III-9 : Effect of a chronic heat stress represented by temperate and tropical climates (TEMP and TROP, respectively) on average daily gain (ADG₁₁₋₂₃), average daily feed intake (ADFI₁₁₋₂₃), and feed conversion ratio (FCR₁₁₋₂₃) between 11 and 23 wk of age, on body weight at 23 wk of age (BW₂₃) and on skin and rectal temperatures at 23 wk of age (ST₂₃ and RT₂₃, respectively).

Least squares means within a trait with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

In TEMP climate, the ADG decreased from 835 to 583 g/d between wk 23 and 24 (SE = 12, $P < 0.05$) and thereafter remained stable from 24 to 26 wk of age (589 g/d on average; SE = 12, $P > 0.05$) (Figure III-10). Regarding the thermoregulation responses, both RT and ST increased from wk 23 to wk 24 (39.3 to 39.6°C, SE = 0.02, $P < 0.05$, and 34.5 to 36.6°C, SE = 0.04, $P < 0.05$, respectively). Between wk 24 and wk 26, RT and ST were reduced from 36.6 to 36.3°C (SE = 0.02, $P < 0.05$) and from 39.6 to 39.4°C (SE = 0.04, $P < 0.05$), respectively.

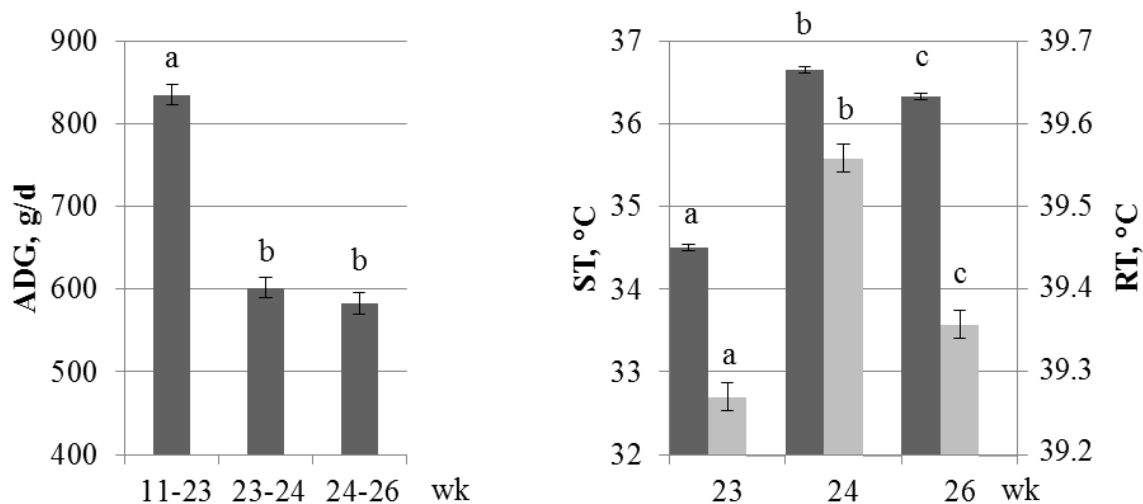


Figure III-10 : Effect of an acute heat challenge applied from wk 24 to 26 on average daily gain (ADG), skin temperature (ST) and rectal temperature (RT).

Least squares means within a trait with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

2.4.2. Impact of an HS on microbiota composition

In the feces samples collected in the present study, the number of sequences ranged from one to 75,234 with an average value of $21,194 \pm 11,539$ sequences. Only the 1,583 samples containing more than 7,000 sequences were retained for further analyses (526 samples in TEMP23 and in TEMP26, and 531 in TROP23). After filtration for the rare OTU, a total of 1,688 OTU remained in our dataset. The average *Prevotella* abundance was $5.6\% \pm 5.1\%$ and average *Ruminococcus* abundance was $0.3\% \pm 0.2\%$. The *Mitsuokella* and *Treponema* genera abundance reached $0.1\% \pm 0.1\%$ and $0.5\% \pm 0.6\%$, respectively.

Fecal samples from the TEMP26 group presented a greater richness compared to those of the TEMP23 group ($P < 0.05$), but no difference in Shannon index ($P = 0.13$). Fecal samples from the TROP23 group did not differ from those of the TEMP23 and TEMP26 groups in the observed counts ($P = 0.63$ and 0.75 , respectively), but presented a lower Shannon index ($P < 0.05$). Based on the PVCA analysis, the environment (TEMP23, TEMP26 or TROP23) explained 20% of the total variance of the microbial composition; the sire family accounted for 3.9%, the batch for 3.2% and the sex type for 0.8% of the total variance. The microbiota composition was dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla (91.7, 88.3 and 87.5% for TEMP23, TEMP26 and TROP23, respectively). The relative abundance of *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Spirochaetes* was greater ($P < 0.05$) under TROP climate when compared

to TEMP climate (Table III-3). The relative abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* was greater ($P < 0.05$) in TEMP23 than in TEMP26 and TROP23 environments.

Table III-3 : Relative percentage at phylum level in samples collected in temperate climate before (TEMP23) and after (TEMP26) an acute heat challenge and in tropical climate (TROP23).

Phylum	TEMP23	TEMP26	TROP23
<i>Firmicutes</i>	66.85 ^a	70.75 ^b	68.73 ^c
<i>Bacteroidetes</i>	24.90 ^a	17.60 ^b	18.80 ^c
<i>Unclassified</i>	5.61 ^a	8.14 ^b	7.27 ^c
<i>Spirochaetes</i>	1.40 ^a	2.11 ^b	3.66 ^c
<i>Proteobacteria</i>	0.79 ^a	0.77 ^a	1.21 ^b
<i>Fibrobacteres</i>	0.25 ^a	0.40 ^b	0.14 ^c
<i>Actonibacteria</i>	0.19 ^a	0.20 ^b	0.17 ^c
<i>Tenericutes</i>	0.01 ^a	0.03 ^b	0.01 ^c
<i>Fusobacteria</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Deferribacteres</i>	<0.01	<0.01	<0.01

^{a-c} Mean percentage within a row with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) in a Kruskal-Wallis test.

Using the GLM from edgeR package, the comparison of the microbiota from TEMP23 and TROP23 highlighted 1,296 OTU with significantly different abundance between the climates: 728 OTU significantly more abundant in TEMP23 and 568 OTU more abundant in TROP23 ($P < 0.05$) (Figure III-11). The corresponding analysis for the comparison between TEMP23 and TEMP26 revealed 87 OTU significantly more abundant in TEMP23 and 95 more abundant in TEMP26 ($P < 0.05$). Based on these comparisons, we could extract the OTU systematically more abundant in hot conditions (either under TROP climate or after a heat challenge under TEMP climate). These 78 OTU belonged mainly to the *Prevotellaceae* family (41% of the OTU) and the *Lachnospiraceae* family (18%). On the contrary, 37% of the 43 OTU always more abundant under TEMP23 came from the *Clostridiaceae 1* family and 5% from the *Peptostreptococcaceae* family.

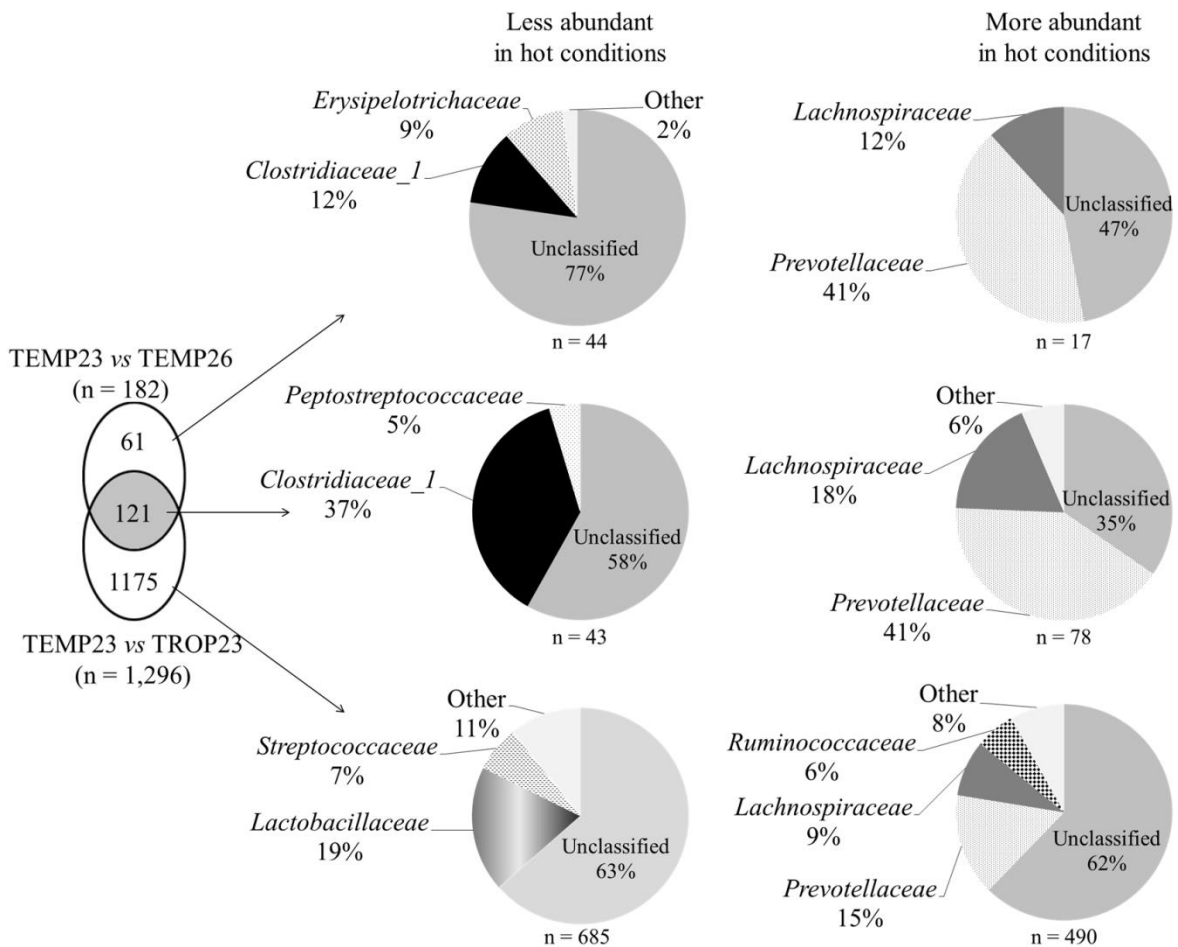


Figure III-11: Venn diagrams of the operational taxonomic units differentially abundant in a GLM analysis, aggregated at family level, between TEMP23 vs. TEMP26, and between TEMP23 vs. TROP23.

The GLM analysis extracted three functional pathways related to metabolism (biosynthesis of isoflavonoids, steroid hormones and betalain) overrepresented in TEMP23 compared to TROP23 (Figure III-12). In contrast, 17 pathways were overrepresented in TROP23 and they were related to human diseases (five pathways), metabolism (four pathways), genetic information processing (three pathways), cellular processes (two pathways) and organismal systems (three pathways). The steroid hormone biosynthesis pathway was overrepresented in TEMP23 compared to TEMP26, and the G protein-coupled receptor pathway was overrepresented in TEMP26 compared to TEMP23.

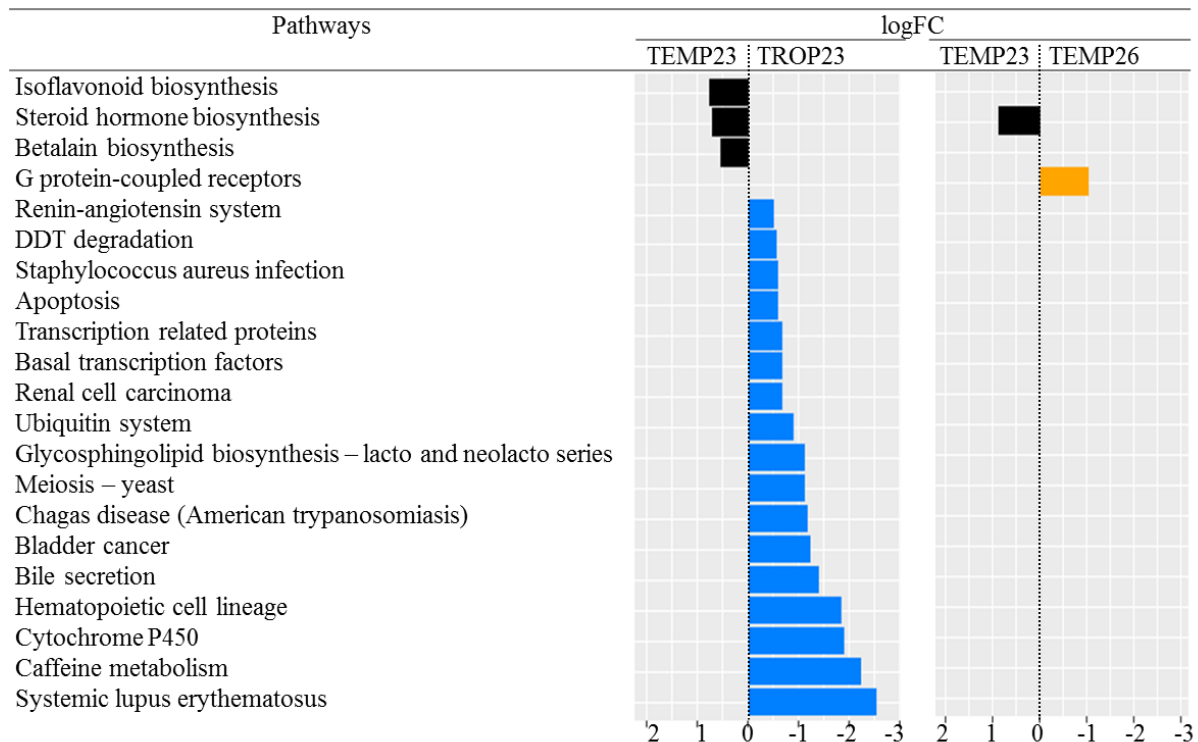


Figure III-12 : Functional pathways differentially abundant between the temperate climate at 23 wk (TEMP23) and 26 wk of age (TEMP26) and the tropical climate at 23 wk of age (TROP23).

Log2 fold changes (logFC) resulted from a two-by-two comparison using a generalized linear model analysis (false discovery rate < 0.05).

The sPLS-DA allowed the discrimination of pigs raised under two different environments (Figure III-13). Pigs raised under TEMP and TROP climates were discriminated with 0.2% error-rate of misclassification using 36 OTU on a first component and 89 supplementary OTU on a second component. Among the OTU selected on the first and the second components, 21% belonged to the *Prevotellaceae* family. As well, fecal samples at TEMP23 and TEMP26 were used to discriminate pigs before and after the acute heat challenge in a multilevel sPLS-DA. The discrimination reached 7.1% error-rate and used 62 OTU on two components. Among the OTU selected on the first and the second components, 19% belonged to the *Prevotellaceae* family and 14% to the *Lachnospiraceae* family. The OTU selected in the sPLS-DA were systematically found as differentially abundant in the GLM analysis using edgeR package. From the comparison of the two previous sPLS-DA analyses, we extracted five OTU systematically used to discriminate pigs raised in TEMP23 from pigs raised in hot

conditions. These OTU belonged to the *Lactobacillaceae* family (n = 1), to the *Peptostreptococcaceae* family (n = 1) and to the *Prevotellaceae* family (n = 3).

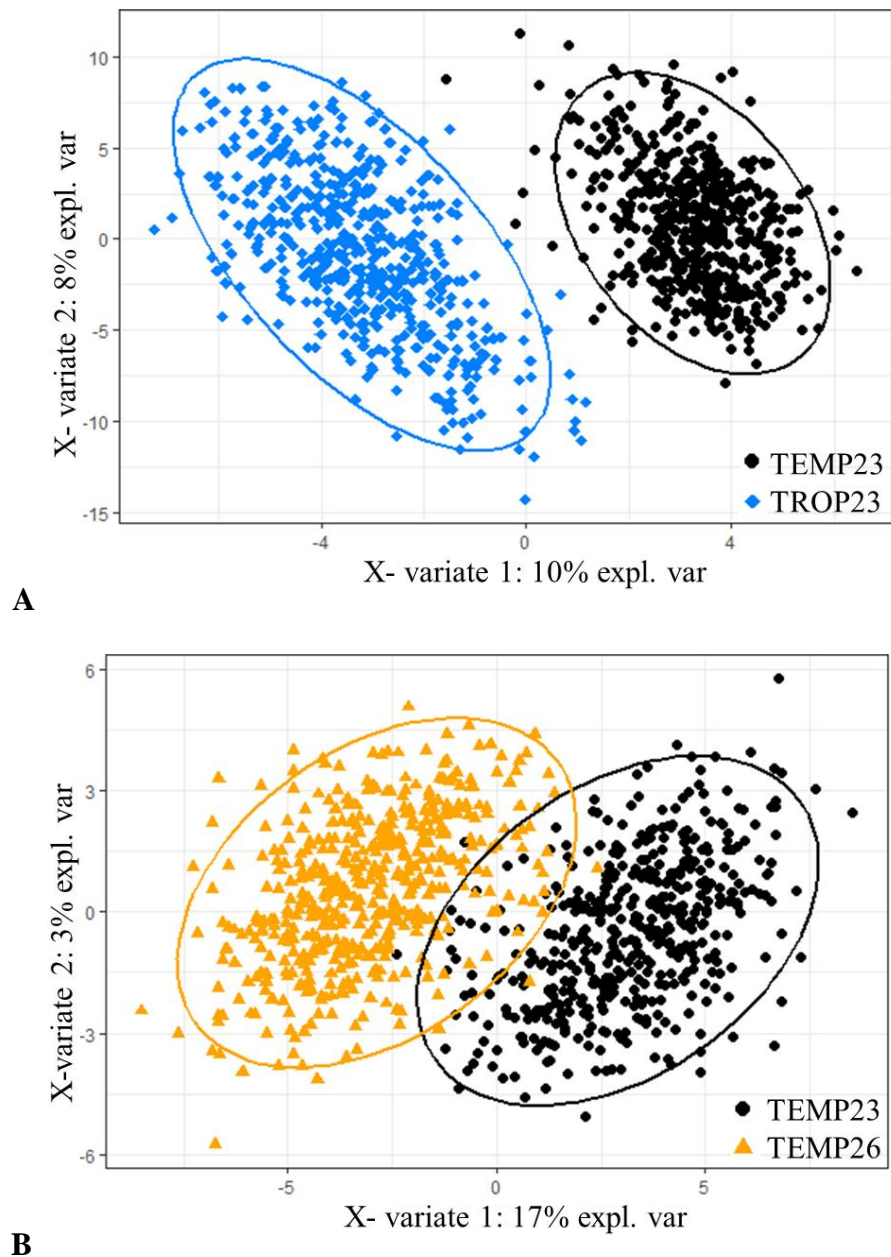


Figure III-13 : Score plot of two-component sparse partial least square discriminant analysis models showing feces samples clustering according to the environment (TEMP23: under temperate climate at wk 23 of age; TEMP26: under temperate climate after a 3-wk heat challenge period; TROP23: under tropical climate at wk 23 of age) with percentage of variance captured for each principal component.

According to the cross-validation permutation test, the misclassification error-rates with two components are 0.2 and 7.1% in models 1 (figure A) and 2 (figure B), respectively.

2.4.3. Effect of the enterotypes on performance and thermoregulation

Following the methodology of Arumugam et al. (2011), the microbiota clustered into two enterotypes with a mean silhouette value of 0.29 (Figure III-14) while the mean silhouette value reached by randomized tables was 0.03. This result confirmed that the enterotypes were accurately discriminated. These two enterotypes were represented in each climate: 261 and 145 pigs clustered in enterotype 1 (E1) in TEMP23 and in TROP23, respectively, and 265 and 386 pigs clustered in enterotype 2 (E2) in TEMP23 and in TROP23, respectively.

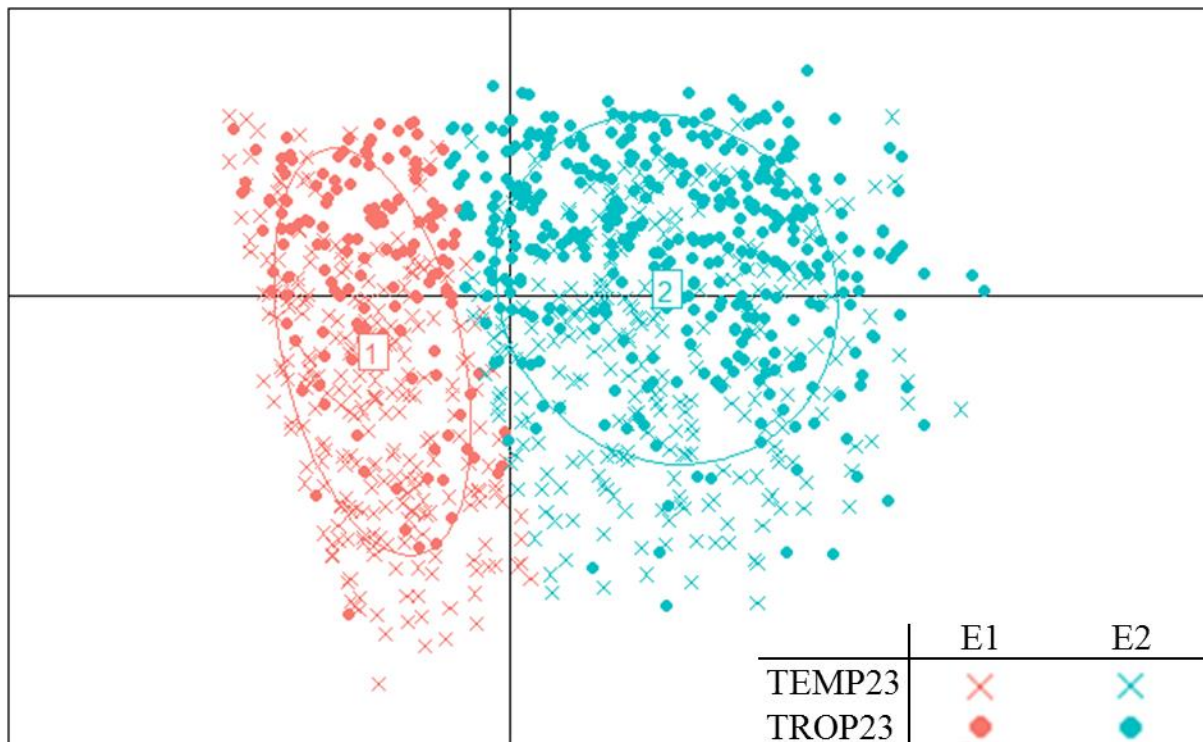


Figure III-14 : Distribution of the microbial enterotypes 1 (E1) and 2 (E2) in 23-wk old pigs raised in temperate (TEMP23) or tropical (TROP23) climates.

Enterotypes in our experiment differed in *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Sarcina* and *Clostridium sensu stricto* abundances ($P < 0.05$). The abundance of these latter genera in E1 were $4.5 \pm 3.7\%$, $0.8 \pm 0.5\%$, $0.8 \pm 1.0\%$ and $2.3 \pm 1.6\%$, respectively (Figure III-15). The corresponding values in E2 were $23.4 \pm 9.1\%$, $0.3 \pm 0.2\%$, $0.2 \pm 0.4\%$ and $0.1 \pm 1.0\%$. This second enterotype was dominated by the *Lactobacillus* genus. According to the ANOVA analysis, based on the number of OTU (2,586 vs. 2,742 OTU in TEMP23 and 2,600 vs 2,698

OTU in TROP23, respectively), the alpha diversity of the samples in E2 was greater ($P < 0.05$) compared to the samples in E1. The Shannon index (7.18 vs. 7.25 in TEMP23 and 7.14 vs. 7.18 in TROP23, respectively) confirmed the greater diversity in E2 compared to E1 (Table III-4).

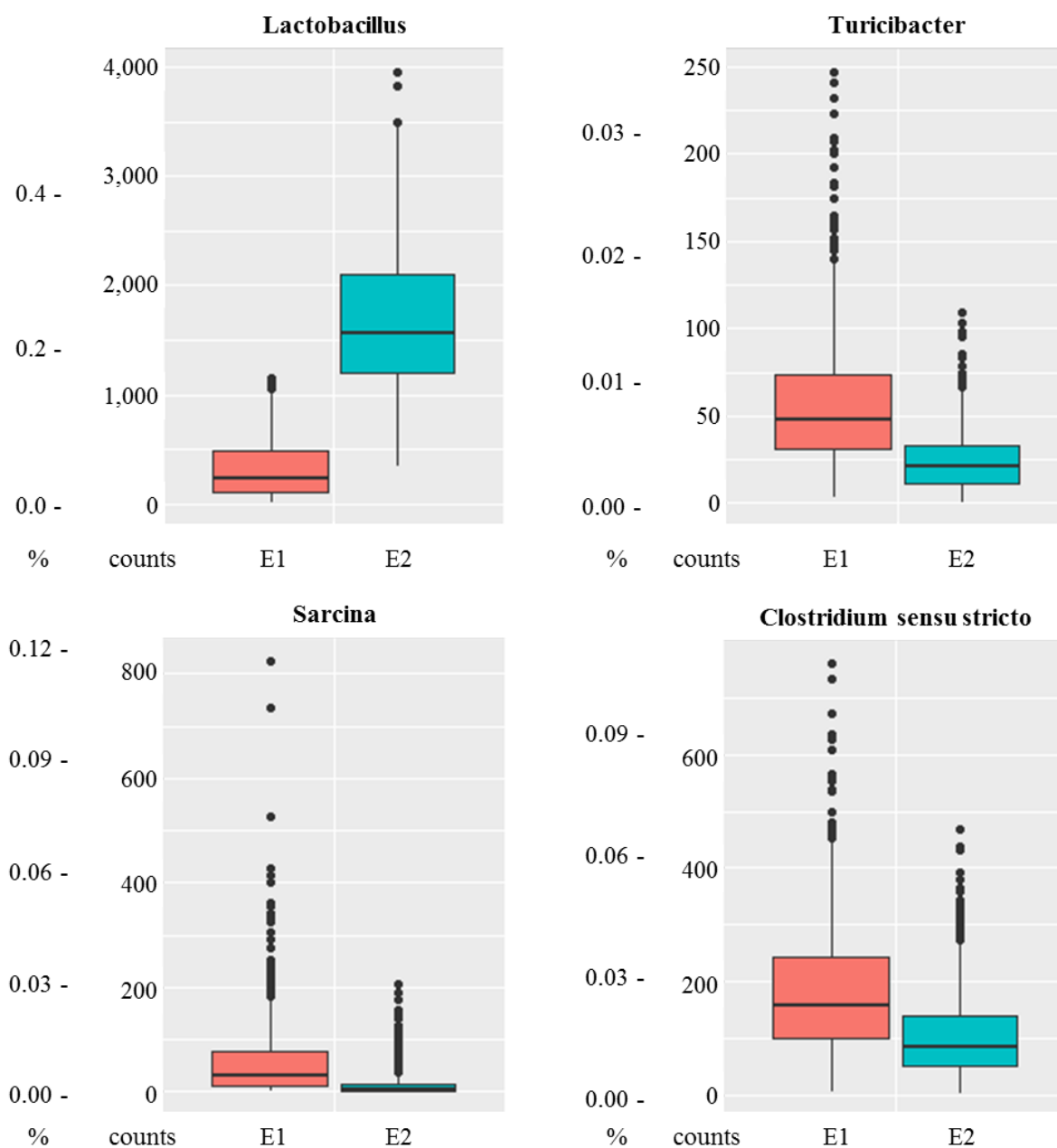


Figure III-15 : Abundance (% and counts) of the four main genera contributing to the microbial enterotypes 1 (E1 in red) and 2 (E2 in turquoise).

Table III-4 : Effect of the microbial enterotype (E1 and E2) established at 23 wk of age on production traits, thermoregulatory responses and microbial diversity (least square means) in temperate (TEMP) and tropical (TROP) climates.

Item ¹	TEMP		TROP		RSD ²	Statistics ³
	E 1	E 2	E 1	E 2		
No. of pigs	261	265	145	386		
Production and thermoregulatory traits						
BW ₁₁ , kg	32 ^a	31 ^a	22 ^b	21 ^c	4	E, C, F
BW ₂₃ , kg	104 ^a	104 ^a	86 ^b	85 ^b	10	C, S, F
ADG ₁₁₋₂₃ , g/d	835 ^a	837 ^a	754 ^b	754 ^b	86	C, S, F
ADFI ₁₁₋₂₃ , kg/d	2.2 ^a	2.2 ^a	1.7 ^b	1.8 ^b	0.4	C, S, F
FCR ₁₁₋₂₃	2.69	2.63	2.37	2.45	0.47	C, S, F
ST ₂₃ , °C	34.5 ^a	34.5 ^a	35.5 ^b	35.7 ^c	0.7	E, C, S, F
RT ₂₃ , °C	39.2 ^a	39.3 ^{ab}	39.4 ^b	39.4 ^b	0.3	C, S, F
Microbial diversity at 23 wk of age						
Number of OTU	2,586 ^a	2,742 ^b	2,600 ^a	2,698 ^b	222	E, S
Shannon Index	7.18 ^a	7.25 ^b	7.14 ^a	7.18 ^a	0.18	E, F

¹BW₁₁ and BW₂₃: body weight at 11 and 23 wk of age, ADG₁₁₋₂₃: average daily gain between 11 and 23 wk of age; ADFI₁₁₋₂₃: average daily feed intake between 11 and 23 wk of age; FCR₁₁₋₂₃: feed conversion ratio between 11 and 23 wk of age; ST₂₃: skin temperature at 23 wk of age; RT₂₃: rectal temperature at 23 wk of age; OTU: operational taxonomic unit.

²Residual Standard Deviation from an ANOVA model accounting for the enterotype (E), the climate (C), the sex type (S), the sire family (F), the batch and the interactions E×C and E×S.

³Significant effects ($P < 0.05$). Batch effect was significant for all traits and is not reported in the table.

^{a-c} Least squares means within a row with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

From the ANOVA analysis of the effect of enterotypes on production and thermoregulation traits recorded during the growth period in both climates, whatever the trait, the interaction between the enterotypes and the climate was not significant ($P > 0.05$). Pigs in E1 were 3.3 kg heavier at wk 11 compared to pigs in E2 ($P < 0.05$) (Table III-4). However, the two enterotypes did not differ for the BW record at 23 wk of age (97.5 vs. 93.8 kg for E1 and E2, respectively; $P = 0.42$). Between 11 and 23 wk of age, the two enterotypes did not relate to different ADG (806 vs. 787 g/d for E1 and E2, respectively; $P = 0.99$), ADFI (2.05 vs. 1.94 kg/d for E1 and E2, respectively; $P = 0.12$) or FCR (2.57 vs. 2.52 for E1 and E2, respectively; $P = 0.09$). Regarding the thermoregulation traits, ST at 23 wk of age was 0.3°C

greater in E2 pigs compared to E1 pigs (34.9 vs 35.2°C, respectively; $P < 0.05$) but the RT did not differ between the two enterotypes (39.3 vs 39.4°C, respectively; $P = 0.11$). In TEMP climate, when pigs were exposed to an acute HS challenge between 23 and 26 wk of age, the animals from both E1 and E2 presented similar ADG and ST variation (Table III-5). During the acute HS challenge, the rise in RT from wk 23 to 24 was greater in pigs from E2 than in those from E1 (0.34 vs 0.25°C, respectively, $P < 0.05$). On a long-term response, between wk 23 and 26, the RT variation remained 0.05°C greater ($P < 0.05$) in E2 compared to E1.

Table III-5 : Effect of the microbial enterotype (E1 and E2) established at 23 wk of age on production traits, thermoregulatory responses and microbial diversity (least square means) after an acute heat stress in temperate climate.

Item ¹	E 1	E 2	RSD ²	Statistics ³
No. of pigs	261	265		
Production and thermoregulatory traits				
Short-term response (from 23 to 24 wk)				
ADG, g/d	590	600	390	F, ADG ₂₁₋₂₃
Change in ST, °C	2.20	2.11	0.98	F, ST ₁₉₋₂₃
Change in RT, °C	0.25 ^a	0.34 ^b	0.45	E, RT ₁₉₋₂₃ , E×S
Long-term response (from 23 to 26 wk)				
ADG, g/d	579	589	157	F, ADG ₂₁₋₂₃ , E×S
Change in ST, °C	1.86	1.87	0.87	ST ₁₉₋₂₃
Change in RT, °C	0.09 ^a	0.14 ^b	0.43	E, RT ₁₉₋₂₃ , E×S
Microbial diversity				
Number of OTU				
At 23 wk	2,586 ^a	2,742 ^b	226	E, F
Change from 23 to 26 wk	12	41	201	No. of OTU ₂₃
Shannon index				
At 23 wk	7.18 ^a	7.25 ^b	0.19	E, F
Change from 23 to 26 wk	-0.02	0.01	0.15	F, Shannon index _{x23}

¹ADG: average daily gain; ST: skin temperature; RT: rectal temperature.

²Residual Standard Deviation from an ANOVA model accounting for the enterotype (E), the sex type (S), the sire family (F), the batch and the interactions E×S. The models for short or long term responses also accounted for the ADG between 21 and 23 wk of age (ADG₂₁₋₂₃), the ST and the RT between 19 and 23 wk of age (ST₁₉₋₂₃ and RT₁₉₋₂₃, respectively), the number of operational taxonomic unit (OTU) and the Shannon index at 23 wk of age (No. of OTU₂₃ and Shannon index_{x23}, respectively) for ADG, ST, RT, number of OTU and Shannon index variations, respectively.

³Significant effects ($P < 0.05$). Batch effect was significant for all traits and is not reported in the table.

^{a-b}Least squares means within a row with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$).

When pigs were exposed to an acute HS in TEMP climate, their distribution in the two enterotypes changed. Among the 241 pigs belonging to E1 in wk 23, 199 (82.6%) remained in the same enterotype in wk 26, but 42 (17.4%) switched from E1 to E2 in wk 26. In contrast, 123 pigs remained in E2 from wk 23 to wk 26 when 122 pigs switched from E2 to E1. Performance and thermoregulation response of pigs switching from one enterotype to another one did not differ from those of pigs that remained stable in their enterotype at 23 and 26 wk of age. In particular, growth performance and rectal temperature variation after HS did not differ between pig that switched or not (results not shown).

2.5. Discussion

2.5.1. Performance and thermoregulatory response to HS

The effects of tropical climate on performance from 11 to 23 wk of age have already been detailed by Rosé et al. (2017). In the subset of pigs with fecal samples included in our study, we confirmed that ADFI and ADG were significantly reduced in TROP compared to TEMP climate. These results are also in agreement with Renaudeau et al. (2006). In TROP, the combined effects of high temperature and high relative humidity possibly accentuate the ADFI reduction due to heat (Granier et al., 1998) due to the low ability of the pigs to lose heat by evaporation under high ambient humidity. In agreement with Rosé et al. (2017), feed efficiency tended to increase in TROP conditions. As suggested by Renaudeau et al. (2011), in moderate HS conditions, feed efficiency increases due to feed restriction effect.

The exposure to a 3-wk acute HS of 29 °C from 23 wk of age resulted in a significant increase in body temperature within the first week of exposure (+ 0.3°C for RT) followed by a gradual decline (- 0.1°C/wk from wk 24 to 26). This biphasic response to an acute HS is in agreement with previous studies: the decrease in RT and ST overtime during the exposition to high ambient temperature demonstrates a long-term adaptation to HS (Morrison and Mount, 1971; Renaudeau et al., 2007; Renaudeau et al., 2008). According to Renaudeau et al. (2013), this acclimation is mainly related to a reduction in metabolic heat production. In addition, this latter study showed that the total amount of energy intake is reduced in hot conditions with subsequent negative effects on both the energy retained and growth performance. This result was confirmed by the reduced ADG during the 3-wk exposure to 29°C, compared to that measured between wk 11 and wk 23.

2.5.2. Microbiota composition response to HS

In accordance with previous studies conducted in pigs (Xiao et al., 2016; Holman et al., 2017), fecal samples collected in the present study were dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. The PVCA analysis revealed that the environment explained 20% of the total variance in microbiota composition. It led to an accurate discrimination of the climates based on the microbial abundance information. Indeed, 77% of the OTU differed between TEMP and TROP, but only 11% differed from fecal samples collected before and after acute HS in TEMP climate. In addition, the TEMP and TROP pigs could be discriminated using sPLS-DA on fecal microbiota composition with a greater accuracy (0.2% error-rate) than the TEMP23 and TEMP26 pigs (7.1% error-rate). The two climates differed in ambient temperature, humidity and feed composition among others non-controlled external effects. In contrast, the acute heat challenge was applied on the same pigs, which drastically reduced the external sources of variation. Similarly, heifers raised under temperate- or tropical-simulated climates differed in ruminal microbiota composition but when exposed to a temperature increase in the TEMP conditions, the microbiota composition did not vary (Tajima et al., 2007). In this latter study as in our, no difference in microbial diversity has been observed between the environmental conditions.

In our experimental conditions, *Lachnospiraceae* abundance in HS conditions (TEMP26 and TROP23) increased. However, contradictory results were published on the relation between *Lachnospiraceae* abundance and stressful situations. Mice exposed to the water immersion restraint stress showed an increase in *Lachnospiraceae* (S. Li et al., 2017). In contrast, *Lachnospiraceae* abundance was negatively correlated with hematological measure of stress in squirrels (Stothart and Newman, 2017). From that, it can be hypothesized that changes in *Lachnospiraceae* abundance would depend on the nature of stress.

In our study, among the OTU more abundant in TEMP23 compared to TROP23, 19% belonged to *Lactobacillaceae*. This family was also highly represented in OTU that discriminated the two climatic conditions with the sPLS-DA. Similarly, the relative abundance of *Lactobacillaceae* was depleted in HS broilers (Song et al., 2014). At a functional level, *Lactobacillus* and *Clostridium* possess a bile salt hydrolase which participates to the detoxification of bile acids in the gut (Krishnan et al., 2015). As a result, reduced *Lactobacillus* and *Clostridium* abundance observed in our HS conditions (TEMP26

and TROP23) could be connected to the over-represented bile secretion pathway reported in these HS conditions. According to Krishnan et al. (2015), the bile acid secretion favors the gut colonization by pathogens. The greater abundance of potentially pathogenic *Prevotellaceae* in TROP compared to TEMP would illustrate a greater colonization of the gut by pathogenic bacteria in HS conditions (Larsen, 2017). In human, *Prevotella* have been associated with chronic inflammatory diseases (Scher et al., 2013; Larsen, 2017). Therefore, we could hypothesize that *Prevotellaceae* bacteria may have participated to the over-representation of disease-related pathways in our experiment. Unfortunately we did not measure traits related to diseases in TROP. Cytochromes P450 enzymes (CYP) related pathway was also over-represented in TROP climate. In agreement, CYP' expression was improved in HS mice (Bhusari et al., 2007). These CYP play an important role in gut health improvement by acting on the degradation of bile acid (Hrycay et al., 2014; Li and Apte, 2015), drugs and xenobiotics (Wilson and Nicholson, 2017). In other words, the over-representation of CYP pathway in hot conditions could be considered as a consequence of the deterioration of gut health.

As explained before, the reduced abundance of *Lactobacillaceae* in HS conditions could be the first step of a dysbiosis and subsequent gut inflammation (Rojo et al., 2017). From that, it can be hypothesized that nutritional strategies based on probiotics supplementation with *Lactobacillus* species would help pigs to cope with the effects of HS. In broilers, when *Lactobacillaceae* abundance decreased, a dietary supplementation with *Lactobacillaceae* improved the broilers' adaptation to acute HS (Lan et al., 2004). In pigs, *Lactobacillus* strains are often used as a probiotic to improve the immune system and the growth performances (Hou et al., 2015; Valeriano et al., 2017) but have not been tested yet in HS conditions. Therefore, *Lactobacillaceae* supplementation could be investigated to improve the pigs' adaptation to HS.

The apoptosis and ubiquitin systems pathways were over-represented in TROP compared to TEMP. In HS broilers, heat shock proteins including ubiquitin were up-regulated (Li et al., 2011) while proteins that negatively regulate apoptosis, among which the ubiquitin specific proteinase 45, were down-regulated in broilers (Li et al., 2011; Loyau et al., 2016; Wang et al., 2018) and in mammals (Parag et al., 1987; Riezman, 2004). In particular, the cellular apoptosis and protein degradation through the ubiquitin system in chronic HS conditions was demonstrated in finishing pigs (Cui et al., 2016). This could be due to an accumulation of

denaturalized proteins and the activation of the mitochondrial-dependent apoptosis pathway in HS pigs (Gu et al., 2015).

2.5.3. Enterotypes and heat challenge perturbation

We classified our fecal samples collected on 23 wk old pigs based on the relative abundance of microbial genera into two enterotypes, according to the methodology from Arumugam et al. (2011). Using the same mathematical methodology, Ramayo-Caldas et al. (2016) had also defined two enterotypes (PEA and PEB) with feces samples collected on 60 days old pigs. The alpha diversity in the PEA enterotype was greater than in the PEB enterotype. Similarly, microbiota diversity differed between the two enterotypes found in the present study. Whatever the climate, E1 enterotype presented a lower diversity compared to E2. In Ramayo-Caldas et al. (2016) work, the PEA enterotype was dominated by *Ruminococcus* and *Treponema* while the PEB enterotype was dominated by *Prevotella* and *Mitsuokella*. In our experiment, the relative abundance of *Prevotella* and *Mitsuokella* corresponded for all samples to the PEA enterotype. However the relative abundance of *Ruminococcus* and *Treponema* measured in our fecal samples situated all of them in the PEB enterotype. As a consequence, the enterotypes as defined previously (Ramayo-Caldas et al., 2016) were not applicable in our study. The discrepancy between this previous study and the present one could be related to the difference of age at sampling the feces. According to Zhao et al. (2015), the microbiota composition is not fully stabilized at 60 d of age and evolves with aging. Similarly, microbiota composition of healthy humans evolved continuously throughout time between three enterotypes previously defined by Arumugam et al. (2011) (Knights et al., 2014). These results suggest that the enterotypes' definition is probably age-dependent. The instability of the enterotypes is one reason why the notion of enterotype is highly controverted (Huse et al., 2012; Jeffery et al., 2012; Gorvitovskaia et al., 2016). In addition, between 23 and 26 wk of age, part of the pigs switched from an enterotype to another, and this switch was not related to changes in production traits or in HS tolerance. The evolution in microbiota composition could have been accentuated by environmental climatic conditions. Similarly, other environmental factors such as feeding management can trigger modifications of the microbiota composition within 24 hours and induced a switch between enterotypes in human (Wu et al., 2011) and in piglets (Mach et al., 2015).

Pigs belonging to E1, with minimal microbial diversity, were heavier at the beginning of the experiment compared to pigs in E2. In accordance, 60 days old pigs in PEB enterotype, with minimal microbial diversity, were heavier than the pigs in PEA enterotype (Ramayo-Caldas et al., 2016). However, we did not observe significant differences in ADG despite a cluster-related growth performance previously observed in younger pigs (Mach et al., 2015; Ramayo-Caldas et al., 2016), maybe due to the differences between the defined enterotypes in these studies compared to ours. In the present experiment, growth and feeding performances were not related to enterotypes in any climate until 23 wk of age. Regarding the impact of the enterotypes on acclimation responses to HS, pigs in the E1 enterotype presented lower ST variation in TEMP and TROP between 19 and 23 wk of age. In addition, pigs in E1 exposed to an acute HS in TEMP showed a more stable RT at short- and long-terms compared to pigs in E2. Therefore, we hypothesized that, despite a lower microbial diversity, the specific microbiota composition in the E1 would help the host to better cope with the heat perturbation compared to pigs in the E2. However, this hypothesis has to be validated in further investigations.

This study demonstrated that fecal microbiota composition is significantly influenced by the climatic conditions. However, it remains unclear how this shift affects microbiota functions and helps the host to better cope with HS conditions. Better understanding of the physiological role of microbial populations that are significantly affected by chronic and acute HS could help to develop targeted approaches to prevent heat distress in swine.

2.6. Acknowledgements

The authors thank K. Benony, D. Beramice, B. Bocage, M. Bructer and F. Silou from the experimental unit INRA-PTEA, and F. Meslier, J. Bailly, P. Epagneaud and C. Lebourhis from the experimental unit INRA-GenESI for animal care and sample collection, and the GeT genomic platform for 16S RNA sequencing.

2.7. References

Cf. liste des références à la fin du manuscrit.

3. Article 3, effets à court et long terme d'expositions courtes à un aliment contaminé au déoxynivalénol sur la composition du microbiote fécal de porcs

Présentation de l'étude : Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures très couramment présentes dans les céréales et qui peuvent contaminer les aliments destinés aux porcs. Elles ont des répercussions négatives majeures sur les performances des animaux. Parmi elles, le déoxynivalénol (DON) est une toxine qui entraîne une réduction de l'appétit et impacte la santé des porcs en croissance-finition. Le microbiote, étant un acteur de détoxification de DON au niveau du gros intestin, est potentiellement un bon prédicteur de la robustesse des animaux face à une exposition à DON.

Dans un premier temps, cet article permet de caractériser l'impact d'expositions courtes et répétées à DON sur la composition du microbiote fécal porcin, encore peu étudié *in vivo* chez le porc. Dans un second temps, les relations entre les variations de composition microbienne et les variations de performances ont été évaluées. Pour cela, 160 porcs mâles castrés et femelles ont été phénotypés entre 99 et 154 jours d'âge. Ces porcs ont été divisés en 4 groupes expérimentaux : un groupe témoin recevant un aliment finition standard pendant toute l'étude, un groupe DC recevant un aliment contaminé par 3,02 mg DON/kg entre 113 et 119 jours d'âge, un groupe CD recevant cet aliment contaminé entre 134 et 140 jours d'âge, et enfin un groupe DD recevant l'aliment contaminé durant ces deux périodes. Seules les femelles ont été prélevées pour l'analyse du microbiote.

Principaux résultats : Après une semaine d'exposition à DON, la composition microbienne intestinale est significativement modifiée. Notamment, à l'échelle des familles, l'exposition à DON entraîne une diminution significative de l'abondance en *Ruminococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae* et une augmentation de l'abondance relative en *Erysipelotrichaceae* à la fois à 119 (après le premier challenge) et à 140 jours d'âge (après le second challenge). Un total de 27 fonctions biologiques permet de discriminer les porcs exposés ou non à un challenge mycotoxine à l'aide d'une sPLS-DA avec 15% d'erreur de classification. Certaines des fonctions identifiées sont impliquées dans la

détoxification de DON dans le tube digestif (métabolisme des xénobiotiques par le cytochrome P450). Après 2 semaines de récupération, sans exposition à DON, la composition microbienne ne diffère pas de celle des prélèvements issus des animaux témoins. Ce résultat semble indiquer une résilience du microbiote face à une perturbation par DON. En termes de performances, la quantité d'aliment ingéré et le gain de poids des porcs exposés à DON sont significativement corrélés à des fonctions biologiques microbiennes, notamment en lien avec des modifications du statut sanitaire et du métabolisme de l'hôte.

Transient effect of single or repeated acute deoxynivalenol dietary challenge on fecal microbiota composition in finishing pigs

Short title: Impact of DON challenge on pig microbiota

Le Sciellour Hazon Mathilde¹, Zemb Olivier², Serviento Aira-Maye¹, Renaudeau David^{1*}

¹PEGASE, INRA, AGROCAMPUS OUEST, 35590, Saint-Gilles, France

²GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVIT, 31320, Castanet Tolosan, France

*Corresponding author: david.renaudeau@inra.fr

Citation : Le Sciellour, M., O. Zemb, A.-M. Serviento and D. Renaudeau. Transient effect of single or repeated acute deoxynivalenol dietary challenge on fecal microbiota composition in finishing pigs. (Soumis dans Animal le 18/09/2019)

Cet article s'inscrit dans le cadre du projet européen Feed-a-Gene Project, financé par le programme H2020 de l'Union Européenne sous le numéro d'agrément 633531.

3.1. Abstract

Mycotoxins are recognized as an important contaminant of feed for pigs with negative effects on health and performance. The present study aimed at investigating the impact of single or repeated acute challenges with a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) on growth performances of finishing pigs and on their gut microbiota composition. A total of 160 pigs were randomly distributed to four experimental groups in two successive replicates of 40 pigs each. The control group (CC) received a control finisher diet from 99 to 154 days of age. The DC, CD and DD groups were submitted to a 7-days acute challenge being fed with a DON-contaminated diet (3.02 mg DON/kg feed) at 113, 134 and both 113 and 134 days, respectively. Microbiota composition was analyzed via 16S rRNA sequencing from fecal samples collected on the 80 females only at 99, 119, 140 and 154 days. Challenged pigs (i.e. DC, CD, and DD groups) reduced their average daily feed intake by 25% and 27% ($P < 0.001$) and feed efficiency by 34% and 28% ($P < 0.05$) during the first and second DON expositions, respectively. The microbiota composition was significantly affected by DON exposure in a multivariate ANOVA analysis. At the family level, DON exposure significantly ($P < 0.05$) decreased the relative abundance of *Ruminococcaceae*, *Streptococcaceae*, and *Veillonellaceae*, and increased the relative abundance of *Erysipelotrichaceae* at both 119 and 140 days of age. After a DON challenge during one week, 6 to 148 operational taxonomic units (OTU) were differentially abundant depending on the treatment group. However, none of these OTU was in common between all treatment groups. Using 27 functional pathways, pigs exposed to DON challenges could be discriminated from controls in a sparse partial least square discriminant analysis with 15% error-rate of misclassification. Regarding the functionality of these predictors, two pathways were involved in DON detoxification (i.e. drug metabolism and metabolism of xenobiotics by cytochrome P450). In challenged pigs, the microbiota composition returned to an initial state within three weeks after the end of the single or repeated DON challenge indicating that gut microbiome is resilient. The feeding and growth performance of the pigs in DON challenged conditions were significantly correlated with biological pathways related to health troubles and modifications in the host metabolism.

Key words: swine, microbiome, mycotoxin, performance, acute challenge

Implications: This experiment supplies information for a better understanding on short and long terms impact of DON challenge on microbiota composition in pigs and on

relationships between these changes and the host performance during the challenges. It demonstrated a transient impact of an acute challenge on microbiota composition suggesting that pigs in a commercial context may recover promptly from this type of perturbation.

3.2. Introduction

The deoxynivalenol (DON) is a secondary metabolite produced by *Fusarium* spp. This mycotoxin is known in livestock production as it impairs animal health and growth when ingested via contaminated cereals as wheat and corn in feed (Bouhet and Oswald, 2005; Antonissen et al., 2014). In particular, pigs' exposition to DON causes epithelial injuries which impact the immune functions of the animals and lead to an inflammatory response, and potentially diarrhea (Bouhet and Oswald, 2005; Sobrova et al., 2010). This results in reduced feed intake and growth rate (Andretta et al., 2012; Serviento et al., 2018). Modifications in pig's microbiota composition were described following a chronic ingestion of fumonisin mycotoxin (Mateos et al., 2018) or DON (Waché et al., 2008). For these latter authors, the chronic exposure to DON resulted in transient modifications of the fecal aerobic mesophilic bacteria abundance during the first week of DON challenge (Waché et al., 2008). However, the short- and long-term impact of single or repeated acute DON challenges on pig gut microbiota composition has not been described yet. From in vitro studies on pig's microbiota, intestinal bacterial strains has been identified that promote metabolism, binding or detoxification of DON (He, 1992; Kollarczik et al., 1994; Eriksen et al., 2002, 2003; Young et al., 2007). Thus, microbiota could help its host to keep on performing despite a DON exposure via the feed. In return, we assume that the capacity of the animals to cope with a DON challenge could be related to microbiota composition and modifications. The present study first aimed at evaluating the impact of one or several acute DON challenges on short- and long-term evolution of fecal microbiota. Then the relationship between microbiota functions and pigs' performance variations due to DON challenge will also be explored.

3.3. Material and methods

The present study was conducted in accordance with the French legislation on animal experimentation and ethics (authorization: 2016022415253973).

3.3.1. Animals and experimental design

The experiment was conducted on Pietrain × (Large White × Landrace) pigs. The 160 pigs (80 castrated males and 80 females) were raised in two replicates from April to October 2017 in the INRA experimental facilities at the Unité Expérimentale Porcs de Rennes located in Saint Gilles, France. Within each replicate, pigs were randomly allotted to the four experimental treatments in a randomized complete block design. Each litter was equally represented in each treatment. The experimental room was equipped with a weighing machine, and automatic precision feeders as described by Pomar et al. (2011). A full description of the experimental room is provided in Serviento et al. (2018). During the challenged periods, the living areas of the control and the challenged pigs were separated to avoid cross-contamination via the feces. Pigs had free access to the water and the feed was provided ad libitum.

A naturally DON-contaminated feed was used to challenge the pigs. Both control finisher diet and DON-contaminated diet were based on corn and soy bean meal with 0.8 g standardized ileal digestible lysine per MJ NE, and met the ideal profile for essential amino acids. The diets' composition is described in Serviento et al. (2018). The control diet was based on a corn with trace DON concentration. The DON-contaminated diet was formulated with a naturally contaminated corn containing 4.8 mg DON/kg. From the analyses of mycotoxin composition, the control diet contained 0.14 mg DON/kg and the DON-contaminated diet contained 3.02 mg DON/kg. The experimental design was described in the Figure III-16. Control group (CC) received the control finisher feed all along the experiment (from 99 to 154 days of age). The experimental groups DC, CD and DD were submitted to the 7-days DON challenge on day 113, day 134 and both days 113 and 134, respectively. During the pre- and post-challenge periods, pigs received the control finisher feed.

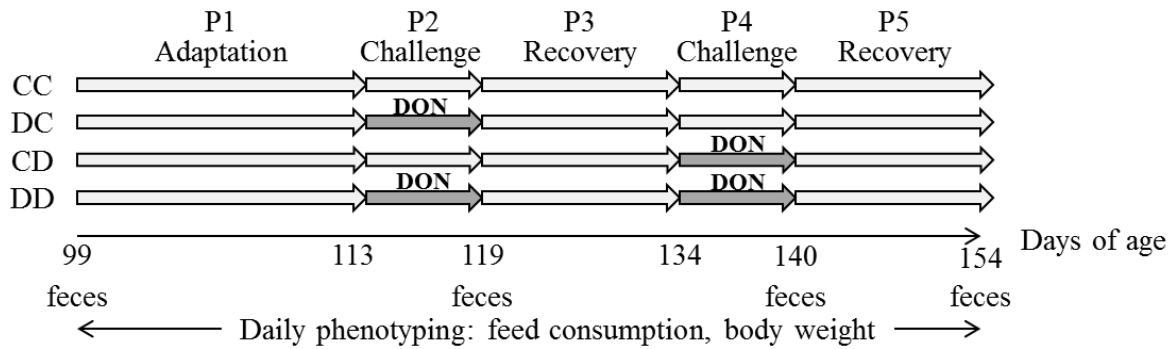


Figure III-16 : Experimental design.

The pigs were given a control diet all over the experimental period except for DC, CD and DD groups fed a DON-contaminated (DON+) diet during P2, P4, and both P2 and P4, respectively.

3.3.2. Measurements

Every time a pig passed through the weighing machine, live body weight (BW) was recorded and daily averaged into the average daily BW. The automatic feeders were used to record the individual daily feed intake. Feces were collected only on females at 99, 119, 140 and 154 days of age. Every fecal sample was taken directly on the rectum, immediately stored in barcode tubes and snap-frozen within 10 minutes following the sampling in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until DNA extraction.

3.3.3. DNA sequencing

DNA extraction was performed from 50 mg of faeces sample. The bead beating lysis and DNA purification using the ZR-96 Soil Microbe DNA kit (Zymo Research, Irvine, CA) were realized according to the manufacturer instructions (Frese et al., 2015). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified through PCR using F460 and R460 primers (F460: CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, R460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) and 30 cycles of PCR with an annealing temperature of 65°C. After sequencing on Illumina MiSeq platform, the 2x250 bp paired-end sequences were cleaned internally for length, homopolymers and undetermined nucleotides. Sequencing and sequences cleaning have been performed in the GeT-PlaGE platform (Toulouse, France).

Chimeras were removed from the sequences using VSEARCH (Rognes et al., 2016). The resulting sequences were clustered de novo into operational taxonomic units (OTU) with a threshold of 0.97 similarity and the abundance of each OTU in each sample was recorded. The taxonomic assignment of each OTU was performed based on SILVA database using Usearch (9.2.64_i86linux32 version). PICRUST pipeline was used to categorize KEGG (Kyoto encyclopaedia of genes and genomes) orthologues resulting from 16S rRNA sequencing data into biological pathways.

3.3.4. Calculations and statistical analysis

Statistical analyses were run under R 3.5.1. (R Core Team, 2018). The microbiota diversity was assessed based on the number of OTU and Shannon index using the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). The structure of the bacterial community was analysed based on the calculation of a Bray-Curtis distance matrix. The homogeneity of the dispersion within each group has been checked using a multivariate analogue of Levene's test for homogeneity of variances. A pairwise MANOVA was applied on the distance matrix to compare CC to treatment groups at 99, 119, 140 and 154 days. The groups' bacterial community difference was significant for adjusted false discovery rate (P_{FDR}) using Benjamini-Hochberg method under 0.05 after 999 permutations. In a second step, the impacts of DON challenges on microbiota composition at family and genus level were evaluated using non-parametric Wilcoxon test by comparing the relative abundance of control and challenged groups within each stage (i.e. 99, 119, 140 and 154 days). Finally, the OTU relative abundance between challenged and control pigs was compared based on generalized linear models (GLM) from edgeR package (Robinson et al., 2010). This method included a replicate effect within each treatment. The GLM analyses were realized in a two by two comparison between CC group and each experimental group within each stage: at 99 days to evaluate the difference prior to the challenges, at 119 and 140 days to evaluate the short-term effect of DON on microbiota composition, and at 154 days of age to evaluate the long-term effect of DON. An OTU was considered significantly differentially abundant when the GLM analysis resulted in a P_{FDR} below 0.05.

In order to extract the biological functions that best discriminated the pigs receiving the DON-enriched diet from the controls at both 119 and 140 days of age, a multivariate integrative sparse partial least square discriminant analysis (MINT sPLS-DA) was used (Lê

Cao et al., 2011). This allows aggregating the functions even if they are carried by different microbial species. Using microbiota information collected at 119 and 140 days as two different datasets, this analysis was applied on the pathways abundance tables, previously normalized using total sum scaling and centered log ratio transformation. The error-rates of the resulting model were validated through 10 repetitions of a 10-fold cross-validation.

The average daily gain (ADG), the average daily feed intake (ADFI) and the feed efficiency ($FE = ADG/ADFI$) were averaged during the DON challenge (between 113 and 119 days of age) and corrected for the replicate effect and the initial body weight at 99 days of age using a linear model. The relation between the performance traits was analysed via Pearson correlations and the correlations were considered significant for PFDR below 0.05. A correlation analysis between the animals' performances (ADG, ADFI and FE) and the relative abundance of the biological pathways of the microbiota was performed using a regularized canonical correlation analysis (rCCA). To determine a significant threshold for the correlation of each pair performance-pathway, the matrix of the relative abundance of the pathways was randomized by pathway. The rCCA was then applied between the pathways and the performances and each correlation by pair was kept. This randomization followed by rCCA was repeated 100 times. For each pair, the threshold for a significant positive correlation was the maximum correlation obtained during the 100 randomizations, and the threshold for a significant negative correlation was the minimum correlation obtained during the 100 randomizations.

3.4. Results

3.4.1. Animal performance

The impact of the DON challenge on all animal's performances has been previously published (Serviento et al., 2018). In this article, we focused on the performance of females because microbiota data has been collected only on these animals. In our experiment, pigs' BW was 54.2 ± 5.0 kg at 99 days of age, and 106.3 ± 10.0 kg at 154 days. Briefly, when exposed to a DON challenge, the ADFI was significantly reduced (on average 1.74 compared to 2.39 kg/d between 113 and 119 days, and 2.17 compared to 2.91 kg/d between 134 and 140 days; $P < 0.001$). However, no difference in ADG between the challenged and the controls pigs over the whole period was observed (on average 0.94 kg/d compared to 0.98 kg/d in CC;

$P > 0.05$). The FE has been degraded during the DON challenge periods (on average 0.29 compared to 0.44 between 113 and 119 days, and 0.29 compared to 0.40 between 134 and 140 days; $P < 0.05$). However, no difference of FE between controls and treatment groups has been observed during recovery periods (i.e. on average 0.39 vs 0.41, respectively, from 119 to 134 days of age, 0.34 and 0.37, respectively, from 140 to 154 days of age; $P > 0.05$).

3.4.2. Microbiota composition

A total of 277 faecal samples were collected on 74 female pigs. Six females were removed from the experiment due to health trouble or due to their non-adaptation to the sorter machine or the automatic feeders. For some female pigs, we did not succeed in collecting faecal samples. The number of sequences in all these samples ranged from 15 924 to 76 582 sequences with an average value of $29\,482 \pm 11\,282$ sequences. No sample was discarded due to its low number of sequences. After filtration for the rare OTU ($< 0.01\%$ of the total number of sequences in the dataset), 1 556 OTU remained in the dataset.

At 99 days of age, the average richness of the faecal samples was $3\,649 \text{ OTU} \pm 364$. The Shannon diversity index was equal to 7.13 ± 0.16 . From Wilcoxon tests applied on richness and Shannon indexes between control and DON challenged pigs at 119 or at 140 days of age, the DON exposure did not impacted the microbial diversity ($P > 0.05$). *Firmicutes* was the most represented phylum (80.10% relative abundance). *Bacteroidetes* represented 15.37% of the affiliated sequences. *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Spirochaetes* were represented by 0.69, 0.49 and 0.18% of the affiliated sequences. *Tenericutes* and *Fibrobacteres* represented less than 0.01% of the sequences. The remaining sequences were unclassified.

According to the MANOVA, no difference of the microbiota composition was observed between treatment groups ($P_{\text{FDR}} > 0.52$) at the beginning of the trial (99 days) (Figure III-17 and Table III-6). At the end of the first DON challenge period, the microbiota composition of the challenged pigs tended to differ from the control's microbiota composition ($P = 0.07$). At the end of the second DON challenge period, the microbiota composition of the challenged pigs significantly differed from the control's microbiota composition ($P = 0.01$). No difference between DC and DD groups was observed at 119 days after one-week DON challenge ($P_{\text{FDR}} = 0.61$), and no difference between CD and DD was observed at 140 days after one-week DON challenge ($P_{\text{FDR}} = 0.43$). After a two-week recovery time, at 154 days,

no difference of the microbiota composition was observed between treatment groups ($P_{\text{FDR}} = 0.99$).

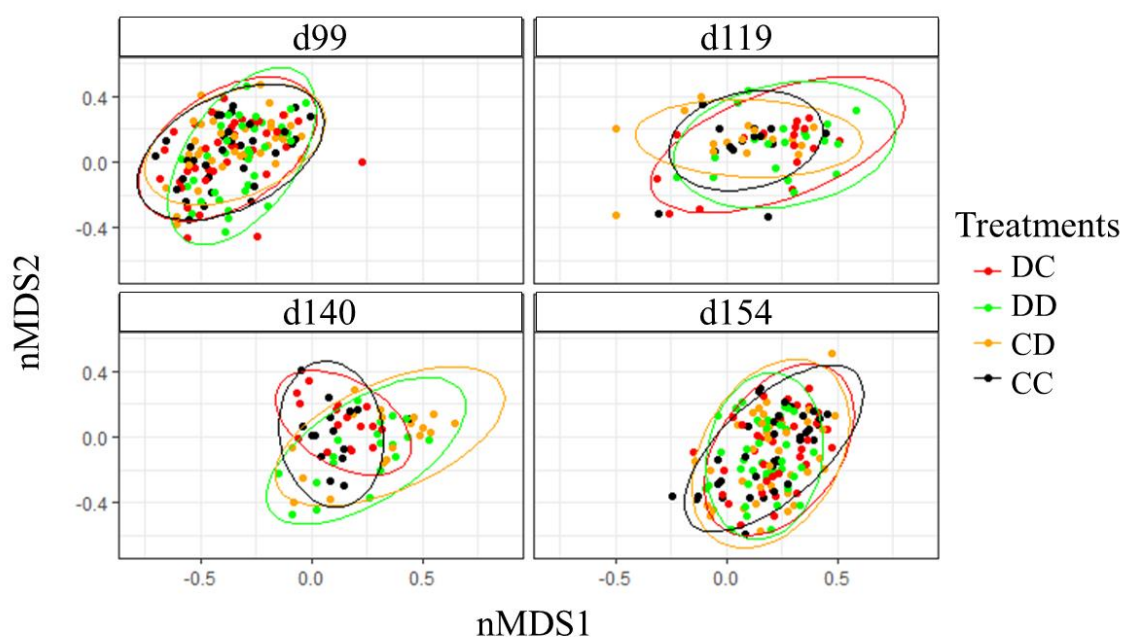


Figure III-17 : Bray-Curtis distance between treatment groups and controls at 99, 119, 140 and 154 days of age represented in a non-metric multidimensional scaling (nMDS).

The control group (CC) has been compared with treatment groups: group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days (DC), group fed a DON-contaminated diet between 134 and 140 days (CD), group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days and between 134 and 140 days (DD). The p-values are presented in Table III-6.

Table III-6 : Adjusted false discovery rate p-values (P_{FDR}) using Benjamini-Hochberg method resulting from 999 iterations of a pairwise MANOVA analysis between control (CC) and treatment groups exposed to a DON-contaminated diet.

Days of age	Nb. of pigs	P_{FDR}		
		DC vs. CC	CD vs. CC	DD vs. CC
d99	71	0.52	0.52	0.68
d119	66	0.07	0.82	0.07
d140	68	0.49	0.01	0.01
d154	72	0.99	0.99	0.99

Pigs in the treatment groups were fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days (DC), between 134 and 140 days (CD), and both between 113 and 119 days and between 134 and 140 days (DD).

From Wilcoxon tests on family abundances, eight families were impacted by the DON challenge (Table III-7). Compared to controls, DON exposure between 113 and 119 days decreased the relative abundance of *Ruminococcaceae* ($P < 0.05$), *Streptococcaceae* ($P < 0.001$), and *Veillonellaceae* ($P < 0.001$), and increased the relative abundance of *Erysipelotrichaceae* ($P < 0.001$), and *Peptostreptococcaceae* ($P < 0.05$). Between 134 and 140 days, DON exposure decreased the relative abundance of *Lachnospiraceae* ($P < 0.05$), *Prevotellaceae* ($P < 0.01$), *Ruminococcaceae* ($P < 0.01$), *Streptococcaceae* ($P < 0.001$), and *Veillonellaceae* ($P < 0.01$), and increased the relative abundance of *Desulfovibrionaceae* ($P < 0.01$), and *Erysipelotrichaceae* ($P < 0.05$). At a genus level, DON exposure between 113 and 119 days decreased the relative abundance of *Blautia* ($P < 0.05$), *Dialister* ($P < 0.001$), *Fusicatenibacter* ($P < 0.05$), *Mitsuokella* ($P < 0.001$), *Olsenella* ($P < 0.01$), *Ruminococcus* ($P < 0.05$), and *Streptococcus* ($P < 0.001$), and increased the abundance of *Clostridium IV* ($P < 0.01$), *Clostridium XI* ($P < 0.01$), *Sarcina* ($P < 0.05$), and *Turcibacter* ($P < 0.001$). From the Wilcoxon tests, the DON exposure between 134 and 140 days did not significantly affect the relative abundance of the genera.

Table III-7 : Relative abundance (%) of families and genera in fecal samples collected in the four different experimental groups¹ at 99, 119, 140 and 154 days of age.

Relative abundance (%)	d99		d119		d140			d154
	All ²	Ctrl ³	DON ³	p ⁴	Ctrl ⁵	DON ⁵	p ⁶	All ²
Nb. of pigs	71	31	35		34	37		72
Families								
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.05	0.05	0.08	0.11	0.07	0.10	<0.01	0.08
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.57	0.98	1.61	<0.001	1.23	1.90	<0.05	1.45
<i>Lachnospiraceae</i>	9.28	5.70	5.35	0.36	5.45	4.35	<0.05	4.24
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.04	0.14	0.19	<0.05	0.55	0.68	0.18	0.62
<i>Prevotellaceae</i>	7.41	5.97	5.02	0.21	5.49	2.74	<0.01	2.61
<i>Ruminococcaceae</i>	4.42	2.78	2.36	<0.05	2.53	1.76	<0.01	1.80
<i>Streptococcaceae</i>	13.76	9.86	5.29	<0.001	9.60	5.49	<0.001	9.21
<i>Veillonellaceae</i>	1.79	0.88	0.27	<0.001	0.36	0.13	<0.01	0.12
Genera								
<i>Bacteroides</i>	0.00	0.00	0.01	0.96	0.00	0.00	<0.05	0.05
<i>Blautia</i>	1.96	0.80	0.70	<0.05	0.54	0.62	0.74	0.51
<i>Clostridium IV</i>	0.02	0.04	0.06	<0.01	0.06	0.06	0.61	0.07
<i>Clostridium XI</i>	0.02	0.09	0.14	<0.01	0.57	0.55	0.92	0.57
<i>Dialister</i>	1.32	0.63	0.12	<0.001	0.14	0.16	0.73	0.08
<i>Fusicatenibacter</i>	0.37	0.21	0.14	<0.05	0.12	0.15	0.20	0.11
<i>Megasphaera</i>	0.02	0.00	0.00	<0.05	0.00	0.00	0.59	0.00
<i>Mitsuokella</i>	0.35	0.15	0.03	<0.001	0.03	0.02	0.32	0.01
<i>Olsenella</i>	0.47	0.12	0.03	<0.01	0.01	0.00	0.07	0.00
<i>Ruminococcus</i>	0.23	0.36	0.23	<0.05	0.37	0.34	0.59	0.31
<i>Sarcina</i>	0.19	0.21	0.56	<0.05	0.23	0.29	0.38	0.14
<i>Streptococcus</i>	13.76	9.86	5.29	<0.001	7.47	7.27	0.90	9.21
<i>Turicibacter</i>	0.45	0.90	1.55	<0.001	1.61	1.49	0.87	1.41

¹The treatments groups are: the CC group fed a control diet during the whole experiment, the DC group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days, the CD group fed a DON-contaminated diet between 134 and 140 days, and the DD group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days and between 134 and 140 days.

²All pigs were not DON challenged at 99 and 154 days of age.

³At 119 days of age, Ctrl referred to the pigs in the CC and CD groups, and DON referred to the pigs in the DC and DD groups.

⁴The p-value (p) resulted from a Wilcoxon test between Ctrl and DON challenged pigs at 119 days of age.

⁵At 140 days of age, Ctrl referred to the pigs in the CC and DC groups, and DON referred to the pigs in the CD and DD groups.

⁶The p-value (p) resulted from a Wilcoxon test between Ctrl and DON challenged pigs at 140 days of age.

In a GLM analysis, OTU abundance did not differ between CC and challenged pigs at 99 days of age (Figure III-18). At 119 days, 148 OTU differed between CC and DC, and six between CC and DD. At 140 days, 15 OTU differed between CC and CD, and 32 between CC and DD. In addition, two OTU on the 1,556 OTU in the dataset significantly differed between CD and DD groups at 140 days. After the recovery period, at 154 days, no OTU abundance differed between CC and challenged pigs. Among the differentially abundant OTU, none were systematically different after a DON challenge period.

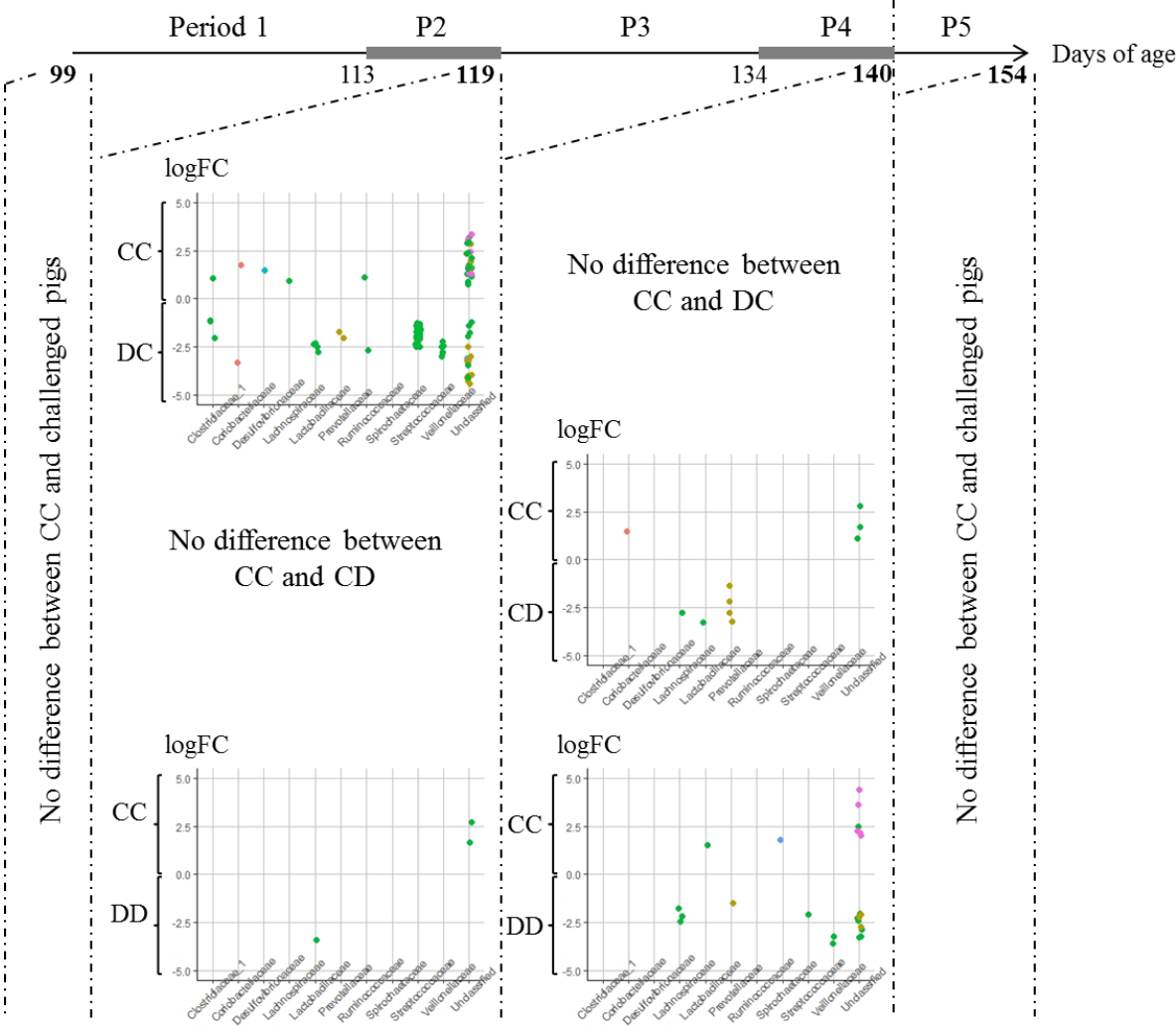


Figure III-18 : OTU differentially abundant between control group (CC) and treatment groups: group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days (DC), group fed a DON-contaminated diet between 134 and 140 days (CD), group fed a DON-contaminated diet between 113 and 119 days and between 134 and 140 days (DD).

Log2 fold changes (logFC) resulted from a 2x2 comparison using a generalized linear model analysis ($P_{FDR} < 0.05$).

Based on the pathways abundance, the MINT sPLS-DA discriminated the pigs receiving a DON-contaminated diet from the unchallenged control pigs using 27 pathways and 15% error-rate (Figure III-19). On the first component of the sPLS-DA and based on the loading values, the main contributors were ether lipid metabolism, amyotrophic lateral sclerosis ALS, ameobiasis, RIG I like receptor signaling pathway, and carbohydrate digestion and absorption pathways (Supplementary Table 1). On the second component, the main contributors were retinol metabolism, drug metabolism cytochrome P450, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides, and inositol phosphate metabolism pathways (Supplementary Table S1).

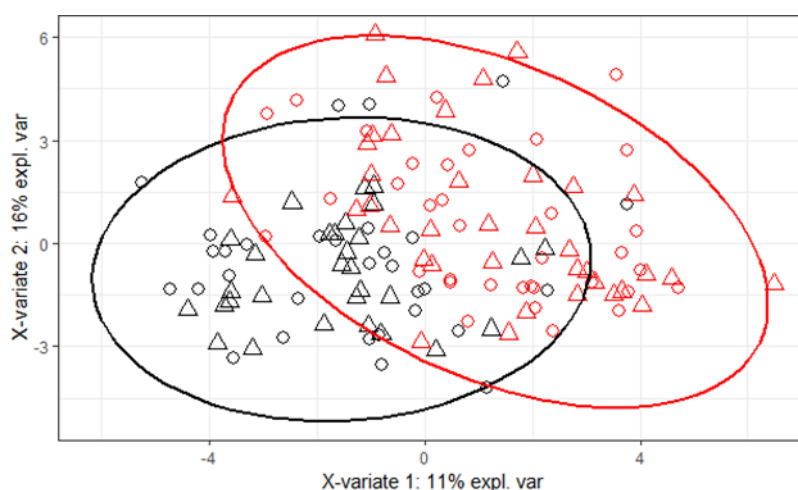


Figure III-19 : MINT sparse Partial Least Square Discriminant Analysis based on pathways abundance at 119 days (○) and 140 days (Δ).

Pigs receiving a DON-contaminated diet (in red) were discriminated from the control pigs (in black) with 27 pathways and 15% error-rate of misclassification.

3.4.3. Relationships between performance and microbial functionality

Mathematical relationships between performance traits and the relative abundance of microbiota were evaluated using correlations analysis. For the performance traits, the ADG was correlated positively with ADFI in P2 (from 113 to 119 days of age) in control conditions ($r = 0.63$, $P < 0.001$) and in challenged conditions ($r = 0.49$, $P < 0.05$), and in P4 (from 134 to

140 days of age) in control conditions ($r = 0.46$, $P < 0.01$) and in challenged conditions ($r = 0.68$, $P < 0.001$).

Based on the rCCA, correlation coefficients between performances traits measured in control or challenged pigs in P2 and P4 and the relative abundances of microbiota pathways depended both on the traits and the period. Microbiota pathways were poorly correlated with ADG and FE in control and in challenged groups (Table III-8). When compared to the P2, few correlations were found significant in P4. In P2, ADFI was correlated with 11 pathways in challenged groups but no significant correlation was calculated for the control group (Table III-8). These 11 pathways corresponded to functions related to environmental information processing, organismal system, human diseases and metabolism (terpenoids and polyketides metabolism, carbohydrate and glycan metabolism, and xenobiotics biodegradation and metabolism). No significant correlation with ADFI was found in P4 during the second challenge. The ADG and the FE were not correlated to the relative abundance of pathways during challenged periods. The FE in control pigs was correlated with two pathways during P2 but neither ADFI nor ADG showed significant correlations. However, in control conditions during P4, the ADFI was correlation with three pathways and the ADG with one pathway. No pathway was correlated to any performance in both control and challenged conditions (Table III-8).

Table III-8 : Regularized canonical correlations (rCCA)¹ between functional pathways relative abundance and the average daily feed intake (ADFI)², the average daily gain (ADG) and the feed efficiency (FE) of pigs.

Function level A	Function level B	Pathway	ADFI				ADG				FE				
			Control ³		Challenged ⁴		Control		Challenged		Control		Challenged		
			P2 ⁵	P4 ⁶	P2	P4	P2	P4	P2	P4	P2	P4	P2	P4	
Environmental information processing	Membrane transport	Secretion system	-	-	-0.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Organismal system	Circulatory system	Cardiac muscle contraction	-	-	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human diseases	Cancers	Bladder cancer	-	-	-0.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Immune diseases	Primary immunodeficiency	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47	-	-	-	
Metabolism	Neurodegenerative diseases	Huntington's disease	-	-	-0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Carbohydrate metabolism	Butanoate metabolism	-	-	-0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Glycan biosynthesis and metabolism	Other glycan degradation	-	-	0.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Glycosaminoglycan degradation	-	-	-	-	-	0.46	-	-	-	-	-	-
	Lipid metabolism	Linoleic acid metabolism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Primary bile acid biosynthesis	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Metabolism of other amino acids	Phosphonate and phosphinate metabolism	-	-	-0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Metabolism of terpenoids and polyketides	Limone and pinene degradation	-	-	-0.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Benzoate degradation	-	-	-0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tetracycline degradation	-	-	-0.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Ethylbenzene degradation	-	-	-0.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Xenobiotics biodegradation and metabolism	Bisphenol degradation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Toluene degradation	-	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

¹To determine a significant threshold to each pair performance-pathway, the matrix of the relative abundance of the pathways was randomized by pathway. A rCCA was then applied and each correlation by pair was kept. This randomization followed by rCCA was repeated 1,000 times. For each pair, the thresholds for a significant positive or negative correlation were the maximum or minimum correlation obtained during the 1,000 randomizations, respectively.

²The performances (ADFI, ADG and FE) were averaged during the DON challenge periods (P2 and P4) and corrected for the replicate effect and the initial body weight at 99 days of age using a linear model.

³Pathways significantly correlated to performance (ADFI, ADG and FE) in control pigs but not in DON challenged pigs.

⁴Pathways significantly correlated to performance (ADFI, ADG and FE) in DON challenged pigs but not in control pigs.

⁵In P2 (between 113 and 119 days of age), the control pigs belong to the CC and CD experimental groups, and the challenged pigs belonged to the DC and DD groups. The performances were correlated with the microbial data at 119 days of age.

3.5. Discussion

This study aimed at investigating the impact of mycotoxin on pig fecal microbiota and its relationships with pig's performance. Because the impact of DON challenges on pigs' performance have already been detailed (Serviento et al., 2018), the present discussion will focus mainly on the effects of DON challenge on gut microbiota and its relationship with animal performance.

Whatever the age of exposure to DON, the relative abundance of *Streptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, and *Veillonellaceae* were decreased and the relative abundance of *Erysipelotrichaceae* was increased. These families seemed to be systematically impacted by a DON challenge. In contrast, Reddy et al. (2018a) did not observe any difference for these families in nine weeks old castrated pigs submitted to a 4-weeks DON challenge. This discrepancy with the present study could be related to the difference in the gender type (castrated males vs. females) and/or the age of the pigs (9 weeks vs. 17 weeks old). In the present study, at a more precise level than families, the OTU or genera impacted by a DON challenge at 119 days of age differed from those impacted at 140 days. This confirmed that the effects of acute DON ingestion on microbiota composition are time-dependent.

The present study was designed to evaluate the effect of repeated DON challenged on microbiota composition. According to our results, the relative abundance of only two OTU differed between the CD and the DD groups at 140 days of age. This result was confirmed by the MANOVA analysis and suggests that no habituation mechanisms was observed in microbiota composition when pigs were twice challenged. Accordingly and based on the ADG and ADFI measurements, pigs with a previous DON challenge experience had similar performance than those challenged only at the end of the finishing period (2018). However, using high DON concentration (> 5 mg/kg BW), a higher feed intake can be observed in twice challenged mice suggesting a dose-dependent effect of the DON on the host response and habituation (Flannery et al., 2011).

In contrast with the effects of a chronic ingestion of DON (Robert et al., 2017), our result clearly indicates that an acute exposure to a DON contaminated diet has no detrimental consequences on overall pig performance. Based on the daily feed intake patterns, pigs adapted to the DON challenge within three days (Serviento et al., 2018). Similarly, a full performance recovery was observed in pigs after one week of feeding with a naturally

contaminated diet (2.8 mg/kg) by Waché et al. (2008). According to these later authors, no difference in microbiota composition between controls and challenged pigs one week after the beginning of the challenge. Based on our results, the number of OTU that differed between control and challenged groups at 119 or 140 days of age varied from six to 148 on a total of 1 556 OTU available in the dataset. This clearly suggests that microbiota composition also showed moderate changes after a 7-days period of DON exposure. From these results, we hypothesize that seven days was too long to observe the greatest modifications in both host's phenotype and its microbiota composition. Unfortunately, data of the present study do not allow us to verify this hypothesis. Further measurements are required for looking at the kinetic of microbiota composition immediately after the beginning of an acute ingestion of DON in swine.

The moderate changes in fecal microbiota composition observed in our study came in accordance with previous studies where a moderate to absent modification of the fecal microbiota composition was observed in case of chronic DON exposition in pigs (Waché et al., 2008) or in rodents (Saint-Cyr et al., 2013; Payros et al., 2017). This could be partially explained by the reduced contact between the mycotoxin and the fecal microbiota. Indeed, before arriving in contact with the caecal microbiota, most of the DON has already been absorbed by the intestine. In pigs, depending on the level of contamination, between 45 and 95% of the ingested DON ends in the urine without being transformed by the microbiota (Prelusky et al., 1988; Eriksen et al., 2003; Dänicke et al., 2004; Nagl et al., 2014). In other words 5 to 55% of the DON ingested is susceptible to be detoxified by the microbiota in the gut.

As previously explained, the relative bacterial abundance was moderately impacted at the end of DON challenges. However, these differences were no longer present two weeks after the end of the challenge. This clearly indicates that short-term DON exposure had a short and transient impact on microbiota composition in pigs. The lack of long-term effect of DON contamination could be partially explained by the rapid elimination of the DON in pigs. In fact, half of the ingested DON is excreted via the urine within 5.8 h (Dänicke et al., 2004) and fully eliminated within 24 h (Prelusky et al., 1988).

The biomarkers of a DON exposure extracted from the sPLS-DA differed from those significantly correlated with the performances. This lack of common pathways highlights the

limits of the functional interpretation of the biomarkers in a discriminant analysis. The information used for the discrimination does not always imply a biological signification and interest and need to be interpreted with caution and restraint. Nevertheless, on a short-term basis, changes in the relative OTU abundance due to DON ingestion were connected to a marginal increase in biological functions related to drug and xenobiotics metabolism via cytochrome P450 (pathways used in the discriminant analysis in our study). This function aims at restoring gut health by degrading toxic components as the xenobiotic mycotoxin (Sobrova et al., 2010; Wilson and Nicholson, 2017). Among the bacteria impacted by a DON challenge in our study, the *Clostridiales* (among them some strains of *Clostridium*) observed in chickens possess the capacity to de-epoxify up to 100% of DON into a much less toxic form: DOM-1 (Yu et al., 2010). This ability of the microbiota to detoxify DON was previously observed in chicken (Yu et al., 2010; Pierron et al., 2016), human (Gratz et al., 2013), and pigs (Eriksen et al., 2002; Gratz et al., 2018). These results confirm that the microbiota seems to play a key role in the detoxification of the mycotoxin. In livestock species, growing evidence exists of a connection between microbiota composition and host performance. However, it is unclear if the change in the functionality of the gut microbiota is the cause or the consequence of the host's performance variations.

As previously explained, microbiota could help the host to maintain a good health when exposed to DON with subsequent positive effects on performance. Most of the microbial functions seemed to be significantly correlated to the ADFI only under challenged conditions compared to control conditions. We hypothesize that the DON challenge exacerbated the differences between the pigs, and in these challenged conditions, significant correlations between the performance and the microbial functions can be highlighted. Particularly, one can be hypothesized that changes in animal performance especially in feeding level due to DON ingestion would also affect the gut microbiota composition. In the present study, one microbiota functional pathway related to the xenobiotic biodegradation and metabolism and three pathways related to the metabolism of terpenoids and polyketides [from which the mycotoxins originated (Huffman et al., 2010)] were found to be negatively correlated to the ADFI measured during the 7-days challenge at 113 days of age. This result suggests that the pigs with reduced voluntary feed intake due to the DON challenge had increased abundances of these microbial functions. In other words, some variations in the functionality of the gut

microbiota are probably indirectly related to the effect of DON on voluntary feed intake rather than directly related to the impact of DON on the microbiota composition.

In addition, two pathways related to human diseases were significantly correlated to the host ADFI under DON challenged conditions. Even if the meaning of these pathways for pigs is questionable, we assume that these modifications are related to the perturbation of the health status of the host exposed to a DON-contaminated diet. Indeed, several impacts of a chronic ingestion of DON on the health status of the host was observed in human and pigs: intestinal pathologies, intestinal barrier function disturbance, and immune response modulation (Pinton and Oswald, 2014; Robert et al., 2017). Particularly in pigs, a 4-weeks chronic DON exposure to 8 mg DON/kg in the feed altered the immune response and resulted in a decrease in ADFI and BW (Reddy et al., 2018b). The extra cost related to inflammation response reduced the amount of energy available for growth. According to Campos et al. (2014), maintenance requirements increase by about 10% when pigs have to fight against an inflammation caused by lipopolysaccharides. Thus, in challenged conditions, the microbial activity might be redirected so that part of the ingested feed is used to improve the immunity functions at the expense of the growth.

3.6. Conclusion

Single or repeated short-term DON challenges resulted in transient modifications of the fecal microbiota composition and microbial biological functions related to mycotoxin detoxification. The long-term evolution of microbiota composition was not impacted. Functions related to metabolism and health status were correlated with the ADFI when the pigs were exposed to a DON challenge assuming a possible role of the microbiote in helping its host to cope with the mycotoxin perturbation.

3.7. Supporting information³

Supplementary Table 1. Functional pathways significantly correlated with ADFI, ADG, and FE under control and DON challenged conditions in a regularized canonical correlation analysis.

³ Le tableau supplémentaire sera disponible dans la version en ligne de l'article.

3.8. Acknowledgements

The authors thank B. Duteil, P. Roger, N. Muller, J. Delamarre and H. Demay from the UEPR and A.-M. Serviento from UMR PEGASE, INRA, 35590 Saint-Gilles, France for animal care and sample collection and C. Barilly from UMR GenPhySE, INRA, 31320 Castanet-Tolosan, France for lab analysis.

3.9. References

Cf. liste des références à la fin du manuscrit.

4. Article 4, comparaison de méthodes de régression statistique pour prédire un phénotype à partir de l'information du microbiote

Présentation de l'étude : L'un des objectifs principaux de la thèse est d'utiliser le microbiote comme prédicteur d'un phénotype d'intérêt quantitatif en relation avec l'EA chez le porc. Les données générées dans les trois études de cette thèse ont été utilisées pour implémenter des modèles de prédiction de la digestibilité de l'énergie ou de l'azote, de l'EA et des performances de croissance à partir du microbiote fécal. Dans les conditions expérimentales testées, constat est fait qu'il est impossible de prédire correctement ces phénotypes avec le microbiote. Deux hypothèses sont soulevées pour expliquer cette incapacité à prédire un phénotype à partir des données microbiennes : 1/ les méthodes mathématiques utilisées dans les analyses ne sont pas adaptées aux données du microbiote ou 2/ l'information contenue dans les jeux de données ne permet pas de prédire les phénotypes d'intérêts étudiés. Dans cette étude méthodologique, la première hypothèse est testée en modélisant des OTU dont la relation de covariance avec le phénotype d'intérêt est fixée arbitrairement et dont l'abondance relative varie. Deux méthodes de régression sont évaluées : régression des moindres carrés partiels (PLSR et sPLSR) et régression random forest (RF).

Cette étude se base sur le jeu de données issu du dispositif expérimental mycotoxine pour lequel l'EA de 147 porcs a été évaluée entre 99 et 113 jours d'âge. Le microbiote obtenu sur des échantillons de fèces prélevés à 99 jours d'âge est utilisé pour établir les modèles de prédiction. Dans ce travail, l'OTU la plus abondante a servi de référence pour générer des OTU fictives corrélées avec l'EA (coefficients de corrélation de Pearson compris entre 0 et 0,97) et variant entre 2,46% et 0,000246% d'abondance relative.

Principaux résultats : A partir du jeu de données réel, aucune des trois méthodes testées n'a permis d'établir un modèle de prédiction valide de l'EA. Un fort sur-apprentissage est présent dans le cas d'une PLSR ainsi que d'une sPLSR, bien que dans ce cas la sélection de variables permette de réduire ce phénomène.

La présence d'OTU fictives dans le jeu de données n'a pas permis d'améliorer les modèles de prédiction par PLSR. Cependant, la sPLSR et RF ont confirmé leur capacité à établir des modèles valides. Les performances de prédiction par sPLSR s'améliorent significativement lorsqu'une OTU corrélée au-delà de 0,39 est présente dans le jeu de données, et au-delà de 0,46 dans le cadre d'une RF.

Lorsque l'abondance relative de l'OTU fictive est inférieure à 0,00246%, après application d'un biais simulant le biais de séquençage, les corrélations avec l'EA sont inférieures à 0,33 et aucune méthode de régression ne permet d'établir des modèles valides.

Cette étude suggère que la meilleure stratégie pour prédire un phénotype quantitatif à partir de données de microbiote est :

- d'utiliser la sPLSR pour construire le modèle de prédiction ;
- valide seulement dans le cas où une corrélation supérieure à 0,39 entre au moins une OTU et le phénotype d'intérêt est observée ;
- et que cette OTU représente au minimum 0,02% des séquences du jeu de données.

TECHNICAL NOTE: Comparison of statistical regression methods to predict a phenotype using microbiota information

Short title: Pig microbiota and phenotype prediction

Le Sciellour Mathilde¹, Dejean Sébastien², Renaudeau David^{1*}, Zemb Olivier^{3*}

¹UMR 1348 PEGASE, Agrocampus-Ouest, INRA, Saint-Gilles, France, F-35590

²Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR 5219, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse Cedex 9, France, F-31062

³UMR 1388 GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France, F-31320

*Corresponding author: olivier.zemb@inra.fr

Citation : Le Sciellour, M., S. Dejean, D. Renaudeau, and O. Zemb. TECHNICAL NOTE: Comparison of statistical regression methods to predict a phenotype using microbiota information. (A soumettre)

Cet article s'inscrit dans le cadre du projet européen Feed-a-Gene Project, financé par le programme H2020 de l'Union Européenne sous le numéro d'agrément 633531.

Cet article a été soumis dans JAS.

4.1. Abstract

The present study aimed at investigating the ability of partial least square regression (PLSR), sparse PLSR (sPLSR) and random forest regression (RF) to predict a quantitative phenotype using sequencing data from the V3V4 regions of the 16S rRNA gene. Fecal samples from 147 Pietrain x (Large White x Landrace) pigs at 99 d of age were used to build the prediction models of feed efficiency (FE) between 99 and 113 d. Using this dataset, regression models were constructed using PLSR, sPLSR or RF with random partitioning for calibration and validation subsets. The prediction performance was very low ($R^2 = 0$). Overfitting was observed in PLSR and sPLSR but not in RF. To estimate the sensitivity of each regression method, we added an artificial operational taxonomic units (OTU) *in silico* with a known correlation with FE. We then simulated the randomness of the sequencing draw from that complemented sample and applied PLSR, sPLSR or RF. The PLSR still failed the validation test but sPLSR and RF passed. The presence of OTU correlated above 0.39 and 0.46 improved the sPLSR and RF predictions, respectively. The relevant OTU could be identified correctly. It should be noted that the observed correlation after the simulation of the sequencing reaction were decreased especially for the rare OTU. Based on similar dataset with artificial OTU, the sPLSR performed better compared to RF. Since no OTU were correlated above 0.30 with FE in the real dataset, the power of the three methods was not enough to extract useful information from the microbiota to predict the phenotype. Similarly for artificial OTU under 0.002% relative abundance, the observed correlation with FE was not enough to build valid prediction models. These results suggest that the best strategy to predict quantitative phenotype using microbiota information is to run sPLSR only if a correlation higher than 0.4 is observed between the OTU abundance and the phenotype.

Key words: feed efficiency, microbiota, partial least square regression, performance, random forest

4.2. Introduction

Sequencing the 16S rRNA gene is the most commonly used method to study complex microbial communities. Sequences of the hypervariable regions of the 16S rRNA gene can be clustered into operational taxonomic units (OTU), and associated to taxonomic information. The microbiota composition reveals a high diversity between the pigs and is highly variable according to environmental conditions (Schokker et al., 2014). Numerous ongoing projects

aim at connecting the observed variability in microbiota composition to phenotypes. The fecal microbiota may offer a non-invasive, attractive alternative as biomarker to replace the time-consuming phenotypic measurements. Microbiota data include a large number of collinear and zero-inflated variables. The large number of variables could lead to over-fitting in predictive models. The capacity of the methods to deal with microbiota information is poorly documented. Previous studies used PLSR to discriminate groups from 16S rRNA data (Barker and Rayens, 2003; Sobhonslidsuk et al., 2018) but none of them applied PLSR to predict a quantitative phenotype. The ability of the microbiota to predict animals' phenotype with accuracy remains to be developed. This article compared prediction models applied on an existing dataset associating 16S rRNA gene sequences of fecal samples and feed efficiency (FE) from pigs (Serviento et al., 2018). This initial dataset has been supplemented *in silico* with artificial OTU whose abundance covaries with the animal's phenotype. These artificial OTU helped to determine the characteristics of the OTU that are required for a good prediction of a phenotype of interest. Three regression methods were tested to predict the animals' FE between 99 and 113 d from microbiota data obtained at 99d of age: partial least square regression (PLSR) (Wold et al., 2001), PLSR with a variable selection step (sPLSR) (Lê Cao et al., 2008), and random forest regression (RF) (Breiman, 2001).

4.3. Material and methods

The present study was conducted in accordance with the French legislation on animal experimentation. The experiment was approved by the Regional Ethical Committee (authorization: 2016022415253973).

4.3.1. Description of the experimental dataset

The experimental database has been described in detail previously (Serviento et al., 2018). It contains animal performance and microbiota data obtained in a total of 147 Pietrain x (Large White x Landrace) pigs raised in two successive replicates at the experimental facilities of INRA Unité Experimentale Porc de Rennes (Saint Gilles, France). Females and castrated males were equally represented within replicates and fed a standard commercial feed. The average daily feed intake (ADFI), live body weight gain (ADG) and feed efficiency ($FE = ADG/ADFI$) were available for 147 pigs from 99 to 113 d of age. Further analysis focused on the FE from the pigs, which were considered as the Y response vector.

Fecal samples were collected directly from the rectum at 99 d of age. DNA extraction was performed using the ZR-96 Soil Microbe DNA kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer instructions (Frese et al., 2015). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using F460 and R460 primers (F460: CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, R460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) and 30 cycles of PCR with an annealing temperature of 65°C. The sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform. Sequences cleaning for length, homopolymers and undertermined nucleotides was realized in the GeT-PlaGE platform (Toulouse, France). Using VSEARCH (Rognes et al., 2016), the resulting sequences were clustered into *de novo* OTU with a threshold of 0.97 similarity and the abundance of each OTU in each sample was recorded. To be able to compare every statistical method without differences in sequencing depth, we rarefied each sample to 15,752 sequences. The OTU whose abundance was lower than 0.01% were discarded. The resulting dataset constituted a X matrix of 1,562 predictors and 147 samples.

In order to evaluate the ability of the method to predict FE if relevant OTU are present, artificial OTU were added. Each artificial OTU was built from a real OTU (2.46% relative abundance in the dataset) in the X matrix to mimic a realistic species abundance distribution. The abundance values of the real OTU were re-organized to fit a specific Pearson correlation with Y ranging from 0 to 0.97 (Figure III-20). Briefly, a fictive dataset fitting the required covariance and the same number of samples was build. The rank of each fictive value was kept and used to sort the OTU abundance accordingly. A total of 11 reorganized OTU, characterized by their correlation with the phenotype, were created this way. The abundance of each of these reorganized OTU was divided by 1, 10, 100, 1,000, and 10,000 to mimic increasingly rare OTU (OTU^{dominant} , $OTU^{\text{subdominant}}$, OTU^{common} , $OTU^{\text{infrequent}}$, OTU^{rare} , respectively) (Figure III-21). This resulted in 55 reorganized OTU. We then replaced each abundance value of the 55 reorganized OTU by a binomial draw with the following parameters: number of draw set to one, sample size equal the total number of sequences in the dataset (i.e. 15,752), proportion equal the abundance to replace divided by 15,752. This resulted in 55 reorganized and biased OTU. These OTU will be added in the datasets, each dataset containing the 1,562 real OTU and one artificial OTU.

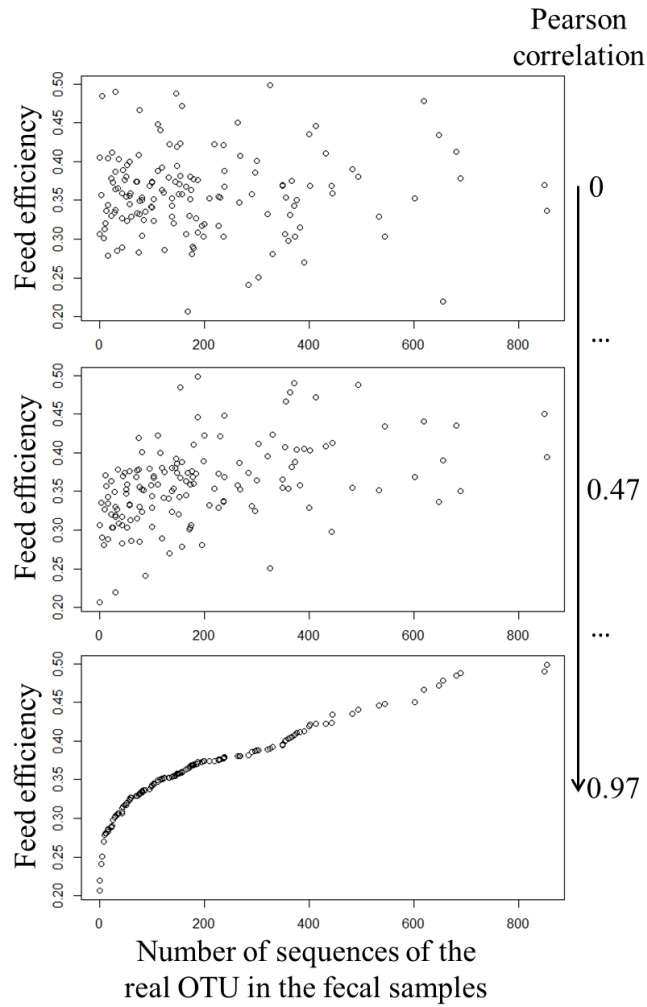


Figure III-20 : Plots of the correlations between the abundance of the artificial OTU built from the observed OTU in the fecal samples and feed efficiency of the pigs associated to the fecal samples.

The abundance of the observed OTU has been re-organized across samples to fit a determined Pearson correlation with feed efficiency ranging from 0 to 0.97.

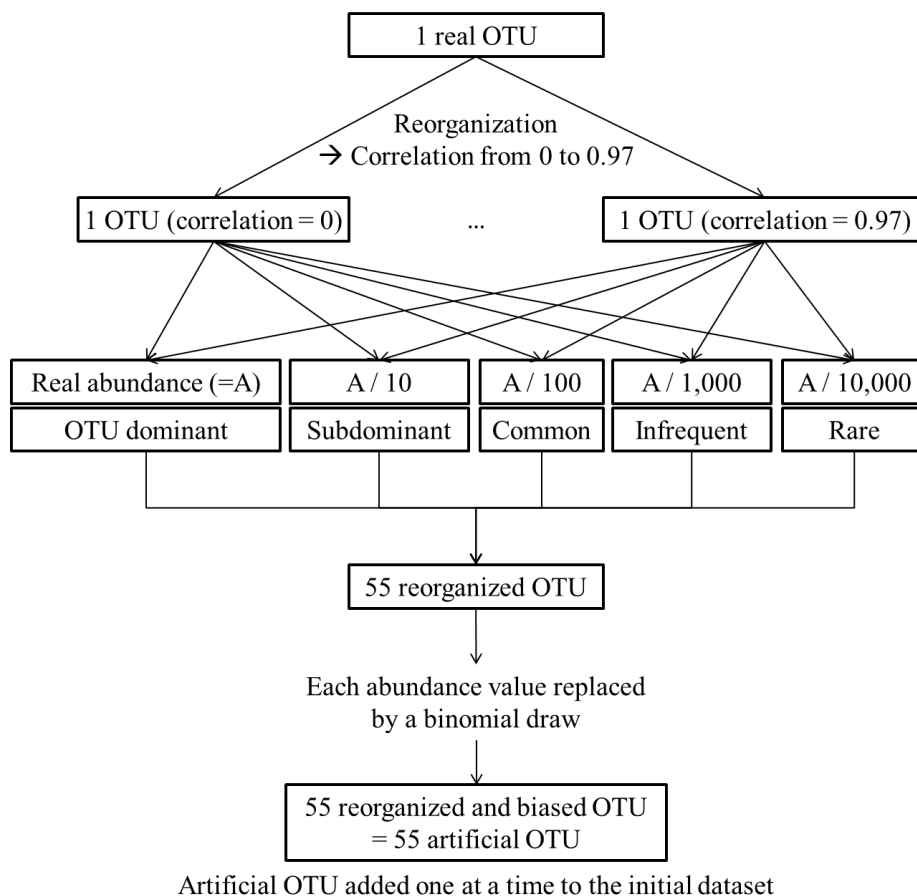


Figure III-21 : Pipeline of artificial OTU building from an observed OTU to artificially reorganized and biased OTU.

The pipeline was based on a real OTU corresponding to the most abundant OTU in the dataset (2.46% relative abundance).

4.3.2. Statistical analysis

Statistical analyses were run under R 3.5.1. (R Core Team, 2018). To predict phenotypes using microbiota information, we applied PLSR (Wold et al., 2001). This method is a multivariate analysis which can handle many noisy and collinear variables in the matrix of predictors (X matrix). The PLSR can establish regression models for several response variables. To be able to compare different regression methods, we chose to focus on only one response variable (vector Y) corresponding to the pig's FE to explain. In a PLSR, X is decomposed into latent variables (t_h , with h ranging from 1 to the number of variables in X) such that the covariance between t_h and Y is maximized. These latent variables are linear combination of the initial variables, and define the PLSR components. The matrix X is also

decomposed into loading vectors that directly indicate how the pairs of X_j and Y explain the relationships between X and Y .

MixOmics package v.6.6.1 in R (Rohart et al., 2017) was used to perform PLSR on the OTU table previously normalized via centered log ratio (CLR) transformation. The first step of the PLSR consists on choosing the number of components to include in the model. In our case, we choose to test from one to 10 components. Above 10, the biological interpretation would have been difficult. Each number of components was tested and the resulting Q^2 from 10-fold cross-validation were recorded. The Q^2 is a statistical measure of the goodness of prediction and components with Q^2 greater than or equal to 0.0975 participates to the improvement of the model and should be included in the model (Tenenhaus, 1998). Loading vectors of the PLSR can be directly interpreted as a measure of the relative importance of the variables in the model.

To select the most informative OTU, a LASSO penalization was applied on the loading vectors. The minimal number of OTU to select on each component was set to five. Simultaneously to the variable selection, PLSR was performed which resulted into a sPLSR (Lê Cao et al., 2008). The predictive power of sPLSR vs PLSR were evaluated via the mean squared error prediction criterion (MSEP) using 10-fold cross-validation. A lower MSEP from sPLSR compared to PLSR indicates that the selected variables are a good linear combination of predictors and results in an improved prediction.

Machine learning was also tested to predict phenotypes from microbiota composition using randomForest R package v4.6-14. The RF is a supervised learning algorithm which combines several decision trees to improve the prediction. In our case, the final model resulted from 1,000 trees. Each tree was built from a subset of randomly selected OTU and 519 variables were tested at each split. This random subset selection reduces the overfitting possibly due to noisy information among the OTU. The RF models are able to establish non-linear relations between X and Y which confer an advantage compared to PLSR. Another advantage of RF is the possibility of mixing qualitative variables and quantitative variables, and therefore to try to explain more variability in the data. In this nonlinear method, sex and replicates were included as qualitative variables in the X matrix. The importance of each variable can be extracted from the final model.

To test the prediction methods, we split the dataset into two subsets: the learning and the validation subsets. The learning subset was constituted with 70% of the samples randomly chosen. The remaining 30% of the samples constituted the validation subset. Models were built on the learning subset and applied on the validation subset. This procedure was repeated 100 times on 100 different randomly chosen learning and validation subsets. The evaluation of the models was performed by comparing observed and predicted performance in a linear regression in both learning and validation subsets. The resulting R-squared will be cited as learning R² and validation R² for learning and validation subsets, respectively.

4.4. Results

4.4.1. Experimental dataset

From 99 to 113 d of age, the pigs' ADG averaged 0.87 ± 0.17 kg/d and ranged from 0.41 to 1.37. The ADFI averaged 2.44 ± 0.45 kg/d and ranged from 1.50 to 3.70. The resulting FE averaged 0.36 ± 0.05 and ranged from 0.21 to 0.50.

A total of 147 fecal samples were collected. The number of sequences in the samples ranged from 15,752 to 80,731 sequences. After rarefaction to 15,752 and filtration of the OTU considered as rare (i.e. whose relative abundance was below 0.01% of the total sequences in the dataset), 1,562 OTU remained in the dataset. In the initial dataset, the highest Pearson correlation value between FE and one OTU was 0.29.

4.4.2. Models comparison on real data

In PLSR on real data, the learning R² averaged 0.66 but the validation R² was null (Figure III-22), revealing an over-fitting issue due to the high number of predictors compared to the number of samples. The variable selection performed by the sPLSR on real data to reduce the over-fitting did not improve the situation and the validation R² remained equal to zero (Figure III-22). Using RF to predict FE, both learning and validation R² were equal to zero (Figure III-22). In comparison with PLSR, by construction, over-fitting did not exist in RF models.

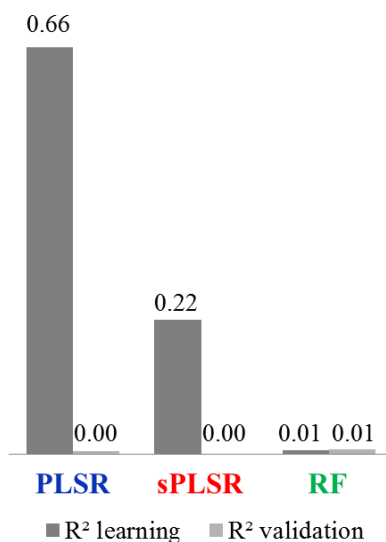


Figure III-22 : Learning and validation R² from partial least square regression (PLSR), sparse partial least square regression (sPLSR) and random forest regression (RF) applied on real dataset to prediction feed efficiency.

4.4.3. Models comparison including artificial OTU

We created 11 artificial OTU whose Pearson correlation coefficients with FE ranged from 0 to 0.97. Since we reorganized existing values of the most abundant OTU to create these artificial OTU, the species abundance distribution is realistic. After application of the binomial draw to simulate the sequencing reaction, correlations between the biased OTU_{subdominant}, OTU_{common}, OTU_{infrequent} and FE ranged from 0 to 0.91, 0 to 0.69, and 0 to 0.33, respectively (Table III-9). The correlation between the biased OTU_{rare} and FE was equal to zero.

Table III-9 : Observed correlations between artificial OTU and feed efficiency after simulating the randomness of sequencing draw (i.e. applying a binomial draw on reorganized OTU).

Artificial OTU	Relative abundance (%)	Correlation of the artificial OTU with feed efficiency										
		0.00	0.10	0.22	0.29	0.38	0.47	0.59	0.65	0.74	0.86	0.97
OTU _{dominant}	2.46	0.00	0.11	0.22	0.27	0.39	0.47	0.60	0.65	0.75	0.85	0.97
OTU _{subdominant}	0.246	0.00	0.08	0.17	0.32	0.33	0.48	0.57	0.64	0.72	0.80	0.91
OTU _{common}	0.0246	0.03	0.01	0.15	0.14	0.20	0.42	0.44	0.44	0.53	0.46	0.69
OTU _{infrequent}	0.00246	0.05	0.14	0.19	0.06	0.05	0.06	0.15	0.24	0.06	0.13	0.33
OTU _{rare}	0.000246	0.12	0.00	0.03	0.00	0.09	0.00	0.05	0.08	0.07	0.05	0.09

Whatever the artificial OTU included in the dataset, validation R^2 from PLSR models was equal to zero (Figure III-23). Even applied on dataset with highly correlated OTU, the PLSR failed to predict FE.

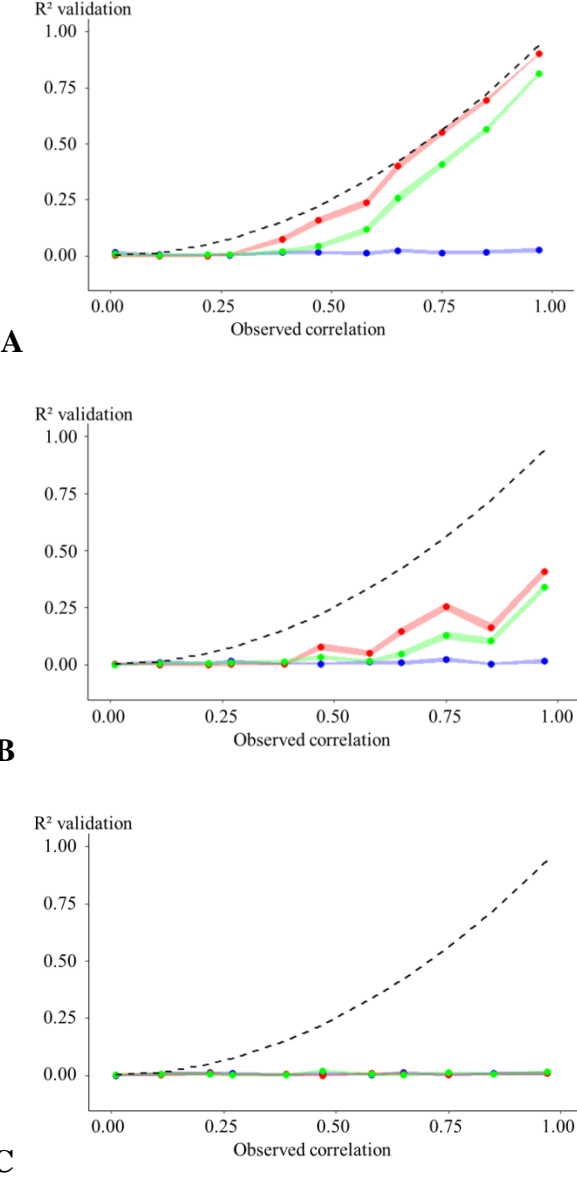


Figure III-23 : Evaluation of the partial least square regression (in blue), sparse partial least square regression (in red) and random forest regression without qualitative variables (in green) models using mean R^2 from the validation subset on 100 iterations.

The initial datasets contained real OTU and an additional artificial OTU; each artificial OTU was reorganized to fit a defined Pearson correlation with feed efficiency and biased using a binomial draw. Figures A, B and C correspond to three different abundances of artificial OTU: artificial OTU^{dominant}, OTU^{common}, and OTU^{infrequent}, respectively. X-axis represents the observed correlation between the reorganized OTU before applying a binomial draw and feed efficiency. The dashed line corresponds to the expected R^2 calculated from the observed correlation between the reorganized OTU and feed efficiency.

When applying sPLSR on datasets with observed Pearson correlations between artificial OTU^{dominant} (after biasing) and FE ranging from 0.00 to 0.27, and with a minimum of five OTU selected by components, the learning R^2 averaged 0.23 and the validation R^2 was null (Figure III-23). For artificial OTU correlated above 0.39 with FE, validation R^2 increased as the correlation coefficient between the artificial OTU and FE increased. As a reference, the maximal expected validation R^2 based on the dataset with the 0.65 correlated OTU was 0.42. The maximal expected value was reached for each artificial OTU correlated above 0.65 for which no over-fitting was observed.

When applying RF, the validation R^2 increased when artificial OTU correlated above 0.46 with FE were included (Figure III-23). Compared to sPLSR applied on similar dataset with artificial OTU, the validation R^2 from the RF method were lower. The RF method applied on datasets with qualitative predictors (sex, replicate) resulted in the same validation R^2 compared to RF on datasets without qualitative predictors.

4.5. Discussion

The first part of this study observed that regression models could not predict FE based on fecal microbial information. The inability to predict FE from the microbiota data could come from regression methods that are not adapted for microbiota data, from the lack of relevant information in the dataset, or from the low variability of the phenotype to predict (13% standard deviation for FE in our cohort). Here we added artificial OTU whose abundance were correlated with the phenotype in order to test the relevance of three regression methods to predict a phenotype from microbiota data.

The main use of PLSR is to extract the relevant variables related to the phenotype of interest before to discriminate groups of individuals (Barker and Rayens, 2003; Cribbs et al., 2016). As observed in our study, the predictive ability of PLSR from CLR-normalized microbiota data is improved by adding a variable selection in sPLSR (Lê Cao et al., 2008). The sPLSR extracts the OTU correlated to the phenotype and therefore reduces the over-fitting caused by a large number of predictors. Our study based on artificial OTU confirmed the ability of sPLSR to extract relevant information to predict a phenotype.

The RF is frequently used to discriminate groups based on microbiota data: human diseases (Eshaghzadeh Torbati et al., 2016; Pasolli et al., 2016) or fecal source of

contamination (Roguet et al., 2018). In contrast, the use of RF to perform quantitative predictions is much less common. Belk et al. (2018) demonstrated that it was possible to predict quantitatively the postmortem interval from 16S rRNA data with RF models. The present study confirm that RF models can be used to perform quantitative predictions of FE on microbiota data in case of relevant information present in the dataset. In our case, the qualitative predictors (sex and replicate) did not contain useful information for the phenotype prediction.

The prediction results obtained from simulated data indicate that sPLSR and RF could predict the phenotype as long as an OTU was correlated above 0.39 and 0.46, respectively. In the initial dataset, every OTU correlation was below 0.29 which could explain the challenge of building valid prediction models from the initial dataset. From these results, several hypotheses could be raised to explain the inability to predict FE phenotype from the microbiota data: 1) fecal microbiota would not totally reflect the functional activity of the entire gut microbiota on the host FE, 2) single OTU information is not relevant because several functionally redundant OTU coexist, 3) the relevant information is in rare OTU and cannot be extracted by the tested statistical methods.

Fecal microbiota may not be relevant to predict FE in our pigs because most of the energy is digested in the foregut when the main part of dietary fibers is degraded by microbial fermentation in the hindgut. In pigs, the largest amount of energy is absorbed in the foregut and does not require microbiota intervention. According to Anguita et al. (2006), only 7% to 18% of the energy are digested in the hindgut where the main part of dietary fibers is degraded by microbial fermentation. In addition, fecal and ileal microbiota composition at genus level are poorly correlated (i.e. 0.37) (Zhao et al., 2015). Finally, previous results indicated that Pearson correlation coefficients between OTU in fecal samples and energy digestibility coefficient were lower than 0.36 in pigs fed low fiber diets and these correlations were not significant in pigs fed high fiber diets (Le Sciellour et al., 2018). As a result, the fecal microbiota composition does not fully represent the digestive activity, which could explain the lack of relevant OTU in our dataset related to FE.

Functional redundancy exists because pigs with similar phenotypes can host different bacteria that have the same fermentation capacities (Martens et al., 2011). Therefore, variation in OTU composition does not necessarily imply changes in the microbiota functionality in

connection to FE. This functional redundancy could be responsible for the difficulty of predicting the phenotype from the microbiota data when analyzing each OTU separately.

Rare OTU may have an impact on their host metabolism and therefore impact the host phenotype (Jousset et al., 2017; Antwis et al., 2019). However, our study demonstrated that regression methods cannot use rare OTU because they present insufficient correlations with FE. The artificial OTU were built to mimic the uncertainty of the DNA extraction and amplification (Huber et al., 2009) assuming that every OTU was equally amplified. In reality however, rare OTU (i.e. below 1%) are more likely to be underestimated by PCR (Gonzalez et al., 2012). The relative abundance of the OTU is of great importance to ensure reproducibility of the prediction. The present study highlighted that OTU below 0.002% relative abundance are not relevant for phenotype predictions.

In our study, we choose to simulate single OTU correlated with FE. This single OTU gave the best prediction models. Further investigation could use a combination of simulated OTU with a great covariation with FE, and each OTU from this combination with less than 0.29 correlation with FE. This would mimic realistic situation where several OTU contain useful information for the prediction of the phenotype.

4.6. Conclusion

In a real dataset, neither PLSR, sPLSR nor RF could build valid predicting models of FE in pigs fed a standard commercial diet. From the present results, the OTU have to represent at least 0.02% of the total sequences and be correlated at 0.39 with the phenotype in order to be useful for a quantitative prediction with PLSR, which performed better than PLSR and RF.

4.7. References

Cf. liste des références à la fin du manuscrit.

5. Complément de bibliographie : notion de redondance fonctionnelle et d'entérotype

Dans les trois essais réalisés durant la thèse, les relations quantitatives entre la composition du microbiote au travers des OTU et les phénotypes de l'hôte ont été étudiées. Il est apparu que les corrélations entre les abondances d'OTU et des phénotypes tels que l'EA sont faibles et ne permettent pas de prédire quantitativement l'EA à partir du microbiote. Une hypothèse a été soulevée : la composition du microbiote établie sur la base des abondances des OTU ne reflète pas les rôles de ce microbiote sur les performances de l'hôte. En effet, au sein d'une population bactérienne, plusieurs bactéries différentes peuvent remplir la même fonction auprès de l'hôte et une différence de composition microbienne pourrait alors rester sans effet d'un point de vue fonctionnel.

Plutôt que d'analyser séparément chaque bactérie et chaque fonction associée, il pourrait alors être intéressant d'étudier le microbiote en tant qu'écosystème et donc comme un ensemble de fonctions biologiques interconnectées. L'intérêt de ce regroupement réside dans l'hypothèse qu'un groupe d'individus avec un écosystème microbien similaire réagiraient de la même manière à une perturbation dans leur environnement, un problème de santé, etc. Il serait alors possible d'adapter précisément l'alimentation, les traitements médicamenteux ou les conditions de vie de chaque individu pour optimiser ses performances de croissance ou pour limiter les impacts négatifs de perturbations potentielles.

En pratique, les individus partageant une composition de microbiote fécal similaire peuvent être regroupés en « entérotypes », chaque entérotype correspondant à un état stable d'un écosystème microbien. Chez l'homme, il a ainsi été mis en évidence trois entérotypes indépendants des continents ou habitudes alimentaires (Arumugam et al., 2011). Ces entérotypes sont définis suivant la composition en espèces bactériennes, notamment vis-à-vis des trois genres bactériens majoritaires *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus* (Qin et al., 2010; Arumugam et al., 2011). De même, chez les grands singes, trois entérotypes sont aussi présents (Moeller et al., 2012). Cette notion a été reprise chez le porc où deux entérotypes ont été définis, basés sur la diversité microbienne et les abondances relatives en *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Mitsuokella* et *Treponema* (Mach et al., 2015; Ramayo-Caldas et al., 2016). Plus récemment, une étude longitudinale sur des porcs croisés (Large White x Landrace) x

Duroc a identifié deux entérotypes dominés par *Escherichia* ou *Prevotella* au sevrage à 19 jours, puis deux entérotypes dominés par *Clostridium* et *Turicibacter* d'un côté ou *Lactobacillus* et *Streptococcus* de l'autre à 118 et à 196 jours (Lu et al., 2018).

Dans chaque entérotipe, suivant les genres bactériens enrichis, différentes fonctions microbiennes sont favorisées. Ainsi chez l'homme, l'entérotipe dominé par les *Bacteroides* semble prioritairement extraire de l'énergie de la fermentation des glucides et des protéines tandis que les entérotypes dominés par *Prevotella* ou *Ruminococcus* semblent favoriser l'hydrolyse de la mucine (Arumugam et al., 2011). De ces différents entérotypes peuvent alors ressortir divers phénotypes, provenant notamment de différences dans les mécanismes digestifs. De même, chez le porc, l'entérotipe dominé par *Prevotella* et *Mitsuokella* a été associé à une croissance plus élevée de 17,9 g par jour et un poids vif à 60 jours supérieur de 850 g par rapport à l'entérotipe dominé par *Ruminococcus* et *Treponema* (Ramayo-Caldas et al., 2016). Un entérotipe dominé par *Treponema* a aussi été retrouvé chez des porcs Duroc de 140 jours présentant une meilleure EA que ceux appartenant à un entérotipe dominé par *Prevotella* (H. Yang et al., 2017). Cependant, les entérotypes ne sont pas toujours associés à des différences de performance, comme observé sur des porcs croisés (Large White x Landrace) x Duroc (Lu et al., 2018). Au regard de ces études, la définition des entérotypes porcins est actuellement peu développée et les relations entre ces entérotypes et les performances des porcs restent à approfondir. Ceci a fait l'objet d'une partie de cette thèse valorisée dans l'article suivant.

6. Article 5, analyse longitudinale de la composition du microbiote et des entérotypes de porcs entre le post-sevrage et la finition

Présentation de l'étude : Au travers de l'essai 2, un résultat innovant est ressorti : des entérotypes peuvent être identifiés à partir de la méthodologie développée par Arumugam et al. (2011). Cependant ces entérotypes ne correspondent pas à ceux déjà identifiés chez des porcs plus jeunes (Ramayo-Caldas et al., 2016) et un même porc peut changer d'entérotype. D'un point de vue phénotypique, les entérotypes peuvent être corrélés à des différences de performances.

L'essai 3 a servi de support pour approfondir la définition des entérotypes : quels entérotypes sont présents à 7, 14, 17, 20 et 22 semaines ? Comment les animaux évoluent d'un entérotype à un autre ? Est-ce relié à des différences de performances ? Cet article a aussi été l'occasion de décrire l'évolution de l'abondance bactérienne entre 7 et 22 semaines d'âge.

Principaux résultats : Les abondances bactériennes évoluent principalement entre le post-sevrage et la phase de finition. Les *Lactobacillaceae* diminuent tandis que les *Streptococcaceae* augmentent. En finition, la composition microbienne continue d'évoluer avec une augmentation de l'abondance en *Spirochaetes* et une diminution des abondances en *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*.

En post-sevrage, 2 entérotypes sont identifiés. L'un est dominé par *Lactobacillus*, l'autre par *Prevotella* et *Sarcina*. En finition, la composition des entérotypes est différente. De même, 2 entérotypes sont identifiés (dominés par *Lactobacillus* ou par *Turicibacter* et *Clostridium sensu stricto*). Ces entérotypes sont identiques à ceux retrouvés dans l'essai 2. En complément, à 17 semaines d'âge, un entérotype intermédiaire est identifié. Durant la période de finition, 75% des porcs ont changé au moins une fois d'entérotype. Les causes de ces

changements ne sont pas connues. En particulier, un changement d'entérotipe n'est pas corrélé à des différences de performance.

Cette étude redéfinit la notion d'entérotipe comme un écosystème dépendant de l'âge de l'animal et instable au cours du temps.

Longitudinal analysis of the microbiota composition and enterotypes of pigs from post-weaning to finishing

Short title: Microbial enterotype evolution in pigs

Le Sciellour Mathilde¹, Renaudeau David¹, Zemb Olivier^{2*}

¹UMR 1348 PEGASE, Agrocampus-Ouest, INRA, Saint-Gilles, France, F-35590

²UMR 1388 GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France, F-31320

*Corresponding author: olivier.zemb@inra.fr

Citation : Le Sciellour, M., D. Renaudeau, and O. Zemb. Longitudinal analysis of the microbiota composition and enterotypes of pigs from post-weaning to finishing. *Microorganisms*. 7(12), 622. doi:10.3390/microorganisms7120622.

Cet article s'inscrit dans le cadre du projet européen Feed-a-Gene Project, financé par le programme H2020 de l'Union Européenne sous le numéro d'agrément 633531.

Cet article a été publié le 28 novembre 2019. Toutes les données sont en libre accès dans Sequence Read Archive sous le numéro d'accèsion PRJNA588139.

6.1. Abstract

The present study aimed at investigating the evolution of pig's fecal microbiota composition from post-weaning to finishing in a longitudinal analysis. The experiment was conducted on 160 Pietrain × (Large White × Landrace) castrated male and female pigs in two replicates. Feces were collected at 52, 99, 119, 140 and 154 days of age for further 16S rRNA sequencing to analyze the microbiota composition. Pig microbiota evolved strongly from 52 to 99 days of age with an increased abundance of *Streptococcaceae* and a decreased abundance of *Lactobacillaceae*. During the finishing stage, microbiota kept evolving at a slower rate. To link the community structure to the performances, the fecal samples were clustered into enterotypes sharing a similar bacterial composition. At 52 days, two enterotypes dominated either by *Lactobacillus* or by *Prevotella - Sarcina* were identified. They differed from the two enterotypes determined from 99 to 154 days which were dominated either by *Lactobacillus* or by *Turicibacter - Clostridium sensu stricto*. During this time period, 75% of the pigs switched enterotypes. The enterotypes were not related to differences in the overall growth or feeding performance. The enterotype definition was time-dependent and seemed to be related to the sex type at 99 days of age.

Key words: longitudinal analysis, microbiota, finishing pig, enterotype

6.2. Introduction

Pigs gut microbiota is composed of more than 700 metagenomic species (Xiao et al., 2016). Gut microbiota plays a central role in its host metabolism and health by participating on nutrients and fat metabolism and absorption, by breaking down toxins, by being a key component to the pig immune system, and by interacting with the peripheral nervous system. Particularly, the gut microbiota helps degrading indigestible carbohydrates contained in the fibers (Anguita et al., 2006; Lamendella et al., 2011). In turn, fibers can also impact the relative abundance of the microbial species (Haenen et al., 2013b; Sun et al., 2015; Le Sciellour et al., 2018; Verschuren et al., 2018). Interestingly, pigs are exposed to various diets that are increasingly rich in fiber from weaning to finishing stage, and their microbiota evolves continuously (Niu et al., 2019). However, the microbiota composition also evolves during the finishing stage even when the diet is constant (Niu et al., 2019), so that the diet and the age of the animal both impact the microbial equilibrium.

Recent advances underlined that several equilibrium states – i.e. enterotypes – are possible. Thus, humans are divided into three enterotypes (Arumugam et al., 2011), with functional implications such as dietary metabolism (Costea et al., 2018). The same methodology applied on pigs between 14 and 70 days of age generated two enterotypes (Mach et al., 2015; Ramayo-Caldas et al., 2016) and retrieved the co-exclusion between *Prevotella* and *Ruminococcus* observed in human (Arumugam et al., 2011), suggesting some common functional architecture of the pig and human microbiota. However, the relationship between enterotypes and pigs' performance is unclear. The *Ruminococcus*-dominated enterotype presented a higher average daily gain (ADG) from 22 to 28 days of age (during lactation) but lower ADG from 29 to 70 days of age (Mach et al., 2015). However, the enterotypes established on 1 200 pigs at 118 and 196 days of age were not related with ADG (Lu et al., 2018). This study also demonstrated that the enterotypes strongly depended on the age. The longitudinal analysis in our experiment aimed at describing the enterotypes from post-weaning to finishing in 52, 99, 119, 140 and 154 days old pigs.

6.3. Material and methods

The experiment has been authorized by the French legislation on animal experimentation and ethics (authorization: 2016022415253973).

6.3.1. Animals and experimental design

The present study was based on an existing experiment where the animals have been exposed to a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON). We choose to check afterward that the DON-contaminated diet did not affect the conclusions of the present study on the microbiota classification. The study was conducted on 160 Pietrain × (Large White × Landrace) castrated male and female pigs. Pigs were raised in two replicates from April to October 2017 in the INRA experimental facilities at the Unité Expérimentale Porcs de Rennes located in Saint Gilles, France. A commercial grower feed was provided *ad libitum* to the pigs from 52 to 91 days of age (Table S1). A transition to a finisher feed was applied between 91 and 98 days of age. The pigs were divided into four experimental groups. A control group (CC) received *ad libitum* a control finisher feed formulated based on 75% corn and 18% soybean meal (10.7 MJ/kg net energy) from 99 to 154 days of age (Table S1). A DON-contaminated diet was formulated similarly with a naturally contaminated corn containing 4.8 mg DON/kg. The experimental groups were submitted to a 7-d DON challenge on day

113 (DC group), day 134 (CD group) and both days 113 and 134 (DD group) (Figure S1). During the pre- and post-challenge periods, pigs received the control finisher feed. During the whole experiment, pigs had free access to the water.

6.3.2. Measurements

The live body weight (BW) and feed intake were automatically recorded daily for each individual pig. The average daily gain (ADG), the average daily feed intake (ADFI) and the feed conversion ratio ($FCR = ADFI/ADG$) were calculated between 99 and 113 days, 113 and 119 days, 119 and 134 days, 134 and 140 days, 140 and 154 days, and during the whole finishing stage between 99 and 154 days of age.

In both replicates, the fecal samples from all pigs were collected at 99 and 154 days of age. Due to time constraint, only females were sampled at 119 and at 140 days of age. In the second replicate, additional fecal samples were also collected from all pigs at 52 days of age. Feces were collected directly from the rectum, stored in barcoded tubes, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

6.3.3. DNA sequencing

The DNA was extracted from 50 mg of feces using the ZR-96 Soil Microbe DNA kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer instructions (Frese et al., 2015). A PCR was applied to amplify the V3-V4 region of the 16S rRNA gene using F460 and R460 primers (F460: CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, R460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). The PCR was run in 30 cycles with an annealing temperature of 65°C . Sequencing was performed with Illumina MiSeq V3 chemistry and the 2x250bp paired-end sequences were cleaned internally for length, and undetermined nucleotides. These sequencing and cleaning steps were performed at the GeT-PlaGE platform (Toulouse, France).

The VSEARCH software (Rognes et al., 2016) has been used to remove chimeras from the sequences. From the sequences, a de novo clustering resulted into operational taxonomic units (OTU) with a threshold of 0.97 similarity. The abundance of each OTU in each sample was recorded. The Usearch software (9.2.64_i86linux32 version) has been used to assign each OTU to a taxonomic affiliation based on SILVA database (version 123, 97% similarity threshold) (Quast et al., 2013). PICRUST version 2.0.3-b was applied to convert the OTU

table to a table of abundance of Metacyc pathways. The pathways that were different between at least one group were identified with a non-parametric Kruskal test adjusted for the false discovery rate by the BenjaminiHochberg method. The conover posthoc test was applied to quantify the differences between the two enterotypes at the postweaning stage and the two enterotypes at the fattening stage.

6.3.4. Calculations and statistical analysis

The R 3.5.1. software (R Core Team, 2018) has been used to run the statistical analyses. Based on the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) and an OTU table rarefied at 15 752 sequences, the number of OTU and Shannon index described the microbiota diversity. Due to the lack of fecal samples at 119 and 140 days of age in male pigs, we chose to analyze the age impact on the microbiota composition in females only. The diversity indexes (number of OTU and Shannon index) and the phyla relative abundance were compared between ages using Kruskal-Wallis tests. To visualize the evolution of the main genera abundance through time, we used a local polynomial regression fitting (degree 2) as proposed by the SplinectomeR package (Shields-Cutler et al., 2018).

A non-metric distance scaling (NMDS) plot was used to represent the similarities between samples based on the Bray-Curtis distance matrix. A pairwise MANOVA was applied on this distance matrix to evaluate the impact of age. The bacterial community was considered significantly different between groups if the adjusted false discovery rate (FDR) is under 0.05 after 999 permutations.

To identify samples with similar bacterial composition, enterotypes at 52, 99, 119, 140 and 154 days were constituted following the methodology from Arumugam et al. (2011). Briefly, from the relative genus abundance, a Jensen-Shannon divergence matrix was calculated. The partitioning around medoids clustering algorithm was applied and the optimal number of clusters (corresponding to enterotypes) was assessed using the Calinski-Harabasz index. The Silhouette coefficient was used to evaluate the significance of this clustering. Kruskal-Wallis tests compared the genus relative abundance between the resulting enterotypes at each age. Chi-squared tests were used to analyze the repartition of the sex types, or the DON challenged groups among the enterotypes. The effects of the enterotypes at each age on pig's performance were analyzed using ANOVA models. The sex, the replicate,

the DON challenge, the body weight at 99 days of age, and their interactions were included in the models.

6.4. Results

Live BW increased from 55 ± 5 kg at 99 days of age to 110 ± 11 kg at 154 days. The ADFI increased from 2.4 ± 0.4 kg/d to 3.3 ± 0.5 kg/d between the beginning and the end of the trial. Due to illness, some animals had to be removed from the experiment. Furthermore, some fecal samples could not be collected from some animals at one time point. At the end of the experiment, 513 fecal samples from 143 pigs have been sequenced for microbiota analysis (Figure S2). The number of sequences ranged from 15 752 to 80 731 ($21\ 156 \pm 12\ 226$ sequences on average). All the samples were kept for further statistical analysis. After filtration for the rare OTU under 0.01% relative abundance, 1 556 OTU remained.

According to Wilcoxon tests applied on control and challenged female pigs at 119 and at 140 days of age, the DON challenge did not significantly impact the number of OTU, the Shannon index, or the relative abundance of the main phyla ($P > 0.05$) (Table SS). Following this result, we chose to group all female pigs (control and challenged) to evaluate the impact of the age on microbiota composition. The richness and Shannon index of the fecal microbial community increased between post-weaning and finishing stages ($P < 0.05$), and remained stable during the finishing stage from 99 to 154 days (Table III-10).

Table III-10 : Age effect on female pigs' fecal microbiota diversity and phyla relative abundance.

Item ¹	Days of age				
	52	99	119	140	154
Nb of pigs ²	32	64	60	61	65
Diversity indexes					
Nb of OTU	2 709 ± 323 a	3 666 ± 363 b	3 600 ± 334 b	3 719 ± 288 b	3 726 ± 298 b
Shannon index	6.67 ± 0.17 a	7.14 ± 0.16 b	7.15 ± 0.13 b	7.19 ± 0.11 b	7.17 ± 0.11 b
Chao1	3 707 ± 506 a	5 229 ± 876 bc	4 966 ± 731 c	5 119 ± 583 bc	5 276 ± 670 b
ACE	3 866 ± 563 a	5 559 ± 980 b	5 227 ± 814 c	5 403 ± 649 bc	5 602 ± 772 b
Simpson	0.994 ± 0.003 a	0.997 ± 0.001 b	0.996 ± 0.001 c	0.997 ± 0.001 bc	0.997 ± 0.001 b
InvSimpson	209 ± 64 a	310 ± 68 b	284 ± 78 c	309 ± 75 bc	324 ± 86 b
Fisher	949 ± 165 a	1 512 ± 242 b	1 467 ± 217 b	1 543 ± 191 b	1 548 ± 200 b
Phyla relative abundance (%)					
<i>Firmicutes</i>	72.09 ± 7.61 a	80.31 ± 5.52 b	78.15 ± 5.05 b	78.44 ± 5.89 b	78.30 ± 6.77 b
<i>Bacteroidetes</i>	22.56 ± 7.82 a	15.02 ± 5.26 bc	16.18 ± 5.14 b	15.17 ± 5.66 bc	13.26 ± 3.90 c
<i>Spirochaetes</i>	0.34 ± 0.88 a	0.18 ± 0.28 a	0.47 ± 0.45 b	0.70 ± 0.49 c	1.33 ± 1.28 d
<i>Actinobacteria</i>	0.66 ± 1.12 a	0.71 ± 1.16 a	0.26 ± 0.20 b	0.20 ± 0.09 b	0.21 ± 0.15 b
<i>Proteobacteria</i>	0.58 ± 0.51	0.48 ± 0.34	0.44 ± 0.22	0.39 ± 0.24	0.53 ± 0.33
<i>Fibrobacteres</i>	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
<i>Tenericutes</i>	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Unclassified	3.75 ± 2.15 a	3.28 ± 1.57 a	4.47 ± 1.89 b	5.06 ± 1.84 b	6.29 ± 2.88 c
<i>Firmicutes/ Bacteroidetes</i>	3.84 ± 2.10 a	6.27 ± 3.05 bc	5.52 ± 2.43 c	5.98 ± 2.45 bc	6.66 ± 2.86 b

^{a-d} Least square means within a row with different superscript significantly differ ($P < 0.05$) in Kruskal-Wallis tests

¹ At 99, 119, 140 and 154 d, the samples were collected on pigs raised in two consecutive batches. At 52 d, pigs' fecal samples from the second replicate only were collected.

The relative abundance of *Firmicutes* increased between 52 and 99 days ($P < 0.05$), and a stability was achieved from day 99. The relative abundance of *Bacteroidetes* decreased all over the trial ($P < 0.05$). The relative abundance of *Spirochaetes* increased and the relative abundance of *Actinobacteria* decreased during the finishing stage ($P < 0.05$). The main represented family among the samples was *Lactobacillaceae*. The abundance of *Lactobacillaceae* (mainly *Lactobacillus*), *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Veillonellaceae* decreased between 52 to 119 days, and were stable afterward. The abundance of *Prevotellaceae* (mainly *Prevotella*) decreased between 52 and 99 days, was stable between 99 and 140 days, and decreased at the end of the trial. The abundance of *Streptococcaceae* (mainly *Streptococcus*) increased between 52 and 99 days, decreased between 99 and 119 days, and was stable afterward. The *Clostridium sensu stricto* relative abundance increased between 52 and 99 days, was stable between 99 and 140 days, and increased at the end of the trial, in exact opposition to the *Prevotella* relative abundance (Figure III-24). Based on the control samples, the structure of the bacterial community evolved across ages but the dispersion at each age remained homogenous ($P = 0.09$). The NMDS grouped the samples according to the age (Figure S3) and this separation was confirmed using the MANOVA (FDR < 0.05 for each pairwise comparison).

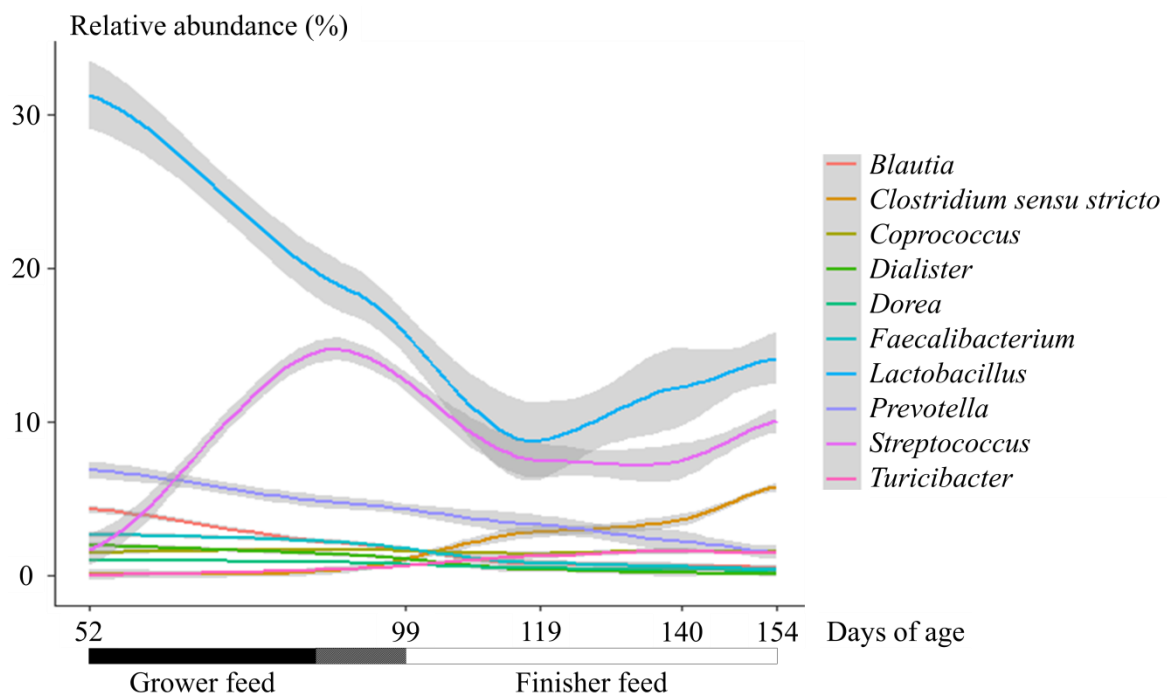


Figure III-24 : Evolution of the relative abundance of 10 main genera across ages in female pigs.

Microbiota composition clustered into two enterotypes at 52 days of age, named Post-Weaning Enterotype 1 (PWE1) and Post-Weaning Enterotype 2 (PWE2) (Figure III-25A) (Figure S4). The microbial diversity in PWE1 was lower compared to PWE2 according to the number of OTU ($2\,605 \pm 313$ vs $2\,953 \pm 258$, $P < 0.001$), as was the Shannon index (6.60 ± 0.19 vs 6.76 ± 0.16 , $P < 0.05$). The PWE1 enterotype was dominated by *Prevotella*, *Sarcina*, *Treponema*, *Dialister*, *Mitsuokella*, *Clostridium sensu stricto*, *Fusicatenibacter*, *Roseburia*, *Blautia*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, and *Desulfovibrio* ($P < 0.05$), whereas *Lactobacillus* and *Megasphaera* were more abundant in the PWE2 enterotype (Table S3). The ADG, ADFI and FCR between 99 and 154 days of age did not differ between the enterotypes at 52 days.

Microbiota composition of finishing pigs clustered into two enterotypes at 99, 140 and 154 days of age, referred as Finishing Enterotype 1 (FE1) and Finishing Enterotype 2 (FE2) (Figure III-25B) (Figure S4). The microbial diversity in FE1 was greater compared to FE2 according to the number of OTU ($3\,786 \pm 320$ vs $3\,611 \pm 303$, $P < 0.001$) but the Shannon index did not differ (7.16 ± 0.13 vs 7.13 ± 0.14 , $P = 0.73$). In the FE1 enterotype, *Lactobacillus* and *Erysipelotrichaceae incertae sedis* were more abundant, whereas the FE2 enterotype was dominated by *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto*, *Sarcina*, *Clostridium XI*, *Treponema*, *Fibrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Clostridium IV* ($P < 0.05$).

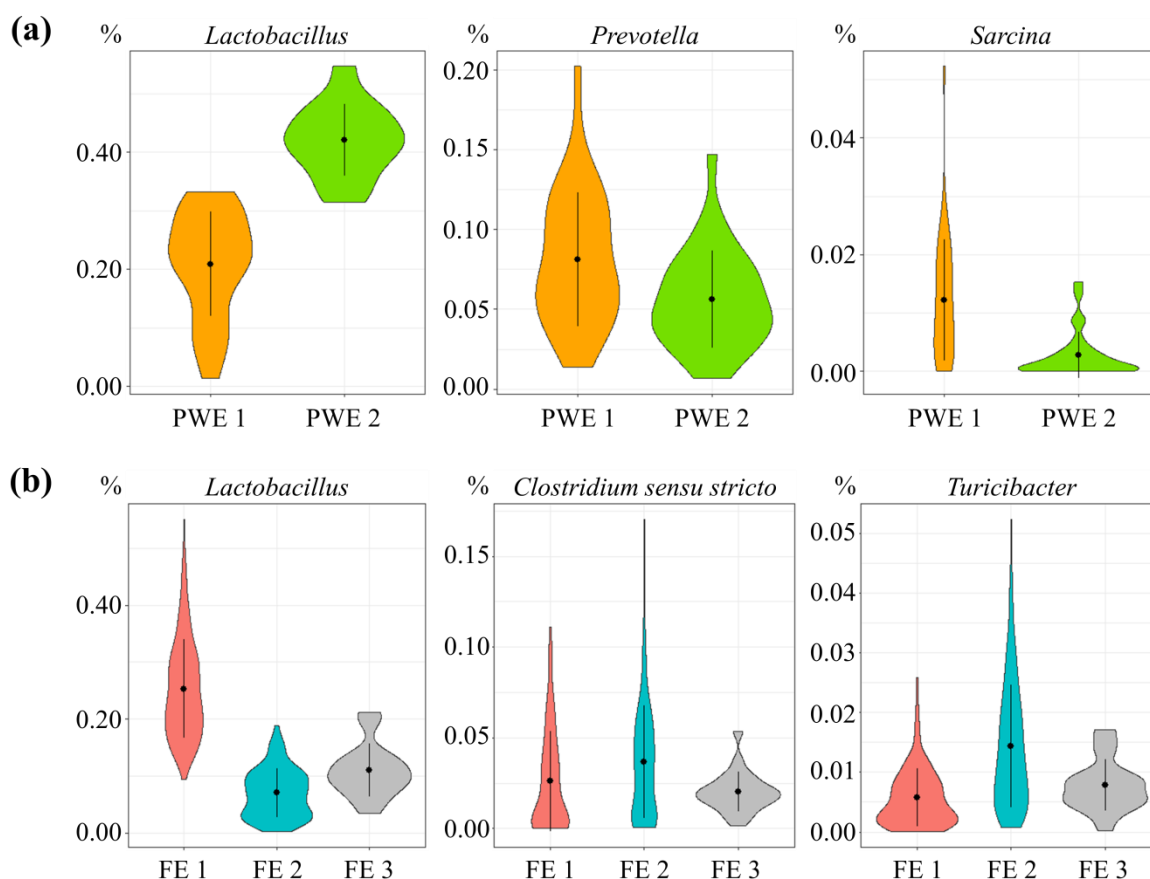


Figure III-25 : Relative abundance (%) of the three main genera contributing (a) to the two enterotypes in post-weaning PWE1 (in orange) and PWE2 (in green), and (b) to the three enterotypes in finishing FE1 (in red), FE2 (in turquoise) and FE3 (in grey).

The ADG, ADFI and FCR did not differ between the enterotypes FE1 and FE2 (Table III-11). At 119 days of age, a third enterotype named FE3 was observed with intermediate genera relative abundance between FE1 and FE2 (Figure III-25B) (Figure S4). Pigs in FE3 had greater ADG between 113 and 119 days of age compared to pigs in FE2. However, no significant difference was observed later in the experiment or between FE3 and FE1 (Table III-11). The four experimental groups (CC, DC, CD and DD) were equally represented in FE1, in FE2 and in FE3 ($P = 0.50$ in a Chi-squared test).

Table III-11 : Effect of the finishing enterotypes on the performance of the pigs.

Age at fecal sampling (d) ¹	Trait _{days of age}	Enterotype						RSD ²	Tested factors	Statistics ³
		FE1		FE2		FE3				
		mean	SE	mean	SE	mean	SE			
99	No. of pigs	86		97						
	ADFI ₉₉₋₁₁₃ (kg/d)	2.45	0.04	2.42	0.04	-	-	0.30	E, R, I, S	I
	ADG ₉₉₋₁₁₃ (kg/d)	0.86	0.02	0.87	0.02	-	-	0.12	E, R, I, S	I
	FCR ₉₉₋₁₁₃	2.89	0.06	2.84	0.05	-	-	0.44	E, R, I, S	I
119	No. of pigs	7		33		26				
	ADFI ₁₁₃₋₁₁₉ (kg/d)	2.08	0.12	1.97	0.06	2.12	0.07	0.31	E, R, I, D	R, I, D
	ADG ₁₁₃₋₁₁₉ (kg/d)	0.84 ^{ab}	0.08	0.65 ^b	0.04	0.89 ^a	0.04	0.21	E, R, I, D	E, D
	FCR ₁₁₃₋₁₁₉	2.96	1.25	4.21	0.65	3.04	0.68	3.18	E, R, I, D	D
	ADFI ₁₁₉₋₁₃₄ (kg/d)	2.50	0.11	2.59	0.06	2.58	0.06	0.27	E, R, I, D	R, I
	ADG ₁₁₉₋₁₃₄ (kg/d)	1.01	0.06	1.04	0.03	1.04	0.04	0.16	E, R, I, D	I
	FCR ₁₁₉₋₁₃₄	2.51	0.46	2.43	0.24	2.89	0.25	1.18	E, R, I, D	-
140	No. of pigs	28		44						
	ADFI ₁₃₄₋₁₄₀ (kg/d)	2.61	0.07	2.55	0.06	-	-	0.37	E, R, I, D	I, D
	ADG ₁₃₄₋₁₄₀ (kg/d)	0.91	0.04	0.91	0.04	-	-	0.22	E, R, I, D	I, D
	FCR ₁₃₄₋₁₄₀	3.21	2.23	5.36	1.86	-	-	11.14	E, R, I, D	-
	ADFI ₁₄₀₋₁₅₄ (kg/d)	3.18	0.07	3.07	0.06	-	-	0.35	E, R, I, D	I
	ADG ₁₄₀₋₁₅₄ (kg/d)	1.12	0.04	1.10	0.03	-	-	0.02	E, R, I, D	D
	FCR ₁₄₀₋₁₅₄	2.89	0.08	2.86	0.07	-	-	0.42	E, R, I, D	-
154	No. of pigs	72		81						
	ADFI ₁₄₀₋₁₅₄ (kg/d)	3.34	0.05	3.35	0.05	-	-	0.38	E, R, I, S	I, S
	ADG ₁₄₀₋₁₅₄ (kg/d)	1.12	0.03	1.10	0.02	-	-	0.21	E, R, I, S	R
	FCR ₁₄₀₋₁₅₄	3.06	0.07	3.11	0.06	-	-	0.48	E, R, I, S	R, I, S

^{a-b} Least square means within a row with different superscript significantly differ ($P < 0.05$)

¹ Feces were collected from females and castrated males at 99 and 154 days of age, and from females only at 119 and 140 days of age. Half of the female pigs received a DON-contaminated diet between 113 and 119, and between 134 and 140 days of age.

² Residual standard deviation from an ANOVA model accounting for the enterotype (E), the replicate (R), the initial body weight of the pig at 99 days of age (I), the sex (S), and the DON challenge (D). All the interactions have been tested and none is significant.

³ Significant effects ($P < 0.05$).

A total of 13 pigs moved from PWE1 enterotype to FE1, 23 from PWE1 to FE2, 13 from PWE2 to FE1 and 16 from PWE2 to FE2 (Figure III-26A). In post-weaning, castrated males and females were equally represented in the enterotypes ($P = 1.00$ in a Chi-squared test). At 99 days of age, sex impacted the enterotype, with the females more represented in the FE2 compared to the FE1 ($P < 0.001$). However, at 154 days of age, the enterotype was independent of the sex ($P = 0.69$). During the finishing stage, the instability of the enterotypes observed in pigs switching enterotypes (in comparison with the stability when pigs remain

clustered in the same enterotype all experiment long) tended to depend on the sex ($P = 0.08$) (Figure III-26A). Furthermore, a switch between the enterotypes during the finishing stage was independent of an exposure to DON ($P = 1.00$) (Figure III-26B). At 154 days of age, pigs receiving the DON-contaminated diet were equally represented in each enterotype ($P = 0.32$) (Figure S5). More precisely when looking at the 49 females pigs between 99 and 154 days, four pigs remained in the FE1 enterotype and eight in the FE2 enterotype (Figure III-27). The other pigs moved from an enterotype to another enterotype once or twice during this time period.

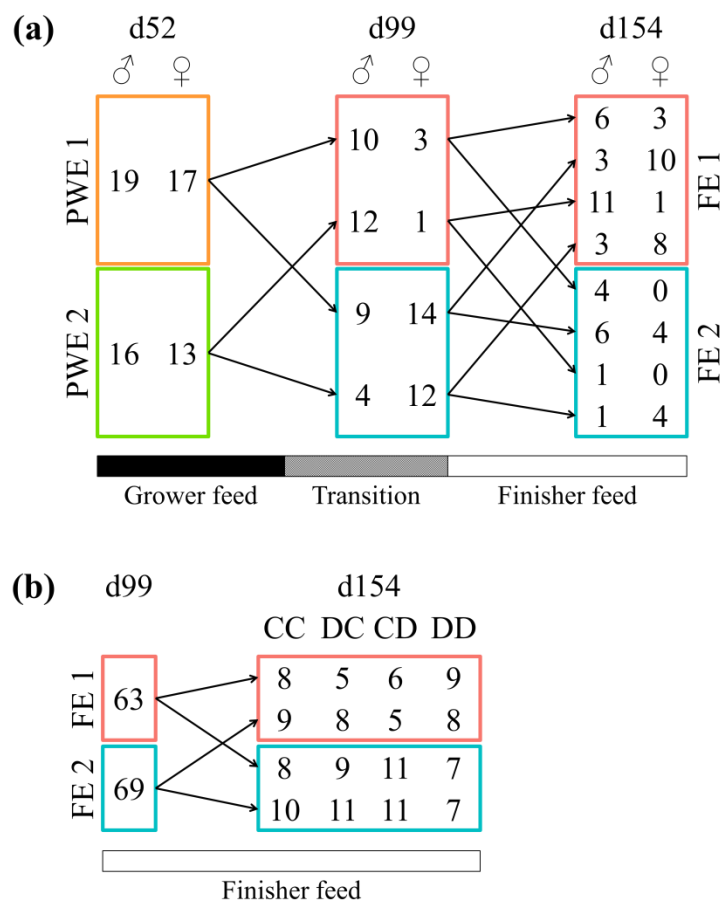


Figure III-26 : Number of pigs switching between enterotypes according (a) to the sex type (castrated males and females) or (b) to the exposition to mycotoxins via the diet.

Enterotypes from the post-weaning stage are represented by PWE1 and PWE2 and from the finishing stage by FE1 and FE2. Figure (a) was based on castrate males and females from the second replicate only. In the figure (b) based on castrated and females from both replicates, the CC, DC, CD and DD experimental groups corresponds to pigs fed with a control finisher diet, exposed to a DON-contaminated diet between 113 d and 119 d, between 134 d et 140 d, and both between 113 d and 119 d, and 134 d and 140 d of age, respectively.

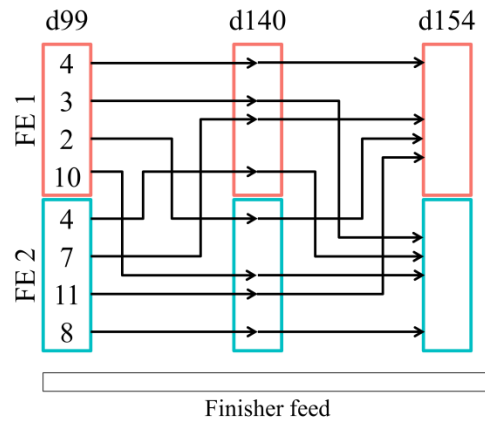


Figure III-27 : Number of female pigs switching between enterotypes (FE1 and FE2) during the finition stage (between 99 and 154 d of age).

6.5. Discussion

This study focused on the evolution of pig's fecal microbiota composition from post-weaning to finishing at both bacteria and ecosystem levels. In our experiment, the diversity increased when the pigs were aging, as previously observed (Holman and Chénier, 2014; Niu et al., 2015; Zhao et al., 2015). At the phylum level, the *Firmicutes*'s relative abundance increased especially between post-weaning and finishing periods (Zhao et al., 2015) and remained stabilized during the late-stages (Han et al., 2018). In accordance with Han et al. (2018), the relative abundance of *Spirochaetes* increased during the finishing period. However, our results on the relative abundances of *Spirochaetes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* differed from those of Zhao et al. (2015) where *Actinobacteria* gradually replaced *Spirochaetes* and *Bacteroidetes* increased when the pigs were aging. At a family level, the main changes in abundance appeared between post-weaning and finishing in accordance with previous findings (Niu et al., 2015). Furthermore, we demonstrated that the microbiota composition kept evolving during all tested stages based on the nMDS and the relative abundance at family and genus levels in line with the results of Kim et al. (2011) despite previous studies demonstrating that a stabilized composition of the microbiota was reached around three month of age (Zhao et al., 2015; Han et al., 2018).

Based on our results, the enterotype definition was age dependent, as two enterotypes (PWE1 and PWE2) were identified at 52 days of age and another two (FE1 and FE2) were identified between 99 and 154 days. The constant evolution of the microbiota composition before three month of age (Zhao et al., 2015; Han et al., 2018) might explain that different enterotypes can be observed at different time point. Our PWE1 and PWE2 enterotypes described at 52 days of age differed from the enterotypes previously described at 60 days of age (Ramayo-Caldas et al., 2016): the PEA enterotype dominated by *Ruminococcus* and *Treponema*, and the PEB enterotype dominated by *Prevotella* and *Mitsuokella*. Indeed, *Ruminococcus* did not differentiate PWE1 and PWE2, while it is a major marker between PEA and PEB. Interestingly, the PWE2 enterotype partially correspond to the PEB enterotype with greater relative abundance of *Prevotella* and *Mitsuokella*, but the relative abundance in *Treponema* in PWE2 pointed toward PEA. These differences in the enterotypes at post-weaning could be related to differences in the diets. However, despite differences in the diet composition and the breeds during the finishing stage, the FE1 and FE2 enterotypes observed from 119 to 152 days of age in our study were consistent with previous observations (Lu et al., 2018; Le Sciellour et al., 2019a).

Enterotypes are unstable, yet robust. Indeed, the pigs moved from an enterotype defined at 52 days of age to another one defined at 99 days of age but the pigs' affiliation to an enterotype at 99 days was not determined by the affiliation to a specific enterotype at 52 days. Similar results were described between enterotypes in post-weaning period (Mach et al., 2015) and between weaning and finishing (Lu et al., 2018). Furthermore, during the finishing stage, pigs' affiliation to an enterotype was not stable and they could switch enterotypes several times from 99 to 154 days. More precisely, this instability has already been observed on 1 057 pigs between 23 and 26 weeks of age where the same enterotypes as in the current experiment have been identified (Le Sciellour et al., 2019a). Interestingly, this indicates that the enterotypes identified here are robust, as the later pigs originated from various farms. Similarly, pigs affiliated to an enterotype at 118 days of age were split into the two enterotypes defined at 196 days (Lu et al., 2018). Such instability was already assumed by Knight et al. (2014) in healthy human.

The enterotypes also differ functionally, especially during the finishing stage. Indeed, the PWE1 and PWE2 enterotypes were functionally relatively similar to eachother, with only 4 other pathways that were significantly different: ppGpp biosynthesis, superpathway of

(Kdo)2-lipid A biosynthesis, glucose, glucose-1-phosphate degradation and adenosylcobalamin salvage from cobinamide I (Table S4). In contrast the PICRUST algorithm predicts that 7 Metacyc pathways have a higher abundance in the FE1 enterotype (Figure S6) : 3 of them are degrading pyruvate (methylerythritol phosphate pathway I, pyruvate fermentation to propanoate and superpathway of butanediol biosynthesis) and 3 others produced Acetyl-CoA (reductive acetyl coenzyme A pathway, L-glutamate degradation V (via hydroxyglutarate) and myo-inositol degradation I). The last pathway was adenosylcobalamin salvage from cobinamide I which was already different between the post-weaning enterotypes (Table S4). Pyruvate also seems to be pivotal for the 40 pathways overrepresented in the FE2 enterotype, where it may be produced by neoglucogenesis, by the reductive TCA cycle I, by the degradation of hexitol or hexuronide, by the Entner douroff pathway or by the degradation of aspartate. Several carbohydrates degradation pathways were also overrepresented in FE2, namely fucose, hexitol, lactose and galactose and rhamnose. The coenzyme A biosynthesis I was overrepresented, and several fermentation pathways (homo- and hetero-lactic, mixed acid, and the Bifidobacterium shunt). Surprisingly, the polyamine biosynthesis I and II were also overrepresented in FE2, yet no adverse impact on growth was observed.

In our experiment, we identified an intermediate enterotype (FE3) at 119 days that illustrate the switch between enterotypes with genus relative abundance in between FE1 and FE2. Pigs in the intermediate enterotype had greater performance compared to the pigs in FE2 during the week before the feces collection. Similarly, Ramayo-Caldas et al. (2016) revealed growth performance difference between the two enterotypes identified in younger pigs (60 days of age). Therefore, we assume that enterotype switches could be related to transient performance modifications. However, the difference of 850 g on 25 kg pigs previously observed remained quite low (Ramayo-Caldas et al., 2016), and in our study, the performance of pigs in FE1 and FE2 enterotypes did not differ in accordance with previous findings (Le Sciellour et al., 2019a). This suggests that the relationship between enterotypes and animal's performance is not so clear.

In this study, the DON exposure impacted the ADFI, ADG and FCR of the pigs at 119 and 140 days of age as previously detailed by Serviento et al. (2018), but no impact on the performances was observed after two-week recovery at 154 days of age. In addition, a transient impact on the microbiota composition has been observed (Le Sciellour et al. 2019b).

However, in our experimental conditions, DON exposure did not impact the enterotype repartition among the animals nor their possible instability, suggesting that the enterotypes are insensitive to DON exposure. From this experiment, we could not identify any cause why pigs switched from an enterotype to another.

At 99 days of age, more female clustered in the FE2 enterotype compared to the FE1 enterotype, while the castrated males were equally distributed. This interaction between the enterotype and the sex type in the beginning of the finishing stage no longer existed at the end of the experiment. It seems that the age interact with the sex type in terms of microbiota composition. Accordingly, the microbial difference observed between male and female pigs disappeared after 63 days of age (Han et al., 2018).

6.6. Conclusion

In conclusion, pig gut microbiota evolved mainly from 52 to 99 days of age with an increased abundance of *Streptococcaceae* and a decreased abundance of *Lactobacillaceae*. At 52 days, two enterotypes dominated either by *Lactobacillus* or by *Prevotella - Sarcina* were identified. They differed from the enterotypes determined from 99 to 154 days and dominated either by *Lactobacillus* or by *Turicibacter - Clostridium sensu stricto*. The enterotype definition was time-dependent. Previous finding about the relationships between enterotypes and improved performance in pigs might have suggested that adding bacterial supplements in the feed could possibly help in modifying the enterotypes and the performance. However, our study demonstrated that the enterotypes defined between 99 and 154 days of age were independent of the growth and feeding performance. Thus, we would advise to use the enterotypes carefully when trying to relate it to performance differences in an industrial context.

6.7. Supplementary materials

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/12/622/s1>, Figure S1: Experimental design, Figure S2: Distribution of samples across sex, time points, replicates, and type of analysis, Figure S3: Non Metric Distance Scaling (NMDS) representation of the microbiota evolution across ages using Bray-Curtis distance in female pigs, Figure S4: Silhouette indexes, Calinski-Harabasz (CH) indexes and plots of the clusters of samples based on the genus relative abundance at 52, 99, 119, 140, and 154 days of age,

Figure S5: Ratio of FE1 enterotypes at Day 154 in the CC, DC, CD and DD experimental groups corresponding to pigs fed with a control finisher diet, exposed to a DON-contaminated diet between 113 d and 119 d, between 134 d et 140 d, and both between 113 d and 119 d, and 134 d and 140 d of age, respectively, Figure S6: Significant MetaCyc pathway predicted by PICRUST, Table S1: Composition of experimental growing and finishing diets, Table S2: DON challenge effect on female pigs' fecal microbiota diversity and phyla relative abundance, Table S3: P-values from Kruskal-Wallis tests for differences in genus relative abundance between the enterotypes at post-weaning (PWE1 vs PWE2) and at finishing (FE1 vs FE2), Table S4: Group file, Table S5: PICRUST prediction of Kegg orthologs, Table S6: PICRUST prediction of Metacyc pathway abundance, Table S7: Statistics on the predicted Metacyc abundance predicted by PICRUST.

6.8. Acknowledgements

The authors thank B. Duteil, P. Roger, N. Muller, J. Delamarre and H. Demay from the UEPR and A.-M. Serviento from UMR PEGASE, INRA, 35590 Saint-Gilles, France for animal care and sample collection and C. Barilly from UMR GenPhySE, INRA, 31320 Castanet-Tolosan, France for lab analysis.

6.9. References

Cf. liste des références à la fin du manuscrit.

IV. Discussion Générale

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier l'impact de divers facteurs environnementaux sur la composition du microbiote fécal de porc puis d'analyser les relations entre la composition microbienne et les variations de performances de l'hôte. L'analyse se base sur trois essais expérimentaux dans lesquels des porcs en croissance-finition ont reçu une alternance entre un régime standard ou riche en fibres, ont été exposés à un stress thermique chronique ou aigu, ou à un challenge alimentaire avec un aliment contaminé par des mycotoxines.

La discussion s'intéressera dans un premier temps à l'impact des facteurs de variation sur la composition du microbiote, son évolution et sa capacité d'adaptation aux perturbations. Une seconde partie portera sur l'utilisation des données de microbiote pour classer les individus suivant les conditions d'élevage. Dans un troisième temps, la capacité à prédire des performances quantitatives à partir du microbiote sera discutée. Enfin, une ouverture sera faite sur une approche différente de l'analyse de la composition microbienne : l'étude d'entérotypes.

1. Facteurs de variation de la composition du microbiote chez le porc

Dans un premier temps, les impacts du type génétique et de l'âge sur la composition microbienne fécale seront développés. Dans un second temps, les effets à court et long terme des facteurs de variation liés à l'environnement (régime alimentaire riche en fibre, régime alimentaire contaminé par DON et stress thermique) sur la composition du microbiote fécal seront décrits.

1.1. Quelle part de variabilité du microbiote est expliquée par les facteurs de variation ?

La thèse s'est appuyée sur trois dispositifs expérimentaux comprenant à la fois des facteurs animaux (type génétique, âge) et environnementaux (régime alimentaire, climat).

L'analyse de variance en composantes principales permet d'estimer la part de variance expliquée par l'ensemble des facteurs contrôlés dans les différents dispositifs expérimentaux. Cette décomposition est présentée dans la Figure IV-1. Les facteurs sont classés de manière croissante selon leur capacité à expliquer la variabilité des jeux de données.

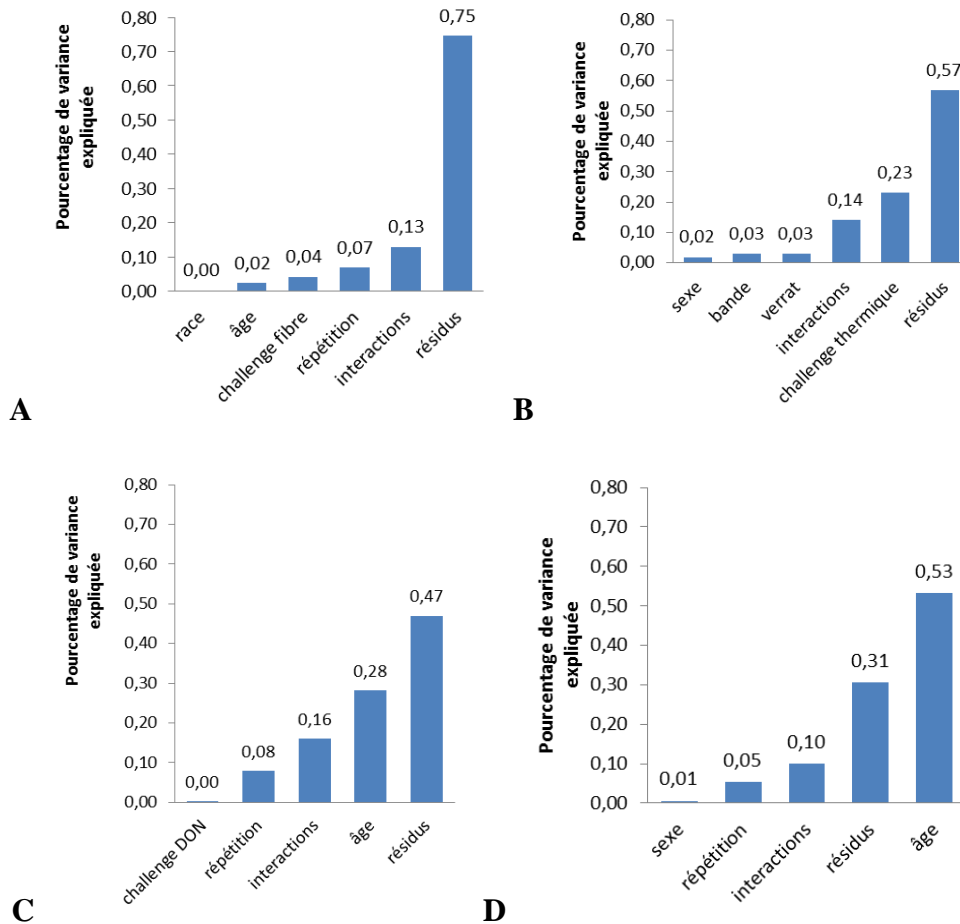


Figure IV-1 : Pourcentage de variabilité de la table d'abondance d'OTU attribuée par analyse de variance en composantes principales aux facteurs de variation étudiés dans les essais 1 (A), 2 (B) et 3 (C et D), en incluant les interactions entre ces différents facteurs.

Dans l'essai 1, les effets testés sont la race (n=3), la répétition (n=2), l'âge (n=4) et le challenge alimentaire comparant un aliment standard à un aliment riche en fibre (« challenge fibre »).

Dans l'essai 2, les effets testés sont le verrat (n=10), la bande (n=12), le sexe (n=2) et le challenge thermique comprenant un environnement tempéré avant et après un stress thermique aigu de 3 semaines et un environnement tropical.

Dans l'essai 3, les effets testés sont la répétition (n=2), le sexe (n=2), l'âge (n=4) et le challenge alimentaire comparant un aliment non contaminé à un aliment contaminé par DON (« challenge DON »). La figure C est établie à partir des données des femelles en finition entre 99 et 154 jours d'âge. La figure D est établie à partir des données des femelles et des mâles castrés à 99 et 154 jours d'âge.

D'après les essais de cette thèse, l'effet sexe semble moins impacter la composition du microbiote fécal que l'effet du stress thermique ou de l'âge. Étonnamment dans l'essai 3, l'effet de l'ingestion d'un régime alimentaire contaminé par DON n'explique qu'une très faible part de la variabilité selon l'analyse de variance (Figure IV-1 C). Cette variabilité est dominée par l'effet de l'âge, rendant compte de l'évolution de la composition du microbiote entre 13 et 22 semaines d'âge. Dans l'essai 1, le type génétique des porcs n'explique qu'une très faible part de la variabilité de la composition microbienne (Figure IV-1 A). Cette hiérarchie des facteurs de variation est retrouvée dans les analyses discriminantes appliquées à un effet race : comme décrit dans l'article 1, il n'est plus possible de discriminer cet effet type génétique dès lors que les animaux ont reçu un régime riche en fibres. L'impact du régime semble supplanter l'effet de la race qui n'est alors pas durable. Étant donné que le régime alimentaire modifie directement le substrat disponible pour la croissance des bactéries, les conditions de pH et le transit, l'impact de ce facteur sur la composition bactérienne est direct (Spiller et al., 1986; Le Goff et al., 2002; Ngoc et al., 2012; Kashyap et al., 2013). En comparaison, la race aurait un effet moins direct ce qui pourrait expliquer la hiérarchie observée entre ces deux facteurs. De même, le stress thermique impacte fortement la quantité d'aliment ingérée, elle-même ayant des répercussions directes sur la composition microbienne intestinale. En comparaison, l'effet génétique du père sur la composition du microbiote est plus faible. Peu d'études comparent la composition microbienne fécale de différents types génétiques porcins au sein d'un même dispositif expérimental. Ceci sera développé dans la suite de ce manuscrit.

1.2. Effet du type génétique sur la composition du microbiote

L'essai 1 est basé sur l'utilisation de porcs Large White, Duroc et Piétrain dans un essai de digestibilité. Les animaux issus des trois races représentées dans l'essai sont originaires de trois élevages de sélection différents. Dans une première approximation, il est alors difficile de distinguer un effet « race » d'un effet « élevage d'origine ». Cependant, tous les animaux sont élevés dans les mêmes conditions (même aliment, une seule salle) en ferme expérimentale dès le sevrage (4 semaines d'âge) et jusqu'à 13 semaines d'âge. On peut alors faire l'hypothèse que les différences dues à l'environnement d'élevage d'origine sont négligeables comparées à un effet de la race.

La comparaison par GLM (paquet edgeR) des abondances relatives des OTU inter-races met en évidence des différences significatives malgré le nombre de tests (correction FDR). Les effectifs d'OTU différentiellement abondantes entre deux races sont présentés dans la Figure IV-2 A. L'abondance de 1 569 OTU (soit 56% des OTU présents dans le jeu de données) est significativement impactée par un effet race. Cet effet race pourrait être lié à une sélection conjointe entre l'hôte et son microbiote. Cette hypothèse est notamment reprise chez le porc pour expliquer les modifications dans la composition du microbiote lorsqu'une sélection divergente pour améliorer l'EA est mise en place (Vigors et al., 2016a; Tan et al., 2017) (cf. partie I-2.1). Une co-sélection entre l'hôte et son microbiote suppose que les abondances bactériennes soient hérissables. En accord avec cette hypothèse, Estelle et al. (2016) ont calculé des hérissabilités modérées à élevées pour l'abondance relative de communautés bactériennes à l'échelle des genres, parmi lesquelles *Blautia* ($h^2 = 0,24$), *Lactobacillus* ($h^2 = 0,18$), *Prevotella* ($h^2 = 0,37$) et *Ruminococcus* ($h^2 = 0,55$). Ces genres (correspondant respectivement aux familles *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Prevotellaceae* et *Ruminococcaceae*) sont représentés parmi les OTU spécifiques des races Large White, Duroc et Piétrain dans notre essai (Figure IV-2 B). Lorsque les races sont comparées deux à deux dans cet essai, l'analyse par GLM identifie 411 OTU différentiellement abondantes entre les porcs Large White et les porcs des deux autres races (Duroc et Piétrain). De même, les abondances de 198 OTU diffèrent entre les porcs Duroc et les porcs des deux autres races (Large White et Piétrain) et les abondances de 96 OTU diffèrent entre les porcs Piétrain et les porcs des deux autres races (Large White et Duroc). Ceci laisse supposer que le choix des critères de sélection (critères pour les lignées maternelles tels que la taille et le poids de portée, le nombre de tétines fonctionnelles etc. ou pour les lignées paternelles tels que le gain de poids, l'EA, la composition de carcasse etc.) pourrait influencer la composition du microbiote. Cette hypothèse est purement spéculative et mériterait d'être testée dans des travaux approfondis.

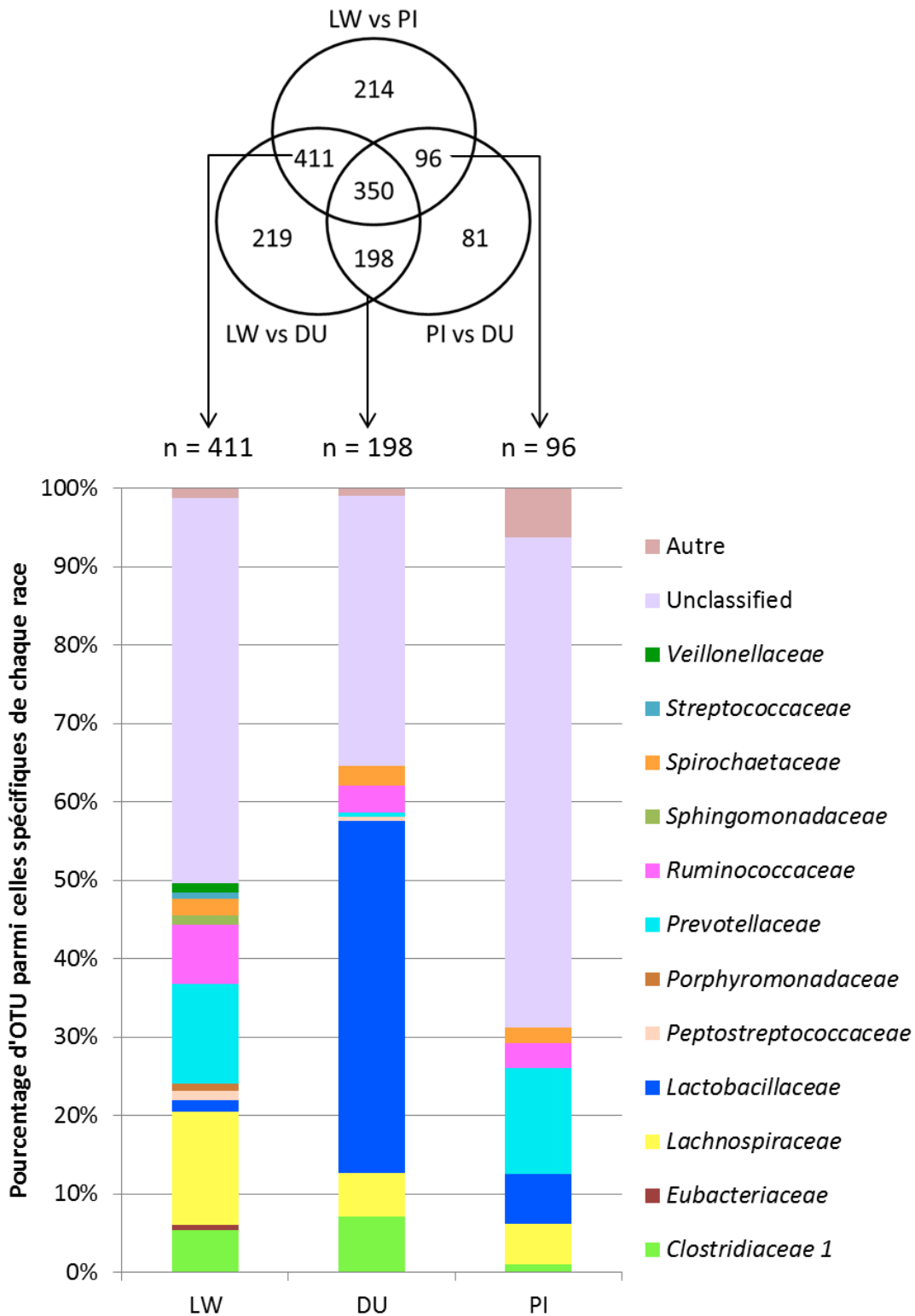


Figure IV-2 : OTU différentiellement abondantes entre les Large White (LW), Piétrain (PI) et Duroc (DU).

Les effectifs d'OTU différentiellement abondants entre deux races sont présentés dans le diagramme venn. Le diagramme en barres représente la répartition taxonomique par famille bactérienne des OTU différentielles spécifiques à chaque race.

1.3. Effet de l'âge sur la composition du microbiote fécal

L'étude longitudinale de la composition microbienne à travers les trois essais de cette thèse confirme l'impact de l'âge sur le microbiote décrit dans la partie bibliographique de ce manuscrit (partie I-1.2.2.1). Cet impact se retrouve à la fois sur la diversité microbienne et sur les abondances relatives des bactéries. Ces deux points seront détaillés dans cette partie.

La diversité microbienne, évaluée à l'aide d'indices de richesse et de Shannon, augmente entre 7 et 13 semaines d'âge puis se stabilise entre 13 et 22 semaines d'âge (Figure IV-3). Ce résultat est en accord avec ceux précédemment obtenus chez le porc (Zhao et al., 2015; Han et al., 2018). Une richesse microbienne stable à partir de 13 semaines d'âge pourrait signifier qu'aucune nouvelle bactérie ne serait en mesure de coloniser le tube digestif au cours de la phase de finition. En effet, une augmentation de la richesse microbienne suppose une colonisation par de nouvelles bactéries provenant de l'environnement immédiat de l'animal (congénères, milieu ambiant, aliment). D'après la littérature, un des premiers facteurs de variation de la composition microbienne intestinale est la conduite alimentaire (quantité, composition, transitions, etc.) (Durmic et al., 1998; Haenen et al., 2013b; Heinritz et al., 2016b; Tilocca et al., 2017) (cf. partie I-1.2.3.1). Cependant, les résultats disponibles dans la littérature suggèrent qu'au-delà de 6 semaines d'âge, la diversité (estimée via le nombre d'OTU et l'indice de Shannon) n'est pas impactée sur le long terme par la variation de la composition du régime chez le porc (Haenen et al., 2013b; Sun et al., 2015; Sun et al., 2016; Verschuren et al., 2018). Les résultats de l'essai 1 (comportant des alternances de transitions alimentaires entre un aliment témoin et un aliment enrichi en fibres) confirment ces observations (Figure IV-3). Il semble donc que la diversité du microbiote soit déjà établie avant 13 semaines d'âge. L'augmentation du nombre d'OTU observée entre la 7^{ème} et la 13^{ème} semaine d'âge dans l'essai 3 semble confirmer une stabilisation précoce de la diversité du microbiote. Une part de la richesse microbienne pourrait être acquise lors des phases de transition au moment du sevrage ou à l'entrée en engraissement qui se traduisent souvent par des changements d'alimentation ou des mélanges d'animaux. En effet, de précédentes études ont démontré que le microbiote intestinal de porcs logés dans une même case a tendance à s'homogénéiser (Thompson et al., 2008; H. Yang et al., 2017). Dans le cadre de l'essai 3, les porcs sont déplacés et mélangés entre le premier prélèvement fécal à 7 semaines et le second réalisé à 13 semaines. Ces changements auraient alors pu participer à l'augmentation de la diversité (richesse et indice de Shannon). Cependant, les analyses réalisées au cours de ce

travail de thèse ne permettent pas d'identifier précisément les processus à l'origine de la diversification du microbiote (origine des bactéries, cinétique de colonisation, etc.). Une étude approfondie de la cinétique d'augmentation de la diversité permettrait de comprendre comment et quand les porcs acquièrent un microbiote stable.

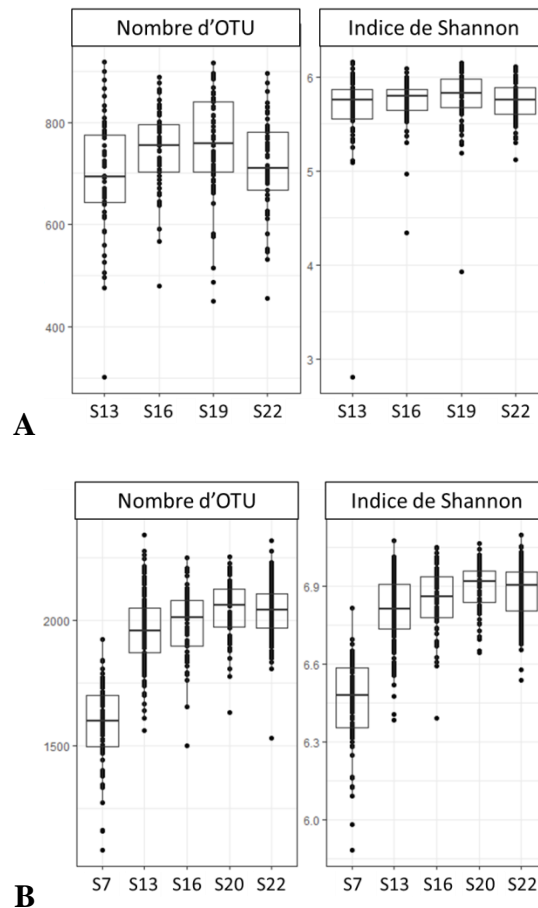


Figure IV-3: Evolution de la diversité microbienne fécale en fonction de l'âge entre les semaines 7 et 22 dans les essais 1 (A) et 3 (B).

Ces indices sont établis sur des tables d'OTU raréfiées à 5 000 séquences par échantillon.

La Figure IV-3 permet une comparaison de la diversité du microbiote entre les essais 1 et 3. D'un point de vue quantitatif, en l'absence d'un témoin interne ajouté dans les échantillons avant le séquençage comme proposé par Venkataraman et al. (2018), il est difficile de comparer quantitativement les compositions microbiennes inter-essais. En effet, les méthodes d'extraction, amplification puis séquençage de l'ADN peuvent introduire des biais sur le nombre de séquences. Cependant, ces biais peuvent difficilement expliquer que l'indice de richesse observé dans l'essai 3 soit environ 2,7 fois plus élevé que dans l'essai 1 sur des porcs

entre 13 et 22 semaines d'âge pour une même profondeur de séquençage (Figure IV-3). Quelques éléments d'explication de cette variabilité de la diversité microbienne pourraient provenir de facteurs environnementaux liés aux logements des animaux et notamment au niveau sanitaire des élevages (Inman et al., 2010). Cet auteur montre qu'un haut statut sanitaire (comme c'est le cas des élevages de sélection dont sont issus les porcs de l'essai 1) réduit la richesse du microbiote des porcs. Ceci pourrait en partie expliquer la plus faible richesse bactérienne des porcs de l'essai 1 par comparaison aux porcs de l'essai 3 issus de l'élevage expérimental à statut sanitaire standard. De plus, les porcs de l'essai 1 étaient logés individuellement dans des cages de digestibilité pour l'expérimentation et avaient un contact limité avec leurs congénères (notamment pendant les périodes de collecte de fèces). Par conséquent, les transferts de microbiote d'un individu à un autre ont pu être limités ce qui pourrait en partie expliquer la richesse microbienne plus faible dans l'essai 1. Au contraire, les animaux de l'essai 3 étaient logés en grands groupes (80 porcs) ce qui a pu favoriser les transferts de microbiote.

Outre la diversité, la composition du microbiote fécal évolue avec l'âge. De manière concomitante avec l'évolution de la richesse microbienne, une évolution majeure de l'abondance relative des OTU est observée entre 7 et 13 semaines d'âge en accord avec les résultats rapportés par Niu et al. (2015) sur des porcs entre 4 et 12 semaines d'âge (cf. partie I-1.2.2.1). Cependant, de précédentes études ont montré que la composition du microbiote semble continuer à évoluer légèrement au-delà de 10 semaines d'âge (Kim et al., 2011; Han et al., 2018). Cette évolution est visible dans l'essai 3 via l'étude de la composition microbienne fécale des porcs témoins entre 13 et 22 semaines d'âge. Parmi les genres les plus impactés, les abondances relatives en *Prevotella* et *Blautia* diminuent tandis que celles en *Clostridium sensu stricto* augmentent (Figure IV-4). Le protocole de l'essai 1 ne permet pas d'étudier cette évolution en finition. En effet, tous les animaux ont reçu l'un ou l'autre des régimes test. Aucun groupe témoin (alimenté avec un seul aliment pendant toute la période expérimentale) n'était présent pour évaluer l'effet de l'âge sur l'évolution de la composition du microbiote, ce qui aurait permis de distinguer la part de variabilité du microbiote due à l'âge de celle due aux transitions alimentaires. En complément de cet essai 1, il pourrait être intéressant de comparer l'évolution de la composition fécale d'individus témoins avec l'évolution de la composition fécale de contemporains exposés à une ou plusieurs transitions alimentaires. De retour à un régime témoin après plusieurs transitions, retrouve-t-on la même composition microbienne ?

A partir de combien de transitions l'évolution est durablement perturbée ? Ces deux questions mériteraient d'être traitées dans des essais complémentaires.

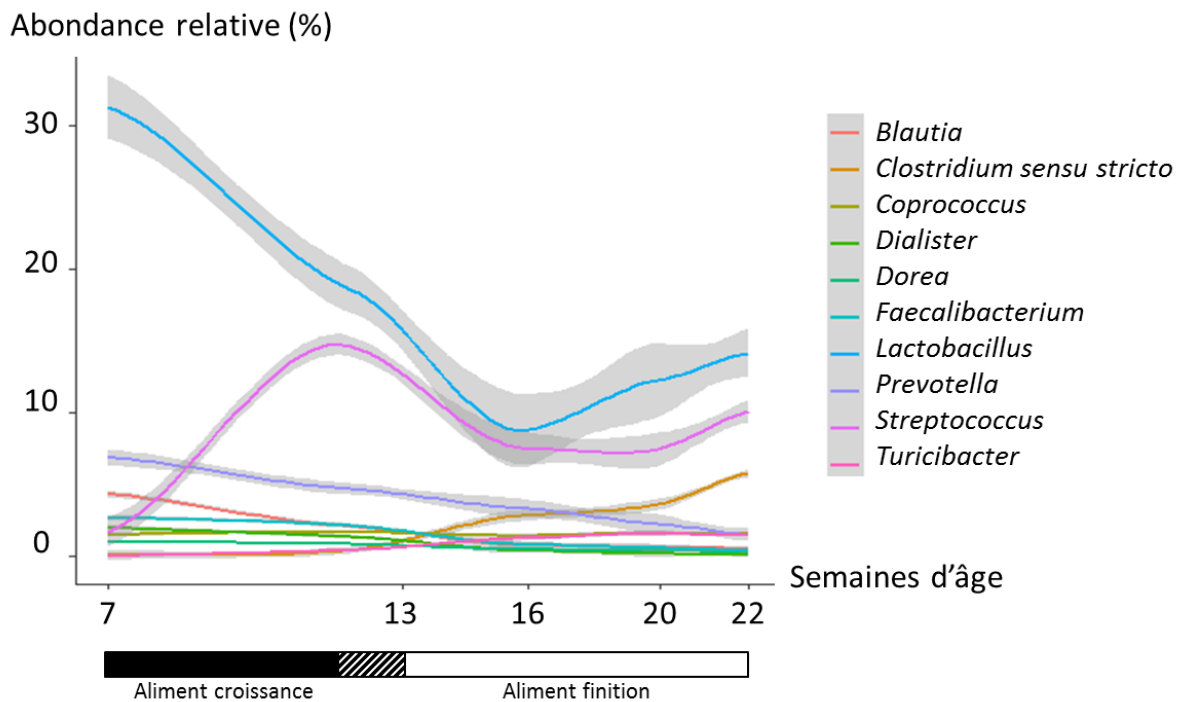


Figure IV-4 : Evolution de la composition du microbiote fécal à l'échelle du genre suivant l'âge entre les semaines 13 et 22 dans l'essai 3.

1.4. Variations à court et long termes face aux perturbations environnementales

Parmi les facteurs environnementaux affectant la composition microbienne fécale, ce travail de thèse a permis d'étudier plus particulièrement l'impact d'un enrichissement en fibres dans la ration, de la contamination alimentaire avec DON et des conditions climatiques.

A court terme, les perturbations environnementales analysées dans la thèse n'impactent pas la diversité microbienne fécale, déjà stabilisée à l'âge où les prélèvements de fèces ont été réalisés (à partir de 13 semaines d'âge). En complément de ces études, il pourrait être intéressant d'évaluer l'impact de ces mêmes challenges sur des animaux plus jeunes, avant que la richesse microbienne maximale soit atteinte. En effet, il pourrait être envisageable que dans ces cas précis, les perturbations environnementales seraient susceptibles de faire varier l'enrichissement bactérien.

Deux facteurs environnementaux impactent significativement l'abondance relative de plus de 75% des OTU à court terme : la transition d'un régime standard à un régime riche en fibres ou inversement dans l'essai 1 (80% des OTU impactées) et la différence de climat (tempéré ou tropical) dans l'essai 2 (77% des OTU impactées). D'autres facteurs environnementaux semblent impacter significativement une plus faible proportion d'OTU : un stress thermique aigu dans l'essai 2 (11% des OTU impactées) et un challenge alimentaire avec un aliment contaminé à DON (entre 0,4 et 10% des OTU impactées suivant le lot de porcs testé). L'interprétation fonctionnelle de ces familles bactériennes au regard des facteurs de variation étudiés est développée dans la discussion des différents articles (cf. partie III). L'ensemble des bactéries présentes pourrait constituer une « réserve » de fonctions, chaque bactérie présentant des particularités fonctionnelles. La présence d'un ensemble de bactéries dans le tube digestif, y compris en petite quantité, permettrait alors une adaptation et une réactivité du microbiote lors de changements environnementaux.

Une des originalités des travaux de cette thèse a été d'étudier l'impact de challenges répétés au cours de la vie productive des porcs (notamment concernant l'impact des fibres et de l'aliment contaminé par des mycotoxines dans les essais 1 et 3) sur la composition du microbiote fécal. L'évolution de la composition du microbiote soumis à une perturbation est schématisée dans la Figure IV-6. En réponse à une perturbation extérieure (par exemple lors d'une transition alimentaire dans les essais 1 et 3), la composition du microbiote évolue en passant par différents états transitoires. Les travaux menés durant la thèse montrent que cette évolution dépend de la nature du challenge mais est peu sensible à la répétition de perturbations de même nature. Suite à une période de récupération, le microbiote peut retrouver une composition proche de celle de l'état initial : dans les essais 1 et 3, dans les 2 semaines suivant l'arrêt de la perturbation ou le retour à une situation alimentaire antérieure, les abondances de certaines OTU retrouvent leur situation initiale (cf. Figure 6 de l'article 1 et Figure IV-5). Cette « résilience » du microbiote face à une perturbation a été précédemment observée chez des hommes ayant reçu un traitement antibiotique ponctuel à l'amoxicilline (De La Cochetière et al., 2005) ou à la ciprofloxacine (Relman, 2012). Dans les 30 jours suivant l'arrêt du traitement à l'amoxicilline, le microbiote fécal a retrouvé 88% de sa composition initiale (De La Cochetière et al., 2005). Cependant, suite au traitement à la ciprofloxacine, la résilience du microbiote peut être incomplète : la composition microbienne se stabilise dans un état légèrement différent de l'état initial (Dethlefsen and Relman, 2011).

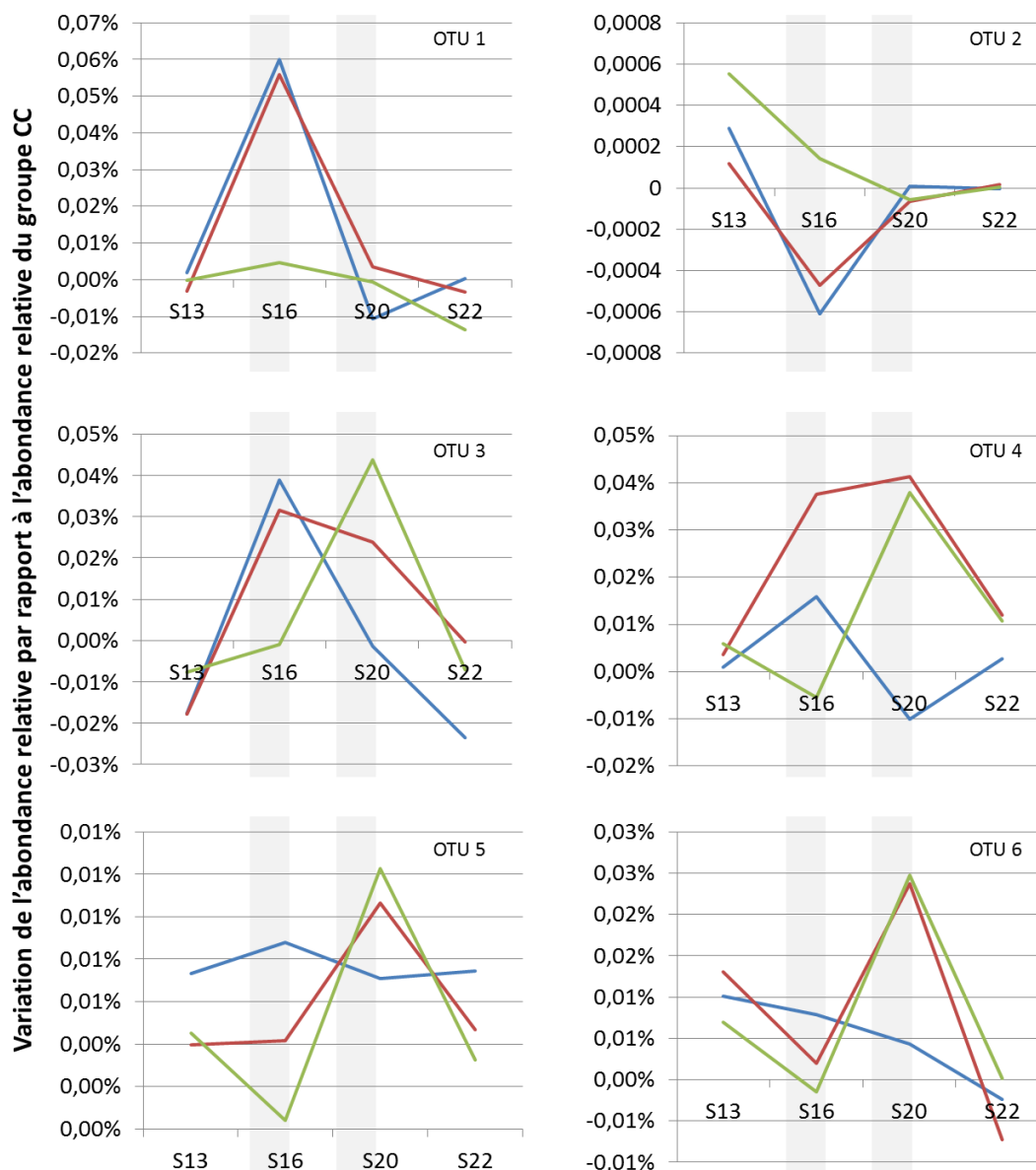
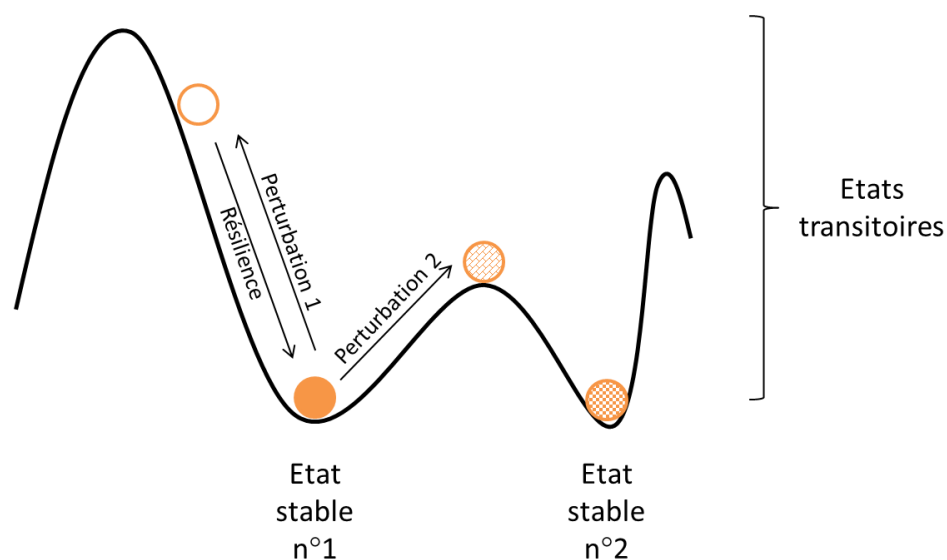


Figure IV-5 : Variations des abondances relatives d'OTU impactées par un challenge au déoxynivalénol (DON) entre 13 et 22 semaines d'âge (S13 et S22).

Les périodes de challenge sont représentées par des zones grisées. L'abondance relative de chaque OTU dans le groupe témoin (CC) a servi de référence pour le calcul des variations d'abondances relatives au sein des groupes expérimentaux : groupe DC (en bleu) ayant reçu l'aliment contaminé par DON durant la semaine 16 (S16), groupe CD (en vert) ayant reçu l'aliment contaminé par DON durant la semaine 20 (S20) et groupe DD (en rouge) ayant reçu l'aliment contaminé en S16 et S20.

Dans une analyse GLM, les abondances relatives des OTU 1 et 2 sont significativement impactées par le challenge DON en S16, les abondances relatives des OTU 3 et 4 sont significativement impactées par le challenge DON en S16 et S20, les abondances relatives des OTU 5 et 6 sont significativement impactées par le challenge en S20.



	Etat du microbiote	Exemple de la thèse	Exemple hypothétique
●	Stable	régime standard de l'essai 3	
●			composition stabilisée chez un animal recevant un aliment riche en fibres
○	En évolution	lors de l'arrêt de l'alimentation contaminée par des mycotoxines dans l'essai 3	
●		dans l'essai 1, 3 semaines après une transition alimentaire avec un aliment riche en fibres	

Figure IV-6 : Schéma de l'évolution d'une composition microbienne soumise à une perturbation.

Les variations d'abondance bactérienne peuvent être accentuées au point qu'une alternance d'absence/présence de certaines OTU soit observée comme c'est le cas lors des transitions alimentaires dans l'essai 1 (Figure III-6). Une bactérie considérée absente dans un séquençage n'est pas pour autant complètement absente du prélèvement initial. En effet, les méthodes d'extraction de l'ADN et de séquençage impactent la détection des bactéries. Suivant la profondeur de séquençage, certaines bactéries rares peuvent ne pas être détectées. Or, en pratique, une bactérie disparaît difficilement complètement du microbiote intestinal d'un individu. Il a ainsi été montré chez des souris qu'en l'absence de substrat adapté, au minimum deux générations successives sont nécessaires pour totalement supprimer une OTU du système digestif de l'hôte (Sonnenburg et al., 2016).

2. Le microbiote : un outil pour classer les animaux selon leur condition d'élevage ?

Dans l'ensemble des dispositifs expérimentaux utilisés durant la thèse, la composition du microbiote fécal est impactée par de nombreux facteurs environnementaux (alimentaires ou climatiques). Ces facteurs représentent jusqu'à 23% de la variabilité du jeu de données de microbiote (Figure IV-1). Grâce à cette variabilité, les abondances relatives des OTU peuvent alors être utilisées dans des modèles de prédiction permettant de classer les individus suivant leur exposition ou non à des perturbations environnementales.

Dans le cadre de cette thèse, des modèles discriminants ont été utilisés pour identifier dans le microbiote fécal des biomarqueurs permettant de classer les individus selon les différentes conditions d'élevage. Quel que soit le dispositif, la capacité des modèles à bien classer les individus a été évaluée par validation croisée. La Table IV-1 résume les résultats obtenus pour les modèles établis dans les essais 1, 2 et 3. Grâce à des étapes de sélection de variables, un nombre relativement réduit d'OTU (variant de 31 à 200 selon les modèles) permet de classer les individus selon leur environnement avec une très bonne précision (entre 0,2 et 16,3% d'erreur). Ces résultats suggèrent donc que certaines OTU peuvent servir de biomarqueurs pour classer les animaux selon leur environnement d'élevage ou leur type génétique. La variation d'abondance relative des OTU sélectionnées comme biomarqueurs pourrait être induite directement par le challenge testé ou plus indirectement par la variation de certains phénotypes liés aux variations des performances de l'hôte (ingestion, réponse immunitaire) en réponse à une perturbation environnementale. Cette relation indirecte pourrait notamment concerner les OTU biomarqueurs appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Clostridium* : les abondances relatives de ces deux genres semblent liées au niveau d'ingestion des porcs (Rist et al., 2012; Le Floch et al., 2014).

Table IV-1 : Synthèse des résultats des analyses sPLS-DA dans les différents dispositifs expérimentaux

Essai	1		2		3
	Race ¹ (régime standard)	Régime alimentaire ²	Conditions climatiques		Régime alimentaire ⁵
Facteur discriminé			Climat ³	Stress thermique aigu ⁴	
Nb. d'individus	32	229	1 057	1 052	134
OTU biomarqueurs					
Nb.	200	31	125	62	88
% du total	7,2	1,1	7,4	3,7	5,7
Erreur moyenne de classification (%)	13,9	3,9	0,2	7,1	16,3
Familles d'appartenance des biomarqueurs (% des OTU biomarqueurs)					
<i>Clostridiaceae 1</i>	-	12,5	-	8,5	4,6
<i>Clostridiales Incertae Sedis XII</i>	-	3,1	-	-	-
<i>Desulfovibrionaceae</i>	-	-	-	-	2,3
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-	-	-	3,4	-
<i>Lachnospiraceae</i>	14,5	-	3,3	13,6	4,6
<i>Lactobacillaceae</i>	21,8	-	4,1	6,8	-
<i>Peptostreptococcaceae</i>	3,4	3,1	1,6	1,7	1,1
<i>Prevotellaceae</i>	9,1	12,5	21,1	18,6	1,1
<i>Ruminococcaceae</i>	3,4	-	4,1	-	3,4
<i>Spirochaetaceae</i>	-	18,8	4,1	-	1,1
<i>Streptococcaceae</i>	-	-	1,6	-	11,5
<i>Succinivibrionaceae</i>	-	-	3,3	-	-
<i>Veillonellaceae</i>	-	-	0,8	-	3,4
Non identifiée	47,8	50,0	56,0	47,4	66,9

¹ Large White vs. Piétrain vs. Duroc. Le modèle de classification a été établi à partir des animaux témoins à 14 semaines d'âge (période 1).

² régime témoin vs. régime riche en fibre

³ porcs élevés dans des conditions tropicales vs. tempérées

⁴ porcs élevés dans des conditions tempérées à 23 semaines d'âge vs. porcs soumis à un challenge thermique de 30°C pendant 3 semaines à partir de 24 semaines d'âge.

⁵ régime témoin vs. régime contaminé avec du déoxynivalénol

Les familles *Prevotellaceae* et *Peptostreptococcaceae* sont retrouvées parmi les biomarqueurs dans tous les modèles de discrimination résumés dans la Table IV-1. De même, les *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae* et *Spirochaetaceae* correspondent à des biomarqueurs dans au moins trois des modèles (Table IV-1). Logiquement, ces populations font partie de celles identifiées dans les analyses descriptives de la composition du microbiote en réponse à une perturbation environnementale. Même si la mise en évidence de ces OTU biomarqueurs peut être interprétée d'un point de vue biologique, ces conclusions doivent être pondérées par le fait qu'entre 47 et 67% des OTU sélectionnées dans les modèles ne sont pas identifiées taxonomiquement à l'échelle de la famille. Par ailleurs, les principales familles représentées par ces biomarqueurs sont les généralement aussi familles les plus abondantes dans le microbiote porcin. Par exemple, les *Prevotella* (appartenant aux *Prevotellaceae*) constituent 26% des séquences présentes dans le microbiote fécal porcin à 93 jours d'âge (Han et al., 2018). De même, les *Clostridia* (appartenant aux *Clostridiaceae*) constituent 12% des séquences présentes. La probabilité d'utiliser une OTU appartenant à ces familles pour discriminer un facteur est donc logiquement plus élevée comparativement à des familles rares.

Les modèles prédictifs sont établis à l'échelle de l'OTU. A partir de ces biomarqueurs qui ne représentent qu'une faible proportion des bactéries constituant une famille bactérienne donnée, il n'est donc pas possible de généraliser la capacité prédictive de l'abondance de cette famille. Une alternative serait d'établir les modèles à partir des abondances relatives des familles. Cependant, comme décrit précédemment, l'absence d'assignation taxonomique à l'échelle du genre ou de la famille pour de nombreuses OTU réduit énormément la quantité d'information utilisable pour établir les modèles de prédiction. Cette option a été testée dans ce travail de thèse. L'utilisation de l'abondance relative des familles ou des genres comme variables explicatives dans les modèles de classification a augmenté très significativement les erreurs de classification et détérioré la capacité prédictive des modèles.

Bien que la fonctionnalité biologique des OTU biomarqueurs ne soit pas systématiquement connue, l'identification de ces OTU permet alors d'orienter les recherches fonctionnelles sur certaines OTU qui semblent présenter une capacité d'adaptation vis-à-vis d'un facteur environnemental. Cette interprétation fonctionnelle de quelques OTU biomarqueurs doit être réalisée avec précaution. En effet, la sélection de biomarqueurs ne signifie pas que seules ces OTU peuvent jouer un rôle fonctionnel dans le cadre de la

discrimination des facteurs. Il pourrait aussi être envisageable que la fonction de ces OTU ne puisse s'exprimer qu'en relation avec d'autres OTU, non sélectionnées lors de la construction des modèles de prédiction. L'information fonctionnelle fournie par les biomarqueurs n'est peut-être pas suffisante pour interpréter les fonctions biologiques reliant un facteur environnemental à la composition microbienne.

3. Le microbiote : un outil pour prédire des performances de l'hôte ?

Le microbiote fécal permet une bonne discrimination des porcs suivant les facteurs environnementaux auxquels ils ont été exposés. Cependant, ces facteurs de variation contrôlés dans les dispositifs expérimentaux ne représentent qu'une part réduite de la variance expliquée par les modèles. Dans l'essai 1, une très large majorité de la variabilité (75%) n'est pas expliquée par les facteurs connus (régime alimentaire, répétition, période et race) (Figure IV-1 A). De même, 57% de la variabilité dans l'essai 2 n'est pas expliquée par le stress thermique, le sexe, le verrat père ou la bande (Figure IV-1 B). Cette proportion descend à 30% dans l'essai 3 dû à un effet âge prédominant (Figure IV-1 D). La forte proportion des résidus pourrait provenir du modèle utilisé pour estimer la variance. En effet, même si les méthodes de normalisation des données de microbiote permettent de s'approcher d'une distribution normale, en pratique, il est probable que cette loi de distribution ne corresponde pas à certaines OTU. Une part de la variabilité résiduelle pourrait également provenir de la difficulté à standardiser les conditions de prélèvements de fèces d'un individu à l'autre, surtout lorsque les prélèvements sont collectés sur un grand nombre d'animaux. Par exemple, le temps entre le dernier repas et le prélèvement fécal n'a pas pu être contrôlé dans les essais de cette thèse. Par ailleurs, une part de la variabilité inexpliquée pourrait provenir de variations induites par les conséquences indirectes des différentes perturbations environnementales sur les porcs : modification des niveaux d'ingestion, modification de la réponse immunitaire, etc. Enfin, il est aussi probable qu'une part de la variance non expliquée soit liée à un effet de l'animal. Il existe une variabilité individuelle qui se traduit par une composition microbienne unique pour chaque individu au sein d'une même race, d'un même sexe et ayant le même âge (Pedersen et al., 2013). De la même manière, il existe aussi une forte variabilité inter-individuelle pour les performances de croissance ou d'alimentation de l'hôte. En pratique, cela pourrait permettre d'envisager d'utiliser la composition microbienne

comme prédicteur d'un phénotype d'intérêt économique. Ceci suppose une dépendance mathématique entre les données de composition du microbiote et les performances de l'hôte obtenues sur un même individu.

3.1. Corrélation entre la composition microbienne et les phénotypes de l'hôte

L'analyse conjointe entre les performances des animaux relatives à l'EA et les abondances des OTU a établi des corrélations de Pearson significatives entre les phénotypes et les données microbiennes. Les résultats de l'essai 1 représentant des corrélations avec les coefficients d'utilisation digestive (CUD) de différents nutriments sont présentés dans la Figure II-10 ainsi que dans l'article 1. Les résultats de l'essai 2 représentant des corrélations avec l'indice de consommation (IC) et la consommation moyenne journalière (CMJ) sont présentés dans la Figure IV-7. Des similitudes peuvent être observées entre les deux essais, notamment dans la représentation de certaines grandes familles. Ainsi, dans l'essai 1, des OTU appartenant aux *Lactobacillaceae* sont corrélées positivement aux caractères en relation avec la composante digestive de l'EA (CUD de l'azote et de l'énergie). De manière similaire dans l'essai 2, des OTU appartenant aux *Lactobacillaceae* sont également corrélées négativement à l'IC et donc corrélées positivement à l'EA. A l'inverse, des OTU appartenant aux familles *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* sont corrélées négativement avec les CUD dans l'essai 1 et positivement avec l'IC dans l'essai 2, ce qui concourt à une dégradation de l'EA. Bien que des grandes familles semblent être représentées parmi les OTU corrélées avec l'EA, il n'est pas possible de conclure directement à une corrélation entre l'abondance de la famille et l'EA. En effet, une partie des OTU d'une famille bactérienne donnée peut être corrélée positivement avec l'EA tandis que d'autres OTU de cette même famille sont corrélées négativement avec l'EA. Il est donc préférable d'observer les corrélations à une échelle taxonomique plus fine. Par exemple, dans l'essai 1, parmi les OTU appartenant à la famille *Prevotellaceae*, toutes celles appartenant au genre *Prevotella* sont négativement corrélées aux CUD. Celles positivement corrélées sont de genre indéterminé. On peut donc supposer que ces dernières appartiennent à un genre différent, avec des propriétés différentes des *Prevotella* vis-à-vis de l'EA de l'hôte.

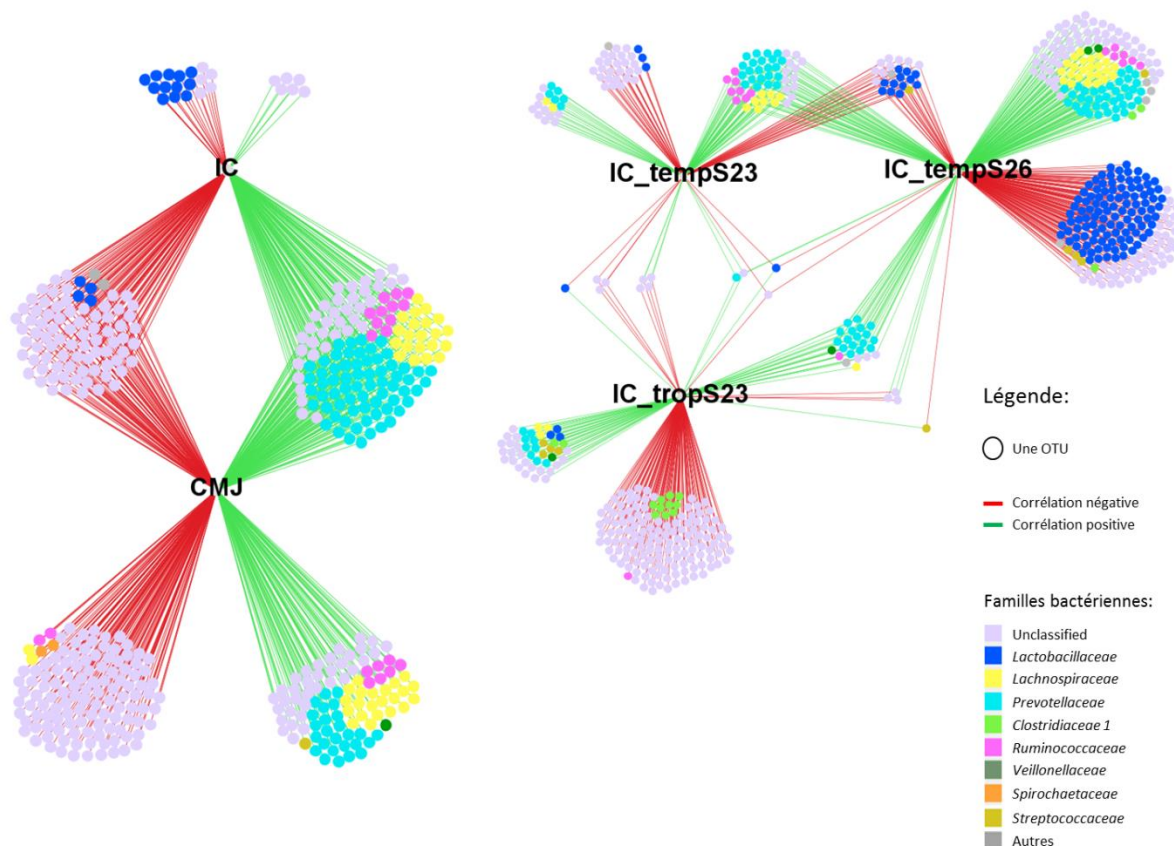


Figure IV-7 : Corrélations de Pearson significatives entre l'abondance d'OTU et l'indice de consommation (IC) ou la consommation moyenne journalière (CMJ) dans l'essai 2.

L'IC et la CMJ ont été calculés sur la base des mesures collectées entre 11 et 23 semaines d'âge. Les corrélations avec l'IC et la CMJ sont établies à partir de tous les échantillons de l'essai 2. Les corrélations avec l'IC_tempS23, l'IC_tempS26 et l'IC_tropS23 sont établies avec les échantillons issus d'animaux élevés en élevage tempéré et ayant 23 semaines d'âge au moment du prélèvement, élevés en milieu tempéré et ayant 26 semaines d'âge, ou élevés en milieu tropical et ayant 23 semaines d'âge, respectivement.

Les corrélations significatives observées ne signifient pas qu'il existe un lien de causalité. Bien que des éléments de la littérature tendent à montrer que certaines familles bactériennes retrouvées dans les essais favorisent ou détériorent la santé digestive (Q. Yang et al., 2017; C.S. Cheng et al., 2018) (cf. partie III-1.5.4), il n'est pas possible de conclure sur cette causalité et de la généraliser à l'ensemble des conditions environnementales. En effet, suivant l'environnement d'élevage ou suivant le climat, les résultats peuvent être différents. Ceci est confirmé dans l'essai 2 : la majorité des OTU négativement corrélées à l'IC en environnement tempéré suite à un stress thermique aigu (noté TEMPS26 sur la Figure IV-7) appartiennent à

la famille *Lactobacillaceae* alors qu'aucune OTU de cette famille n'est négativement corrélée à l'IC en environnement tropical (noté TROPS23). Il semble donc que les relations entre le microbiote et les performances de l'hôte soit fortement dépendantes de l'environnement dans lequel les animaux sont élevés.

Bien que significatives d'un point de vue statistique, les corrélations observées entre l'abondance relative d'une OTU et les performances de l'hôte restent faibles. Dans l'essai 1, elles ne dépassent pas 0,45. Dans l'essai 2 le maximum de corrélation observé est de 0,25. Lorsque les analyses sont réalisées à l'échelle du genre ou de la famille, les corrélations ne sont pas plus élevées. Par exemple, dans l'essai 2, le coefficient de corrélation entre la CMJ résiduelle entre 11 et 23 semaines en élevage tempéré et l'abondance relative des *Lactobacillaceae* est de -0,23. Seule cette famille est corrélée significativement avec ce phénotype. De même, à l'échelle des genres, seule l'abondance en *Lactobacillus* est corrélée avec la CMJ résiduelle et cette corrélation reste faible ($r = -0,17$). En conclusion, les corrélations entre un phénotype et une abondance bactérienne sont faibles quel que soit le niveau taxonomique bactérien étudié. Les limites de la mise en relation de compositions microbiennes avec des phénotypes ont déjà été soulignées par plusieurs études qui montrent que des changements de composition bactérienne restent sans impact sur les performances de l'hôte (Gunal et al., 2006; Pedroso et al., 2006; Geier et al., 2009; Mu et al., 2017). Par conséquent, une approche basée sur la mesure de liens mathématiques entre l'abondance bactérienne et les performances dans le but de comprendre les rôles fonctionnels du microbiote n'est peut-être pas la plus pertinente. Dans cette approche, la redondance fonctionnelle des bactéries n'est pas prise en compte. En effet, plusieurs bactéries remplissent le même rôle, notamment dans les fonctions principales associées à la fermentation des fibres indigestibles pour l'hôte, et donc associées à l'EA (Jandhyala et al., 2015; Eng and Borenstein, 2018). Il pourrait alors être plus pertinent de corréler directement les abondances des fonctions aux performances de l'hôte.

Dans l'essai 1, l'abondance de 122 KEGG Orthologues (KO) était corrélée aux coefficients de digestibilité de l'azote, l'énergie, la cellulose et l'hémicellulose, quel que soit le régime alimentaire reçu par les porcs. Ces KO correspondent aux voies métaboliques de base, notamment au métabolisme des acides aminés, de l'amidon et des glucides. Ceci confirme l'intérêt de corréler directement les abondances des fonctions aux phénotypes et en particulier à l'EA. Cependant, les coefficients de corrélation obtenus à partir des KO ne sont

pas plus élevés que ceux obtenus à partir des OTU. La Table IV-2 présente les fonctions biologiques corrélées à l'IC de porcs entre 11 et 23 semaines d'âge élevés en environnement tempéré (essai 2). Deux difficultés sont rencontrées dans l'étude des fonctions. Tout d'abord, seules 46% des séquences complètes d'Eucaryotes et Procaryotes sont associées à des fonctions (Kanehisa et al., 2016). Par ailleurs, comme les corrélations établies entre des familles et des phénotypes ne prennent pas en compte l'information des OTU non identifiées, les corrélations obtenues à partir des fonctions se base sur une quantité d'informations réduite. Par conséquent, il est possible qu'une part des fonctions participant à l'EA soit inconnue, ce qui biaise l'interprétation des corrélations observées. De plus, de nombreuses fonctions ont été identifiées à partir du génome humain, notamment en lien avec diverses maladies. C'est ainsi que des fonctions, telles que le cancer de la prostate, se retrouvent corrélées avec l'EA... L'interprétation des corrélations entre phénotype et abondance de fonctions biologique doit donc être réalisée avec précaution.

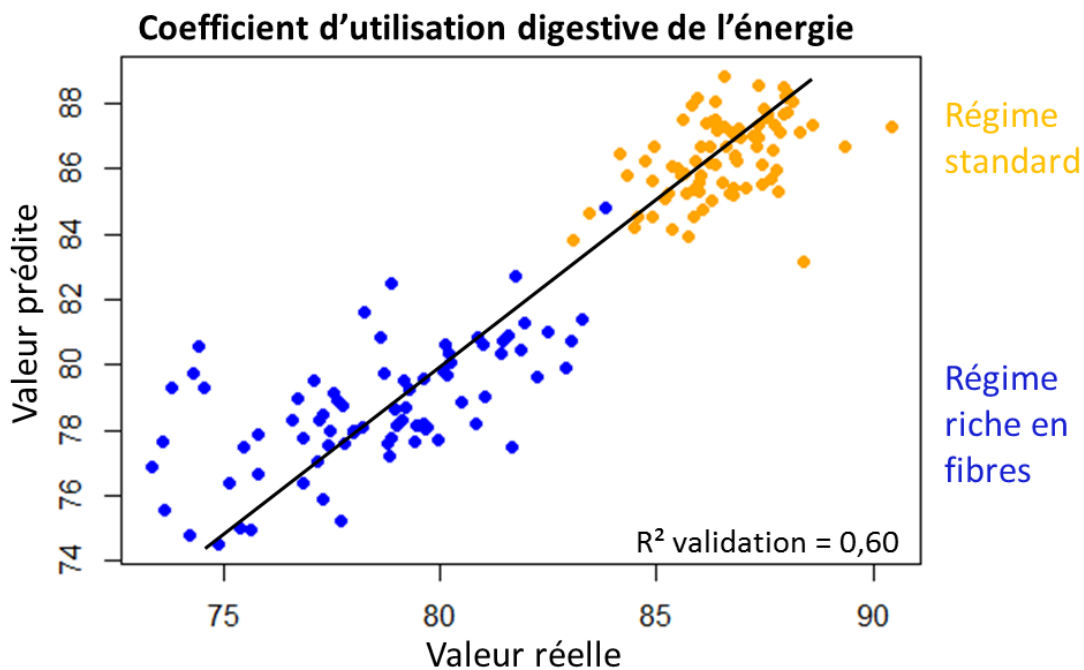
Table IV-2 : Fonctions biologiques issues de prélèvements de microbiote à 23 semaines d'âge corrélées significativement à l'indice de consommation de porcs entre 11 et 23 semaines d'âge élevés en environnement tempéré (essai 2).

Fonction biologique	Coefficient de corrélation de Pearson
Ubiquitin system	-0,21
Caprolactam degradation	-0,19
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	-0,17
Lipoic acid metabolism	-0,16
Drug metabolism - cytochrome P450	-0,16
Isoflavonoid biosynthesis	-0,15
Renal cell carcinoma	-0,15
Apoptosis	-0,15
Nucleotide metabolism	-0,13
Steroid hormone biosynthesis	0,13
Energy metabolism	0,13
Biotin metabolism	0,13
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	0,15
Biosynthesis of ansamycins	0,15
Nitrotoluene degradation	0,15
Arachidonic acid metabolism	0,15
NOD-like receptor signaling pathway	0,16
Prostate cancer	0,16
Proteasome	0,16
Antigen processing and presentation	0,16
Progesterone-mediated oocyte maturation	0,16
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	0,17
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	0,17
Cell division	0,18

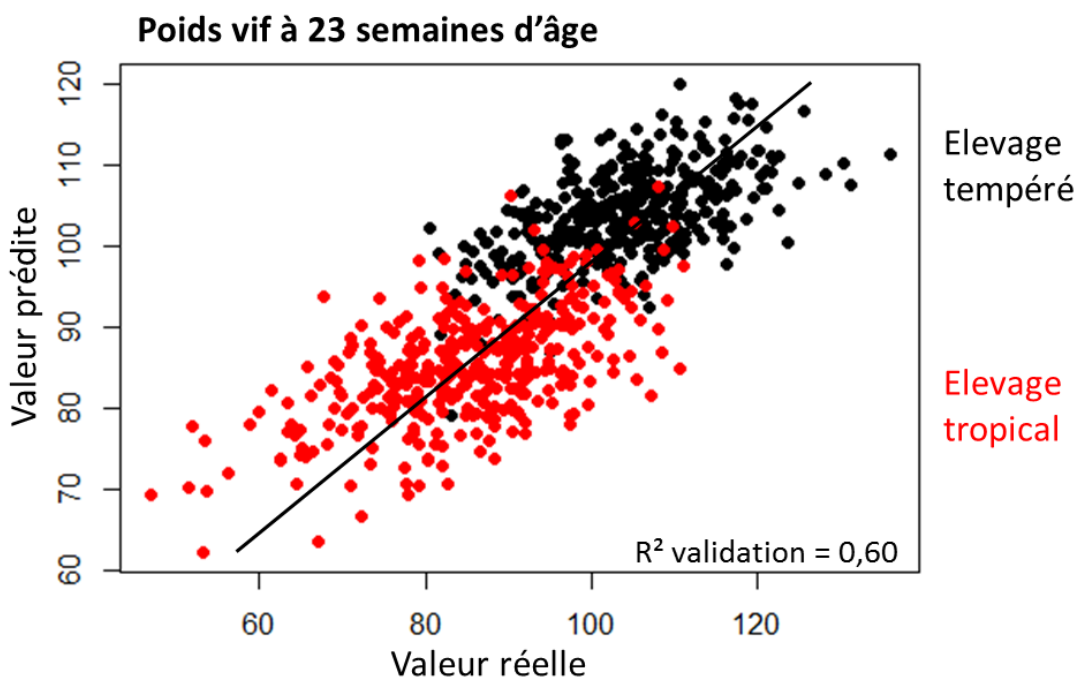
3.1. Prédiction quantitative des phénotypes

Des corrélations entre la composition du microbiote et les performances de l'hôte ont été identifiées. Bien que ces corrélations soient faibles, on peut supposer que chaque bactérie apporte une information différente. Des modèles prenant en compte les différentes OTU et leur covariance de manière additive pourraient alors prédire les performances quantitatives (notamment l'EA) à partir du microbiote.

Les données des essais 1 et 2 ont été utilisées pour construire des modèles de prédiction de la digestibilité de l'énergie et du poids vif à 23 semaines d'âge à partir de l'abondance relative des OTU à l'aide de régressions PLS. Les coefficients de validation R^2 des modèles de prédiction sont présentés dans la Figure IV-8 et s'élèvent à environ 0,6. Cependant, il s'avère que le jeu de données est fortement structuré par les facteurs environnementaux et notamment le régime alimentaire ou l'environnement d'élevage dans les deux dispositifs expérimentaux. Ces résultats démontrent l'importance de vérifier la structuration du jeu de données lors d'études prédictives quantitatives de phénotypes à partir de microbiote, en particulier lorsque des facteurs de variation de cette composition du microbiote sont identifiés. S'il est relativement aisé de « corriger » les données phénotypiques en lien avec les performances des animaux en utilisant la résiduelle d'un modèle qui ajuste linéairement les effets des facteurs contrôlés des dispositifs expérimentaux, cette opération est beaucoup plus difficile à réaliser sur les données microbiennes. De plus, à ma connaissance, il n'existe actuellement aucune méthode mathématique permettant cette correction à la fois sur le phénotype d'intérêt et la table d'OTU. Pour s'affranchir de cette structuration du jeu de données, les modèles de prédictions sont jusque-là établis pour chaque sous-ensemble de données correspondants aux modalités des facteurs environnementaux. Lorsque l'analyse est réalisée dans chaque sous-ensemble de données, aucune relation linéaire entre les valeurs réelles et prédites n'est observée. La subdivision du jeu de données entraîne une perte de puissance dans les modèles statistiques et il peut alors s'avérer difficile d'établir des liens entre les phénotypes et les abondances d'OTU. Cependant, dans l'essai 2, la subdivision du jeu de données conserve plus de 500 animaux par environnement d'élevage mais ne permet pas non plus d'établir des modèles de prédiction de performances pertinents (Table IV-3).



A



B

Figure IV-8 : Structuration d'un jeu de données par un facteur externe : exemples des essais 1 (A : prédiction de la valeur du coefficient d'utilisation digestive de l'énergie à partir du microbiote prélevé à 14, 17, 20 et 23 semaines d'âge) et 2 (B : prédiction du poids vif à 23 semaines à partir du microbiote prélevé à 23 semaines d'âge).

Les modèles de prédiction des phénotypes ont été établis par sPLS sur 70% des échantillons. Les 30% restants ont servi à valider les modèles. Le coefficient de détermination (R^2) est issu de cette validation.

Les résultats de prédiction par sPLS issus des essais 1 et 2 de cette thèse sont présentés dans la Table IV-3. La comparaison des résultats des modèles obtenus sur les jeux de données d'apprentissage aux résultats obtenus sur les jeux de validation indique un fort sur-apprentissage malgré une sélection des variables explicatives lors de la construction des modèles sPLS. En d'autres termes, il semble que les modèles de régression s'ajustent parfaitement aux données des jeux de calibration mais ne sont pas adaptés pour des échantillons extérieurs.

Table IV-3 : Résultats de prédiction par PLS de phénotypes liés à l'efficacité alimentaire dans les essais 1 et 2.

Essai	Phénotype prédit	Conditions environnementales	R ² apprentissage ¹	R ² validation
Essai 1	CUD énergie	Régime standard ²	0,43	0,12
		Régime riche en fibres	0,94	0,17
	CUD azote	Régime standard	0,38	0,06
		Régime riche en fibres	0,93	0,10
	CUD cellulose	Régime standard	0,48	0,17
		Régime riche en fibres	0,94	0,05
	CUD hémicellulose	Régime standard	0,36	0,03
		Régime riche en fibres	0,94	0,02
Essai 2	Poids vif 23 semaines	Elevage tempéré	0,58	0,05
		Elevage tropical	0,58	0,13
	CMJ 11-23 semaines	Elevage tempéré	0,54	0,10
		Elevage tropical	0,56	0,23
	IC 11-23 semaines	Elevage tempéré	0,54	0,06
		Elevage tropical	0,56	0,12
	GMQ 11-23 semaines	Elevage tempéré	0,59	0,14
		Elevage tropical	0,57	0,10

¹Pour chaque phénotype, dans chaque condition environnementale, le jeu de données est constitué de prédicteurs correspondant aux abondances des OTU et d'un phénotype à prédire. A partir de ces données, 70% des échantillons, choisis aléatoirement, sont utilisés comme jeu de données d'apprentissage pour construire le modèle de régression PLS. Les 30% restants servent de jeu de données de validation du modèle établi. Un coefficient de régression R² est obtenu par régression entre les valeurs observées et les valeurs prédites. Cette étape d'apprentissage-validation est répétée 100 fois. Les R² d'apprentissage et de validation présentés dans le tableau correspondent à la moyenne des R² obtenus lors des 100 itérations.

²Dans l'essai 1, dans le cas d'un régime standard, les OTU corrélées significativement au CUD sont utilisées pour construire le modèle de prédiction. Dans le cas du régime riche en fibres, aucune OTU n'est corrélée significativement aux CUD dont aucune sélection des OTU n'est effectuée.

Dans le cadre de la thèse, il est difficile de prédire les performances des porcs de plus de 13 semaines d'âge à partir de données d'abondance relative d'OTU. En particulier, les modèles de prédiction de l'EA développés dans l'article 4 montrent la difficulté à valider ces modèles à partir de jeux de données d'élevage (essai 3). Dans cet article, la capacité de prédiction de modèles de régression sPLS et Random Forest (RF) a été évaluée sur des jeux de données d'OTU fictifs. Ces modélisations ont établi que la sPLS permettait de construire des modèles valides de prédiction de l'EA dès lors qu'au moins une OTU était corrélée au-delà de 0,39 avec l'EA et qu'elle avait une abondance relative supérieure à 0,02%. De même, les modèles RF peuvent aussi établir des prédictions quantitatives de l'EA à partir d'OTU corrélées au-delà de 0,46.

L'article 4 de cette thèse, basé sur la construction d'OTU fictives, artificiellement corrélées avec l'EA, démontre la capacité de plusieurs méthodes de régression mathématiques à prédire l'EA. Pour chaque modèle de prédiction, une OTU fictive a été ajoutée au jeu de données réelles afin d'observer la capacité des méthodes à utiliser cette OTU pour améliorer les modèles de prédiction. Cependant, dans un jeu de données réel, une combinaison linéaire de plusieurs OTU faiblement corrélées avec l'EA pourrait contenir la même information que cette unique OTU. Ceci a fait l'objet d'une nouvelle modélisation. L'OTU réelle utilisée dans l'article 4 pour construire les OTU fictives a servi de référence dans cette nouvelle modélisation. Pour un individu donné, la valeur d'abondance de cette OTU a été divisée aléatoirement en 3 sous-abondances. Ces 3 sous-abondances sont attribuées à 3 OTU fictives (nommées A, B et C). Le même processus aléatoire est reproduit pour chaque individu. Il en résulte 3 OTU fictives dont la somme des abondances est égale à l'abondance de l'OTU de référence. Cependant, la corrélation de Pearson observée entre chacune de ces 3 nouvelles OTU fictives et l'EA est plus faible que pour l'OTU de référence (Table IV-4).

Table IV-4 : Corrélations de Pearson observées entre les OTU fictives et l'efficacité alimentaire (EA).

Objectif de corrélation OTU-EA		0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
Corrélation observée	OTU référence ¹	0,00	0,10	0,22	0,29	0,38	0,47	0,59	0,65	0,74	0,86	0,97
	OTU_A ²	0,02	0,12	0,00	0,34	0,14	0,21	0,45	0,32	0,35	0,49	0,46
	OTU_B	0,03	0,04	0,13	0,11	0,30	0,27	0,36	0,52	0,47	0,60	0,55
	OTU_C	0,00	0,02	0,24	0,07	0,24	0,36	0,21	0,33	0,48	0,52	0,56

¹L'OTU de référence correspond à une OTU réelle dont les valeurs d'abondance ont été réorganisées pour s'approcher de l'objectif de corrélation.

²Pour un individu donné, la valeur d'abondance de l'OTU de référence a été divisée aléatoirement en 3 sous-abondances. Ces 3 sous-abondances sont attribuées aux 3 OTU fictives. Le même processus aléatoire est reproduit pour chaque individu. Il en résulte 3 OTU fictives A, B et C dont la somme des abondances est égale à l'abondance de l'OTU de référence.

Pour rappel, avec l'OTU de référence, les modèles établis par sPLS présentent un R^2 de validation similaire au R^2 attendu d'après la valeur de corrélation de l'OTU (cf. partie III-4). Les modèles sont donc parfaitement validés. Dans cette nouvelle modélisation, les modèles établis à partir des 3 OTU fictives A, B et C sont moins bons que ceux établis avec l'OTU de référence (Figure IV-9), même si les trois OTU apportent la même information que celle de référence. Mathématiquement, une relation linéaire entre OTU ne suffit pas à apporter l'information nécessaire pour établir un modèle valide. L'information en relation avec l'EA contenue dans ces OTU semblerait trop « diluée » dans la quantité d'informations présente dans la table d'OTU. Les méthodes statistiques étudiées durant la thèse ne permettent pas d'extraire totalement l'information utile pour prédire l'EA. Il pourrait être intéressant d'étendre l'étude de la prédiction de phénotypes tels que l'EA à partir de données microbiennes à d'autres modèles statistiques tels que des modèles bayésiens qui cherchent à établir des lois de réponse sans a-priori sur la distribution initiale des données.

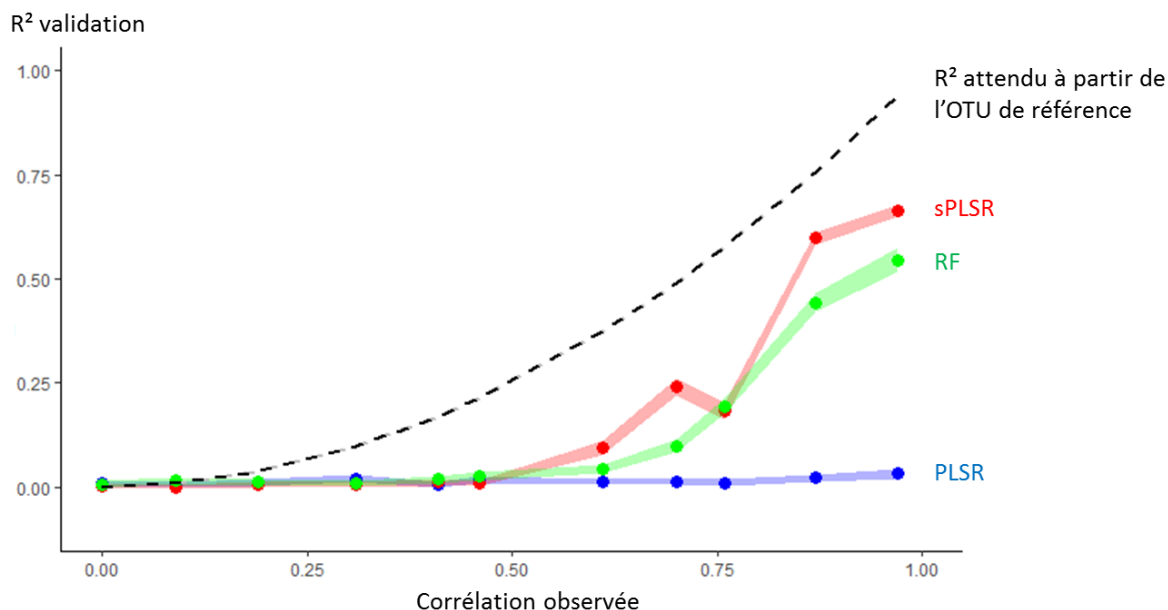


Figure IV-9 : Evaluation de la prédiction de l'efficacité alimentaire (EA) par la régression des moindres carrés partiels (PLSR), la sparse PLSR (sPLSR) et la régression en forêts aléatoires (RF) par le coefficient de détermination (R^2).

Le jeu de données de prédictors comprend l'ensemble des données d'abondance des OTU réelles et 3 OTU fictives A, B et C, corrélées avec l'EA. L'axe des abscisses représente la corrélation observée entre l'OTU de référence ayant servi à la construction des OTU A, B et C et l'EA.

Les modèles de prédiction des phénotypes ont été établis sur 70% des échantillons. Les 30% restants ont servi à valider les modèles. La répartition des échantillons entre les jeux de données d'apprentissage et de validation a été réalisée aléatoirement 100 fois et les trois méthodes de prédiction ont été appliquées à chaque itération. Les R^2 correspondent à la moyenne sur ces 100 itérations.

Outre la pertinence des modèles statistiques développés précédemment, différentes hypothèses peuvent être discutées afin d'expliquer l'incapacité à prédire des phénotypes d'intérêt chez le porc à partir de données de composition du microbiote :

- Une première hypothèse se base sur la redondance fonctionnelle du microbiote. Une modification de l'abondance relative des bactéries pourrait rester sans effet sur les performances de l'hôte, du fait de cette redondance fonctionnelle. A partir des fonctions connues à l'heure actuelle, il est difficile de corréler ou de prédire un phénotype à partir de données d'abondance fonctionnelles. Ceci est confirmé par l'essai 3 : aucune méthode de régression basée sur les abondances des fonctions microbiennes n'a permis de valider des modèles de prédiction de l'EA de porcs de 14 à 16 semaines d'âge à partir de la composition

du microbiote fécal à 14 semaines. Sur des jeux de données de validation, les coefficients de détermination obtenus avec des régressions des moindres carrés sans ou avec sélection de variables (PLSR ou sPLSR) ou des régressions en forêts aléatoires (RF) sont nuls.

- Une seconde hypothèse fait référence à la difficulté actuelle de corriger des données de microbiote pour des facteurs de variation qualitatifs connus (régime alimentaire, climat etc.) ou quantitatifs (niveau d'ingestion, poids initial etc.). La prise en compte de cette variabilité pourrait peut-être permettre d'améliorer la qualité des modèles de prédiction.

- Enfin, une dernière hypothèse remet en question la pertinence de l'utilisation du microbiote fécal pour prédire l'EA. En effet, la majeure partie des rôles du microbiote dans l'EA ont lieu plus en amont dans le tube digestif. Ainsi, le microbiote fécal serait trop éloigné des régions d'action du microbiote dans les performances de son hôte et ne refléterait pas totalement la composition microbienne agissant réellement sur ces performances. De plus, l'EA est un phénotype complexe, impliquant de nombreux éléments au niveau du métabolisme et de la santé de l'hôte. Cette complexité du phénotype « EA » pourrait expliquer le manque de lien mathématique entre l'EA et la composition microbienne. Il en résulte une réelle difficulté à prédire ce phénotype à partir de données d'abondance relative du microbiote.

4. Entérotypes

D'après les analyses menées durant cette thèse, il est difficile d'établir des relations qualitatives et quantitatives entre les abondances relatives d'OTU particulières et des performances de l'hôte. En effet, il est très probable qu'une variation d'abondance relative d'une OTU ou de la famille de bactéries associée ne se traduise pas par une modification de la fonction du microbiote du fait des phénomènes de redondance fonctionnelle. En effet, au sein d'un écosystème microbien, chaque microbe agit en interaction avec les autres et les conséquences fonctionnelles sur l'hôte sont la résultante de toutes ces actions conjointes. Les analyses à l'échelle des OTU peuvent difficilement prendre en compte toutes ces interactions et ceci pourrait donc expliquer notre incapacité à utiliser l'information « OTU » pour établir des prédictions.

Pour contourner ce problème, l'étude des écosystèmes microbiens intestinaux par la définition d'entérotypes pourrait être une solution. En effet, le travail sur des écosystèmes se

base sur l'identification de populations qui co-évoluent ou sur les phénomènes de co-exclusion. Un équilibre populationnel est alors établi ce qui aboutit à une communauté stable. Chaque entérotype correspond ainsi à une communauté bactérienne stable. A cet équilibre pourrait correspondre un phénotype particulier.

D'après la littérature, trois entérotypes ont été distingués chez l'homme (Arumugam et al., 2011) et deux chez des porcs de 60 jours d'âge (Mach et al., 2015; Ramayo-Caldas et al., 2016). Cependant, à partir des données des essais 2 et 3 de cette thèse, nous avons identifié d'autres entérotypes principalement caractérisés par leur abondance relative en *Lactobacillus*, *Turicibacter* et *Clostridium sensu stricto*. Ces résultats chez le porc en finition confirment ceux obtenus par Lu et al. (2018) sur des porcs de 16 et 28 semaines d'âge. De ces résultats sur des porcs d'âges différents, il semblerait que la composition des entérotypes chez le porc dépende de l'âge des animaux. Cette hypothèse a récemment été confirmée dans le projet Sevrobust mené au sein de PEGASE (INRA) auquel j'ai apporté mon expertise pour l'analyse des données. Dans cette étude, des fèces ont été collectés 2 jours avant sevrage (26 jours d'âge) et 5 jours après sevrage (33 jours d'âge) sur 196 porcelets Piétrain x (Large White x Landrace) mâles entiers issus de 16 fermes commerciales représentatives de la production porcine du Grand Ouest de la France. La composition microbienne fécale a permis d'identifier 4 entérotypes (SE1 à SE4) présents à la fois à 26 et à 33 jours, et différents de ceux identifiés en finition dans les essais 2 et 3. Après le sevrage, aucun entérotype n'a disparu, aucun n'est apparu. Les entérotypes ne semblent donc pas directement liés à la variation des conditions d'élevage, dont l'alimentation. De manière similaire, les différents entérotypes en finition (essais 2 et 3) ont été identifiés dans des élevages avec des environnements complètement différents (température, aliment, sexe, race...). Ceci confirme que des écosystèmes bactériens stables peuvent être identifiés indépendamment du type génétique, du sexe, de l'alimentation ou d'autres conditions environnementales mais qu'ils dépendent de l'âge de l'hôte.

Bien que des entérotypes distincts existent au sein d'une population d'individus, indépendamment de facteurs animaux ou environnementaux, les porcs ne restent pas figés dans l'un d'eux comme cela a été observé chez l'homme (Knights et al., 2014). En finition, jusqu'à 75% des porcs changent au moins une fois d'entérotype d'après les essais 2 et 3. De même dans l'essai Sevrobust, 76% des porcelets changent d'entérotype entre 26 et 33 jours d'âge et les porcs semblent évoluer graduellement de l'entérotype SE1 vers l'entérotype SE4 en passant par SE2 et SE3 (Figure IV-10 et Table IV-5). Une évolution entre entérotypes a été

montrée chez l'homme où la composition microbienne semble continuellement évoluer entre les 3 entérotypes identifiés chez des individus en bonne santé (Knights et al., 2014). L'instabilité des entérotypes est l'une des raisons pour lesquelles la notion même d'entérotipe est controversée (Huse et al., 2012; Jeffery et al., 2012; Gorvitovskaia et al., 2016). Les entérotypes pourraient alors plutôt être définis comme des états transitoirement stabilisés d'écosystèmes microbiens, susceptibles d'évoluer. Actuellement, les causes des changements d'entérotipe n'ont pas été identifiées. Les essais 2 et 3 ont cependant montré que ces changements étaient indépendants d'une exposition à DON ou d'un stress thermique.

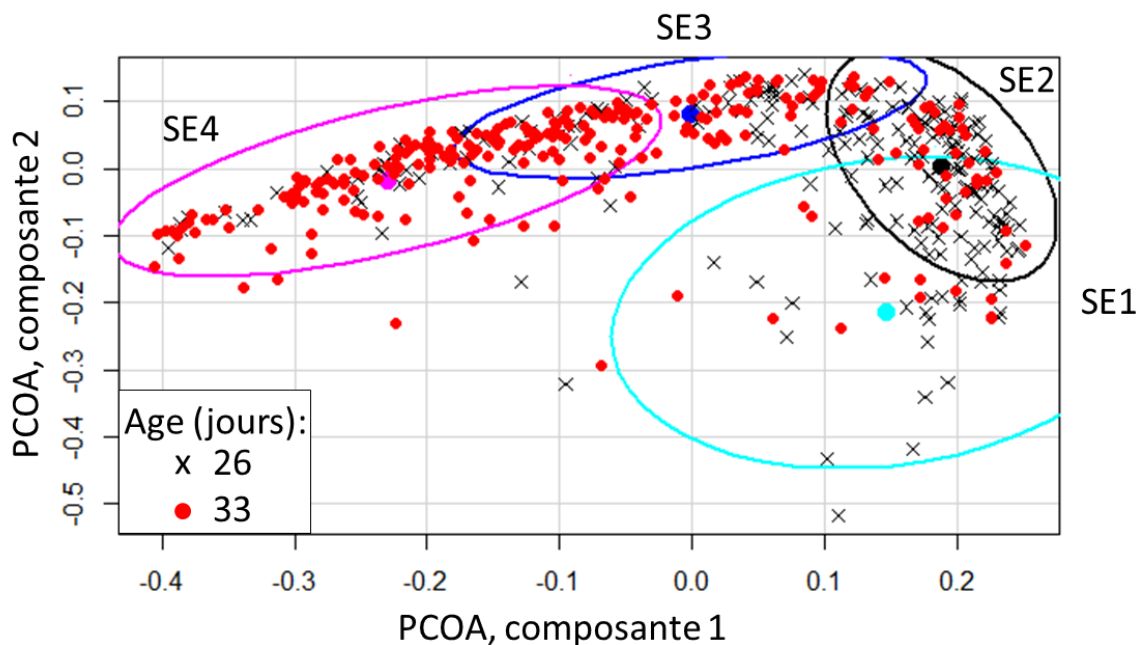


Figure IV-10 : Entérotypes (SE1 à SE4) identifiés chez des porcelets à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage représentés dans une analyse en coordonnées principales (PCOA).

Les entérotypes sont établis selon la méthode décrite par Arumugam et al. (2011). Selon cette méthode, le nombre maximal de clusters est de 4 dans cet essai.

Table IV-5 : Effectifs de porcelets présentant les entérotypes SE1 à SE4 à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage.

		26 jours d'âge				
		SE1	SE2	SE3	SE4	Total
33 jours d'âge	SE1	1	4	1	2	8
	SE2	6	19	3	4	32
	SE3	9	35	18	11	73
	SE4	11	45	17	10	83
	Total	27	103	39	27	

D'après l'essai « Sevrobust », il semblerait que les entérotypes chez les porcelets évoluent d'un entérotipe « non mature » à un « mature » avec des intermédiaires. En effet, l'entérotipe SE4 est caractérisé par une plus grande diversité (indice de Shannon = 4,9, comparé à SE1 : 3,7, SE2 : 4,3 ou SE3 : 4,4 ; $P < 0,05$) et une augmentation de l'abondance en certaines bactéries (*Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Prevotella* et *Roseburia*)(Figure IV-11) plus adaptées à un régime varié et riche en fibres (Varel et al., 1989; Flint et al., 2008; Ellekilde et al., 2014; Kovatcheva-Datchary et al., 2015). De plus, les porcelets issus des entérotypes SE2 et SE3 à 33 jours d'âge ont une plus faible croissance comparée à celle de porcelets ayant atteint l'entérotipe SE4 à ce stade. La maturité du microbiote semble favoriser de meilleures performances de croissance. Une hypothèse serait que le microbiote « mature » comprend toutes les fonctions permettant à l'hôte d'optimiser son potentiel en termes de croissance et d'EA.

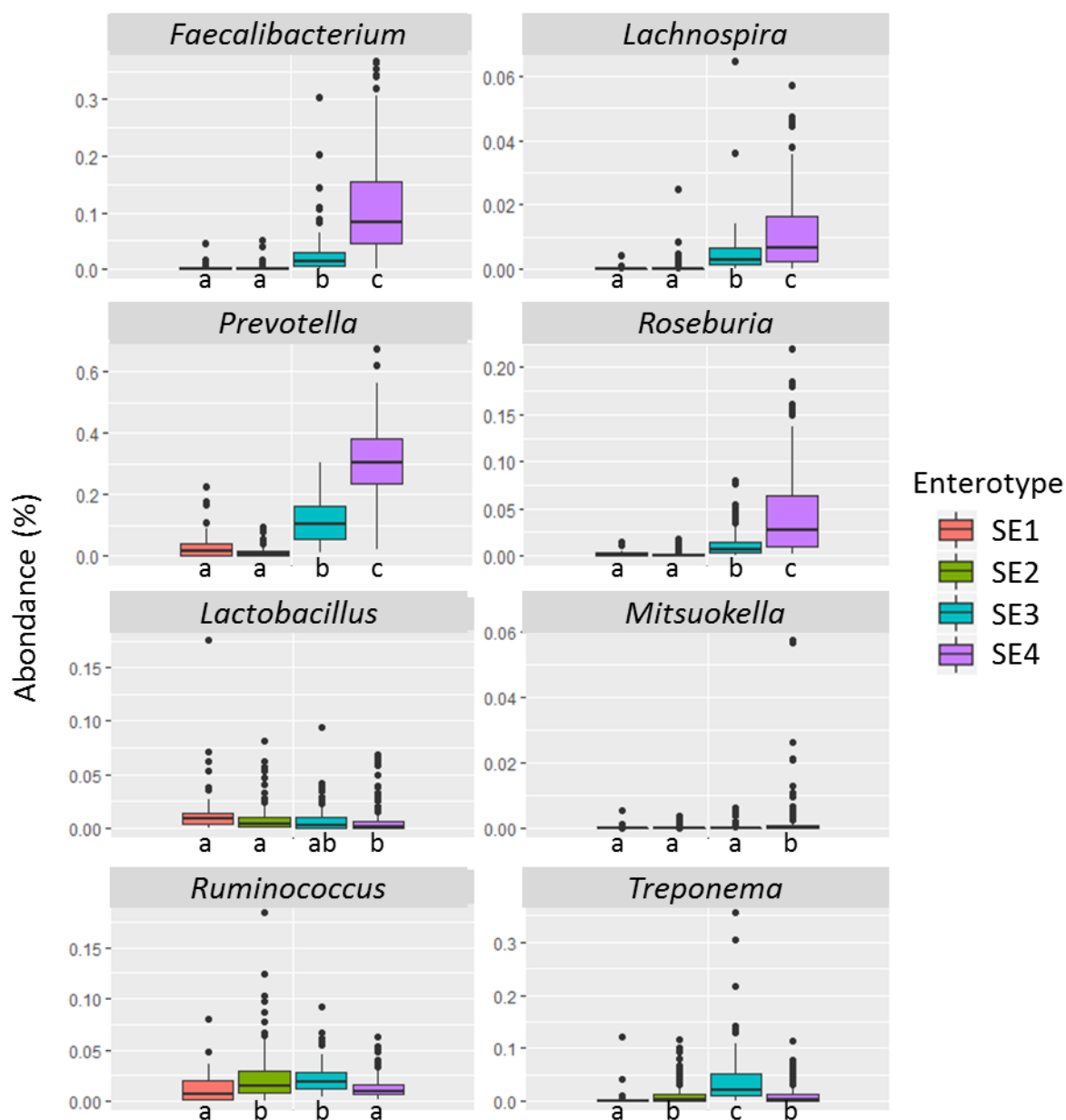


Figure IV-11 : Abondance par genre suivant les entérotypes (SE1 à SE4) identifiés chez des porcelets à 26 et 33 jours d'âge, soit 2 jours avant et 5 jours après sevrage.

Les abondances avec des lettres (a-c) différentes diffèrent par un test de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

Quelques différences de performances entre les individus appartenant à différents entérotypes en finition sont aussi observées dans l'essai 2. Ainsi, les porcs appartenant à l'entérotipe dominé par *Lactobacillus* sont moins robustes face à un stress thermique, ce qui se traduit par une élévation plus importante de la température interne à court et à long terme. Cependant, dans cet essai, les porcs des deux entérotypes en finition ne montrent pas de

différence de performance de croissance ou d'alimentation. De même, les performances des porcs de l'essai 3 ne diffèrent pas suivant l'entérotypage microbien. Ceci pourrait en partie être expliqué par le fait que pour maintenir son équilibre, chaque écosystème devrait assurer les mêmes fonctions de base (métabolisme énergétique, renouvellement des protéines...). Une modification de l'écosystème ne modifierait ainsi pas les fonctions bactériennes, d'où peu de changements fonctionnels à l'échelle de l'hôte. Durant la thèse, bien que peu de liens aient été établis entre les entérotypes et les performances de croissance ou d'alimentation des porcs, il semblerait que certains écosystèmes favorisent une meilleure robustesse des porcs face à une perturbation extérieure (stress thermique, sevrage...). Cette approche des relations entre composition microbienne et phénotype de l'hôte par l'analyse des écosystèmes microbiens reste à approfondir.

Conclusion

Cette thèse documente l'impact de facteurs de variations environnementaux (alimentation enrichie en fibres, contaminée par des mycotoxines DON, stress thermique) sur la composition du microbiote fécal de porcs en croissance-finition. Elle a aussi permis l'étude de l'impact de quelques facteurs animaux sur cette composition microbienne. L'évolution de la composition du microbiote fécal avec l'âge de l'animal a été confirmée. Cette évolution peut être modifiée par l'exposition des animaux à des perturbations telles que des transitions alimentaires, l'exposition à un stress thermique ou l'exposition à des mycotoxines. Cependant, dans le cadre de cette thèse, le microbiote est résilient face à ces perturbations. La résilience a été observée dans les 2 semaines suivant une perturbation. En complément de ce travail de thèse, la cinétique d'adaptation du microbiote aux modifications environnementales pourrait être étudiée, notamment en réalisant des prélèvements répétés sur un même animal dans les jours suivant le début et l'arrêt d'une perturbation.

Des analyses discriminantes permettent d'extraire des OTU dont l'abondance est impactée par un facteur de variation donné. Ainsi les porcs ayant reçu un régime alimentaire standard ou riche en fibre, ayant été exposés à un stress thermique chronique ou aigu, et ayant ingéré un aliment contaminé par la mycotoxine DON ont pu être discriminés à l'aide du microbiote fécal. Actuellement, la fonctionnalité des OTU est relativement peu connue, notamment chez le porc, et ne permet pas une compréhension précise des liens fonctionnels entre les OTU biomarqueurs et les facteurs de variation alimentaires ou climatiques. Cette interprétation fonctionnelle serait à approfondir, notamment au regard des impacts phénotypiques que ces biomarqueurs microbiens pourraient avoir sur les performances de l'hôte soumis à un challenge alimentaire ou thermique.

Un second objectif de la thèse était d'établir des relations quantitatives entre la composition microbienne fécale des porcs et des performances de l'hôte, notamment l'EA. La composante digestive de l'EA est corrélée à l'abondance de certaines OTU appartenant à des familles déjà identifiées dans la littérature comme adaptées à la digestion de fibres ou favorables à une bonne santé de l'hôte. Cependant, ces corrélations entre un phénotype d'intérêt et l'abondance d'OTU, de genres, de familles, de fonctions bactériennes etc. restent

faibles. Dans le but de prédire l'EA à partir de données de composition microbienne fécale, plusieurs méthodes statistiques ont été évaluées (régression partielle des moindres carrés et régression en forêt aléatoire). Dans le cadre de cette thèse, il n'a pas été possible d'établir des modèles de prédiction de l'EA satisfaisants. Une étude méthodologique approfondie a montré que des modèles valides ne peuvent être construits que si le jeu de données contient des OTU dont l'abondance est supérieure à 0,02% du nombre de séquences total et présentant une corrélation avec l'EA supérieure à 0,4. Ce travail pourrait être complété par l'étude d'autres types de modèles de prédiction tels que des régressions bayésiennes.

En partant des résultats de corrélation et de prédiction entre EA et composition microbienne mitigés, une approche par écosystème a été envisagée. La thèse a défini différents entérotypes à partir des données de composition microbienne fécale. Ces entérotypes varient selon l'âge des animaux. Il a de plus été mis en évidence que les animaux peuvent changer d'entérotipe à moins de 3 semaines d'intervalle. Ces nouveaux éléments remettent en question la définition des entérotypes. Les entérotypes correspondraient alors plutôt à des états transitoirement stabilisés d'écosystèmes microbiens. En finition, les entérotypes sont liés à des différences de robustesse à un stress thermique, mais sans impact sur les performances de croissance ou d'alimentation de l'hôte. Il serait intéressant d'approfondir l'analyse de ces écosystèmes microbiens et notamment d'étudier les interactions compositionnelles et fonctionnelles entre les populations bactériennes, et entre ces populations et l'hôte. Dans l'objectif de mettre en lien des performances d'un hôte avec son microbiote, plutôt que d'analyser chaque bactérie séparément, il faudrait préférer l'étude de la fonction globale de l'écosystème microbien.

« Diversity is Microbiome version 1; Functionality is Microbiome version 2 »

Mark Lyte, ASAS 2019 (Austin, TX)

Références

Abolbaghaei, A., B. D. Oomah, H. Tavakoli, and F. Hosseinian. 2018. Influence of branched chain amino acids on insulin sensitivity and the mediator roles of short chain fatty acids and gut hormones: a review. *JFB*. 2:1–15. doi:10.31665/JFB.2018.2136.

Adhikari, B., S. W. Kim, and Y. M. Kwon. 2019. Characterization of microbiota associated with digesta and mucosa in different regions of gastrointestinal tract of nursery pigs. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1630. doi:10.3390/ijms20071630.

Agyekum, A. K., and C. M. Nyachoti. 2017. Nutritional and metabolic consequences of feeding high-fiber diets to swine: a review. *Engineering*. 3:716–725. doi:10.1016/J.ENG.2017.03.010.

Allen, H. K., T. Looft, D. O. Bayles, S. Humphrey, U. Y. Levine, D. Alt, and T. B. Stanton. 2011. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *mBio*. 2:e00260-11. doi:10.1128/mBio.00260-11.

Altaher, Y. W., M. F. Jahromi, R. Ebrahim, I. Zulkifli, J. B. Liang, Y. W. Altaher, M. F. Jahromi, R. Ebrahim, I. Zulkifli, and J. B. Liang. 2015. *Lactobacillus Pentosus Ita23* and *L. Acidipiscis Ita44* enhance feed conversion efficiency and beneficial gut microbiota in broiler chickens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 17:159–164. doi:10.1590/1516-635x1702159-164.

Andretta, I., M. Kipper, C. R. Lehen, L. Hauschild, M. M. Vale, and P. A. Lovatto. 2012. Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in growing pigs. *animal*. 6:1476–1482. doi:10.1017/S1751731111002278.

Anguita, M., N. Canibe, J. F. Pérez, and B. B. Jensen. 2006. Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: use of cannulated pigs and in vitro fermentation. *J. Animal Sci.* 84:2766–2778. doi:10.2527/jas.2005-212.

Antonissen, G., A. Martel, F. Pasmans, R. Ducatelle, E. Verbrugghe, V. Vandenbroucke, S. Li, F. Haesebrouck, F. Van Immerseel, and S. Croubels. 2014. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins*. 6:430–452. doi:10.3390/toxins6020430.

Antwis, R. E., K. L. Edwards, B. Unwin, S. L. Walker, and S. Shultz. 2019. Rare gut microbiota associated with breeding success, hormone metabolites and ovarian cycle phase in the critically endangered eastern black rhino. *Microbiome*. 7:27. doi:10.1186/s40168-019-0639-0.

AOAC. 1990. Official methods of analysis. AOAC, Whashington (DC).

Argenzio, R., and M. Southworth. 1975. Sites of organic acid production and absorption in gastrointestinal tract of the pig. *A. J. P. Legacy Content*. 228:454–460. doi:10.1152/ajplegacy.1975.228.2.454.

Argüello, H., J. Estellé, S. Zaldívar-López, Á. Jiménez-Marín, A. Carvajal, M. A. López-Bascón, F. Crispie, O. O’Sullivan, P. D. Cotter, F. Priego-Capote, L. Morera, and J. J. Garrido. 2018. Early *Salmonella Typhimurium* infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci. Rep.* 8:7788. doi:10.1038/s41598-018-26083-3.

Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J.-M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Doré, MetaHIT Consortium, M. Antolín, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariáz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, K. Kristiansen, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Mérieux, R. M. Minardi, C. M’rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and P. Bork. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473:174–180. doi:10.1038/nature09944.

Bach Knudsen, K. E. 2001. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 90:3–20. doi:10.1016/S0377-8401(01)00193-6.

Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*. 101:15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.

Barker, M., and W. Rayens. 2003. Partial least squares for discrimination. *J. Chemometr.* 17:166–173. doi:10.1002/cem.785.

Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone, and S. R. Bloom. 2004. Does gut hormone PYY 3–36 decrease food intake in rodents? (reply). *Nature*. 430:3. doi:10.1038/nature02666.

Becker, D. E., S. W. Terrill, R. J. Meade, and R. M. Edwards. 1952. The efficacy of various antibacterial agents for stimulating the rate of gain in the pig. *Antibiot Chemother (Northfield)*. 2:421–426.

Belk, A., Z. Z. Xu, D. O. Carter, A. Lynne, S. Bucheli, R. Knight, and J. L. Metcalf. 2018. Microbiome data accurately predicts the postmortem interval using random forest regression models. *Genes*. 9:104. doi:10.3390/genes9020104.

Bergen, W. G. 2015. Small-intestinal or colonic microbiota as a potential amino acid source in animals. *Amino Acids*. 47:251–258. doi:10.1007/s00726-014-1875-z.

Berthiller, F., R. Krska, K. J. Domig, W. Kneifel, N. Juge, R. Schuhmacher, and G. Adam. 2011. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicol. Lett.* 206:264–267. doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.006.

Bhusari, S., Z. Liu, L. B. Hearne, D. E. Spiers, W. R. Lamberson, and E. Antoniou. 2007. Expression profiling of heat stress effects on mice fed ergot alkaloids. *Toxicol. Sci.* 95:89–97. doi:10.1093/toxsci/kfl142.

Bian, G., S. Ma, Z. Zhu, Y. Su, E. G. Zoetendal, R. Mackie, J. Liu, C. Mu, R. Huang, H. Smidt, and W. Zhu. 2016. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology.* 18:1566–1577. doi:10.1111/1462-2920.13272.

Biddle, A., L. Stewart, J. Blanchard, and S. Leschine. 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity.* 5:627–640. doi:10.3390/d5030627.

Bloemen, J. G., K. Venema, M. C. van de Poll, S. W. Olde Damink, W. A. Buurman, and C. H. Dejong. 2009. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland).* 28:657–661. doi:10.1016/j.clnu.2009.05.011.

Bouhet, S., and I. P. Oswald. 2005. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:199–209. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.010.

Breiman, L. 2001. Random Forests. *Machine Learning.* 45:5–32. doi:10.1023/A:1010933404324.

Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A. I. Muir, M. J. Wigglesworth, I. Kinghorn, N. J. Fraser, N. B. Pike, J. C. Strum, K. M. Steplewski, P. R. Murdock, J. C. Holder, F. H. Marshall, P. G. Szekeres, S. Wilson, D. M. Ignar, S. M. Foord, A. Wise, and S. J. Dowell. 2003. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278:11312–11319. doi:10.1074/jbc.M211609200.

Buffie, C. G., and E. G. Pamer. 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 13:790–801. doi:10.1038/nri3535.

Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. Patterson. 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. *Poultry Sci.* 87:1734–1741. doi:10.3382/ps.2008-00107.

Burrough, E. R., B. L. Arruda, and P. J. Plummer. 2017. Comparison of the luminal and mucosa-associated microbiota in the colon of pigs with and without swine dysentery. *Front. Vet. Sci.* 4:139. doi:10.3389/fvets.2017.00139.

Bushel, P. 2018. pvca: Principal Variance Component Analysis (PVCA).

Butler, J. E., P. Weber, M. Sinkora, D. Baker, A. Schoenherr, B. Mayer, and D. Francis. 2002. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J. Immunol.* 169:6822–6830. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6822.

Byrne, C. S., E. S. Chambers, H. Alhabeeb, N. Chhina, D. J. Morrison, T. Preston, C. Tedford, J. Fitzpatrick, C. Irani, A. Busza, I. Garcia-Perez, S. Fountana, E. Holmes, A. P. Goldstone, and G. S. Frost. 2016. Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 104:5–14. doi:10.3945/ajcn.115.126706.

Calenge, F., C. Martin, N. Le Floch, F. Phocas, D. Morgavi, C. Rogel-Gaillard, and P. Quéré. 2014. Intégrer la caractérisation du microbiote digestif dans le phénotypage de l'animal de rente : vers un nouvel outil de maîtrise de la santé en élevage ? *INRA Productions animales.* 27:209–222.

Campos, P. H. R. F., E. Labussière, J. Hernández-García, S. Dubois, D. Renaudeau, and J. Noblet. 2014. Effects of ambient temperature on energy and nitrogen utilization in lipopolysaccharide-challenged growing pigs. *J. Animal Sci.* 92:4909–4920. doi:10.2527/jas.2014-8108.

Canny, G. O., and B. A. McCormick. 2008. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect. Immun.* 76:3360–3373. doi:10.1128/IAI.00187-08.

Carmody, R. N., G. K. Gerber, J. M. Luevano, D. M. Gatti, L. Somes, K. L. Svenson, and P. J. Turnbaugh. 2015. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe.* 17:72–84. doi:10.1016/j.chom.2014.11.010.

Carré, B., J. M. Brillouet, E. Beaufils, C. R. Bernard, G. Botorel, P. Dauvillier, P. Maupetit, P. Metra, J. Vigneron, and E. Nouat. 1989. Determination of water-insoluble cell walls in feeds: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:463–467.

Castilho, N. P. A., M. Colombo, L. L. de Oliveira, S. D. Todorov, and L. A. Nero. 2019. *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiol.* 19:63. doi:10.1186/s12866-019-1436-4.

Chambers, E. S., A. Viardot, A. Psichas, D. J. Morrison, K. G. Murphy, S. E. K. Zaccarelli, K. MacDougall, T. Preston, C. Tedford, G. S. Finlayson, J. E. Blundell, J. D. Bell, E. L. Thomas, S. Mt-Isa, D. Ashby, G. R. Gibson, S. Kolida, W. S. Dhillon, S. R. Bloom, W. Morley, S. Clegg, and G. Frost. 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut.* 64:1744–1754. doi:10.1136/gutjnl-2014-307913.

Chen, S., J. Wang, D. Peng, G. Li, J. Chen, and X. Gu. 2018. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows. *Sci. Rep.* 8:14606. doi:10.1038/s41598-018-32886-1.

Cheng, B., C. Wan, S. Yang, H. Xu, H. Wei, J. Liu, W. Tian, and M. Zeng. 2010. Detoxification of deoxynivalenol by *Bacillus* strains. *J. Food Saf.* 30:599–614. doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00228.x.

Cheng, C. S., H. K. Wei, P. Wang, H. C. Yu, X. M. Zhang, S. W. Jiang, and J. Peng. 2018. Early intervention with faecal microbiota transplantation: an effective means to improve growth performance and the intestinal development of suckling piglets. *animal.* 1–9. doi:10.1017/S1751731118001611.

Cheng, S., X. Ma, S. Geng, X. Jiang, Y. Li, L. Hu, J. Li, Y. Wang, and X. Han. 2018. Fecal microbiota transplantation beneficially regulates intestinal mucosal autophagy and alleviates gut barrier injury. *mSystems.* 3:e00137-18. doi:10.1128/mSystems.00137-18.

Cherbut, C., L. Ferrier, C. Rozé, Y. Anini, H. Blottière, G. Lecannu, and J.-P. Galmiche. 1998. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* 275:G1415–G1422. doi:10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1415.

Chowdhury, S. R., D. E. King, B. P. Willing, M. R. Band, J. E. Beever, A. B. Lane, J. J. Loor, J. C. Marini, L. A. Rund, L. B. Schook, A. G. Van Kessel, and H. R. Gaskins. 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genom.* 8:215. doi:10.1186/1471-2164-8-215.

Chung, H., S. J. Pamp, J. A. Hill, N. K. Surana, S. M. Edelman, E. B. Troy, N. C. Reading, E. J. Villablanca, S. Wang, J. R. Mora, Y. Umesaki, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Relman, and D. L. Kasper. 2012. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell.* 149:1578–1593. doi:10.1016/j.cell.2012.04.037.

Chung, W. S. F., A. W. Walker, P. Louis, J. Parkhill, J. Vermeiren, D. Bosscher, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2016. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 14:3. doi:10.1186/s12915-015-0224-3.

Clausen, M. R., and P. B. Mortensen. 1995. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut.* 37:684–689. doi:10.1136/gut.37.5.684.

Collins, S. M., Z. Kassam, and P. Bercik. 2013. The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: experimental evidence and clinical implications. *Curr. Opin. Microbiol.* 16:240–245. doi:10.1016/j.mib.2013.06.004.

Cornick, S., A. Tawiah, and K. Chadee. 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers.* 3:e982426. doi:10.4161/21688370.2014.982426.

Corrêa, R. O., J. L. Fachi, A. Vieira, F. Takeo Sato, and M. A. R. Vinolo. 2016. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *CTI.* 5:e73. doi:10.1038/cti.2016.17.

Costea, P. I., F. Hildebrand, M. Arumugam, F. Bäckhed, M. J. Blaser, F. D. Bushman, W. M. de Vos, S. D. Ehrlich, C. M. Fraser, M. Hattori, C. Huttenhower, I. B. Jeffery, D. Knights, J. D. Lewis, R. E. Ley, H. Ochman, P. W. O'Toole, C. Quince, D. A. Relman, F. Shanahan, S.

Sunagawa, J. Wang, G. M. Weinstock, G. D. Wu, G. Zeller, L. Zhao, J. Raes, R. Knight, and P. Bork. 2018. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol.* 3:8–16. doi:10.1038/s41564-017-0072-8.

Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschöp, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone, and T. L. Horvath. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 37:649–661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1.

Crespo-Piazuelo, D., J. Estellé, M. Revilla, L. Criado-Mesas, Y. Ramayo-Caldas, C. Óvilo, A. I. Fernández, M. Ballester, and J. M. Folch. 2018. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Sci. Rep.* 8:12727. doi:10.1038/s41598-018-30932-6.

Cribbs, S. K., K. Uppal, S. Li, D. P. Jones, L. Huang, L. Tipton, A. Fitch, R. M. Greenblatt, L. Kingsley, D. M. Guidot, E. Ghedin, and A. Morris. 2016. Correlation of the lung microbiota with metabolic profiles in bronchoalveolar lavage fluid in HIV infection. *Microbiome.* 4:3. doi:10.1186/s40168-016-0147-4.

Cuche, G., J. C. Cuber, and C. H. Malbert. 2000. Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* 279:G925-930. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.5.G925.

Cui, Y., Y. Hao, J. Li, W. Bao, G. Li, Y. Gao, and X. Gu. 2016. Chronic heat stress induces immune response, oxidative stress response, and apoptosis of finishing pig liver: a proteomic approach. *Int. J. Mol. Sci.* 17:393. doi:10.3390/ijms17050393.

Dalby, M. J., A. W. Ross, A. W. Walker, and P. J. Morgan. 2017. Dietary uncoupling of gut microbiota and energy harvesting from obesity and glucose tolerance in mice. *Cell Rep.* 21:1521–1533. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.056.

Dänicke, S., H. Valenta, and S. Döll. 2004. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (don) in the pig. *Arch. Anim. Nutr.* 58:169–180. doi:10.1080/00039420410001667548.

De La Cochetière, M. F., T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. P. Galmiche, and J. Doré. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol.* 43:5588–5592. doi:10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005.

Derrien, M., E. E. Vaughan, C. M. Plugge, and W. M. de Vos. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1469–1476. doi:10.1099/ijms.0.02873-0.

DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05.

Dethlefsen, L., and D. A. Relman. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *PNAS*. 108:4554–4561. doi:10.1073/pnas.1000087107.

Diao, H., H. L. Yan, Y. Xiao, B. Yu, J. Yu, J. He, P. Zheng, B. H. Zeng, H. Wei, X. B. Mao, and D. W. Chen. 2016. Intestinal microbiota could transfer host gut characteristics from pigs to mice. *BMC Microbiol.* 16:238. doi:10.1186/s12866-016-0851-z.

Dicksved, J., J. K. Jansson, and J. E. Lindberg. 2015. Fecal microbiome of growing pigs fed a cereal based diet including chicory (*Cichorium intybus* L.) or ribwort (*Plantago lanceolata* L.) forage. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:53. doi:10.1186/s40104-015-0054-8.

Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14:927–930. doi:10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.

Dou, S., P. Gadonna-Widehem, V. Rome, D. Hamoudi, L. Rhazi, L. Lakhal, T. Larcher, N. Bahi-Jaber, A. Pinon-Quintana, A. Guyonvarch, I. L. E. Huërou-Luron, and L. Abdennebi-Najar. 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS ONE*. 12:e0169851. doi:10.1371/journal.pone.0169851.

Dowarah, R., A. K. Verma, and N. Agarwal. 2017. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: a review. *Animal Nutrition*. 3:1–6. doi:10.1016/j.aninu.2016.11.002.

Dritz, S. S., M. D. Tokach, R. D. Goodband, and J. L. Nelssen. 2002. Effects of administration of antimicrobials in feed on growth rate and feed efficiency of pigs in multisite production systems. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:1690–1695.

Drucker, D. J. 2005. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat. Clin. Pract. Endoc.* 1:22. doi:10.1038/ncpendmet0017.

Durmic, Z., D. W. Pethick, J. R. Pluske, and D. J. Hampson. 1998. Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *J. Appl. Microbiol.* 85:574–582. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853539.x.

Ellekilde, M., E. Selfjord, C. S. Larsen, M. Jakesevic, I. Rune, B. Tranberg, F. K. Vogensen, D. S. Nielsen, M. I. Bahl, T. R. Licht, A. K. Hansen, and C. H. F. Hansen. 2014. Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Sci. Rep.* 4:5922. doi:10.1038/srep05922.

Elmqvist, J. K., E. Maratos-Flier, C. B. Saper, and J. S. Flier. 1998. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci.* 1:445. doi:10.1038/2164.

El-Nezami, H. S., A. Chrevatidis, S. Auriola, S. Salminen, and H. Mykkänen. 2002. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit. Contam.* 19:680–686. doi:10.1080/02652030210134236.

Elsden, S. R., and M. G. Hilton. 1978. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Arch. Microbiol.* 117:165–172. doi:10.1007/BF00402304.

Emerson, E. L., and P. J. Weimer. 2017. Fermentation of model hemicelluloses by *Prevotella* strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:4269–4278. doi:10.1007/s00253-017-8150-7.

Eng, A., and E. Borenstein. 2018. Taxa-function robustness in microbial communities. *Microbiome.* 6:45. doi:10.1186/s40168-018-0425-4.

Engelstoft, M. S., W.-M. Park, I. Sakata, L. V. Kristensen, A. S. Husted, S. Osborne-Lawrence, P. K. Piper, A. K. Walker, M. H. Pedersen, M. K. Nøhr, J. Pan, C. J. Sinz, P. E. Carrington, T. E. Akiyama, R. M. Jones, C. Tang, K. Ahmed, S. Offermanns, K. L. Egerod, J. M. Zigman, and T. W. Schwartz. 2013. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol. Metab.* 2:376–392. doi:10.1016/j.molmet.2013.08.006.

Eriksen, G. S., H. Pettersson, K. Johnsen, and J. E. Lindberg. 2002. Transformation of trichotheceles in ileal digesta and faeces from pigs. *Arch. Tierernähr.* 56:263–274. doi:10.1080/00039420214343.

Eriksen, G. S., H. Pettersson, and J. E. Lindberg. 2003. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Tierernähr.* 57:335–345.

Eshaghzadeh Torbati, M., M. Mitreva, and V. Gopalakrishnan. 2016. Application of taxonomic modeling to microbiota data mining for detection of helminth infection in global populations. *data.* 1:19. doi:10.3390/data1030019.

Estelle, J., C. Larzul, N. Mach, F. Levenez, Y. Ramayo-Caldas, M.-J. Mercat, G. Lemonnier, C. Denis, Y. Billon, I. P. Oswald, J. Dore, M. Berri, P. Lepage, and C. Rogel-Gaillard. 2016. Microbiote intestinal chez le porc : paramètres génétiques de sa composition et liens avec des caractères immunitaires. *Journées Recherche Porcine.* 48:267–272.

Everard, A., V. Lazarevic, N. Gaïa, M. Johansson, M. Ståhlman, F. Backhed, N. M. Delzenne, J. Schrenzel, P. François, and P. D. Cani. 2014. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J.* 8:2116–2130. doi:10.1038/ismej.2014.45.

Fairbrother, J. M., É. Nadeau, and C. L. Gyles. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health. Res. Rev.* 6:17–39. doi:10.1079/AHR2005105.

Falentin, H., L. Rault, A. Nicolas, D. S. Bouchard, J. Lassalas, P. Lambertson, J.-M. Aubry, P.-G. Marnet, Y. Le Loir, and S. Even. 2016. Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Front. Microbiol.* 7:480. doi:10.3389/fmicb.2016.00480.

Fan, P., P. Liu, P. Song, X. Chen, and X. Ma. 2017. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Sci. Rep.* 7:43412. doi:10.1038/srep43412.

Fang, S., X. Xiong, Y. Su, L. Huang, and C. Chen. 2017. 16S rRNA gene-based association study identified microbial taxa associated with pork intramuscular fat content in feces and cecum lumen. *BMC Microbiol.* 17:162. doi:10.1186/s12866-017-1055-x.

FAO. 2017. Codex Alimentarius, Guidelines on nutrition labelling, CAC/GL 2-1985.

Faust, K., J. F. Sathirapongsasuti, J. Izard, N. Segata, D. Gevers, J. Raes, and C. Huttenhower. 2012. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput. Biol.* 8:e1002606. doi:10.1371/journal.pcbi.1002606.

Ferreira, J. A., K. J. Wu, A. J. Hryckowian, D. M. Bouley, B. C. Weimer, and J. L. Sonnenburg. 2014. Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance. *Cell Host Microbe.* 16:770–777. doi:10.1016/j.chom.2014.11.003.

Fioramonti, J. 2014. Etapes clé du devenir des aliments dans le tube digestif. *Innovations Agronomiques.* 36:1–13.

Flint, H. J., E. A. Bayer, M. T. Rincon, R. Lamed, and B. A. White. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:121–131. doi:10.1038/nrmicro1817.

Frankel, W. L., W. Zhang, A. Singh, D. M. Klurfeld, S. Don, T. Sakata, I. Modlin, and J. L. Rombeau. 1994. Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology.* 106:375–380. doi:10.1016/0016-5085(94)90595-9.

Freeland, K. R., and T. M. S. Wolever. 2010. Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor- α . *Br. J. Nutr.* 103:460–466. doi:10.1017/S0007114509991863.

Frese, S. A., K. Parker, C. C. Calvert, and D. A. Mills. 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome.* 3:28. doi:10.1186/s40168-015-0091-8.

Frost, G., M. L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, B. Lizarbe, S. Cerdan, L. Brody, J. Anastasovska, S. Ghourab, M. Hankir, S. Zhang, D. Carling, J. R. Swann, G. Gibson, A. Viardot, D. Morrison, E. Louise Thomas, and J. D. Bell. 2014. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.* 5:3611. doi:10.1038/ncomms4611.

Fu, J., M. J. Bonder, M. C. Cenit, E. F. Tigchelaar, A. Maatman, J. A. M. Dekens, E. Brandsma, J. Marczyńska, F. Imhann, R. K. Weersma, L. Franke, T. W. Poon, R. J. Xavier, D. Gevers, M. H. Hofker, C. Wijmenga, and A. Zhernakova. 2015. The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. *Circ. Res.* 117:817–824. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306807.

Fuentes-Zaragoza, E., M. J. Riquelme-Navarrete, E. Sánchez-Zapata, and J. A. Pérez-Álvarez. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Res. Int.* 43:931–942. doi:10.1016/j.foodres.2010.02.004.

Fukumoto, S., M. Tatewaki, T. Yamada, M. Fujimiya, C. Mantyh, M. Voss, S. Eubanks, M. Harris, T. N. Pappas, and T. Takahashi. 2003. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *A. J. P. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284:R1269–R1276. doi:10.1152/ajpregu.00442.2002.

Fuller, M. F., and P. J. Reeds. 1998. Nitrogen cycling in the gut. *Annual Review of Nutrition*. 18:385–411. doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.385.

Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, I. Hautefort, A. Thompson, J. C. Hinton, and F. Van Immerseel. 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:946–949. doi:10.1128/AEM.72.1.946-949.2006.

Gao, P., Y. Guo, N. Zhang, W. Zhang, H. Wang, X. Guo, Z. Duan, M. Du, Q. Yang, B. Li, Y. Li, and G. Cao. 2019. Characterization and comparisons of microbiota in different intestinal segments between adult Chinese Shanxi Black pigs and Large White pigs. *Ann. Microbiol.* 69:447–456. doi:10.1007/s13213-018-1430-3.

Gaskins, H. R., C. T. Collier, and D. B. Anderson. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal Biotechnology*. 13:29–42. doi:10.1081/ABIO-120005768.

Geier, M. S., V. A. Torok, G. E. Allison, K. Ophel-Keller, and R. J. Hughes. 2009. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the performance of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 106:1540–1548. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04116.x.

Gidenne, T. 1996. Conséquences digestives de l'ingestion de fibres et d'amidon chez le lapin en croissance: vers une meilleure définition des besoins. *INRA Productions animales*. 9:243–254.

Gilbert, H., Y. Billon, L. Brossard, J. Faure, P. Gatellier, F. Gondret, E. Labussière, B. Lebre, L. Lefaucheur, N. Le Floch, I. Louveau, E. Merlot, M.-C. Meunier-Salaün, L. Montagne, P. Mormede, D. Renaudeau, J. Riquet, C. Rogel-Gaillard, J. van Milgen, A. Vincent, and J. Noblet. 2017. Review: divergent selection for residual feed intake in the growing pig. *animal*. 11:1427–1439. doi:10.1017/S175173111600286X.

Gonzalez, J. M., M. C. Portillo, P. Belda-Ferre, and A. Mira. 2012. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS ONE*. 7:e29973. doi:10.1371/journal.pone.0029973.

Goodacre, R. 2007. Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* 137:259S-266S. doi:10.1093/jn/137.1.259S.

Goodrich, J. K., S. C. Di Rienzi, A. C. Poole, O. Koren, W. A. Walters, J. G. Caporaso, R. Knight, and R. E. Ley. 2014. Conducting a microbiome study. *Cell*. 158:250–262. doi:10.1016/j.cell.2014.06.037.

Gorvitovskaia, A., S. P. Holmes, and S. M. Huse. 2016. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*. 4:15. doi:10.1186/s40168-016-0160-7.

Granier, R., P. Massabie, and A. Bouby. 1998. Incidence du taux d'humidité relative de l'air ambiant sur les performances zootechniques du porc à l'engrais élevé à 28°C. *Journées Recherche Porcine*. 30:331–336.

Gratz, S. W., V. Currie, A. J. Richardson, G. Duncan, G. Holtrop, F. Farquharson, P. Louis, P. Pinton, and I. P. Oswald. 2018. Porcine small and large intestinal microbiota rapidly hydrolyze the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside and release deoxynivalenol in spiked batch cultures in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02106-17. doi:10.1128/AEM.02106-17.

Gratz, S. W., G. Duncan, and A. J. Richardson. 2013. The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1821–1825. doi:10.1128/AEM.02987-12.

Grieshop, C. M., D. E. Reese, and G. C. J. Fahey. 2001. Nonstarch polysaccharides and oligosaccharides in swine nutrition. In: *Swine nutrition*. CRC Press. Lewis A.J., Southern L.L., Boca Raton, FL. p. 107.

Gu, Z. T., L. Li, F. WU, P. Zhao, H. Yang, Y. S. Liu, Y. Geng, M. Zhao, and L. Su. 2015. Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca²⁺ dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci. Rep.* 5:11497. doi:10.1038/srep11497.

Guevarra, R. B., S. H. Hong, J. H. Cho, B.-R. Kim, J. Shin, J. H. Lee, B. N. Kang, Y. H. Kim, S. Wattanaphansak, R. E. Isaacson, M. Song, and H. B. Kim. 2018. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9:54. doi:10.1186/s40104-018-0269-6.

Guevarra, R. B., J. H. Lee, S. H. Lee, M.-J. Seok, D. W. Kim, B. N. Kang, T. J. Johnson, R. E. Isaacson, and H. B. Kim. 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10:1. doi:10.1186/s40104-018-0308-3.

Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, and O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *Int. J. Poultry Sci.* 5:149–155. doi:10.3923/ijps.2006.149.155.

Haenen, D., C. Souza da Silva, J. Zhang, S. J. Koopmans, G. Bosch, J. Vervoort, W. J. J. Gerrits, B. Kemp, H. Smidt, M. Müller, and G. J. E. J. Hooiveld. 2013a. Resistant starch induces catabolic but suppresses immune and cell division pathways and changes the microbiome in the proximal colon of male pigs. *J. Nutr.* 143:1889–1898. doi:10.3945/jn.113.182154.

Haenen, D., J. Zhang, C. Souza da Silva, G. Bosch, I. M. van der Meer, J. van Arkel, J. J. G. C. van den Borne, O. Pérez Gutiérrez, H. Smidt, B. Kemp, M. Müller, G. J. E. J. Hooiveld, M. Müller, and G. J. E. J. Hooiveld. 2013b. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *J. Nutr.* 143:274–283. doi:10.3945/jn.112.169672.

Halder, M., P. Petsophonakul, A. C. Akbulut, A. Pavlic, F. Bohan, E. Anderson, K. Maresz, R. Kramann, and L. Schurgers. 2019. Vitamin K: double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20:896. doi:10.3390/ijms20040896.

Han, G. G., J.-Y. Lee, G.-D. Jin, J. Park, Y. H. Choi, S.-K. Kang, B. J. Chae, E. B. Kim, and Y.-J. Choi. 2018. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Sci. Rep.* 8:6012. doi:10.1038/s41598-018-24508-7.

He, J., Y. He, D. Pan, J. Cao, Y. Sun, and X. Zeng. 2019. Associations of gut microbiota with heat stress-induced changes of growth, fat deposition, intestinal morphology, and antioxidant capacity in ducks. *Front. Microbiol.* 10:903. doi:10.3389/fmicb.2019.00903.

He, M., S. Fang, X. Huang, Y. Zhao, S. Ke, H. Yang, Z. Li, J. Gao, C. Chen, and L. Huang. 2016. Evaluating the contribution of gut microbiota to the variation of porcine fatness with the cecum and fecal samples. *Front. Microbiol.* 7:2108. doi:10.3389/fmicb.2016.02108.

He, P. 1992. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3857–3863.

Heinritz, S. N., E. Weiss, M. Eklund, T. Aumiller, C. M. E. Heyer, S. Messner, A. Rings, S. Louis, S. C. Bischoff, and R. Mosenthin. 2016a. Impact of a high-fat or high-fiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients.* 8:317. doi:10.3390/nu8050317.

Heinritz, S. N., E. Weiss, M. Eklund, T. Aumiller, S. Louis, A. Rings, S. Messner, A. Camarinha-Silva, J. Seifert, S. C. Bischoff, and R. Mosenthin. 2016b. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a high-fat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet. *PLoS ONE.* 11:e0154329. doi:10.1371/journal.pone.0154329.

Hoffmann, A. R. 2017. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. In: S. M. F. Torres and P. Roudebush, editors. *Advances in Veterinary Dermatology.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. p. 71–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119278368.ch4.1>

Holman, D. B., B. W. Brunelle, J. Trachsel, and H. K. Allen. 2017. Meta-analysis to define a core microbiota in the swine gut. *mSystems.* 2:e00004-17. doi:10.1128/mSystems.00004-17.

Holman, D. B., and M. R. Chénier. 2014. Temporal changes and the effect of subtherapeutic concentrations of antibiotics in the gut microbiota of swine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90:599–608. doi:10.1111/1574-6941.12419.

Hou, C., X. Zeng, F. Yang, H. Liu, and S. Qiao. 2015. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:14. doi:10.1186/s40104-015-0014-3.

Hrycay, E., D. Forrest, L. Liu, R. Wang, J. Tai, A. Deo, V. Ling, and S. Bandiera. 2014. Hepatic bile acid metabolism and expression of cytochrome P450 and related enzymes are altered in Bsep^{-/-}mice. *Mol. Cell. Biochem.* 389:119–132. doi:10.1007/s11010-013-1933-y.

Hu, L., S. Geng, Y. Li, S. Cheng, X. Fu, X. Yue, and X. Han. 2018. Exogenous fecal microbiota transplantation from local adult pigs to crossbred newborn piglets. *Front. Microbiol.* 8:2663. doi:10.3389/fmicb.2017.02663.

Huber, J. A., H. G. Morrison, S. M. Huse, P. R. Neal, M. L. Sogin, and D. B. Mark Welch. 2009. Effect of PCR amplicon size on assessments of clone library microbial diversity and community structure. *EMI.* 11:1292–1302. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01857.x.

Huffman, J., R. Gerber, and L. Du. 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers.* 93:764–776. doi:10.1002/bip.21483.

Huse, S. M., L. Dethlefsen, J. A. Huber, D. M. Welch, D. A. Relman, and M. L. Sogin. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* 4:e1000255. doi:10.1371/journal.pgen.1000255.

Huse, S. M., Y. Ye, Y. Zhou, and A. A. Fodor. 2012. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS ONE.* 7:e34242. doi:10.1371/journal.pone.0034242.

IFIP. 2013. *Mémento de l'éleveur de porc.* 7th ed. Institut du porc.

IFIP. 2017. *Porc par les chiffres.* 2017th–2018th ed. IFIP, Paris.

Ilhan, Z. E., A. K. Marcus, D.-W. Kang, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown. 2017. pH-mediated microbial and metabolic interactions in fecal enrichment cultures. *mSphere.* 2:e00047-17. doi:10.1128/mSphere.00047-17.

Imaoka, A., H. Setoyama, A. Takagi, S. Matsumoto, and Y. Umesaki. 2004. Improvement of human faecal flora-associated mouse model for evaluation of the functional foods. *J. Appl. Microbiol.* 96:656–663. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02189.x.

Inman, C. F., K. Haverson, S. R. Konstantinov, P. H. Jones, C. Harris, H. Smidt, B. Miller, M. Bailey, and C. Stokes. 2010. Rearing environment affects development of the immune system in neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 160:431–439. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04090.x.

Ivarsson, E., S. Roos, H. Y. Liu, and J. E. Lindberg. 2014. Fermentable non-starch polysaccharides increases the abundance of *Bacteroides*–*Prevotella*–*Porphyromonas* in ileal microbial community of growing pigs. *animal.* 8:1777–1787. doi:10.1017/S1751731114001827.

Jandhyala, S. M., R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala, and D. N. Reddy. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21:8787–8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787.

Jeffery, I. B., M. J. Claesson, P. W. O'Toole, and F. Shanahan. 2012. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat. Rev. Microbiol.* 10:591–592. doi:10.1038/nrmicro2859.

Jha, R., and J. D. Berrocoso. 2015. Review: Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. *animal*. 9:1441–1452. doi:10.1017/S1751731115000919.

Jiao, A. R., H. Diao, B. Yu, J. He, J. Yu, P. Zheng, Z. Q. Huang, Y. H. Luo, J. Q. Luo, X. B. Mao, and D. W. Chen. 2018. Oral administration of short chain fatty acids could attenuate fat deposition of pigs. *PLoS ONE*. 13:e0196867. doi:10.1371/journal.pone.0196867.

Jiménez, E., M. L. Marín, R. Martín, J. M. Odriozola, M. Olivares, J. Xaus, L. Fernández, and J. M. Rodríguez. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*. 159:187–193. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.007.

Jin, C., J. Henao-Mejia, and R. A. Flavell. 2013. Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression. *Cell Metab*. 17:873–882. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.011.

Jombart, T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11:94. doi:10.1186/1471-2156-11-94.

Jones, B. V., M. Begley, C. Hill, C. G. M. Gahan, and J. R. Marchesi. 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *PNAS*. 105:13580–13585. doi:10.1073/pnas.0804437105.

Jørgensen, J. R., M. R. Clausen, and P. B. Mortensen. 1997. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut*. 40:400–405. doi:10.1136/gut.40.3.400.

Jousset, A., C. Bienhold, A. Chatzinotas, L. Gallien, A. Gobet, V. Kurm, K. Küsel, M. C. Rillig, D. W. Rivett, J. F. Salles, M. G. A. van der Heijden, N. H. Youssef, X. Zhang, Z. Wei, and W. H. G. Hol. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J*. 11:853. doi:10.1038/ismej.2016.174.

Kamada, N., Y.-G. Kim, H. P. Sham, B. A. Vallance, J. L. Puente, E. C. Martens, and G. Núñez. 2012. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*. 336:1325–1329. doi:10.1126/science.1222195.

Kanehisa, M., Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 44:D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070.

Kanengoni, A. T., M. Chimonyo, T. Tasara, P. Cormican, A. Chapwanya, B. K. Ndimba, and K. Dzama. 2015. A comparison of faecal microbial populations of South African Windsnyer-type indigenous pigs (SAWIPs) and Large White × Landrace (LW × LR) crosses fed diets containing ensiled maize cobs. *FEMS Microbiol. Lett*. 362:fnv100. doi:10.1093/femsle/fnv100.

Karaki, S., H. Tazoe, H. Hayashi, H. Kashiwabara, K. Tooyama, Y. Suzuki, and A. Kuwahara. 2008. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J. Mol. Hist*. 39:135–142. doi:10.1007/s10735-007-9145-y.

Kashyap, P. C., A. Marcobal, L. K. Ursell, M. Larauche, H. Duboc, K. A. Earle, E. D. Sonnenburg, J. A. Ferreyra, S. K. Higginbottom, M. Million, Y. Tache, P. J. Pasricha, R. Knight, G. Farrugia, and J. L. Sonnenburg. 2013. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology*. 144:967–977. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.047.

Kil, D. Y., B. G. Kim, and H. H. Stein. 2013. Feed energy evaluation for growing pigs. *AJAS*. 26:1205–1217. doi:10.5713/ajas.2013.r.02.

Kim, H. B., K. Borewicz, B. A. White, R. S. Singer, S. Sreevatsan, Z. J. Tu, and R. E. Isaacson. 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.* 153:124–133. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.021.

Kiros, T. G., H. Derakhshani, E. Pinloche, R. D’Inca, J. Marshall, E. Auclair, E. Khafipour, and A. V. Kessel. 2018. Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Actisaf Sc 47) supplementation on the performance and hindgut microbiota composition of weanling pigs. *Sci. Rep.* 8:5315. doi:10.1038/s41598-018-23373-8.

Kiros, T. G., D. Luise, H. Derakhshani, R. Petri, P. Trevisi, R. D’Inca, E. Auclair, and A. G. van Kessel. 2019. Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on the performance and cecum microbial profile of suckling piglets. *PLoS One*. 14:e0219557. doi:10.1371/journal.pone.0219557.

Knights, D., T. L. Ward, C. E. McKinlay, H. Miller, A. Gonzalez, D. McDonald, and R. Knight. 2014. Rethinking “Enterotypes.” *Cell Host Microbe*. 16:433–437. doi:10.1016/j.chom.2014.09.013.

Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402:656. doi:10.1038/45230.

Kollarczik, B., M. Gareis, and M. Hanelt. 1994. In vitro transformation of the fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Natural Toxins*. 2:105–110. doi:10.1002/nt.2620020303.

Konstantinidis, K. T., and J. M. Tiedje. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *PNAS*. 102:2567–2572. doi:10.1073/pnas.0409727102.

Konstantinov, S. R., A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. L. Akkermans, H. Smidt, and W. M. De Vos. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *EMI*. 8:1191–1199. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x.

Kovatcheva-Datchary, P., A. Nilsson, R. Akrami, Y. S. Lee, F. De Vadder, T. Arora, A. Hallen, E. Martens, I. Björck, and F. Bäckhed. 2015. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 22:971–982. doi:10.1016/j.cmet.2015.10.001.

Kraimi, N., L. Calandreau, O. Zemb, K. Germain, C. Dupont, P. Velge, E. Guitton, S. Lavillatte, C. Parias, and C. Leterrier. 2019. Effects of gut microbiota transfer on emotional

reactivity in Japanese quails (*Coturnix japonica*). *J. Exp. Biol.* 222:jeb.202879. doi:10.1242/jeb.202879.

Krishnan, S., N. Alden, and K. Lee. 2015. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr. Opin. Biotech.* 36:137–145. doi:10.1016/j.copbio.2015.08.015.

Kubasova, T., L. Davidova-Gerzova, E. Merlot, M. Medvecký, O. Polansky, D. Gardan-Salmon, H. Quesnel, and I. Rychlík. 2017. Housing systems influence gut microbiota composition of sows but not of their piglets. H. Smidt, editor. *PLoS ONE*. 12:e0170051. doi:10.1371/journal.pone.0170051.

Labussière, E., J. van Milgen, C. F. M. de Lange, and J. Noblet. 2011. Maintenance energy requirements of growing pigs and calves are influenced by feeding level. *J. Nutr.* 141:1855–1861. doi:10.3945/jn.111.141291.

Lamendella, R., J. W. Santo Domingo, S. Ghosh, J. Martinson, and D. B. Oerther. 2011. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol.* 11:103. doi:10.1186/1471-2180-11-103.

Lan, P. T. N., M. Sakamoto, and Y. Benno. 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiology and Immunology*. 48:917–929. doi:10.1111/j.1348-0421.2004.tb03620.x.

Lan, R., J. Koo, and I. Kim. 2017. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbial and noxious gas emission in weaning pigs. *J. Sci. Food Agric.* 97:1310–1315. doi:10.1002/jsfa.7866.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *PNAS*. 82:6955–6959. doi:10.1073/pnas.82.20.6955.

Langille, M. G. I., J. Zaneveld, J. G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J. A. Reyes, J. C. Clemente, D. E. Burkepille, R. L. V. Thurber, R. Knight, R. G. Beiko, and C. Huttenhower. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31:814–821. doi:10.1038/nbt.2676.

Lanning, D. K., K.-J. Rhee, and K. L. Knight. 2005. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol.* 26:419–425. doi:10.1016/j.it.2005.06.001.

Larsen, J. M. 2017. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 151:363–374. doi:10.1111/imm.12760.

Lê Cao, K.-A., S. Boitard, and P. Besse. 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinform.* 12:253. doi:10.1186/1471-2105-12-253.

Lê Cao, K.-A., D. Rossouw, C. Robert-Granié, and P. Besse. 2008. A sparse PLS for variable selection when integrating omics data. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 7:35. doi:10.2202/1544-6115.1390.

Le Floch, N., C. Knudsen, T. Gidenne, L. Montagne, E. Merlot, and O. Zemb. 2014. Impact of feed restriction on health, digestion and faecal microbiota of growing pigs housed in good or poor hygiene conditions. *animal*. 8:1632–1642. doi:10.1017/S1751731114001608.

Le Gall, M., M. Warpechowski, Y. Jaguelin-Peyraud, and J. Noblet. 2009. Influence of dietary fibre level and pelleting on the digestibility of energy and nutrients in growing pigs and adult sows. *animal*. 3:352–359. doi:10.1017/S1751731108003728.

Le Goff, G., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002. Influence of dietary fibre on digestive utilization and rate of passage in growing pigs, finishing pigs and adult sows. *Animal Science*. 74:503–515. doi:10.1017/S1357729800052668.

Le Goff, G., and J. Noblet. 2001. Comparative total tract digestibility of dietary energy and nutrients in growing pigs and adult sows. *J. Animal Sci.* 79:2418–2427. doi:10.2527/2001.7992418x.

Le, M. H. A., S. Galle, Y. Yang, J. L. Landero, E. Beltranena, M. G. Gänzle, and R. T. Zijlstra. 2016. Effects of feeding fermented wheat with *Lactobacillus reuteri* on gut morphology, intestinal fermentation, nutrient digestibility, and growth performance in weaned pigs. *J. Animal Sci.* 94:4677–4687. doi:10.2527/jas.2016-0693.

Le Poul, E., C. Loison, S. Struyf, J.-Y. Springael, V. Lannoy, M.-E. Decobecq, S. Brezillon, V. Dupriez, G. Vassart, J. V. Damme, M. Parmentier, and M. Detheux. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278:25481–25489. doi:10.1074/jbc.M301403200.

Le Roy, T., J. Debédât, F. Marquet, C. Da-Cunha, F. Ichou, M. Guerre-Millo, N. Kapel, J. Aron-Wisnewsky, and K. Clément. 2019. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter. *Front. Microbiol.* 9:3289. doi:10.3389/fmicb.2018.03289.

Le Sciellour, M., E. Labussière, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2018. Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs. *PLoS ONE*. 13:e0206159. doi:10.1371/journal.pone.0206159.

Le Sciellour, M., O. Zemb, I. Hochu, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi, Y. Billon, J.-L. Gourdine, and D. Renaudeau. 2019a. Effect of chronic and acute heat challenges on fecal microbiota composition, production, and thermoregulation traits in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 97:3845–3858. doi:10.1093/jas/skz222.

Le Sciellour, M., O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019b. Acute challenges with a DON-contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs. In: Austin, Texas, Etats-Unis.

Lebel, P., A. Letellier, J. Longpré, B. Laplante, E. Yergeau, and P. Fravallo. 2017. Feed presentation options in swine early fattening mitigates *Salmonella* shedding and specifically modulates the faecal microbiota. *J. Appl. Microbiol.* 122:30–39. doi:10.1111/jam.13305.

Ley, R. E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS*. 102:11070–11075. doi:10.1073/pnas.0504978102.

Li, C., X. Wang, G. Wang, N. Li, and C. Wu. 2011. Expression analysis of global gene response to chronic heat exposure in broiler chickens (*Gallus gallus*) reveals new reactive genes. *Poultry Sci.* 90:1028–1036. doi:10.3382/ps.2010-01144.

Li, L., S. Chen, X. Li, D. Wan, G. Liu, Y. Liu, X. Kong, X. Xiong, X. Wu, S. W. Kim, and Y. Yin. 2017. Intestinal microbiota in growing pigs: effects of stocking density. *Food Agr. Immunol.* 1–12. doi:10.1080/09540105.2017.1409195.

Li, N., S. Huang, L. Jiang, W. Wang, T. Li, B. Zuo, Z. Li, and J. Wang. 2018. Differences in the gut microbiota establishment and metabolome characteristics between low- and normal-birth-weight piglets during early-life. *Front. Microbiol.* 9:1798. doi:10.3389/fmicb.2018.01798.

Li, N., Q. Wang, Y. Wang, A. Sun, Y. Lin, Y. Jin, and X. Li. 2019. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. *Stress.* 1–11. doi:10.1080/10253890.2019.1617267.

Li, S., Z. Wang, Y. Yang, S. Yang, C. Yao, K. Liu, S. Cui, Q. Zou, H. Sun, and G. Guo. 2017. Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Expr.* 7:82. doi:10.1186/s13568-017-0383-4.

Li, T., and U. Apte. 2015. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation and cancer. *Adv. Pharmacol.* 74:263–302. doi:10.1016/bs.apha.2015.04.003.

Lin, S., X. Yang, P. Yuan, J. Yang, P. Wang, H. Zhong, X. Zhang, L. Che, B. Feng, J. Li, Y. Zhuo, Y. Lin, S. Xu, D. Wu, D. G. Burrin, and Z. Fang. 2019. Undernutrition shapes the gut microbiota and bile acid profile in association with altered gut-liver FXR signaling in weaning pigs. *J. Agric. Food Chem.* 67:3691–3701. doi:10.1021/acs.jafc.9b01332.

Littman, D. R., and E. G. Pamer. 2011. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe.* 10:311–323. doi:10.1016/j.chom.2011.10.004.

Liu, J., J.-K. Wang, W. Zhu, Y.-Y. Pu, L.-L. Guan, and J.-X. Liu. 2014. Monitoring the rumen pectinolytic bacteria *Treponema saccharophilum* using real-time PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87:576–585. doi:10.1111/1574-6941.12246.

Looft, T., H. K. Allen, B. L. Cantarel, U. Y. Levine, D. O. Bayles, D. P. Alt, B. Henrissat, and T. B. Stanton. 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* 8:1566–1576. doi:10.1038/ismej.2014.12.

Louis, P., G. L. Hold, and H. J. Flint. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:661–672. doi:10.1038/nrmicro3344.

Loyau, T., C. Hennequet-Antier, V. Coustham, C. Berri, M. Leduc, S. Crochet, M. Sannier, M. J. Duclos, S. Mignon-Grasteau, S. Tesseraud, A. Brionne, S. Métayer-Coustard,

M. Moroldo, J. Lecardonnell, P. Martin, S. Lagarrigue, S. Yahav, and A. Collin. 2016. Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge. *BMC Genom.* 17:329. doi:10.1186/s12864-016-2661-y.

Lu, D., F. Tiezzi, C. Schillebeeckx, N. P. McNulty, C. Schwab, C. Shull, and C. Maltecca. 2018. Host contributes to longitudinal diversity of fecal microbiota in swine selected for lean growth. *Microbiome.* 6:4. doi:10.1186/s40168-017-0384-1.

Luecke, R. W., F. Thorp, H. W. Newland, and W. N. Mcmillen. 1951. The growth promoting effects of various antibiotics on pigs. *J Anim Sci.* 10:538–542. doi:10.2527/jas1951.102538x.

Luo, Y., B. Zeng, L. Zeng, X. Du, B. Li, R. Huo, L. Liu, H. Wang, M. Dong, J. Pan, P. Zheng, C. Zhou, H. Wei, and P. Xie. 2018. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Transl. Psychiatry.* 8:187. doi:10.1038/s41398-018-0240-5.

Mach, N., M. Berri, J. Estellé, F. Levenez, G. Lemonnier, C. Denis, J.-J. Leplat, C. Chevalyere, Y. Billon, J. Doré, C. Rogel-Gaillard, and P. Lepage. 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *EMIR.* 7:554–569. doi:10.1111/1758-2229.12285.

Martens, E. C., E. C. Lowe, H. Chiang, N. A. Pudlo, M. Wu, N. P. McNulty, D. W. Abbott, B. Henrissat, H. J. Gilbert, D. N. Bolam, and J. I. Gordon. 2011. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol.* 9:e1001221. doi:10.1371/journal.pbio.1001221.

Maslowski, K. M., A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, D. Yu, H. C. Schilter, M. S. Rolph, F. Mackay, D. Artis, R. J. Xavier, M. M. Teixeira, and C. R. Mackay. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 461:1282–1286. doi:10.1038/nature08530.

Mateos, I., S. Combes, G. Pascal, L. Cauquil, C. Barilly, A.-M. Cossalter, J. Laffitte, S. Botti, P. Pinton, and I. P. Oswald. 2018. Fumonisin-exposure impairs age-related ecological succession of bacterial species in weaned pig gut microbiota. *Toxins.* 10:230. doi:10.3390/toxins10060230.

McCormack, U. M., T. Curião, S. G. Buzoianu, M. L. Prieto, T. Ryan, P. Varley, F. Crispie, E. Magowan, B. U. Metzler-Zebeli, D. Berry, O. O’Sullivan, P. D. Cotter, G. E. Gardiner, and P. G. Lawlor. 2017. Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e00380-17. doi:10.1128/AEM.00380-17.

McCormack, U. M., T. Curião, T. Wilkinson, B. U. Metzler-Zebeli, H. Reyer, T. Ryan, J. A. Calderon-Diaz, F. Crispie, P. D. Cotter, C. J. Creevey, G. E. Gardiner, and P. G. Lawlor. 2018. Fecal microbiota transplantation in gestating sows and neonatal offspring alters lifetime intestinal microbiota and growth in offspring. R. I. Adams, editor. *mSystems.* 3:e00134-17. doi:10.1128/mSystems.00134-17.

McLamb, B. L., A. J. Gibson, E. L. Overman, C. Stahl, and A. J. Moeser. 2013. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *PLoS ONE*. 8:e59838. doi:10.1371/journal.pone.0059838.

McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*. 8:e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.

McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2014. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003531. doi:10.1371/journal.pcbi.1003531.

McNeil, N. I., J. H. Cummings, and W. P. James. 1978. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*. 19:819–822. doi:10.1136/gut.19.9.819.

Merrifield, C. A., M. C. Lewis, B. Berger, O. Cloarec, S. S. Heinzmann, F. Charton, L. Krause, N. S. Levin, S. Duncker, A. Mercenier, E. Holmes, M. Bailey, and J. K. Nicholson. 2016. Neonatal environment exerts a sustained influence on the development of the intestinal microbiota and metabolic phenotype. *ISME J.* 10:145–157. doi:10.1038/ismej.2015.90.

Mesa, D., D. R. Lammel, E. Balsanelli, C. Sena, M. D. Nosedá, L. F. Caron, L. M. Cruz, F. O. Pedrosa, and E. M. Souza. 2017. Cecal microbiota in broilers fed with prebiotics. *Front. Genet.* 8:153. doi:10.3389/fgene.2017.00153.

Mesonero-Escuredo, S., K. Strutzberg-Minder, C. Casanovas, and J. Segalés. 2018. Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porcine Health Manag.* 4:5. doi:10.1186/s40813-018-0083-8.

Messaoudi, M., R. Lalonde, N. Violle, H. Javelot, D. Desor, A. Nejdí, J.-F. Bisson, C. Rougeot, M. Pichelin, M. Cazaubiel, and J.-M. Cazaubiel. 2011. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* 105:755–764. doi:10.1017/S0007114510004319.

Metges, C. C. 2000. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J. Nutr.* 130:1857S-1864S. doi:10.1093/jn/130.7.1857S.

Metzger, S. A., L. L. Hernandez, J. H. Skarlupka, G. Suen, T. M. Walker, and P. L. Ruegg. 2018. Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: Results of a pilot study. *J. Dairy Sci.* 101:6346–6356. doi:10.3168/jds.2017-14212.

Michelland, R., S. Combes, V. Monteils, C. Bayourthe, L. Cauquil, F. Enjalbert, C. Julien, M. Kimsé, A. Troegeler-Meynadier, A. Zened, T. Gidenne, and L. Fortun-Lamothe. 2012. Analyse comparée des écosystèmes digestifs du rumen de la vache et du caecum du lapin. *INRA Productions animales.* 25:395–406.

Mignon-Grasteau, S., A. Narcy, N. Rideau, C. Chantry-Darmon, M.-Y. Boscher, N. Sellier, M. Chabault, B. Konsak-Ilievski, E. L. Bihan-Duval, and I. Gabriel. 2015. Impact of selection for digestive efficiency on microbiota composition in the chicken. *PLoS ONE*. 10:e0135488. doi:10.1371/journal.pone.0135488.

Million, M., J. C. Lagier, D. Yahav, and M. Paul. 2013. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:305–313. doi:10.1111/1469-0691.12172.

Moeller, A. H., P. H. Degan, A. E. Pusey, M. L. Wilson, B. H. Hahn, and H. Ochman. 2012. Chimpanzees and humans harbour compositionally similar gut enterotypes. *Nat. Commun.* 3:1179. doi:10.1038/ncomms2159.

Montagne, L., I. Créviu-Gabriel, R. Toullec, and J. P. Lallès. 2003. Influence of dietary protein level and source on the course of protein digestion along the small intestine of the veal calf. *J. Dairy Sci.* 86:934–943. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73676-5.

Morris, D. R., and R. H. Fillingame. 1974. Regulation of amino acid decarboxylation. *Annu. Rev. Biochem.* 43:303–321. doi:10.1146/annurev.bi.43.070174.001511.

Morrison, S. R., and L. E. Mount. 1971. Adaptation of growing pigs to changes in environmental temperature. *Animal Science.* 13:51–57. doi:10.1017/S0003356100029421.

Mozos, I., D. Stoian, and C. T. Luca. 2017. Crosstalk between vitamins A, B12, D, K, C, and E status and arterial stiffness. *Dis. Markers.* 2017:8784971. doi:10.1155/2017/8784971.

Mu, C., Y. Yang, Y. Su, E. G. Zoetendal, and W. Zhu. 2017. Differences in microbiota membership along the gastrointestinal tract of piglets and their differential alterations following an early-life antibiotic intervention. *Front. Microbiol.* 8:797. doi:10.3389/fmicb.2017.00797.

Mulder, I. E., B. Schmidt, M. Lewis, M. Delday, C. R. Stokes, M. Bailey, R. I. Aminov, B. P. Gill, J. R. Pluske, C.-D. Mayer, and D. Kelly. 2011. Restricting microbial exposure in early life negates the immune benefits associated with gut colonization in environments of high microbial diversity. *PLoS ONE.* 6:e28279. doi:10.1371/journal.pone.0028279.

Mulder, I. E., B. Schmidt, C. R. Stokes, M. Lewis, M. Bailey, R. I. Aminov, J. I. Prosser, B. P. Gill, J. R. Pluske, C.-D. Mayer, C. C. Musk, and D. Kelly. 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol.* 7:79. doi:10.1186/1741-7007-7-79.

Müller, V. 2008. Bacterial fermentation. In: eLS. American Cancer Society. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0001415.pub2>

Murphy, E. F., P. D. Cotter, S. Healy, T. M. Marques, O. O’Sullivan, F. Fouhy, S. F. Clarke, P. W. O’Toole, E. M. Quigley, C. Stanton, P. R. Ross, R. M. O’Doherty, and F. Shanahan. 2010. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut.* 59:1635–1642. doi:10.1136/gut.2010.215665.

Nagl, V., B. Woechtl, H. E. Schwartz-Zimmermann, I. Hennig-Pauka, W.-D. Moll, G. Adam, and F. Berthiller. 2014. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicol. Lett.* 229:190–197. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.032.

Namkung, H., M. Li, J. Gong, H. Yu, M. Cottrill, and C. F. M. De Lange. 2004. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota

and digestive function in newly weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 84:697–704. doi:10.4141/A04-005.

Neis, E. P. J. G., C. H. C. Dejong, and S. S. Rensen. 2015. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients.* 7:2930–2946. doi:10.3390/nu7042930.

Ng, K. M., J. A. Ferreyra, S. K. Higginbottom, J. B. Lynch, P. C. Kashyap, S. Gopinath, N. Naidu, B. Choudhury, B. C. Weimer, D. M. Monack, and J. L. Sonnenburg. 2013. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature.* 502:96–99. doi:10.1038/nature12503.

Ngoc, T. T. B., T. T. T. Hong, N. T. Len, and J. E. Lindberg. 2012. Effect of fibre level and fibre source on gut morphology and micro-environment in local (Mong Cai) and exotic (Landrace x Yorkshire) pigs. *AJAS.* 25:1726–1733. doi:10.5713/ajas.2012.12305.

Nicholson, J. K., E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia, and S. Pettersson. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 336:1262–1267. doi:10.1126/science.1223813.

Niderkorn, V. 2007. Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.

Niderkorn, V., H. Boudra, and D. P. Morgavi. 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 101:849–856. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x.

Nielsen, T. S., H. N. Lærke, P. K. Theil, J. F. Sørensen, M. Saarinen, S. Forssten, and K. E. B. Knudsen. 2014. Diets high in resistant starch and arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs. *Br. J. Nutr.* 112:1837–1849. doi:10.1017/S000711451400302X.

Niu, Q., P. Li, S. Hao, S. W. Kim, T. Du, J. Hua, and R. Huang. 2019. Characteristics of gut microbiota in sows and their relationship with apparent nutrient digestibility. *Int. J. Mol. Sci.* 20:870. doi:10.3390/ijms20040870.

Niu, Q., P. Li, S. Hao, Y. Zhang, S. W. Kim, H. Li, X. Ma, S. Gao, L. He, W. Wu, X. Huang, J. Hua, B. Zhou, and R. Huang. 2015. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Sci. Rep.* 5:9938. doi:10.1038/srep09938.

Noblet, J., H. Gilbert, Y. Jaguelin-Peyraud, and T. Lebrun. 2013. Evidence of genetic variability for digestive efficiency in the growing pig fed a fibrous diet. *animal.* 7:1259–1264. doi:10.1017/S1751731113000463.

Noblet, J., and X. S. Shi. 1994. Effect of body weight on digestive utilization of energy and nutrients of ingredients and diets in pigs. *Livest. Prod. Sci.* 37:323–338. doi:10.1016/0301-6226(94)90126-0.

Noblet, J., X. S. Shi, and S. Dubois. 1993. Metabolic utilization of dietary energy and nutrients for maintenance energy requirements in sows: basis for a net energy system. *Br. J. Nutr.* 70:407. doi:10.1079/BJN19930135.

Oksanen, J., G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, H. H. Stevens, E. Szoecs, and H. Wagner. 2018. *Vegan: community ecology package*. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Org, E., M. Mehrabian, B. W. Parks, P. Shipkova, X. Liu, T. A. Drake, and A. J. Lulis. 2016. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes.* 7:313–322. doi:10.1080/19490976.2016.1203502.

Pajarillo, E. A. B., J. P. Chae, M. P. Balolong, H. B. Kim, K.-S. Seo, and D.-K. Kang. 2014. Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *J. Microbiol.* 52:646–651. doi:10.1007/s12275-014-4270-2.

Pajarillo, E. A. B., J. P. Chae, M. P. Balolong, H. B. Kim, K.-S. Seo, and D.-K. Kang. 2015. Characterization of the fecal microbial communities of Duroc pigs using 16S rRNA gene pyrosequencing. *AJAS.* 28:584–591. doi:10.5713/ajas.14.0651.

Palmer, C., E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5:e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177.

Parag, H. A., B. Raboy, and R. G. Kulka. 1987. Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* 6:55–61.

Park, J., T. Kotani, T. Konno, J. Setiawan, Y. Kitamura, S. Imada, Y. Usui, N. Hatano, M. Shinohara, Y. Saito, Y. Murata, and T. Matozaki. 2016. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids. *PLoS ONE.* 11:e0156334. doi:10.1371/journal.pone.0156334.

Pasolli, E., D. T. Truong, F. Malik, L. Waldron, and N. Segata. 2016. Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights. *PLoS Comput. Biol.* 12:e1004977. doi:10.1371/journal.pcbi.1004977.

Payros, D., U. Dobrindt, P. Martin, T. Secher, A. P. F. L. Bracarense, M. Boury, J. Laffitte, P. Pinton, E. Oswald, and I. P. Oswald. 2017. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio.* 8:e00007-17. doi:10.1128/mBio.00007-17.

Pedersen, R., A. D. Andersen, L. Mølbak, J. Stagsted, and M. Boye. 2013. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs. *BMC Microbiol.* 13:30. doi:10.1186/1471-2180-13-30.

Pedroso, A. A., J. F. Menten, M. R. Lambais, A. M. C. Racanicci, F. A. Longo, and J. O. B. Sorbara. 2006. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poultry Sci.* 85:747–752. doi:10.1093/ps/85.4.747.

Perez-Muñoz, M. E., M.-C. Arrieta, A. E. Ramer-Tait, and J. Walter. 2017. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 5:48. doi:10.1186/s40168-017-0268-4.

Pierron, A. 2016. Toxicity of three biological derivatives of deoxynivalenol: deepoxy-deoxynivalenol, 3-epi-deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside on pigs [phdthesis]. Université Paul Sabatier - Toulouse III. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01540294/document>

Pierron, A., S. Mimoun, L. S. Murate, N. Loiseau, Y. Lippi, A.-P. F. L. Bracarense, G. Schatzmayr, J. W. He, T. Zhou, W.-D. Moll, and I. P. Oswald. 2016. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Sci Rep*. 6:29105. doi:10.1038/srep29105.

Pinton, P., and I. P. Oswald. 2014. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins*. 6:1615–1643. doi:10.3390/toxins6051615.

Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J*. 176:21–31. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.016.

Pollock, J., D. L. Gally, L. Glendinning, R. Tiwari, M. R. Hutchings, and J. G. M. Houdijk. 2018. Analysis of temporal fecal microbiota dynamics in weaner pigs with and without exposure to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Animal Sci*. 96:3777–3790. doi:10.1093/jas/sky260.

Pomar, J., V. López, and C. Pomar. 2011. Agent-based simulation framework for virtual prototyping of advanced livestock precision feeding systems. *Comput. Electron. Agr*. 78:88–97. doi:10.1016/j.compag.2011.06.004.

Prelusky, D. B., K. E. Hartin, H. L. Trenholm, and J. D. Miller. 1988. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol*. 10:276–286.

Price, K. L., H. R. Totty, H. B. Lee, M. D. Utt, G. E. Fitzner, I. Yoon, M. A. Ponder, and J. Escobar. 2010. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection¹. *Journal of Animal Science*. 88:3896–3908. doi:10.2527/jas.2009-2728.

Prosky, L., N. G. Asp, I. Furda, J. W. DeVries, T. F. Schweizer, and B. F. Harland. 1985. Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 68:677–679.

Puls, C. L., G. L. Allee, J. M. Hammer, and S. N. Carr. 2019. Effects of different antibiotic feeding programs on morbidity and mortality and growth performance of nursery pigs housed in a wean-to-finish facility. *Trans Anim Sci*. 3:123–129. doi:10.1093/tas/txy096.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, Shaochuan Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J.-M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner,

H. Zhu, C. Yu, Shengting Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, Songgang Li, N. Qin, H. Yang, Jian Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, M. Consortium, M. Antolin, F. Artiguenave, H. Blottiere, N. Borruel, T. Bruls, F. Casellas, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariáz, R. Dervyn, M. Forte, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, M. Kleerebezem, J. Knol, M. Kristensen, S. Layec, K. Le Roux, M. Leclerc, E. Maguin, R. M. Minardi, R. Oozer, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Tims, T. Torrejon, E. Varela, W. M. De Vos, Y. Winogradsky, E. Zoetendal, P. Bork, S. D. Ehrlich, and Jun Wang. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464:59–65. doi:10.1038/nature08821.

Quan, J., G. Cai, J. Ye, M. Yang, R. Ding, X. Wang, E. Zheng, D. Fu, S. Li, S. Zhou, D. Liu, J. Yang, and Z. Wu. 2018. A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Sci. Rep.* 8:4536. doi:10.1038/s41598-018-22692-0.

Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glöckner. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41:D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.

R Core Team. 2018. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org/>

Rahat-Rozenbloom, S., J. Fernandes, J. Cheng, and T. M. S. Wolever. 2017. Acute increases in serum colonic short-chain fatty acids elicited by inulin do not increase GLP-1 or PYY responses but may reduce ghrelin in lean and overweight humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 71:953–958. doi:10.1038/ejcn.2016.249.

Ramayo-Caldas, Y., N. Mach, P. Lepage, F. Levenez, C. Denis, G. Lemonnier, J.-J. Leplat, Y. Billon, M. Berri, J. Doré, C. Rogel-Gaillard, and J. Estellé. 2016. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J.* 10:2973–2977. doi:10.1038/ismej.2016.77.

Ramírez-Pérez, O., V. Cruz-Ramón, P. Chinchilla-López, and N. Méndez-Sánchez. 2017. The role of the gut microbiota in bile acid metabolism. *Ann. Hepatol.* 16:s15–s20. doi:10.5604/01.3001.0010.5494.

Rapin, A., C. Pattaroni, B. J. Marsland, and N. L. Harris. 2017. Microbiota analysis using an Illumina MiSeq platform to sequence 16S rRNA genes. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 7:100–129. doi:10.1002/cpmo.29.

Rasmussen, H. S., K. Holtug, and P. B. Mortensen. 1988. Degradation of amino acids to short-chain fatty acids in humans. An in vitro study. *Scand. J. Gastroenterol.* 23:178–182.

Rea, M. C., C. S. Sit, E. Clayton, P. M. O'Connor, R. M. Whittall, J. Zheng, J. C. Vederas, R. P. Ross, and C. Hill. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *PNAS.* 107:9352–9357. doi:10.1073/pnas.0913554107.

Reddy, K. E., J. Y. Jeong, J. Song, Y. Lee, H.-J. Lee, D.-W. Kim, H. J. Jung, K. H. Kim, Minji Kim, Y. K. Oh, S. D. Lee, and Minseok Kim. 2018a. Colon microbiome of pigs fed diet contaminated with commercial purified deoxynivalenol and zearalenone. *Toxins*. 10:347. doi:10.3390/toxins10090347.

Reddy, K. E., J. Song, H.-J. Lee, M. Kim, Dong-Wook Kim, H. Jung, B. Kim, Y. Lee, D. Yu, Dong-Woon Kim, Y. Oh, and S. Lee. 2018b. Effects of high levels of deoxynivalenol and zearalenone on growth performance, and hematological and immunological parameters in pigs. *Toxins*. 10:114. doi:10.3390/toxins10030114.

Reinhardt, C., M. Bergentall, T. U. Greiner, F. Schaffner, G. Ostergren-Lundén, L. C. Petersen, W. Ruf, and F. Bäckhed. 2012. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*. 483:627–631. doi:10.1038/nature10893.

Relman, D. A. 2012. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev*. 70:S2–S9. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x.

Renaudeau, D., G. Frances, S. Dubois, H. Gilbert, and J. Noblet. 2013. Effect of thermal heat stress on energy utilization in two lines of pigs divergently selected for residual feed intake. *J. Animal Sci*. 91:1162–1175. doi:10.2527/jas.2012-5689.

Renaudeau, D., M. Giorgi, F. Silou, and J. L. Weisbecker. 2006. Effect of breed (lean or fat pigs) and sex on performance and feeding behaviour of group housed growing pigs in a tropical climate. *AJAS*. 19:593–600. doi:10.5713/ajas.2006.593.

Renaudeau, D., J.-L. Gourdine, and N. R. St-Pierre. 2011. A meta-analysis of the effects of high ambient temperature on growth performance of growing-finishing pigs. *J. Animal Sci*. 89:2220–2230. doi:10.2527/jas.2010-3329.

Renaudeau, D., E. Huc, and J. Noblet. 2007. Acclimation to high ambient temperature in Large White and Caribbean Creole growing pigs. *J. Animal Sci*. 85:779–790. doi:10.2527/jas.2006-430.

Renaudeau, D., M. Kerdoncuff, C. Anaïs, and J. L. Gourdine. 2008. Effect of temperature level on thermal acclimation in Large White growing pigs. *animal*. 2:1619. doi:10.1017/S1751731108002814.

Rérat, A. 1996. Influence of the nature of carbohydrate intake on the absorption chronology of reducing sugars and volatile fatty acids in the pig. *Reprod. Nutr. Dev*. 36:3–19. doi:10.1051/rnd:19960101.

Richardson, A., A. T. Delbridge, N. J. Brown, R. D. Rumsey, and N. W. Read. 1991. Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut*. 32:266–269. doi:10.1136/gut.32.3.266.

Riezman, H. 2004. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle*. 3:60–62. doi:10.4161/cc.3.1.625.

Rijnen, M. M. J. A., M. W. A. Verstegen, M. J. W. Heetkamp, J. Haaksma, and J. W. Schrama. 2001. Effects of dietary fermentable carbohydrates on energy metabolism in group-housed sows. *J. Animal Sci*. 79:148–154. doi:10.2527/2001.791148x.

Rinttilä, T., and J. Apajalahti. 2013. Intestinal microbiota and metabolites — Implications for broiler chicken health and performance. *J. Appl. Poult. Res.* 22:647–658. doi:10.3382/japr.2013-00742.

Rist, V. T. S., M. Eklund, E. Bauer, N. Sauer, and R. Mosenthin. 2012. Effect of feeding level on the composition of the intestinal microbiota in weaned piglets. *J. Animal Sci.* 90:19–21. doi:10.2527/jas.52642.

Robert, H., D. Payros, P. Pinton, V. Théodorou, M. Mercier-Bonin, and I. P. Oswald. 2017. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J. Toxicol. Environ. Health B.* 20:249–275. doi:10.1080/10937404.2017.1326071.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26:139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.

Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, R. Redondo, and C. Cajarville. 2003. Effects of feed intake on composition of sheep rumen contents and their microbial population size. *Br. J. Nutr.* 89:97–103. doi:10.1079/BJN2002752.

Roediger, W. E. W. 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology.* 83:424–429. doi:10.1016/S0016-5085(82)80339-9.

Rognes, T., T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, and F. Mahé. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 4:e2584. doi:10.7717/peerj.2584.

Roguet, A., A. M. Eren, R. J. Newton, and S. L. McLellan. 2018. Fecal source identification using random forest. *Microbiome.* 6:185. doi:10.1186/s40168-018-0568-3.

Rohart, F., B. Gautier, A. Singh, and K.-A. Lê Cao. 2017. mixOmics: an R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752.

Rojo, D., C. Méndez-García, B. A. Raczkowska, R. Bargiela, A. Moya, M. Ferrer, and C. Barbas. 2017. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 41:453–478. doi:10.1093/femsre/fuw046.

Rolhion, N., and B. Chassaing. 2016. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 371:20150504. doi:10.1098/rstb.2015.0504.

Rosé, R., H. Gilbert, T. Loyau, M. Giorgi, Y. Billon, J. Riquet, D. Renaudeau, and J.-L. Gourdine. 2017. Interactions between sire family and production environment (temperate vs. tropical) on performance and thermoregulation responses in growing pigs. *J. Animal Sci.* 95:4738–4751. doi:10.2527/jas2017.1611.

Rosselló-Móra, R., and R. Amann. 2015. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:209–216. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.001.

Rougière, N., and B. Carré. 2010. Comparison of gastrointestinal transit times between chickens from D+ and D- genetic lines selected for divergent digestion efficiency. *animal*. 4:1861–1872. doi:10.1017/S1751731110001266.

Ruiz, V. L. A., J. G. Bersano, A. F. Carvalho, M. H. B. Catroxo, D. P. Chiebao, F. Gregori, S. Miyashiro, A. F. C. Nassar, T. M. F. S. Oliveira, R. A. Ogata, E. P. Scarcelli, and P. O. Tonietti. 2016. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Res. Notes*. 9:22. doi:10.1186/s13104-015-1751-2.

Ruud, J., and J. C. Brüning. 2015. Light on leptin link to lipolysis. *Nature*. 527:43–44. doi:10.1038/527043a.

Saint-Cyr, M. J., A. Perrin-Guyomard, P. Houée, J.-G. Rolland, and M. Laurentie. 2013. Evaluation of an oral subchronic exposure of deoxynivalenol on the composition of human gut microbiota in a model of human microbiota-associated rats. *PLoS ONE*. 8:e80578. doi:10.1371/journal.pone.0080578.

Salfen, B. E., J. A. Carroll, D. H. Keisler, and T. A. Strauch. 2004. Effects of exogenous ghrelin on feed intake, weight gain, behavior, and endocrine responses in weanling pigs. *J. Animal Sci*. 82:1957–1966. doi:10.2527/2004.8271957x.

Schatzmayr, G., and E. Streit. 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin J*. 6:213–222. doi:10.3920/WMJ2013.1572.

Schatzmayr, G., F. Zehner, M. Täubel, D. Schatzmayr, A. Klimitsch, A. P. Loibner, and E. M. Binder. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res*. 50:543–551. doi:10.1002/mnfr.200500181.

Scher, J. U., A. Sczesnak, R. S. Longman, N. Segata, C. Ubeda, C. Bielski, T. Rostron, V. Cerundolo, E. G. Pamer, S. B. Abramson, C. Huttenhower, and D. R. Littman. 2013. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*. 2:e01202. doi:10.7554/eLife.01202.

Schokker, D., J. Fledderus, R. Jansen, S. A. Vastenhouw, F. M. de Bree, M. A. Smits, and A. A. J. M. Jansman. 2018. Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development. *J. Animal Sci*. 96:2139–2153. doi:10.1093/jas/sky110.

Schokker, D., J. Zhang, L. Zhang, S. A. Vastenhouw, H. G. H. J. Heilig, H. Smidt, J. M. J. Rebel, and M. A. Smits. 2014. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS ONE*. 9:e100040. doi:10.1371/journal.pone.0100040.

Scott, K. P., S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2008. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*. 33:201–211. doi:10.1111/j.1467-3010.2008.00706.x.

Serviento, A. M., L. Brossard, and D. Renaudeau. 2018. An acute challenge with a deoxynivalenol-contaminated diet has short- and long-term effects on performance and feeding behavior in finishing pigs. *J. Animal Sci*. 96:5209–5221. doi:10.1093/jas/sky378.

Shi, D., L. Bai, Q. Qu, S. Zhou, M. Yang, S. Guo, Q. Li, and C. Liu. 2019. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poultry Sci.* 98:2405–2413. doi:10.3382/ps/pez026.

Shields-Cutler, R. R., G. A. Al-Ghalith, M. Yassour, and D. Knights. 2018. SplinctomeR enables group comparisons in longitudinal microbiome studies. *Front. Microbiol.* 9:785. doi:10.3389/fmicb.2018.00785.

Shin, R., M. Suzuki, and Y. Morishita. 2002. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Med. Microbiol.* 51:201–206. doi:10.1099/0022-1317-51-3-201.

Siegerstetter, S.-C., R. M. Petri, E. Magowan, P. G. Lawlor, Q. Zebeli, N. E. O’Connell, and B. U. Metzler-Zebeli. 2018. Feed restriction modulates the fecal microbiota composition, nutrient retention, and feed efficiency in chickens divergent in residual feed intake. *Front. Microbiol.* 9:2698. doi:10.3389/fmicb.2018.02698.

Simpson, H. L., and B. J. Campbell. 2015. Review article: dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 42:158–179. doi:10.1111/apt.13248.

Sinclair, L., O. A. Osman, S. Bertilsson, and A. Eiler. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the Illumina platform. *PLoS ONE.* 10:e0116955. doi:10.1371/journal.pone.0116955.

Smith, E. A., and G. T. Macfarlane. 1996. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J. Appl. Microbiol.* 81:288–302. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x.

Sobhonslidsuk, A., S. Chanprasertyothin, T. Pongrujikorn, P. Kaewduang, K. Promson, S. Petraksa, and B. Ongphiphadhanakul. 2018. The association of gut microbiota with nonalcoholic steatohepatitis in Thais. *BioMed Res. Int.* 2018:9340316. doi:10.1155/2018/9340316.

Sobrova, P., V. Adam, A. Vasatkova, M. Beklova, L. Zeman, and R. Kizek. 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* 3:94–99. doi:10.2478/v10102-010-0019-x.

Sohail, M. U., M. E. Hume, J. A. Byrd, D. J. Nisbet, M. Z. Shabbir, A. Ijaz, and H. Rehman. 2015. Molecular analysis of the caecal and tracheal microbiome of heat-stressed broilers supplemented with prebiotic and probiotic. *Avian Pathol.* 44:67–74. doi:10.1080/03079457.2015.1004622.

Sommer, F., I. Nookaew, N. Sommer, P. Fogelstrand, and F. Bäckhed. 2015. Site-specific programming of the host epithelial transcriptome by the gut microbiota. *Genome Biol.* 16:62. doi:10.1186/s13059-015-0614-4.

Song, J., K. Xiao, Y. L. Ke, L. F. Jiao, C. H. Hu, Q. Y. Diao, B. Shi, and X. T. Zou. 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Sci.* 93:581–588. doi:10.3382/ps.2013-03455.

Sonnenburg, E. D., S. A. Smits, M. Tikhonov, S. K. Higginbottom, N. S. Wingreen, and J. L. Sonnenburg. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*. 529:212–215. doi:10.1038/nature16504.

Sorokulova, I., L. Globa, O. Pustovyy, and V. Vodyanoy. 2016. Prevention of heat stress adverse effects in rats by *Bacillus subtilis* strain. *J. Vis. Exp.* e54122. doi:10.3791/54122.

Spiller, G. A., J. A. Story, L. G. Wong, J. D. Nunes, M. Alton, M. S. Petro, E. J. Furumoto, J. H. Whittam, and J. Scala. 1986. Effect of increasing levels of hard wheat fiber on fecal weight, minerals and steroids and gastrointestinal transit time in healthy young women. *J. Nutr.* 116:778–785. doi:10.1093/jn/116.5.778.

Stanley, D., M. S. Geier, S. E. Denman, V. R. Haring, T. M. Crowley, R. J. Hughes, and R. J. Moore. 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Vet. Microbiol.* 164:85–92. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.030.

Stanley, D., R. J. Hughes, M. S. Geier, and R. J. Moore. 2016. Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 7:187. doi:10.3389/fmicb.2016.00187.

Stanogias, G., and G. R. Pearce. 1985. The digestion of fibre by pigs: 3. Effects of the amount and type of fibre on physical characteristics of segments of the gastrointestinal tract. *Br. J. Nutr.* 53:537–548. doi:10.1079/BJN19850063.

Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper, and J. I. Gordon. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS*. 99:15451–15455. doi:10.1073/pnas.202604299.

Stothart, M., and A. Newman. 2017. A gut reaction to city life, stress-microbiome interactions in urban squirrels. Available from: <http://hdl.handle.net/10214/10375>

St-Pierre, N. R., B. Cobanov, and G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US Livestock Industries. *J. Dairy Sci.* 86:E52–E77. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5.

Strube, M. L., J. E. Hansen, S. Rasmussen, and K. Pedersen. 2018. A detailed investigation of the porcine skin and nose microbiome using universal and *Staphylococcus* specific primers. *Sci. Rep.* 8:12751. doi:10.1038/s41598-018-30689-y.

Sun, Y., Y. Su, and W. Zhu. 2016. Microbiome-metabolome responses in the cecum and colon of pig to a high resistant starch diet. *Front. Microbiol.* 7:779. doi:10.3389/fmicb.2016.00779.

Sun, Y., Li. Zhou, L. Fang, Y. Su, and W. Zhu. 2015. Responses in colonic microbial community and gene expression of pigs to a long-term high resistant starch diet. *Front. Microbiol.* 6:877. doi:10.3389/fmicb.2015.00877.

Suzuki, K., S. Ha, M. Tsuji, and S. Fagarasan. 2007. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin. Immunol.* 19:127–135. doi:10.1016/j.smim.2006.10.001.

Suzuki, K., R. Harasawa, Y. Yoshitake, and T. Mitsuoka. 1983. Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Nihon Juigaku Zasshi.* 45:331–8. doi:10.1292/jvms1939.45.331.

Tajima, K., I. Nonaka, K. Higuchi, N. Takusari, M. Kurihara, A. Takenaka, M. Mitsumori, H. Kajikawa, and R. I. Aminov. 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe.* 13:57–64. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.12.001.

Tan, Z., T. Yang, Y. Wang, K. Xing, F. Zhang, X. Zhao, H. Ao, S. Chen, J. Liu, and C. Wang. 2017. Metagenomic analysis of cecal microbiome identified microbiota and functional capacities associated with feed efficiency in Landrace finishing pigs. *Front. Microbiol.* 8:1546. doi:10.3389/fmicb.2017.01546.

Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J.-P. Furet, E. Ugarte, R. Muñoz-Tamayo, D. L. E. Paslier, R. Nalin, J. Dore, and M. Leclerc. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *EMI.* 11:2574–2584. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.

Tazoe, H., Y. Otomo, I. Kaji, R. Tanaka, S. I. Karaki, and A. Kuwahara. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 Suppl 2:251–262.

Tenenhaus, M. 1998. *La régression PLS: théorie et pratique.* Editions TECHNIP.

Theander, O., E. Westerlund, P. Åman, and H. Graham. 1989. Plant cell walls and monogastric diets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 23:205–225. doi:10.1016/0377-8401(89)90098-9.

Theander-Carrillo, C., P. Wiedmer, P. Cettour-Rose, R. Nogueiras, D. Perez-Tilve, P. Pfluger, T. R. Castaneda, P. Muzzin, A. Schürmann, I. Szanto, M. H. Tschöp, and F. Rohner-Jeanraud. 2006. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J. Clin. Invest.* 116:1983–1993. doi:10.1172/JCI25811.

Thompson, C. L., B. Wang, and A. J. Holmes. 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J.* 2:739–748. doi:10.1038/ismej.2008.29.

Thompson, G. R., and P. C. Trexler. 1971. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut.* 12:230–235. doi:10.1136/gut.12.3.230.

Tilocca, B., K. Burbach, C. M. E. Heyer, L. E. Hoelzle, R. Mosenthin, V. Stefanski, A. Camarinha-Silva, and J. Seifert. 2017. Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome—from days to weeks. *Microbiome.* 5:144. doi:10.1186/s40168-017-0362-7.

Torok, V. A., C. Dyson, A. McKay, and K. Ophel-Keller. 2013. Quantitative molecular assays for evaluating changes in broiler gut microbiota linked with diet and performance. *Anim. Prod. Sci.* 53:1260–1268. doi:10.1071/AN12272.

Torok, V. A., R. J. Hughes, L. L. Mikkelsen, R. Perez-Maldonado, K. Balding, R. MacAlpine, N. J. Percy, and K. Ophel-Keller. 2011. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5868–5878. doi:10.1128/AEM.00165-11.

Torrallardona, D., C. I. Harris, and M. F. Fuller. 2003a. Lysine synthesized by the gastrointestinal microflora of pigs is absorbed, mostly in the small intestine. *A. J. P. Endocrinology and Metabolism.* 284:E1177–E1180. doi:10.1152/ajpendo.00465.2002.

Torrallardona, D., C. I. Harris, and M. F. Fuller. 2003b. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *J. Nutr.* 133:1127–1131. doi:10.1093/jn/133.4.1127.

Tschöp, M., D. L. Smiley, and M. L. Heiman. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 407:908. doi:10.1038/35038090.

Turnbaugh, P. J., M. Hamady, T. Yatsunencko, B. L. Cantarel, A. Duncan, R. E. Ley, M. L. Sogin, W. J. Jones, B. A. Roe, J. P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A. C. Heath, R. Knight, and J. I. Gordon. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 457:480–484. doi:10.1038/nature07540.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 444:1027–1031. doi:10.1038/nature05414.

Umu, Ö. C. O., J. A. Frank, J. U. Fangel, M. Oostindjer, C. S. da Silva, E. J. Bolhuis, G. Bosch, W. G. T. Willats, P. B. Pope, and D. B. Diep. 2015. Resistant starch diet induces change in the swine microbiome and a predominance of beneficial bacterial populations. *Microbiome.* 3:16. doi:10.1186/s40168-015-0078-5.

Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe.* 16:27–33. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.04.006.

Valeriano, V. D. V., M. P. Balolong, and D. K. Kang. 2017. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *J. Appl. Microbiol.* 122:554–567. doi:10.1111/jam.13364.

Van Milgen, J., J. F. Bernier, Y. Le Cozler, S. Dubois, and J. Noblet. 1998. Major determinants of fasting heat production and energetic cost of activity in growing pigs of different body weight and breed/castration combination. *Br. J. Nutr.* 79:509–517. doi:10.1079/BJN19980089.

Van Milgen, J., and J. Noblet. 2003. Partitioning of energy intake to heat, protein, and fat in growing pigs. *J. Animal Sci.* 81:E86–E93. doi:10.2527/2003.8114_suppl_2E86x.

Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50:50–55.

Varel, V. H., S. J. Fryda, and I. M. Robinson. 1984. Cellulolytic bacteria from pig large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:219–221.

Varel, V. H., A. J. Richardson, and C. S. Stewart. 1989. Degradation of barley straw, ryegrass, and alfalfa cell walls by *Clostridium longisporum* and *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3080–3084.

Venkataraman, A., M. Parlov, P. Hu, D. Schnell, X. Wei, and J. P. Tiesman. 2018. Spike-in genomic DNA for validating performance of metagenomics workflows. *BioTechniques.* 65:315–321. doi:10.2144/btn-2018-0089.

Verschuren, L. M. G., M. P. L. Calus, A. J. M. Jansman, R. Bergsma, E. F. Knol, H. Gilbert, and O. Zemb. 2018. Fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex. *J. Animal Sci.* 96:1405–1418. doi:10.1093/jas/sky060.

Větrovský, T., and P. Baldrian. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 8:e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923.

Vigors, S., J. V. O’Doherty, A. K. Kelly, C. J. O’Shea, and T. Sweeney. 2016a. The effect of divergence in feed efficiency on the intestinal microbiota and the intestinal immune response in both unchallenged and lipopolysaccharide challenged ileal and colonic explants. *PLoS ONE.* 11:e0148145. doi:10.1371/journal.pone.0148145.

Vigors, S., T. Sweeney, C. J. O’Shea, A. K. Kelly, J. V. O’Doherty, and J. V. O’Doherty. 2016b. Pigs that are divergent in feed efficiency, differ in intestinal enzyme and nutrient transporter gene expression, nutrient digestibility and microbial activity. *animal.* 10:1848–1855. doi:10.1017/S1751731116000847.

Vizcarra, J. A., J. D. Kirby, S. K. Kim, and M. L. Galyean. 2007. Active immunization against ghrelin decreases weight gain and alters plasma concentrations of growth hormone in growing pigs. *Domest. Anim. Endocrin.* 33:176–189. doi:10.1016/j.domaniend.2006.05.005.

Waché, Y. J., C. Valat, G. Postollec, S. Bougeard, C. Burel, I. P. Oswald, and P. Fravallo. 2008. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int. J. Mol. Sci.* 10:1–17. doi:10.3390/ijms10010001.

Walker, A. W., J. Ince, S. H. Duncan, L. M. Webster, G. Holtrop, X. Ze, D. Brown, M. D. Stares, P. Scott, A. Bergerat, P. Louis, F. McIntosh, A. M. Johnstone, G. E. Lobley, J. Parkhill, and H. J. Flint. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 5:220–230. doi:10.1038/ismej.2010.118.

Wang, S.-H., C.-Y. Cheng, C.-J. Chen, H.-L. Chan, H.-H. Chen, P.-C. Tang, C.-F. Chen, Y.-P. Lee, and S.-Y. Huang. 2018. Acute heat stress changes protein expression in the testes of a broiler-type strain of Taiwan country chickens. *Animal Biotechnology.* 30:129–145. doi:10.1080/10495398.2018.1446972.

Wang, Y., and P.-Y. Qian. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE.* 4:e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401.

Werner, J. J., M. L. Garcia, S. D. Perkins, K. E. Yarasheski, S. R. Smith, B. D. Muegge, F. J. Stadermann, C. M. DeRito, C. Floss, E. L. Madsen, J. I. Gordon, and L. T. Angenent. 2014. Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation. A. M. Spormann, editor. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:3375–3383. doi:10.1128/AEM.00166-14.

White, J. K., J. L. Nielsen, and A. M. Madsen. 2019. Microbial species and biodiversity in settling dust within and between pig farms. *Environ. Res.* 171:558–567. doi:10.1016/j.envres.2019.01.008.

Wilfart, A., L. Montagne, H. Simmins, J. van Milgen, and J. Noblet. 2007a. Sites of nutrient digestion in growing pigs: effect of dietary fiber. *J. Animal Sci.* 85:976–983. doi:10.2527/jas.2006-431.

Wilfart, A., L. Montagne, H. Simmins, J. Noblet, and J. van Milgen. 2007b. Digesta transit in different segments of the gastrointestinal tract of pigs as affected by insoluble fibre supplied by wheat bran. *Br. J. Nutr.* 98:54–62. doi:10.1017/S0007114507682981.

Wilson, I. D., and J. K. Nicholson. 2017. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy and toxicity. *Transl. Res.* 179:204–222. doi:10.1016/j.trsl.2016.08.002.

Wintzingerode, F. V., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:213–229. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x.

Wold, S., M. Sjöström, and L. Eriksson. 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* 58:109–130. doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1.

Wong, J., Y. M. Piceno, T. Z. DeSantis, M. Pahl, G. L. Andersen, and N. D. Vaziri. 2014. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* 39:230–237. doi:10.1159/000360010.

Wu, G. D., J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y.-Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F. D. Bushman, and J. D. Lewis. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 334:105–108. doi:10.1126/science.1208344.

Wu, Y., L. Pan, Q. H. Shang, X. K. Ma, S. F. Long, Y. T. Xu, and X. S. Piao. 2017. Effects of isomalto-oligosaccharides as potential prebiotics on performance, immune function and gut microbiota in weaned pigs. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 230:126–135. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.05.013.

Xiao, L., J. Estellé, P. Kiilerich, Y. Ramayo-Caldas, Z. Xia, Q. Feng, S. Liang, A. Ø. Pedersen, N. J. Kjeldsen, C. Liu, E. Maguin, J. Doré, N. Pons, E. L. Chatelier, E. Prifti, J. Li, H. Jia, X. Liu, X. Xu, S. D. Ehrlich, L. Madsen, K. Kristiansen, C. Rogel-Gaillard, and J. Wang. 2016. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat. Microbiol.* 1:16161. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.161.

Xiong, Y., N. Miyamoto, K. Shibata, M. A. Valasek, T. Motoike, R. M. Kedzierski, and M. Yanagisawa. 2004. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes

through the G protein-coupled receptor GPR41. *PNAS*. 101:1045–1050. doi:10.1073/pnas.2637002100.

Yan, H., H. Diao, Y. Xiao, W. Li, B. Yu, J. He, J. Yu, P. Zheng, X. Mao, Y. Luo, B. Zeng, H. Wei, and D. Chen. 2016. Gut microbiota can transfer fiber characteristics and lipid metabolic profiles of skeletal muscle from pigs to germ-free mice. *Sci. Rep.* 6:31786. doi:10.1038/srep31786.

Yang, H., X. Huang, S. Fang, M. He, Y. Zhao, Z. Wu, M. Yang, Z. Zhang, C. Chen, and L. Huang. 2017. Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. *Front. Microbiol.* 8:1555. doi:10.3389/fmicb.2017.01555.

Yang, Q., X. Huang, S. Zhao, W. Sun, Z. Yan, P. Wang, S. Li, W. Huang, S. Zhang, L. Liu, and S. Gun. 2017. Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Front. Microbiol.* 8:502. doi:10.3389/fmicb.2017.00502.

Yang, Y., X. Zhao, M. H. A. Le, R. Zijlstra, and M. Gänzle. 2015. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front. Microbiol.* 6:762. doi:10.3389/fmicb.2015.00762.

Yoshii, K., K. Hosomi, K. Sawane, and J. Kunisawa. 2019. Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity. *Front. Nutr.* 6:48. doi:10.3389/fnut.2019.00048.

Young, J. C., T. Zhou, H. Yu, H. Zhu, and J. Gong. 2007. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food Chem. Toxicol.* 45:136–143. doi:10.1016/j.fct.2006.07.028.

Young, J. M., W. Cai, and J. C. M. Dekkers. 2011. Effect of selection for residual feed intake on feeding behavior and daily feed intake patterns in Yorkshire swine. *J. Animal Sci.* 89:639–647. doi:10.2527/jas.2010-2892.

Yu, H. F., A. N. Wang, X. J. Li, and S. Y. Qiao. 2008. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 17:61–69. doi:10.22358/jafs/66470/2008.

Yu, H., T. Zhou, J. Gong, C. Young, X. Su, X.-Z. Li, H. Zhu, R. Tsao, and R. Yang. 2010. Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. *BMC Microbiol.* 10:182. doi:10.1186/1471-2180-10-182.

Zeineldin, M., B. Aldridge, and J. Lowe. 2019. Antimicrobial effects on swine gastrointestinal microbiota and their accompanying antibiotic resistome. *Front Microbiol.* 10:1035. doi:10.3389/fmicb.2019.01035.

Zeng, W., R. M. Pirzgalska, M. M. A. Pereira, N. Kubasova, A. Barateiro, E. Seixas, Y.-H. Lu, A. Kozlova, H. Voss, G. G. Martins, J. M. Friedman, and A. I. Domingos. 2015. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell.* 163:84–94. doi:10.1016/j.cell.2015.08.055.

Zhang, F., W. Zheng, Y. Xue, and W. Yao. 2019. Suhuai suckling piglet hindgut microbiome-metabolome responses to different dietary copper levels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:853–868. doi:10.1007/s00253-018-9533-0.

Zhang, X., Y. Zhao, M. Zhang, X. Pang, J. Xu, C. Kang, M. Li, C. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang, X. Li, G. Ning, and L. Zhao. 2012. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS ONE.* 7:e42529. doi:10.1371/journal.pone.0042529.

Zhao, J., Q. Wang, L. Liu, Y. Chen, A. Jin, G. Liu, K. Li, D. Li, and C. Lai. 2017. Comparative digestibility of nutrients and amino acids in high-fiber diets fed to crossbred barrows of Duroc boars crossed with Berkshire×Jiaying and Landrace×Yorkshire. *AJAS.* 31:721–728. doi:2018.31.5.721.

Zhao, L., G. Wang, P. Siegel, C. He, H. Wang, W. Zhao, Z. Zhai, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang, Z. Sun, W. Chen, Y. Zhang, and H. Meng. 2013. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Sci. Rep.* 3:1163. doi:10.1038/srep01163.

Zhao, W., Y. Wang, S. Liu, J. Huang, Z. Zhai, C. He, J. Ding, J. Wang, H. Wang, W. Fan, J. Zhao, and H. Meng. 2015. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS ONE.* 10:e0117441. doi:10.1371/journal.pone.0117441.

Zhu, L., R. Liao, N. Wu, G. Zhu, and C. Yang. 2019. Heat stress mediates changes in fecal microbiome and functional pathways of laying hens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:461–472. doi:10.1007/s00253-018-9465-8.

Ziemer, C. J., B. J. Kerr, T. E. Weber, S. Arcidiacono, M. Morrison, and A. Ragauskas. 2012. Effects of feeding fiber-fermenting bacteria to pigs on nutrient digestion, fecal output, and plasma energy metabolites. *J. Animal Sci.* 90:4020–4027. doi:10.2527/jas.2012-5193.

Annexes

1. Abstract, EAAP 2018, Effect of heat stress on faecal microbiota composition in swine: preliminary results

Citation: Le Sciellour, M., I. Hochu, O. Zemb, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi, Y. Billon, J.-L. Gourdine, and D. Renaudeau. 2018. Effect of heat stress on faecal microbiota composition in swine: preliminary results. In: Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Wageningen Academic Publishers, Wageningen (Pays-Bas) 978-908686-323-5, Dubrovnik, Croatia. p. 705.

Abstract: Gut microbiota plays a central role in health and nutrient digestion and would help the host for better coping with environmental perturbations. In tropical conditions or in temperate countries during summer, elevated ambient temperatures lead to cause economic losses in pig industry. In heat stress (HS), the reduction in voluntary feed intake is the main adaptation response for reducing heat production. This lower feed intake has subsequent negative effects on pig performance. The main purpose of this study was to investigate the relationships between HS and gut microbiota composition. A better understanding of the microbiota response to HS could allow the selection for HS well adapted animals.

Genetically related pigs were raised under temperate or tropical farm conditions with mean thermal humidity indexes respectively 23 and 25.5 from 11 to 23 weeks of age. In temperate conditions, pigs were submitted to a 3-week HS challenge at 30°C. Fecal samples were collected in all the pigs at 23 weeks of age in both environments (n=1200 samples) and at 26 weeks of age in temperate environment (n=600 samples). Therefore, it was possible to compare microbiota from pigs raised under temperate environment, under tropical climate and those exposed to HS. Microbiota extracted from pigs under temperate and tropical environments presented different compositions whereas pigs exposed to heat challenge or raised in tropical farm tended to share a common microbiota. HS challenge drastically

modified gut microbiota and the groups before and after the challenge could be predicted in a multilevel sparse partial least square discriminant analysis with 32 OTUs and a mean classification error-rate of 10%.

Our experiment suggests that microbiota can be used as biomarkers of heat stress exposition.

This study is part of the Feed-a-Gene Project funded from the European Union's H2020 Program (grant 633531), and of the PigHeat project funded by the French National Agency of Research (ANR-12-ADAP-0015).

2. Abstract et poster, EAAP 2018, Effect of successive fibre diets on nutrient digestibility and faecal microbiota composition in pigs

Citation: Le Sciellour, M., E. Labussière, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2018. Effect of successive fibre diets on nutrient digestibility and faecal microbiota composition in pigs. In: Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Wageningen Academic Publishers, Wageningen (Pays-Bas) 978-908686-323-5, Dubrovnik, Croatia. p. 208.

Abstract: Gut microbial population acts in complement with its host through nutrient digestion and health of the gastrointestinal tract. Changes in microbiota composition may then lead to changes in nutrient digestibility. The present study aimed at determining the effects of dietary fiber content on gut microbiota composition and apparent fecal nutrient digestibility in pigs. Furthermore, the relationships between microbiota and digestibility coefficients were investigated.

Growing-finishing pigs (from 35 to 74 kg mean body weight) were fed alternatively a low-fiber (LF) and a high-fiber (HF) diet during 4 successive 3-week periods. Data collection for digestibility measurements was achieved during the last week of each period and fecal microbiota was collected at the end of each period for 16S rRNA gene sequencing. The two diets fed by the pigs could be discriminated using 31 predicting OTUs in a sparse partial least square discriminant analysis (mean classification error-rate 3.9%). Furthermore, microbiota was resilient to diet effect. Pearson correlations between microbiota composition and apparent digestibility coefficients of energy, protein, cellulose and hemicellulose emphasized the fact that in LF group, Clostridiaceae and Turicibacter were negatively correlated with protein and energy digestibility coefficients whereas Lactobacillus was positively correlated. In addition, Lachnospiraceae and Prevotella were negatively correlated with cell wall components digestibility. In HF diet, no significant correlation between microbiota and digestibility was found.

The present study demonstrates that 3 weeks of adaptation to a new diet seem to be sufficient to observe resilience in growing pigs gut microbiota. In addition, fecal microbiota can be used to classify pigs according to their diet. Because some bacterial family and genera are favorable to digestibility, this study suggests that manipulations of bacterial populations can improve digestibility and feed efficiency.

This study is part of the Feed-a-Gene Project, funded from the European Union's H2020 Programme under grant agreement no 633531.



EFFECT OF DIETARY FIBER CONTENT ON NUTRIENT DIGESTIBILITY AND FECAL MICROBIOTA COMPOSITION IN GROWING PIGS

Le Sciellour M.¹, Labussière E.¹, Zemb O.^{2*}, Renaudeau D.¹

¹PEGASE, Agrocampus-Ouest, INRA, 35590, Saint-Gilles, France
²GenPhySE, INRA, INPT, INPT-ENV, Université de Toulouse, 31320, Castanet-Tolosan, France
 *olivier.zemb@inra.fr



Introduction

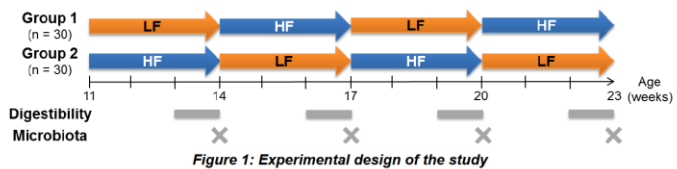
Gut microbial population acts in complement with its host on nutrient digestion and health of the gastrointestinal tract. Changes in microbiota composition may have consequences in nutrient digestibility.

The present study aimed at determining the effects of dietary fiber content on gut microbiota composition and nutrient digestibility in growing pigs.

	LF diet	HF diet
Cereals ¹	70.12	53.31
Soybean meal	15.74	9.18
High fiber raw materials ²	2.50	31.97
Crude fiber	2.8	7.7
Neutral Detergent Fiber	10.0	20.0
Digestible Lysine / Net energy (g/MJ)	0.86	0.86

¹ corn + barley + wheat
² Wheat bran + rapeseed meal + soybean hulls + sugar beet pulp

Material and methods



Experimental design and animals

- Large-White, Duroc and Pietrain growing-finishing pigs (n=10 per breed and per group)
- A low-fiber (LF) and a high-fiber (HF) diet during 4 successive 3-week periods

Measurements

- During one week: feed intake and total collection of feces to evaluate the digestibility
- Feces collection for microbiota analyses: one spot sample at the end of the collection period (16S rRNA gene sequencing → Operational Taxonomic Units (OTUs))

Results

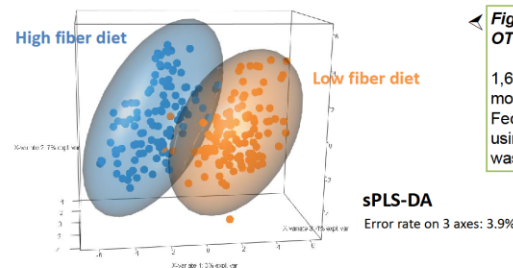


Figure 2: sPLS-DA allows discriminating pigs fed high- and low-fiber diets with 31 OTUs

1,641 OTUs over 2,041 were differentially abundant between LF and HF diets using a glm model.

Fecal microbiota of pigs fed 2 diets different in their fiber content have been discriminated using Spare Partial Least Square Discriminant Analysis. The misclassification error-rate was 3.9% using 31 OTUs. These 31 OTUs can be used as fiber diet biomarkers.

Figure 3: diet bacterial biomarkers are resilient after diet transition (example on 6 OTUs)

The 31 biomarkers of the diet were resilient after each diet transition. These biomarkers belong to *Clostridiaceae*, *Spirochaetaceae*, *Prevotellaceae* and *Peptostreptococcaceae* families.

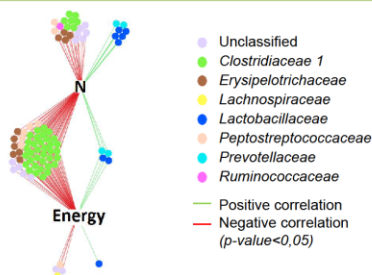
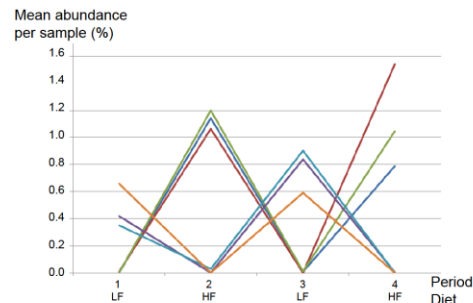


Figure 4: OTUs are correlated with digestibility coefficients of hemicellulose, cellulose, N and energy in LF diet

Pearson correlations associated OTUs belonging to *Lactobacillus* with N and energy digestibility coefficients in a positive correlation. On the contrary, OTUs belonging to *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto* and *Clostridium XI* were negatively correlated with N and energy digestibility. Some OTUs from *Prevotella* and several *Lachnospiraceae* were negatively correlated with the digestibility of cell wall components.



Conclusions

- Fecal microbiota can be used to discriminate pigs according to their diet.
- 3 weeks of adaptation to a new diet seem to be sufficient to observe partial resilience in growing pigs fecal microbiota.
- Bacteria belonging to several bacterial genera and families were correlated with digestibility coefficients.

→ This study suggests that manipulation of bacterial populations can improve digestibility and feed efficiency.

The authors want to thank A. Berrée, A. Chauvin, M. Genissel, J. Georges, G. Guillemois, F. Legouevic, M.-H. Lohat, V. Piedvache, J.-F. Rouaud, Y. Jaguelin, E. Janvier, A. Marchais, B. Gabaud and the GeT genomic platform.



This study is part of the Feed-a-Gene Project, funded from the European Union's H2020 Program under grant agreement no 633531



3. Abstract et poster, ASAS 2019, Acute challenges with deoxynivalenol contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs

Citation: Le Sciellour, Mathilde, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019. Acute challenges with a DON-contaminated diet induce transient changes on microbiota composition in finishing pigs. In: Austin, Texas, Etats-Unis. (A paraître dans Journal of Animal Science, E. Suppl.)

Abstract: The present study aimed at describing the impact of a deoxynivalenol (DON) - contaminated diet on microbiota composition. A total of 147 (Large White x Landrace) x Piétrain pigs from two replicates were affected to four different experimental treatments. Pigs in the control group (CC) received a control diet from 99 to 154 days of age. Groups DC, CD, and DD were given the DON-contaminated diet (3.02 mg DON/kg feed) for 7 days at 113, at 134, and at 113 and 134 days of age, respectively. The DON-contaminated diet was formulated with a naturally contaminated corn. The body weight gain and the feed intake were daily recorded from day 99 to 154. Fecal samples were collected at the beginning of the experiment (d99), immediately after the end of the 7-days DON challenges (d119 and 140), and at the end of the experiment (d154) for further 16S rRNA sequencing. During challenge periods, ADFI was decreased by 26% to 32% ($P < 0.05$) and ADG by 40% to 60% ($P < 0.05$). Short-term DON challenges induced transient changes in microbiota composition. Two weeks after the end of the DON challenges, this composition went back to control state. Whatever the age, DON challenged pigs could be discriminated from controls in a sparse PLS discriminant analysis based on 88 operational taxonomic units or 27 functional pathways with 16% error-rate. The main predictors raised by this discrimination belonged to *Streptococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Clostridiaceae* families. In our experimental conditions, changes in microbiota composition observed during DON challenges were poorly correlated to changes in ADG and ADFI. This experiment revealed a transient modification of the microbiota composition following the exposition to DON-contaminated diet, with no long-term impact on pigs' performance. This study is part of the Feed-a-Gene Project funded from the European Union's H2020 Program (grant 633531).



Introduction

- Mycotoxin deoxynivalenol (DON) : important contaminant of feed for farm animals with negative effects on health and performance.
- Some intestinal bacterial strains : promote metabolism, binding or detoxification of DON. So microbiota could help its host to keep on performing despite a DON exposure via the feed
- The present study aimed at determining the effects of one or several acute DON challenges on short- and long-term evolution of fecal microbiota

Material and methods

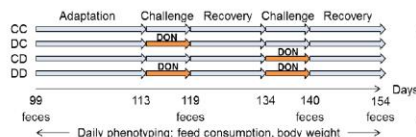


Figure 1: Experimental design of the study

Table 1: Diet composition (%)	Ctrl	DON
Corn	75.00	-
Corn DON contaminated ¹	-	75.00
Wheat bran	1.54	1.64
Soybean meal	18.10	18.00
Digestible Lysine / Net energy (g/MJ)	0.8	0.8

¹ 3.02 mg DON/kg feed

- Pietrain x (Large White x Landrace) finishing pigs (n=40 per treatment group)
- Feces collection for microbiota analyses: 16S rRNA gene sequencing → Operational Taxonomic Units (OTUs)
- Average daily feed intake (ADFI) and average daily gain (ADG) daily recorded

Results



Figure 2: Significant decrease in ADFI ($P < 0.01$) during DON challenges

- DON-challenge: significantly reduced ADFI
- Decrease of the ADG of the challenged pigs : on average 0.94 kg/d compared to 1.05 kg/d in CC ($P < 0.05$)

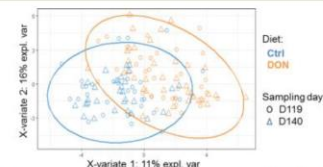


Figure 3: MINT sPLSDA discriminated diets with 88 OTU and 16% error-rate

Whatever the age, DON challenged pigs could be discriminated from controls in a MINT sPLSDA based on 88 OTU or 27 functional pathways with 16% error-rate

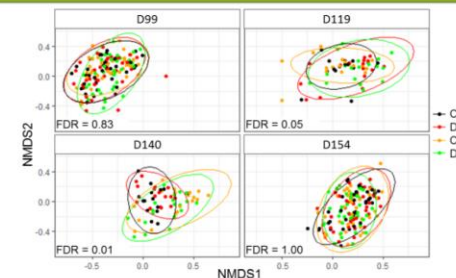


Figure 2: Impact of DON challenge on microbiota composition using NMDS on bray-curtis distance

- DON challenge: microbiota composition of the challenged pigs differed from the CC ($P < 0.05$)
- After a two-week recovery time, no difference of the microbiota composition → resilience of microbiota 11 families impacted:
 - ↳ *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*
 - ↳ *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*

Conclusions

- An acute exposition to DON-contaminated diet modify both microbial composition and functionality.
 - 2 weeks recovery seem to be sufficient to observe resilience in pigs fecal microbiota after an acute DON challenge.
 - Changes in microbiota composition due to DON does not impact long-term performance of the finishing pigs.
- This study suggests that the capacity of the pigs to tolerate the acute DON perturbation is independent of the microbiota composition variation.



4. Abstract et poster, ASAS 2019, Can we predict feed efficiency using fecal microbiota information?

Citation: Le Sciellour, Mathilde, S. Dejean, O. Zemb, and D. Renaudeau. 2019. Can we predict feed efficiency using fecal microbiota information? In: Austin, Texas, Etats-Unis. (A paraître dans Journal of Animal Science, E. Suppl.)

Abstract: The present study aimed at predicting feed efficiency (FE) based on fecal microbiota, using partial least square regression (PLSR), sparse PLSR, and random forest regression (RF). Fecal samples from 147 Pietrain x (Large White x Landrace) pigs reared in two consecutive batches were collected at 99 days of age. Daily live body weight and feed intake were individually measured in pigs fed ad libitum with a corn soybean diet. The relative abundances of operational taxonomic units (OTU) resulting from fecal 16S rRNA sequencing were used to build the prediction models of FE between 99 and 113 days. From these data, neither PLSR nor RF models have been validated on external datasets. An important over-fitting has been observed in PLSR. With this aim to test the ability of the methods to retrieve information, synthetic OTU were created to fit an artificial Pearson correlation with FE ($r^2 = 0$ to 0.9) and were added among the predictors in the dataset. Artificial OTU correlated above 0.37 with FE improved the prediction in sparse PLSR and RF, and reduced the over-fitting. The best predictions were achieved by sparse PLSR. The present study emphasized the ability of sparse PLSR and RF to build valid prediction models of a quantitative phenotype, based on fecal microbiota composition. Since no OTU was correlated above 0.30 with FE in the real dataset, the power of the prediction methods was not enough to extract useful information from the fecal microbiota. The functional redundancy of the microbiota could explain the lack of relevant information in the real dataset to predict pigs' quantitative phenotype. These results suggest that the best strategy is to run sparse PLSR only if a correlation higher than 0.37 is observed. This study is part of the Feed-a-Gene Project funded from the European Union's H2020 Program (grant 633531).



ASAS 2019
PSXIII-9

CAN WE PREDICT FEED EFFICIENCY USING FECAL MICROBIOTA INFORMATION?

Le Sciellour M.^{1*}, Dejean S.², Renaudeau D.¹, Zemb O.³

*mathilde.lesciellour@inra.fr

¹PEGASE, INRA, Agrocampus-Ouest, 35042, Rennes, France

²Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR 5219, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse Cedex 9, France, F-31062

³GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, 31320, Castanet-Tolosan, France

Objectives:
→ To compare 3 regression methods applied on 16S rRNA dataset
→ To determine the OTU characteristics required for a good prediction

Introduction

Fecal microbiota : non-invasive biomarker to replace the time-consuming phenotypic measurements.
The capacity of the quantitative regression methods to deal with microbiota information is poorly documented.

Material and methods

- 147 Piétrain x (large White x Landrace) pigs
- Castrated male and females
- Between 99 and 113 d of age: daily body weight and feed intake recording → feed efficiency (FE) calculation
- At 99 d of age: feces collection → 16S rRNA sequencing via MiSeq → Operational taxonomic unit (OTU) composition

3 regression methods tested:

- partial least square regression (PLSR)
- sparse PLSR (sPLSR)
- random forest regression (RF)

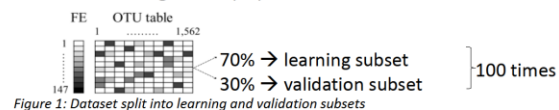


Figure 1: Dataset split into learning and validation subsets

Results from real dataset



Figure 2: Learning and validation R² from regression models applied on real dataset to predict FE

- Neither PLSR nor RF models have been validated on external datasets.
- An important over-fitting has been observed in PLSR.

To test the ability of the methods to retrieve information, synthetic OTU were created to fit an artificial Pearson correlation with FE and were added among the predictors

OTU simulation

1) Simulation approach with fictives OTU artificially correlated with FE

- Based on the actual distribution of OTU
- Reorganize the abundance to fit a specific correlation with FE
- Result in 11 artificial OTU with Pearson correlations coefficients ranging from 0 to 0.97
- Artificial OTU added 1 by 1 to the dataset

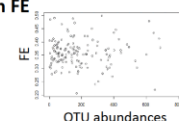


Figure 3: Abundance reorganization to fit a specific correlation with FE

2) Mimic differences in abundance in artificial OTU

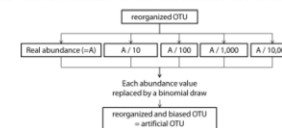


Figure 4: Pipeline of artificial OTU building from an observed OTU

Results from simulation

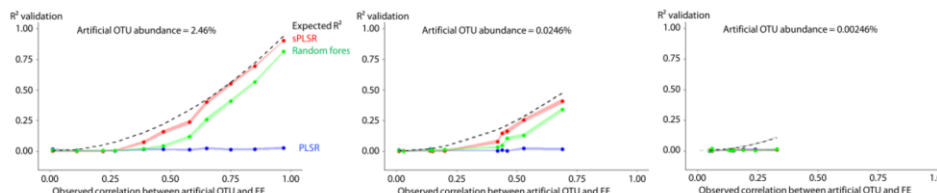


Figure 5: Evaluation of the regression models using mean R² from the validation subset on 100 iterations. The initial datasets contained real OTU and an additional artificial OTU

Since **no OTU was correlated above 0.30 with FE in the real dataset**, the power of the prediction methods was not enough to extract useful information from the fecal microbiota.

How to explain our low ability to predict a phenotype from OTU information?

- High variability in microbiome information → variability in microbiota not directly related to variability in phenotypes?
- Fecal microbiota not representative of the functional microbiota in the gut?
- Lower role of microbiota in case of highly digestible diets?

Conclusions

- The best strategy to predict FE is to run sPLS.
- The OTU have to represent at least 0.02% of the total sequences and be correlated at 0.37 with the phenotype in order to be useful for a quantitative prediction



This study is part of the Feed-a-Gene Project, funded from the European Union's H2020 Program under grant agreement no 633531



5. JRP 2020, Impact d'expositions courtes et répétées au déoxynivalénol sur les performances et la composition microbienne fécale du porc en finition

Le Sciellour M.¹, Serviento A.¹, Zemb O.², Renaudeau D.^{1*}

¹ UMR 1348 PEGASE, Agrocampus-Ouest, INRA, Saint-Gilles, France, F-35590

² UMR 1388 GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France, F-31320

* auteur correspondant : david.renaudeau@inra.fr

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'expositions courtes et répétées à de l'aliment naturellement contaminé avec des mycotoxines et notamment de la déoxynivalénol (DON) via l'alimentation sur les performances de porcs en finition et la composition microbienne fécale. Au total, 160 porcs issus de 2 bandes successives ont été répartis aléatoirement entre 4 traitements expérimentaux. Le groupe témoin a reçu un aliment finition standard (non contaminé) entre 99 et 154 jours d'âge. Les groupes expérimentaux ont reçu pendant 7 jours un aliment formulé à partir de maïs naturellement contaminé par DON (3.02 mg DON/kg) à 113, 134 et à la fois 113 et 134 jours. Une exposition à DON a entraîné une réduction significative de l'ingéré (1,90 vs 2,64 kg/j suite à la première période d'exposition et 2,27 vs 3,27 kg/j suite à la deuxième période d'exposition, $P < 0,05$). Il en résulte une diminution du gain de poids mesuré sur l'ensemble de la période de test (0,94 kg/j vs 1,05 kg/j, $P < 0,05$). La composition du microbiote a été analysée par séquençage du gène de l'ARN 16S dans des fèces collectées à 99, 119, 140 et 154 jours d'âge. Une exposition à DON entraîne une modification temporaire de la composition microbienne et des fonctions bactériennes notamment celles associées à la dégradation de DON dans le tube digestif. Après une période de récupération de 2 semaines, aucune différence n'est observée entre les animaux exposés et les témoins suggérant une forte résilience du microbiote. En revanche, aucun lien n'a été observé entre les différences de performance des porcs suite à l'exposition à DON et la composition microbienne fécale.

6. Abstract, article du projet Sevrobust

Influence of farming environment on faecal microbiota of piglets and correlates with their robustness at weaning

Diana Luise¹, Arnaud Buchet^{2,3}, Mathilde Le Sciellour², Rémi Resmond², Charlène Clement², Marie-Noelle Rossignol⁴, Deborah Jardet⁴, Olivier Zemb⁵, Catherine Belloc⁶, Elodie Merlot^{2*}

¹ Agricultural, Environmental, Food Science and Technology, Department of Agricultural and Food Sciences (DISTAL), Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Italy.

² PEGASE, INRA, AGROCAMPUS OUEST, 35590, Saint Gilles, France.

³ Cooperl Arc Atlantique, Lamballe, France.

⁴ @BRIDGE, INRA, Jouy-en-Josas, France.

⁵ BioEpAR, INRA, Toulouse, France.

⁶ BioEpAR, INRA, ONIRIS, Nantes, France.

* Corresponding author: elodie.merlot@inra.fr

In pig husbandry, the severity of the health perturbations observed in piglets after weaning strongly depends on the farm environment. This study aimed at describing the variability of the response of microbiota to weaning in commercial farms, and determining if microbiota composition could be associated with the robustness of piglets after weaning. Faecal samples and growth data were collected just before and 7 days after weaning in 288 piglets from 16 commercial farms characterised by their pathogenic status and antimicrobial use. All farms weaned their piglets at 4 weeks of age. We could define 4 enterotypes for which the most discriminating genera were *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, and *Lachnospira*, and corresponding to a gradual maturational shift from pre to post-weaning microbiota. The four enterotypes were ubiquitous in the 16 farms. The effect of weaning on most abundant microbial families was roughly the same in all farms. Nevertheless, microbiome structure was influenced by the farm factors: after weaning, of the 1 177 OTUs contained in the dataset, 462 and 340 taxa respectively had a fold-change affected ($P < 0.05$) by the use of antimicrobials and by the global sanitary status of the herd, respectively. In each farm, animals were then classified as fast- or slow-growing animals relatively to the growth performance of their own farm. This classification was based on the relative average daily gain (rADG) calculated between 26 and 48 days of age. Whatever the farm, rADG+ piglets had less *Oscillospira* ($P <$

0.05) and *Campylobacter* ($P < 0.01$), and showed a greater increase in *Prevotella* ($P < 0.01$), *Coprococcus* ($P < 0.01$) and *Lachnospira* ($P < 0.05$) after weaning than rADG- piglets.

To conclude, the previously described effect of weaning on fecal microbiota was confirmed in a variety of commercial farms and piglets that reached just after weaning the enterotype 4 might be more robust. Besides antimicrobial use, the general health status of the farm had a major influence on the post-weaning evolution of piglet microbiota.

(L'article a été soumis dans bioRxiv et dans Microbial Biotechnology)

Titre : Microbiote intestinal chez le porc, facteurs de variation et relations avec les performances des animaux

Mots clés : microbiote, porc, efficacité alimentaire, fibres, stress thermique, mycotoxines

Résumé : L'amélioration de l'efficacité alimentaire (EA) est un enjeu important pour la filière porcine. L'EA est un phénotype complexe faisant intervenir un grand nombre de fonctions chez le porc. Au travers son rôle dans le métabolisme de son hôte et le maintien de sa santé, le microbiote intestinal est susceptible d'impacter les performances de l'hôte et en particulier son EA. Ce travail de thèse vise à étudier les modifications de composition du microbiote intestinal du porc soumis à différents facteurs environnementaux et à évaluer les relations entre cette composition microbienne et les performances de l'hôte. Pour cela, les données de trois études réalisées sur des porcs en croissance-finition (entre 60 et 1 200 porcs par étude) soumis à des perturbations de natures différentes (aliment riche en fibres, aliment contaminé par des mycotoxines (DON) ou exposition à un stress thermique chronique ou aigu) ont été utilisées. L'analyse du microbiote a été réalisée sur la base de prélèvements de fèces obtenus avant et après les perturbations. Parallèlement, des phénotypes en lien avec l'EA de l'hôte ont été mesurés afin d'évaluer et quantifier les relations entre les performances du porc et son microbiote intestinal.

L'analyse bio-informatique et statistique approfondie des données microbiennes a montré que les perturbations environnementales impactent la composition du microbiote fécal mais que cet effet n'est généralement que transitoire. Selon la nature du challenge (régime alimentaire standard vs. riche en fibre, exposition à un stress thermique chronique ou aigu, et aliment contaminé par DON), l'impact sur la composition du microbiote intestinal diffère. Les données d'abondances relatives des OTU permettent de discriminer les groupes de porcs suivant des facteurs de variation qualitatifs mais ne permettent pas d'établir des modèles de prédiction quantitatifs entre les performances et les profils bactériens. Des phénomènes de redondance fonctionnelle pourraient expliquer la faible capacité prédictive de ces modèles. Une approche écosystémique basée sur la notion d'entérotipe a été utilisée pour caractériser le microbiote. Ces travaux montrent que les entérotypes peuvent être instables au cours du temps chez le porc mais peuvent être associés à des phénotypes, notamment en lien avec la robustesse. Ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'utilisation fonctionnelle des données microbiennes pour l'étude des performances de l'hôte.

Title: Intestinal microbiota in pigs, variation factors and relationships with animals' performance

Keywords: microbiota, pig, feed efficiency, fiber, heat stress, mycotoxins

Abstract: Improving feed efficiency (FE) is a major preoccupation for pig production. The FE is a complex trait dealing with lots of functions in pig. The intestinal microbiota is known to play a key role in host metabolism and health with subsequent impact on its performance. The PhD program aimed at studying the modifications of the intestinal microbiota composition on pigs exposed to several environmental perturbations and to evaluate the relationships between digestive microbiota composition and the host performance. Data from three experimental studies conducted on growing-finishing pigs (60 to 1.200 depending on the study) which were exposed to different perturbations [high fiber diet, diet contaminated by mycotoxin (DON), or exposed to acute or chronic heat stress] have been used. The microbiota analysis was based on fecal samples collected before and after the perturbations. Phenotypes directly or indirectly related to FE were measured to evaluate and to quantify the relationships between the host performance and its microbiota.

A detailed bioinformatic and statistical analysis of the microbial data demonstrated that the environmental perturbations affect the fecal microbiota composition but these effects were generally transient. Depending on the nature of the challenge (standard or high fiber diet, exposition to a chronic or acute heat stress, or DON-contaminated diet), the impact on fecal microbiota composition seemed to differ. In this PhD program, the relative abundance of the OTU does not allow to implement quantitative prediction models of pig performance. Functional redundancy found in the microbiota related information could explain the low predictive capacity of these models. An ecosystemic approach based on the enterotypes was used to characterize the microbiota. This work shows that enterotypes are unstable across ages in pigs but that they can be related to phenotypes, in particular those in relation with robustness. These results offer some promising perspectives on the functional use of microbiota data to study the host performance.